

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS  
Curso de Graduação em Farmácia-Bioquímica

**Uso de Matrizes Alternativas no Controle do *Doping* no Esporte**

**Guilherme Forster**

Trabalho de Conclusão do Curso de  
Farmácia-Bioquímica da Faculdade de  
Ciências Farmacêuticas da  
Universidade de São Paulo.

Orientador:  
Prof. Dr. Maurício Yonamine

São Paulo

2018

## SUMÁRIO

	Pág.
Lista de Abreviaturas .....	1
RESUMO .....	2
1. INTRODUÇÃO	4
2. OBJETIVOS	9
3. MATERIAIS E MÉTODOS	9
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	12
5. CONCLUSÃO	28
6. BIBLIOGRAFIA	32
7. ANEXOS	35

## LISTA DE ABREVIATURAS

AAF	<i>Adverse Analytical Findings</i>
ABP	Passaporte Biológico do Atleta ( <i>Athlete Biological Passport</i> )
ACN	Acetonitrila
AE	Ar Exalado
CG	Cromatografia Gasosa
CG-EM	Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas
CL-EM	Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas
COI	Comitê Olímpico Internacional
DBS	<i>Dried Blood Spot</i>
DHCMT	Diidroclorometiltestosterona
DHT	Diidroepiandrosterona
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FN1	Fibronectina 1
LOD	Limite inferior de detecção
LOQ	Limite inferior de quantificação
OF	<i>Oral Fluid</i>
rhGH	Hormônio de Crescimento Recombinante
UV	Ultravioleta
WADA	<i>World Anti-Doping Agency</i>

## RESUMO

FORSTER, G. **Uso de Matrizes Alternativas no Controle do Doping no Esporte.** 2018. no. 773-18-1º. Trabalho de Conclusão de Curso de Farmácia-Bioquímica – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

Palavras-chave: *Doping, Esporte, Matriz Alternativa, Cromatografia*

**INTRODUÇÃO:** O uso de substâncias capazes de alterar a performance do homem data desde o início das atividades físicas organizadas. Porém, com o crescente avanço da tecnologia, substâncias cada vez mais nocivas à saúde e ao espírito esportivo têm sido utilizadas pelos atletas. Diante deste cenário, as análises de sangue ou urina têm se provado insuficientes para detectar e quantificar as diversas substâncias proscritas ao uso esportivo, sendo necessário buscar novas matrizes alternativas para suprir as desvantagens do uso das matrizes aprovadas pela *World Anti-Doping Agency* (WADA).

**OBJETIVO:** O objetivo deste trabalho foi coletar e analisar dados da literatura científica sobre o uso de matrizes alternativas no controle do *doping* no esporte, a fim de expor de forma crítica as vantagens e desvantagens de cada matriz e os desafios analíticos, forenses e sociais enfrentados atualmente para a viabilidade dessas análises no âmbito da competição esportiva.

**MATERIAIS E MÉTODOS:** Uma análise qualitativa foi realizada por meio da coleta de artigos científicos de estudos primários ou revisões da literatura, utilizando as bases de dados *PubMed Central:PMC* e *MEDLINE Complete (EBSCO)*, e analisados quanto ao seu teor, de modo a conter a palavra *doping* e o indicativo de análise utilizando matriz alternativa. Além disso, os critérios de inclusão foram artigos posteriores aos anos 2000 que tratassesem de ensaios analíticos para substâncias dopantes em matrizes alternativas ou tradicionais. Foram excluídos os artigos que tratavam de matrizes animais ou que não analisavam substâncias proibidas pela WADA.

**RESULTADOS:** Dentre as matrizes alternativas analisadas, a *Dried Blood Spots (DBS)* possui vantagens significativas em relação à urina e sangue como facilidade de coleta e transporte, boa estabilidade, boa capacidade de quantificação de analitos em baixas concentrações, coleta pouca invasiva, etapa de pré-tratamento simplificada e correlação direta com a concentração plasmática. Alguns desafios estão relacionados à baixa recuperação de analitos durante a extração e o pequeno volume de amostra. Por sua vez, as matrizes de queratina como cabelo e unha se mostram promissoras para identificação de histórico de uso de substâncias proibidas e possuem alta afinidade por esteroides anabolizantes básicos devido à melanina. Seus desafios analíticos estão relacionados com a variabilidade interindividual na distribuição dos xenobióticos pelo fio de cabelo e efeitos de cosméticos sobre a concentração dos analitos. Já o fluido oral pode ser utilizado para identificação de pequenas moléculas lipofílicas básicas, como o caso de drogas de abuso, podendo substituir a análise de urina nestes casos, e, assim, evitar os falsos-positivos decorrentes da larga janela de detecção da urina. Além disso, estudos sobre o ar exalado demonstram que este possui amplo espectro de detecção em relação às classes de substâncias proibidas, porém suas vantagens em relação à análise de sangue e urina ainda precisam ser elucidadas.

**CONCLUSÃO:** Com o avanço de técnicas cromatográficas mais sensíveis, capazes de detectar analitos na ordem de picogramas, o uso de matrizes alternativas tornou-se viável para ser desenvolvido e utilizado pelos órgãos fiscalizadores na análise de substâncias dopantes no esporte, no que concerne suas vantagens em relação às matrizes convencionais como sangue e urina, atualmente utilizados pela WADA.

## 1. INTRODUÇÃO

Na perspectiva histórica, o uso de substâncias capazes de alterar a *performance* remonta desde o período em que o homem passou a desenvolver atividades físicas organizadas, de modo que alguns autores já denominam esta prática de *universal cultural* (TAVARES, 2002). Em eventos esportivos, o uso de substâncias de melhoria de *performance* data de 800 a.C., pelos gregos, com o uso de estricnina e cogumelos alucinógenos (AQUINO NETO, 2001). Porém, foi apenas no “*Tour de France*” em 1886 que se teve notícia do primeiro caso fatal, com a morte do ciclista Linton sob o efeito de estresse e *speed ball* (cocaína e heroína). Já no contexto da 2ª Guerra Mundial, o uso de substâncias dopantes como testosterona era corrente e, em 1953, produziu-se o primeiro esteroide sintético com potência cinco vezes maior que a testosterona, marco da institucionalização do *doping* durante a guerra-fria nos países de regime autocrático (AQUINO NETO, 2001).

Em 1960, Kurt Jensen, ciclista dinamarquês, morre por overdose de anfetamina nas Olimpíadas de Roma e, em 1967, morre Tommy Simpson sendo televisionado no “*Tour de France*”, também por abuso de anfetaminas. No mesmo ano, após essas duas mortes, o Comitê Olímpico Internacional (COI - criado em 1894 pelo Barão de Coubertin por ocasião da primeira edição dos jogos olímpicos da Era Moderna) institui a Comissão Médica que bane o uso de *doping* (BROWN et al., 2011). Em 1968, é realizado o primeiro controle de dopagem nas Olimpíadas de Inverno de Grenoble e nas Olimpíadas do México. A partir destas Olimpíadas, o controle de substâncias proscritas ao uso esportivo tornou-se rigoroso com o desenvolvimento de técnicas analíticas cada vez mais sensíveis e precisas.

O primeiro teste abrangente utilizando cromatografia em fase gasosa (CG) como metodologia para triagem de estimulantes e opioides ocorreu nas Olimpíadas de Munique em 1972, e, em 1983, o uso de cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM) provocou êxodo de atletas do Pan-Americano de Caracas. Em 1999, é criada a *World Anti-Doping Agency*

(WADA) assim como a lista de substância proibidas pela Agência dentro da competição, em qualquer tempo (dentro e fora da competição), e para esportes específicos (desde 2004).

A introdução de uma nova substância na lista de substâncias dopantes da WADA parte de três princípios: defesa do espírito esportivo (ou defesa da ética médica e esportiva), proteção da saúde do atleta, e igualdade de chances para todos os esportistas (NETO et al., 2002). Dentre as principais classes de substâncias proibidas, destaca-se os agentes anabólicos, hormônios peptídicos, fatores de crescimento, agonistas beta-2, moduladores hormonais e metabólicos e diuréticos e agentes mascarantes como proibidos em qualquer tempo; estimulantes, narcóticos, canabinoides e glicocorticoides como proibidos dentro da competição; e betabloqueadores como proibidos em esportes específicos (arco-e-flecha, dardos, golfe, tiro, entre outros).

**Tabela 1 – Exemplos de substâncias dopantes proibidas pela WADA**

Classe das principais Substâncias Proibidas	Proibidos em qualquer tempo	Proibidos somente dentro da competição	Proibidos em esportes específicos
Agentes Anabólicos	1-testosterona 1-androsterona  Oxabolona  Estanozolol  Trembolona	-	-
Agonistas Beta-2	Formoterol  Indacaterol  Salbutamol	-	-
Estimulantes		Anfetamina  Cocaína  Fenproporex  Efedrina	

Narcóticos	Fentanil
-	Metadona
	Morfina
Betabloqueadores	Atenolol
-	Metoprolol
	Timolol

Fonte: WADA, 2018.

Atualmente, o relatório de resultados da WADA de 2017 revelou aumento de 7,1% no número de amostras de sangue e urina analisadas em laboratórios acreditados pela Agência (de 300.565 em 2016 para 322.050 em 2017), em comparação com redução do número de descobertas analíticas adversas (*adverse analytical findings*) de 1,60% em 2016 para 1,43% em 2017. No entanto, em estudo publicado por Alaranta *et al.* 446 atletas foram questionados anonimamente e descobriu-se que 30% deles disseram que conhecem pessoalmente pelo menos um atleta que já fez uso das substâncias proscritas ao uso esportivo pela WADA (ALARANTA et al., 2006). Estes resultados, em comparação com os resultados da WADA em 2017, indicam necessidade de buscar novas maneiras de expandir a capacidade de identificação do uso das substâncias proibidas no âmbito esportivo.

Dentre estas possibilidades, observa-se crescente aumento no uso de matrizes alternativas como fios de cabelo, amostras de sangue seco (*dried blood spots*), saliva e suor na determinação de substância dopantes. Estas matrizes podem ser coletadas e utilizadas em análises oficiais de acordo com o parágrafo 5.2.4.4 do código da WADA (última versão aprovada em 2015), desde que os resultados analíticos não se oponham a dados atípicos ou adversos das amostras de urina, ou seja, desde que o resultado final (positivo ou negativo) não se oponha ao resultado final do mesmo indivíduo em amostra de urina.

As amostras de sangue e urina são atualmente utilizadas para análise de substâncias proibidas no esporte, principalmente devido à vasta literatura científica

disponível, facilidade de correlação com a biodisponibilidade (sendo bons modelos quantitativos) e capacidade de detectar ampla gama de analitos (THIEME., 2012). No entanto, seu uso possui limitações. A coleta de sangue é considerada um método invasivo e, apesar de ser a matriz preferencial na identificação da concentração dos xenobióticos, devido à sua correlação direta com a biodisponibilidade das substâncias, o sangue possui alto custo de armazenagem e transporte no pré-analítico, devendo-se atentar à escolha do anticoagulante (influencia no tempo de conservação da amostra), material dos recipientes e o uso de conservantes ou diluentes, para que não contribuam para a variabilidade analítica (MOREAU et al., 2016).

A urina é amplamente utilizada no controle de *doping* no esporte, devido à facilidade de coleta, grande volume de amostra e boa correlação com a biodisponibilidade do xenobiótico. No entanto, a quantidade de substância biotransformada e a capacidade de filtração glomerular influenciam na capacidade de detecção das substâncias, principalmente as de alto peso molecular (THIEME et al., 2012). Além disso, a urianálise gera muitos resultados ambíguos, como falsos-positivos devido à ingestão desconhecida, principalmente em suplementos que adicionam substâncias dopantes para aumentar a performance do produto, e falsos-negativos devido à interrupção do uso das substâncias proibidas antes da competição (DESHMUKH et al., 2010)

Neste contexto, o uso de matrizes alternativas pode ser a solução para complementar a análise de *doping*, considerando que possuem propriedades bastante diversas das amostras de sangue e urina. Por exemplo, as amostras de sangue seco, ou DBS (do inglês *dried blood spots*, gotas de sangue seco em papel de filtro) apresentam grandes vantagens, como a custo-efetividade, correlação direta com a biodisponibilidade, robustez e facilidade de armazenamento e transporte (TRETZEL et al., 2015). Comparado à coleta usual de sangue, o volume de coleta de DBS é cerca de 20 uL de sangue capilar obtido da ponta do dedo ou da orelha, o que representa uma coleta menos invasiva, mas com as mesmas vantagens da análise do sangue intravenoso (TRETZEL et al., 2015).

Além da DBS, o cabelo é a matriz biológica alternativa com mais estudos realizados, principalmente devido ao concomitante desenvolvimento de técnicas analíticas forenses (no âmbito criminal) ou no âmbito da toxicologia social, uma vez que a maior diferença entre análise de *doping* e análises forenses/clínicas consiste na base legal (THIEME et al., 2000). Uma das grandes vantagens do uso do cabelo é a identificação da frequência de uso das substâncias proibidas, seja esporadicamente ou de forma crônica (NETO et al., 2002). O cabelo é uma matriz de fácil coleta, não invasivo (dependendo da quantidade) e de maior segurança do que a urina, uma vez que diante da alegação de mistura de amostras ou falha na cadeia de custódia, é possível obter uma amostra idêntica à original, diferentemente da urina que apresenta características únicas do momento da coleta (KINTZ et al., 2002). No entanto, algumas desvantagens devem ser consideradas, como falta de métodos analíticos, inviabilidade da extração de hormônios peptídicos, coloração e efeito de produtos químicos no cabelo e prova de que a incorporação das substâncias dopantes ao cabelo se distribui de forma uniforme ao longo do tempo em todas as pessoas (KINTZ et al., 2002).

Dentre as demais matrizes alternativas, o fluido oral (OF) é outra matriz biológica que tem ganhado destaque em análises de substâncias dopantes, principalmente estimulantes usados em competição, devido à baixa janela de detecção do OF, de horas até alguns dias. De modo geral, as substâncias são transportadas por difusão passiva ao OF, exceto algumas proteínas de maior peso molecular que podem ser transportadas de forma ativa por transportadores transmembrana (ANIZAN et al., 2014). Estas características fazem com que o fluido oral seja vantajoso na identificação de esteroides endógenos e hormônios peptídicos, pois a concentração se correlaciona melhor com a sanguínea do que a urina. No entanto, desvantagens como falta de dados de estabilidade, baixo volume, dificuldade de instrumentalização e sensibilidade de bases fracas à alteração de pH devido à atividade enzimática presente no fluido oral, fazem com que o uso desta matriz alternativa requeira melhores soluções analíticas (ANIZAN et al., 2014).

Deve-se considerar, além das matrizes alternativas citadas e muito pesquisadas pela comunidade científica, o ar exalado (AE) como uma recente descoberta de matriz para identificação de substâncias dopantes. Inicialmente, o AE foi considerado como matriz apenas para identificação de compostos voláteis, no entanto, um número considerável de solutos não voláteis foram identificados no AE, fazendo deste uma matriz biológica interessante como suporte nas análises de dopagem (THEVIS et al., 2017). Sua principal vantagem consiste na coleta não intrusiva e não invasiva, no entanto, poucos trabalhos científicos foram desenvolvidos neste campo, além da necessidade de equipamentos muito sensíveis para a identificação das substâncias dopantes, haja vista a baixa concentração dos alvos analíticos no ar exalado dos atletas (THEVIS et al., 2017).

Diante de propriedades distintas das matrizes biológicas e a necessidade de ampliação do controle de dopagem no esporte para assegurar os princípios éticos das competições esportivas, faz-se necessário uma análise detalhada da literatura científica a fim de identificar oportunidades de desenvolvimento e melhoria das técnicas analíticas utilizadas pela WADA para o controle de *doping* no esporte.

## **2. OBJETIVO(S)**

O objetivo deste trabalho é coletar e analisar dados da literatura científica sobre o uso de matrizes alternativas no controle do *doping* no esporte (dentro e fora da competição) a fim de expor de forma crítica as vantagens e desvantagens de cada matriz e os desafios analíticos, forenses e sociais enfrentados atualmente para a viabilidade dessas análises no âmbito da competição esportiva.

## **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

A coleta dos artigos de revistas científicas e publicações sobre o uso de matrizes alternativas no controle do *doping* no esporte foi feita utilizando as bases de dados *PubMed Central:PMC* e *MEDLINE Complete (EBSCO)*. Para a análise de trabalhos e teses de mestrado ou pós-graduação de universidades nacionais, utilizou-se o Google Acadêmico como ferramenta para acessar os trabalhados

depositados na SciELO ou sites das Universidades, em que foram considerados os estudos publicados após o ano 2000 como de relevância analítica. Estudos mais antigos foram considerados apenas para introdução da matriz ou históricas. O endereço eletrônico da WADA foi consultado para coleta de publicações oficiais da Agência, como a Lista de Substâncias Proibidas de 2018, a Lista de Laboratórios Credenciados, o Relatório Estatístico de 2017 e os documentos técnicos vigentes para harmonização dos requerimentos analíticos.

### **3.1. Estratégias de pesquisa**

A pesquisa nos bancos de dados internacionais se baseou no uso de palavras-chave entre os operados booleanos OR e AND. As palavras-chave utilizadas foram: “*Doping*”[All Fields] ou “*Doping in sports*” [All Fields] e as matrizes alternativas “DBS” [All Fields] ou “*Dried Blood Spot*” [All Fields], “*Hair*” [All Fields], “*Exhaled breath*” [All Fields], “*Oral Fluid*” [All Fields] ou “*Fingernails*” [All Fields]. Para a pesquisa nos bancos de dados nacionais, utilizou-se os termos “*Doping*” e “Matriz(es) Alternativa(s)”, “cabelo” ou “saliva”. Não foram feitas buscas específicas para uso de proteínas recombinantes.

**Tabela 2** – Resultados encontrados no *Pubmed* segundo estratégia de busca

Estratégia de busca ( <i>Pubmed</i> )	Resultado da busca em quantidade de artigos encontrados
(Doping AND Dried Blood Spot)	21
(Doping[Title] AND Hair[Title])	24
(Doping AND Oral Fluid)	23
(Doping AND Fingernail)	6
(Doping AND Exhaled Breath)	5

Fonte: site *Pubmed*. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em: 02/dez/2018.

### **3.2. Critérios de inclusão**

Os critérios para inclusão se basearam nos artigos que continham no seu título a palavra *doping* e o indicativo de análise utilizando matriz alternativa. Tanto revisões da literatura quanto estudos primários foram considerados. Foram considerados também artigos que não tratavam especificamente do âmbito esportivo, mas continham validação de métodos analíticos para a análise de estimulantes, narcóticos ou canabinoides (substâncias de interesse forense e da toxicologia social) em matrizes alternativas. Para a análise comparativa do uso das matrizes alternativas com a análise convencional em sangue ou urina, foram considerados também os artigos científicos mais recentes em relação à análise de *doping* por sangue ou urina, mesmo que não abordassem outras matrizes biológicas, dentro do contexto do *doping* esportivo. Para a análise dos métodos analíticos foram considerados apenas os artigos recentes (posteiros aos anos 2000) enquanto que, para considerações biológicas das matrizes ou históricas das entidades reguladoras, não foram estabelecidos critérios de data de publicação.

### **3.3. Critérios de exclusão**

Os artigos científicos que tratavam de análise de matrizes alternativas em animais, como crina de cavalo, pelos de roedores, etc.. não foram considerados neste trabalho, de modo a não aumentar a variabilidade de fatores para fins de comparações analíticas. Também não foram considerados artigos que tratavam da análise convencional de substâncias dopantes por sangue ou urina fora do contexto do *doping* esportivo. Além disso, não foram considerados os artigos que tratavam de análise em matrizes biológicas alternativas de substâncias fora da lista de substâncias proibidas da WADA em 2018.

### **3.4. Análise estatística**

Os estudos primários foram sumariados sem tratamento estatístico, de modo que apenas a análise qualitativa foi realizada.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. DBS (*Dried Blood Spots*)

O uso de DBS foi primeiramente introduzido por Ivar Bang em 1913 para monitorar níveis de glicose em ratos (SADONES et al., 2016), porém a DBS ficou conhecida somente após Robert Guthrie em 1963, que utilizou esta matriz biológica para investigação de fenilcetonúria em recém-nascidos (TRETZEL et al., 2015). Atualmente, a DBS é bastante utilizada nos primeiros dias de vida do recém-nascido para investigação de distúrbios metabólicas ou exposição a drogas de abuso (volume retirado é de aproximadamente 80uL) (SADONES et al., 2016).

A DBS define-se como pequenas coletas de sangue, em torno de 20 uL por picada no dedo ou orelha, secas em papel de filtro (TRETZEL et al., 2015). Suas principais vantagens são a custo-efetividade, desenvolvimento de métodos diretos e robustos, simplificação do processamento (já que não requer centrifugação para obtenção de plasma) e fácil armazenagem e transporte (algumas amostras não requerem refrigeração) (DENNIFF et al., 2010).

**Figura 1** – Fotografia de amostras de sangue seco (DBS)



Fonte: Marek Uliasz/fotobia.com

A DBS pode ser utilizada como matriz suplementar para aumentar a frequência de análises de *doping* dentro da competição ou fora da competição, podendo ser usada em competições menores/mais amadoras para fins

educacionais. Ao contrário da urina, não é necessário realizar o controle visual da coleta da amostra de forma a inibir o atleta, e, ao contrário das amostras de sangue intravenoso, é considerada uma matriz pouco invasiva, além de não precisar de flebotomista (TRETZEL et al., 2015).

Dentre os desafios do uso da DBS, deve-se considerar a possível interação dos componentes da amostra com proteínas do sangue ou efeitos da coagulação, uma vez seco. Além disso, diferenças interindividuais ou efeito do hematócrito alteram a viscosidade do sangue e, portanto, as dimensões do DBS. Denniff et al. investigou, em 2010, o efeito do hematócrito (dentro da faixa considerada normal para adultos e crianças de 28-67%) em relação ao volume das amostras de DBS em papel de celulose quando um disco de diâmetro fixo é retirado da amostra, obtendo uma diferença de até 35% de variação no volume da DBS. Observou-se que, quanto maior o hematócrito, mais escura é a gota de sangue seco e menor seu volume no papel de filtro, e, quanto menor o hematócrito, mais clara é a gota de sangue seco e maior seu volume no papel de filtro. Denniff et al. concluiu que o viés do ensaio aumentou com o aumento do hematócrito de até 60%, decrescendo em seguida para hematócritos de até 80%, porém dentro da variação aceitável de 15% de viés para a validação de métodos bioanalíticos. Possíveis abordagens para resolver esta variação seriam a inclusão de amostras de controle de qualidade com diferentes níveis de hematócrito e a normalização da concentração da amostra utilizando amostras de controle de qualidade com o mesmo hematócrito que a amostra a ser analisada, além da preparação de padrões de calibração com a variação de hematócrito igual à variação da amostra (DENNIFF et al., 2010).

#### **4.1.1. Tipos de papel e volume de amostra**

Os papéis de filtro predominantes para análise de DBS são fabricados 100% de fibra de algodão. O mais utilizado é o Whatman® 903, porém outros papéis como Ahlström 226, Sartorius TFN, Whatman® BFC 180 and Whatman® FTA® também são utilizados (O FTA® é tratado quimicamente para prevenir a degradação do DNA) (SADONES et al., 2016). No entanto, de acordo com Hudson

et al., o Bond Elut DMS, material sem celulose, é capaz de reduzir ligações não específicas, melhorar a resposta do analito na espectrometria de massas, e melhorar a relação sinal/ruído. Apesar dos possíveis benefícios, Sadones et al. reportou baixa rigidez do papel, dificultando a punção manual, em 2014. Já Eibak et al. obteve melhores taxas de recuperação de metadona usando espuma de alginato e quitosana comparado com o FTA® e o Bond Elut DMS, em 2012. Esta espuma pode ser solubilizada em 1mM de HCl, porém mais experimentos são necessários para investigar sua viabilidade analítica.

O volume de sangue na DBS pode variar de 5uL à 100uL (SADONES et al., 2016), porém volumes altos são difíceis de obter por picada no dedo ou orelha. Geralmente, o volume da DBS é em torno de 20uL, e, quando a gota de sangue é aplicada diretamente sobre o papel de filtro, um disco de 3mm a 6mm é obtido. Para contornar o efeito do hematócrito, relatado por Denniff et al. em 2010, é recomendável analisar a amostra de sangue seco completa, ao invés de definir um diâmetro fixo de extração.

#### **4.1.2. Preparação e extração da amostra**

O processo de pré-tratamento das amostras de DBS ainda é bastante manual, apesar de alguma automação por extração online (SAUSSEREAU et al., 2012) ou sistema robótico na extração em fase sólida (MURPHY et al., 2013) já ter sido relatada. A extração do sangue seco do papel de filtro (dessorção) é feita utilizando solventes orgânicos, água, ou mistura de ambos (SADONES et al., 2016). Misturas com conteúdo de água maior do que 25-30% levam à formação de extratos coloridos, indicando a liberação de hemoglobina e outras proteínas.

O processo de dessorção pode ser realizado de forma passiva, porém é facilitado pelo uso de sonicação, agitação ou aquecimento.

Outra forma de simplificação da etapa pré-analítica consiste na etapa de derivatização para injeção no CG-EM. Ingels et al. reportaram em 2014 a quantificação de GHB adicionando agentes de derivatização diretamente no papel de filtro, sem o uso de solventes de extração, seguido de secagem e redissolução

em solvente adequado, levando a um baixo consumo de reagentes e tempo de pré-tratamento. No entanto, deve-se observar a possível necessidade de outras etapas de pré-tratamento como precipitação de proteínas, extração em fase sólida ou extração líquido-líquido, que são bastante trabalhosas. Caso a injeção do extrato não seja uma possibilidade devido à sensibilidade ou compatibilidade do solvente de extração com o sistema de análise, é ainda possível utilizar a técnica de evaporação, porém ressalta-se que é uma técnica que demanda bastante tempo.

De modo geral, a DBS possui a desvantagem de prover apenas pequenas quantidades de analito, necessitando do uso de CG-EM ou CL-EM para atingir a sensibilidade necessária. Em punções de 3mm, aproximadamente 3uL de sangue são analisados e o resultado são picogramas de analito. Para resolver este problema, punções de volumes maiores ou múltiplas punções podem ser analisadas simultaneamente. Neste contexto, extrações online de DBS podem ser úteis para garantir a transferência completa do analito ao sistema cromatográfico.

#### **4.1.3. Ensaios de Validação utilizando DBS**

Em estudo publicado por Tretzel et al., um método bioanalítico para identificação e quantificação de três compostos de abuso frequente utilizando DBS foi desenvolvido. Estanozolol e diidroclorometiltestosterona (DHCMT) foram escolhidos para representar a classe dos agentes anabólicos e a pseudoefedrina para a classe dos estimulantes, sendo estes compostos de abuso frequente no meio esportivo (TRETZEL et al., 2015). No estudo, amostras de sangue foram colhidas de voluntários e fortificadas com solução de trabalho (padrão interno) de estanozolol, DHCMT e pseudoefedrina, e 20uL foram pipetados em papel de filtro. Ressalta-se que a validação foi realizada com sangue venoso, diferentemente da situação real em que o sangue capilar é coletado pelo dedo. Sadones et al. pontua em seu artigo de 2014 que a maioria dos estudos de validação sobre DBS são realizados com sangue venoso, e que seria necessário um estudo de equivalência entre a concentração capilar e venosa para a quantificação exata do analito.

A extração dos componentes da DBS foi realizada em solvente orgânico (mistura de metanol e tBME, e posteriormente acetona) com banho ultrassônico de 60 minutos. O sobrenadante foi seco por centrifugação à vácuo e ressuspendido em 50 uL de ACN-água (50:50). Cinco microlitros foram injetados no sistema CL-EM. A análise de urina foi conduzida em paralelo, como método de confirmação, de acordo com os guias da WADA pelo laboratório *antidoping* de Cologne. Pseudoefedrina e estanozolol foram diluídos e injetados em CL-EM, enquanto o DHCMT precisou de etapa de hidrólise enzimática e extração líquido-líquido antes da injeção em CG-EM.

De acordo com os guias de autoridades *antidoping*, a validação foi realizada utilizando os parâmetros de especificidade, precisão, exatidão, linearidade, limite inferior de detecção e quantificação, recuperação e estabilidade. Em contraste com a análise de urina, não existe definição de mínimos níveis requeridos de *performance* ou limites de decisão para sangue. A validação foi concluída satisfatoriamente e foi realizada prova de conceito para qualificar a DBS como matriz para teste de rotina no esporte. Dentre os resultados da validação, destaca-se a moderada recuperação após extração, de 22% para estanozolol, 26% para DHCMT e 23% para pseudoefedrina. No entanto, a eficiência moderada da recuperação é compensada pela alta pureza obtida dos extratos demonstrando nenhum efeito de supressão de íons devido à co-eluição com os componentes da matriz. Em outro estudo realizado por Tretzel el al., com testosterona, também é obtida uma recuperação baixa, de 11-24%, no qual foi explicada possivelmente à forte adsorção dos ésteres anabólicos esteroides na matriz de celulose (TRETZEL el al., 2014). Neste contexto, faz-se necessário o estudo de métodos analíticos utilizando outros papéis de filtro para testar o efeito de adsorção da matriz em papel de celulose ou sem celulose a fim de otimizar a recuperação dos analitos.

No estudo de Tretzel el al. foi avaliada a estabilidade dos analitos na DBS, e ao final da armazenagem em temperatura ambiente após 28 dias, nenhum produto de degradação foi observado. As concentrações determinadas após 28 dias foram de 94% para estanozolol, 92% para pseudoefedrina e 99% para DHCMT em relação à concentração inicial, variações que estão dentro da

imprecisão do método analítico validado (TRETZEL et al., 2014). Diante dos resultados da estabilidade, as amostras de DBS demonstram maior estabilidade em relação ao sangue, o que é de grande valia considerando a quantidade reduzida de laboratórios certificados pela WADA e a necessidade de períodos de transporte longos entre a coleta e a análise. A estabilidade aumentada na DBS pode estar relacionada com a eliminação da umidade via desidratação e inativação das enzimas de degradação (TRETZEL et al., 2014).

Em relação à prova de conceito, 5mg de estanozolol e DHCMT foram administrados via oral à voluntários e as concentrações plasmáticas foram medidas após 72 horas. O pico de concentração de estanozolol no 3º dia foi de 10 ng/mL, resultados compatíveis com os de urina, assim como o pico de concentração de DHCMT de 11 ng/mL. Observa-se que a DBS provê informações do estado agudo do paciente, diferentemente da urina que possui maior janela temporal de detecção e a possibilidade de identificação de metabólitos de longa meia-vida após a ingestão do xenobiótico, como análogos hidroxilados (metabólitos de fase 1) ou seus respectivos sulfatos e gluconorídeos (metabólitos de fase 2). Por exemplo, metabólitos de estanozolol podem ser detectados até 28 dias da ingestão da substância na urina, diferentemente das amostras de DBS, que caracterizam apenas o ativo inicial.

Neste contexto, Kojima et al. estudou em 2016 as diferenças de concentração entre DBS e urina para outros estimulantes (efedrina e metilefedrina). De acordo com o autor, a urina é a matriz adequada para identificar a utilização de substâncias proscritas ao uso esportivo em qualquer tempo (dentro e fora da competição), porém falha quando se trata de identificar substâncias proibidas apenas dentro da competição, como os estimulantes. De acordo com o estudo publicado em 2016, a administração de 25 mg de efedrina e metilefedrina não atingiu o limiar de 10 ug/mL na urina entre 4-10h, atingindo apenas após 12h-24h em alguns voluntários. Na DBS, diferentemente, as concentrações máximas de efedrina e pseudoefedrina foram atingidas após 2-8h de seu uso.

Além disso, as amostras de sangue demonstraram pouca variabilidade interindividual, sugerindo que as concentrações de efedrina e pseudoefedrina

podem ser afetadas pelo pH e volume urinário. Neste sentido, o uso de diuréticos e agentes mascarantes é de conhecimento dos atletas e proibidos pela WADA. Ressalta-se que estes agentes são proibidos unicamente devido ao uso da urina como matriz biológica para análise, e que poderiam ser retirados em caso de viabilidade de análise via outras matrizes alternativas. Adicionalmente, é de conhecimento dos atletas que a ingestão de substâncias alcalinas como bicarbonato de sódio reduz a excreção urinária de substâncias dopantes básicas, como a efedrina, nor-efedrina e metilefedrina, de modo que a análise de urina apresenta muitas desvantagens em relação à análise de substâncias proibidas dentro da competição. Na análise de urina, a urina alcalina (máximo observado pH de 8.6) teve 22-35% da dose de efedrina administrada via oral excretada na forma inalterada, enquanto a urina com pH de 6.0-7.4 teve 70-80% da dose excretada na forma de efedrina inalterada. Outro ponto que deve-se ressaltar é que muitos resultados analíticos adversos reportados em competição para efedrina e metilefedrina podem se referir ao seu uso fora da competição (devido à janela de detecção da urina), o que pode levar a sanções injustificadas devido ao uso dessas substâncias pelos atletas (KOJIMA et al., 2016).

Outro estudo realizado por Tretzel et al. em 2014 avaliou o potencial da DBS em identificar e simplificar a prova de administração exógena de testosterona. A testosterona é um agente anabólico esteroide proibido pelo COI desde 1976, porém é um dos agentes dopantes detectados com mais frequência (TRETZEL et al., 2014). De modo geral, a testosterona exógena é separada da endógena pela razão de isótopos de carbono por espectrometria de massas, após a elaboração do perfil esteroidal ( $\text{razão testosterona/espitestosterona} > 4$ ) na urina. Esta razão é capaz de identificar a testosterona exógena, pois esta é degradada no trato gastro-intestinal no caso de administração oral. Por isso, a administração oral é feita via ésteres de testosterona (pró-drogas) que podem ser identificados nas análises forenses. No entanto, métodos muito sensíveis são requeridos devido ao baixo volume de amostra na DBS e pela curta meia-vida dos ésteres de testosterona na circulação sistêmica. Apesar disto, a DBS provê uma prova direta e inequívoca do uso de ésteres de testosterona.

Para aumentar a sensibilidade do método, Tretzel et al. utilizou derivados de metiloxima na função 3-oxo dos ésteres e da nandrolona. Com a introdução de nitrogênio na fórmula molecular, a ionização, e, portanto, a sensibilidade foi aumentada. A análise dos derivados com metiloxima resultou num aumento de dez vezes da área dos picos cromatográficos comparado com os ésteres-3-oxo não derivatizados (TRETZEL et al., 2014).

Além das moléculas de baixo peso molecular, Ferro et al. relatou, em publicação de 2017, que a DBS contendo linfócitos do sangue periférico parece ser uma boa matriz para detectar o uso de rhGH (hormônio de crescimento recombinante) e IGF-1, por meio da detecção do biomarcador FN1 (fibronectina 1). Atualmente, os biomarcadores aprovados para identificação do uso de rhGH são IGF-1 e P-III-NP. Utilizando o método de imunoensaio ELISA, os pesquisadores descobriram que, apesar dos resultados iniciais promissores na urina, o uso de FN1 pareceu limitado, uma vez que a concentração de FN1 na urina ficou parecida entre aqueles que fizeram e aqueles que não fizeram o uso de rhGH. Observou-se que o provável efeito de proteinuria e função renal alterada pós-exercício podem ter influenciado na correlação. Entretanto, para a DBS a diferença entre os tratados e não tratados com rhGH ficou bastante evidente, demonstrando que a DBS possui vantagem em relação à urina para identificação de biomarcadores do uso de rhGH quando se trata do uso agudo.

#### **4.2. Matrizes de Queratina – Cabelo e Unha**

As matrizes de queratina, como cabelo e unha, são eficientes para detectar histórico de uso de substâncias proibidas no esporte, de semanas até meses, diferentemente das demais matrizes como urina e sangue (incluindo DBS) que resgatam apenas o histórico de alguns dias antes da coleta (baixa janela de detecção). Tanto a unha quanto o cabelo possuem crescimento contínuo, sendo que a média de crescimento do cabelo humano é de 1-1,5 cm por mês (DESHMUKH et al., 2010). Este crescimento relacionado ao tempo é utilizado na

análise de *doping* para verificar, por meio da localização do analito na matriz, a data estimada de sua administração (BROWN et al., 2011).

Brown et al. relata que a unha pode ser vantajosa em relação ao cabelo devido à possibilidade de os atletas rasparem o cabelo ou devido à sua queda natural após o uso constante de agentes anabólicos esteroides, o que não acontece na unha. No entanto, ambos podem ser coletados de forma não intrusiva e com bastante facilidade, sem necessidade de pessoal treinado (BROWN et al., 2011). Neste mesmo estudo, o autor relatou a análise por CL-EM e UV de três agentes anabólicos: testosterona, propionato de testosterona e estanozolol em administração única. Durante a validação, a sensibilidade do método não foi suficiente para quantificar os analitos (valores ficaram muito próximos do limite de detecção) indicando que na análise de unha como matriz biológica, a concentração das substâncias dopantes administradas de forma aguda é da ordem de picogramas e a validação do método se torna bastante complexa (o método atingiu o limite de detecção de 2 ng/mL conforme exigido pela WADA, porém foi insuficiente para a detecção na unha), de modo que esta não seria a matriz ideal para casos de uso agudo.

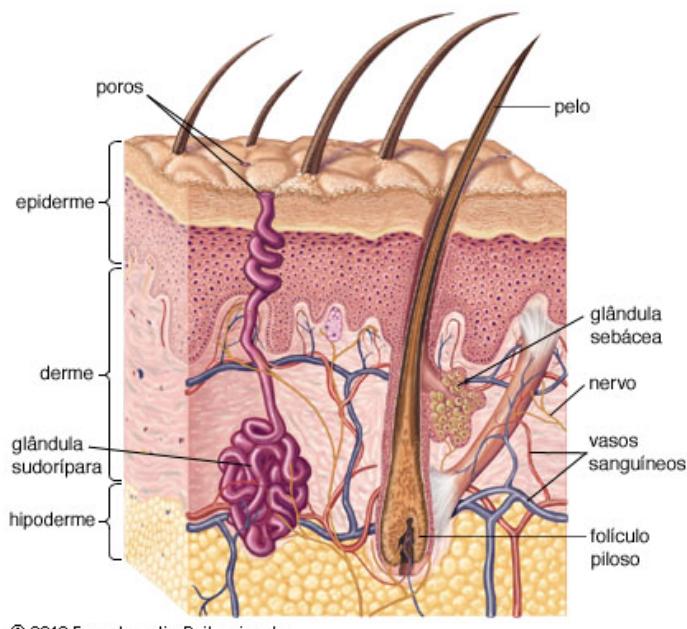
Choi et al. também realizou estudo, publicado em 2001, para identificação de testosterona e pregnenolona por CG-EM. Cerca de 100 mg de unha foram lavadas com metanol para evitar a contaminação de testosterona no suor e depois pré-tratadas por digestão alcalina e extração líquido-líquido. O pesquisador derivatizou as duas posições ionizáveis da testosterona e pregnenolona (grupos hidroxila e cetona) com MSTFA/NH4I/DTE para melhorar as propriedades cromatográficas no CG e eliminar picos de interferência. O método apresentou excelentes resultados na validação (LOD e LOQ menores que 0,1 e 0,2 pg/g respectivamente, recuperação de 86,7% e 89,9%, precisão e exatidão dentro dos limites aceitáveis e linearidade maior que 0,99). No estudo, observou-se que as concentrações de testosterona e pregnenolona variaram de 0,24 a 5,80 ng/g, concentração dez vezes menor do que a média para pregnenolona no cabelo, de 21,38 ng/g. Estes resultados demonstram que os métodos de identificação de agentes anabólicos na unha precisam ser mais sensíveis do que os métodos de

identificação no cabelo, devido à baixa deposição das substâncias na unha, e o possível acúmulo destas substâncias também no corpo da unha e não apenas na borda, de onde a matriz é coletada.

O cabelo possui mais estudos publicados do que unha como matriz alternativa na identificação de substâncias dopantes. A análise de cabelo é amplamente utilizada para detectar anfetaminas, opioides, cocaína e canabinoides, principalmente em relação ao histórico de uso (THIEME et al., 2000). No entanto, como estimulantes e canabinoides são proibidos apenas dentro da competição (uso agudo), esta matriz alternativa no *doping* é mais utilizada para análise de agentes anabólicos proibidos em qualquer tempo. Além disso, o teste em cabelo pode reduzir a frequência de testes de *doping* acompanhamentos, devido a capacidade de identificação de uso de substâncias dopantes de semanas há meses antes da coleta.

Os esteroides anabolizantes são depositados no cabelo de duas formas: pelo caminho endógeno, por difusão passiva da molécula da circulação para o cabelo em crescimento; ou pelo caminho exógeno-endógeno por absorção ou transferência das moléculas da substância para o cabelo por excreção transdérmica, suor ou sebo. (DESHMUKH et al., 2010).

**Figura 2 – Esquema da pele contendo pelo (cabelo)**



Fonte: Enciclopédia Britânia, Inc. 2010.

Além disso, o cabelo tem um pH isoelétrico de 6,0 e, por isso, favorece a incorporação de drogas básicas não dissociadas (por exemplo, estanozolol, que é preferencialmente distribuído no cabelo pigmentado devido à natureza básica do anel pirazol presente na sua estrutura química). As análises de cabelo também favorecem a detecção de drogas na forma inalterada, uma vez que costumam ser menos polares do que seus metabólitos e, por isso, favorecidos na matriz queratinosa, oposto da urina (por exemplo, estanozolol e 3OH-estanozolol).

Em estudo publicado por Deshmukh et al. em 2010 para detecção de nandrolona e estanozolol no cabelo por ELISA, aproximadamente 20 mg de cabelo humano foram coletados de cada voluntário (14-15 fios de cabelo) do vértice posterior da cabeça devido ao crescimento mais uniforme e menor impacto estético ao atleta. O método foi capaz de detectar 0,5 pg de estanozolol e 3,0 pg de nandrolona por mg de cabelo, confirmando 11 atletas positivos para estanozolol e 1 para nandrolona. O método demonstra a aplicabilidade da análise em cabelo para detectar ambos os esteroides em baixas concentrações e com quantidades reduzidas de fios de cabelo.

Thieme et al. avaliou em estudo publicado em 2000 que agentes anabólicos sintéticos possuem taxa de incorporação no cabelo maior para cabelos escuros do que loiros, indicando alta afinidade de ligação com a melanina. (THIEME et al., 2000). Neste contexto, Neto et al. concluiu em 2002 que fatores como a afinidade dos analitos pela melanina, assim como a lipofilicidade e permeabilidade dos mesmos na membrana capilar afetam a taxa de deposição destas substâncias na matriz. Substâncias neutras ou ácidas, como esteroides ou canabinoides, são pouco absorvidas na matriz capilar, enquanto as básicas (drogas de abuso como cocaína ou anfetaminas) são altamente incorporadas na matriz capilar. O autor concluiu que, devido à alta lipofilicidade e ausência de cargas formais dos esteroides anabólicos, a permeabilidade destes no cabelo é dependente do gradiente de pH entre o sangue (pH de 7,4) e o cabelo (pH de aproximadamente 5,0), de modo que se encontram em baixas concentração nesta

matriz quando usados de forma aguda (NETO et al., 2002). Em relação à alta lipofilicidade, thieme et al. também relatou dificuldade em extrair estanozolol de amostras de cabelo utilizando metanol, necessitando aplicar desintegração da matriz por hidróxido de sódio para isolar o estanozolol (THIEME et al., 2000). Desta mesma forma, há dificuldade de isolar os picos de estanozolol por CG devido à alta lipofilicidade, sendo necessário derivatizar com enol-TMS para obtenção de picos sem interferência.

Ainda em relação à interação das substâncias proibidas pela WADA com o cabelo, Neto et al. também avalia, em publicação de 2002, que, no caso dos beta-2-agonistas, o mecanismo de interação com a melanina do cabelo envolveria interações eletrostáticas, devido ao acúmulo dez vezes maior de clembuterol (amina primária) em relação ao salbutamol, indicando parâmetros de distribuição diferenciados. A basicidade do clembuterol também pode ter contribuído significativamente para a maior concentração no cabelo.

Deshmukh et al. realizou uma validação de metodologia para identificar testosterona e epitestosterona no cabelo, da mesma forma com tretzel et al. realizou o estudo para DBS em 2014 (DESHMUKH et al., 2010). Assim como informado por trezel et al., na urianálise, a amostra é considerada suspeita quanto a razão da concentração de testosterona dividido pela concentração de epitestosterona é maior que 4.0, porém diferenças na taxa de glicuronidação, devido às enzimas UGT2B17 e UGT2B7 em concentrações diferentes por pessoa, pode alterar a concentração encontrada na urina. Neste sentido, a análise de cabelo é vantajosa para análise retroativa de substâncias na sua forma desconjugada. Além disso, a diferença entre a testosterona e a epitestosterona é a posição do C-17. Os epímeros têm transações MRM similares e a co-eluição pode gerar níveis inflados de testosterona.

No estudo de Deshmukh, 75 amostras de cabelo de participantes cujo cabelo não tinha tratamento químico foram coletadas (50 fios de cabelo cada com 3cm mínimos de comprimento). A preparação das amostras foi realizada por lavagem com diclorometano e digestão básica com hidróxido de sódio. Em seguida, foi feita a neutralização, tamponamento e extração líquido-líquido com

pentano. O uso de hidróxido de sódio não afetou à análise devido à estabilidade dos analitos em condições alcalinas. Devido ao custo de tempo e financeiro da análise com derivatização, a análise por CG-EM foi realizada sem reação com agente derivatizante (DESHMUKH et al., 2010). Nos resultados, Deshmikn relatou baixa concentração de epitestosterona no cabelo (0-8,7 pg/mg) devido à sua baixa deposição e dificuldade de detecção. A relação de T/E ficou na faixa de 0,50-3,27 em homens e 0,56-1,81 em mulheres, porém nenhuma diferença significativa estatisticamente foi observada [ $t(39) = 0.117$ ,  $p = 0.908$ ].

Em relação aos estudos com cabelos tratados com cosméticos, a concentrações de xenobióticos decai dramaticamente por um fator de 40-80% após o tratamento cosmético (NETO et al., 2002). Já em relação à contaminação exógena, inúmeros casos de falsos-positivos foram relatados devido à exposição passiva das substâncias provenientes do meio ambiente e suor (NETO el al., 2002).

De modo geral, as matrizes de queratina possuem vantagem quando se trata de identificação de uso de substâncias proibidas ao longo do tempo, porém requerem métodos mais sensíveis e são facilmente contaminadas por agentes externos como cosméticos. Além disso, a afinidade de compostos pela melanina e a basicidade das substâncias têm efeito significativo na concentração final. Neste sentido, mais estudos são necessários para avaliar a equivalência das concentrações no cabelo com a sanguínea. Dentre as possíveis causa de variabilidade de resultados, ainda é incerto a taxa de variação interindividual em relação à distribuição das substâncias dopantes ao longo do fio de cabelo em diferentes pessoas, para a demarcação da temporalidade do consumo (fator relevante quando se trata de substâncias proibidas apenas dentro da competição). Apesar de algumas desvantagens, o cabelo e a unha podem ser matrizes úteis para identificação de compostos ainda não metabolizados, como no caso de ésteres de testosterona que são depositados no cabelo e podem indicar o uso de testosterona exógena. O uso destas matrizes ainda possui a vantagem da facilidade de coleta e transporte e capacidade de adquirir a mesma matriz alguns dias depois no caso de falsos-positivos. Com isto, poder-se-ia reduzir o número de

análises de acompanhamento e ampliar o controle de *doping* para competições mais amadores com finalidade educacional.

#### **4.3. Saliva (Fluido Oral)**

A saliva é melhor definida como fluido oral, de acordo com o *United States Food and Drug Administration* (US FDA), pois desta forma inclui não apenas a secreção das glândulas salivares, mas o transudado da mucosa e o fluido crevicular gengival (KINTZ et al., 2002). É importante ressaltar que a concentração de xenobióticos no fluido oral é relativa à biodisponibilidade da substância livre, sem considerar a ligação com proteínas plasmáticas e, por isso, sua concentração não é igual à concentração sanguínea.

O tempo de formação médio da saliva é de 0,7 mL/min e é significativamente dependente de estímulos, seja por doença ou medicamentos, podendo variar entre 0,05 mL/min a 3 mL/min (THIEME et al., 2012). A incorporação de xenobióticos na saliva se dá via difusão passiva, ultrafiltração ou transporte ativo, dependendo da lipofilicidade, basicidade ou peso molecular, sendo estes atributos favoráveis ao transporte de substâncias para a saliva, de modo que a transferência de moléculas inalteradas é favorecida em relação aos seus metabólitos primários ou secundários.

Além disso, o pH da saliva, geralmente em torno de 5-7 é um importante fator para a determinação da concentração de xenobióticos. Apenas substâncias não ionizadas atravessam a membrana entre o sangue e as glândulas salivares, estabelecendo equilíbrio entre os dois compartimentos. No entanto, quanto menor o pH da saliva, maior a ionização de substâncias mais básicas, alterando o equilíbrio para aumento da concentração destas substâncias na saliva (íons ficam presos na saliva). Por outro lado, quanto maior a estimulação de salivação, maior o pH (atingindo até 8), devido ao aumento de bicarbonato da matriz, e, portanto, reduzindo a capacidade de prender os íons básicos. Este fenômeno poderia interferir significativamente na análise de *doping*, uma vez que muitos agentes dopantes são bases fracas com pKa menor que 8,5. Desta forma, a estimulação da salivação por chicletes ou ácido cítrico poderia levar à diminuição da

concentração de substâncias básicas na saliva, levando à resultados falso-negativos (ANIZAN et al., 2014)

A transferência de xenobióticos para a saliva é favorecida em moléculas de peso molecular entre 300-1900 Da, assim como para moléculas mais básicas, devido a diferença do pH neutro do sangue e o pH levemente ácido da saliva por causa da ionização de compostos. Desta forma, a utilização do fluido oral ganhou particular relevância da identificação de drogas de abuso (geralmente são pequenas moléculas lipofílicas básicas) (THIEME et al., 2012). Assim, testes rápidos para confirmação de opioides, anfetaminas e cocaína já estão disponíveis no mercado por meio de alguns dispositivos médicos.

Além de drogas de abuso, o fluido oral também pode ser utilizado para identificação de estimulantes e narcóticos, porém há pouco benefício em relação à análise convencional em urina. Neste sentido, o fluido oral poderia ser vantajoso em relação à urina para quantificação de beta2-agonistas, como o formoterol e salbutamol, visto que são proibidos apenas em dosagens sobre terapêuticas (limites de 1000 ng/mL para salbutamol e 30ng/mL de formoterol na urina) e a concentração urinária é muito influenciada pela biotransformação destes compostos, sendo uma medida quantitativa menos direta do que a concentração no fluido oral (THIEME et al., 2012).

Em relação aos agentes anabólicos, a administração transdérmica de testosterona é mais facilmente detectada na saliva do que na urina (SCHÖNFELDER et al., 2016). No entanto, os métodos de identificação na urina requerem sensibilidade da ordem de ng/mL enquanto que na saliva é requerido pg/mL. Felizmente com o avanço da tecnologia esta sensibilidade já pode ser alcançada por técnicas como CG-EM (VAN GANSBEKE et al., 2015). Dessa forma, para comprovar a aplicabilidade da saliva como matriz alternativa eficiente na detecção de substâncias proibidas pela WADA, Polet et al. propôs estabelecer um limite de normalidade para a concentração de testosterona e diidroepiandrosterona (DHT) na saliva utilizando amostra de 826 voluntários. Desta forma, é possível estabelecer a concentração média destes agentes anabólicos a fim de identificar quando estes limites são excedidos como uma

possível utilização de testosterona exógena. Vale ressaltar que a atualização do passaporte biológico do atleta (ABP) para registro dos níveis de variação interindividual é essencial para identificar o uso de agentes anabólicos externos (POLET et al., 2018). De acordo com o estudo, o limite de concentração para considerar a amostra suspeita foi de 106 pg/mL para homens e 13 pg/mL para as mulheres, na saliva. A administração do gel de testosterona elevou sua concentração para 7300 pg/mL na saliva, seguido por alta variação do valor até o retorno da concentração ao nível basal. Este aumento expressivo da concentração de testosterona na saliva pode ser explicado pelo fato de que 98% da concentração de testosterona sérica está ligada à albumina ou carreadores específicos para hormônios e, na administração transdérmica, uma grande quantidade de testosterona livre é introduzida na circulação, levando ao acúmulo na saliva. Desta forma, a detecção de testosterona na saliva é mais sensível do que na urina para a administração de testosterona transdérmica.

De maneira geral, o fluido oral é vantajoso em relação à urina para identificação de substâncias proibidas dentro da competição, como estimulantes, narcóticos e canabinoides, devido à sua estreita janela de detecção e afinidade por pequenas moléculas lipofílicas e básicas. Além disso, também apresentou excelente capacidade de detecção de testosterona administrada por via transdérmica. Outras vantagens do fluido oral são sua fácil coleta e transporte, assim como não requer pessoal qualificado para a sua obtenção.

#### **4.3. Ar Exalado**

O ar exalado tem sido relatado cada vez mais em estudos de análise forense e clínica, em linha com a busca por matrizes alternativas menos invasivas (THEVIS et al., 2017). No início, o ar exalado era considerado apenas para a identificação de substâncias voláteis, porém um número considerável de substâncias não voláteis já foi identificado no ar exalado (principalmente no fluido alveolar e no surfactante) (POPOV et al., 2011). Apesar de que entre o surfactante do pulmão e o sangue capilar existirem diversas barreiras endoteliais, proteínas do

plasma já foram encontradas no surfactante numa relação inversamente proporcional entre a permeabilidade alveolar e a massa molecular, assim como cada vez mais fármacos são liberados na circulação sistêmica via pulmonar. Desta forma, Thevis et al. investigou se no ar exalado também poderiam ser identificadas substâncias dopantes, em 2017. Para isto, utilizou um dispositivo para ar exalado disponível comercialmente, que utiliza filtro eletrostático para reter as partículas carregadas do aerossol, seguido de injeção da matriz extraída em CL-EM.

O estudo focou em quatro classes de substâncias proibidas, agentes anabólicos, estimulantes, beta-bloqueadores e moduladores hormonais e metabólicos. Para todos os casos, foram obtidos sinais abundantes da ordem de picogramas, porém mais estudos são necessários para a correlação destas quantidades com o abuso de substâncias dopantes pelos atletas. Dentre todas as matrizes alternativas, o ar exalado apresenta menor quantidade de estudos e possivelmente as menores vantagens em relação ao sangue ou urina, de modo que sua viabilidade para a análise de *doping* é ainda desconhecida, apesar dos resultados promissores com o avanço das técnicas de identificação de analitos por cromatografia líquida ou gasosa acoplada à espectrometria de massas.

## 5. CONCLUSÃO

As matrizes alternativas possuem propriedades diversas entre si e atualmente muitos estudos propõe demonstrar sua viabilidade na análise de *doping* esportivo. Porém, no período da criação da WADA, as matrizes biológicas escolhidas para realizar as análises de *doping* eram urina e sangue venoso, devido, principalmente, à sua capacidade de detecção de amplo espectro de xenobióticos, janela de detecção de até algumas semanas, e tecnologia analítica disponível para quantificar analitos da ordem de microgramas até nanogramas. Com o surgimento de técnicas analíticas mais sensíveis, como CG-EM e CL-EM, tornou-se viável a detecção e quantificação de analitos na ordem de picogramas a nanogramas. Com isso, reacendeu-se a discussão sobre o uso de matrizes alternativas. Dentre as matrizes biológicas disponíveis, a DBS tem demonstrado

baixo custo, facilidade de coleta e transporte, boa estabilidade em temperatura ambiente e refrigerada, correlação direta com a concentração plasmática, baixa quantidade de etapas de pré-tratamento e extração, pouco invasiva na hora da coleta, e quantidade considerável de métodos analíticos validados. Diante dessas características, a DBS pode ser utilizada para expandir a análise de *doping* em competições amadoras para fins educacionais e também para expandir a análise de sangue no meio esportivo, uma vez que a análise de urina (bastante difundida no meio esportivo) possui diversas limitações diante dos novos agentes dopantes, muitas vezes proteínas e métodos genéticos, que não são facilmente detectados na urina na forma de metabólitos específicos, necessitando do uso de biomarcadores para correlacionar o aumento da sua concentração no plasma e indicar uso abusivo destas substâncias. Além disso, a DBS pode diminuir a quantidade de falso-positivos em análises de urina de substâncias proibidas apenas dentro da competição, haja vista que, geralmente, a janela de detecção da urina de dias até semanas é muito ampla para quantificar o uso imediato destas substâncias. Como desafio à DBS, as alterações de concentração devido ao hematócrito podem ser reduzidas com o acompanhamento do atleta via passaporte biológico (ABP), em que as concentrações séricas são marcadas periodicamente e o próprio atleta passa a funcionar como seu padrão interno para diminuir a variabilidade analítica.

Já as matrizes de queratina, como unha e cabelo, demonstram boa viabilidade para identificar as substâncias proibidas em qualquer tempo, já que diante do uso agudo a concentração dos analitos nestas matrizes não é suficiente para a quantificação adequada. Desta forma, seu uso mais expressivo é na identificação de agentes anabólicos básicos (como estanozolol) uma vez que possuem alta afinidade pela melanina e são depositados no cabelo. Além disso, devido ao depósito preferencial de xenobióticos na sua forma inalterada (mais lipofílicos) o cabelo pode se tornar uma prova direta do uso de testosterona pela identificação de ésteres de testosterona inalterados, marca do uso exógeno de testosterona, já que estes não são metabólitos da própria testosterona. Em relação à marcação da temporalidade do uso de agentes dopantes, mais estudos

são requeridos visando a análise das diferenças interindividuais na distribuição dos analitos ao longo dos fios de cabelo, assim como os impactos de agentes cosméticos na quantificação das substâncias dopantes. No entanto, o uso de cabelo e unha introduz na análise de *doping* a possibilidade de reduzir o número de análises de acompanhamento, uma vez que possuem alta janela de detecção.

**Tabela 3** – Principais vantagens e desvantagens no uso de matrizes alternativas

Matriz Alternativa	Vantagens	Desvantagens
DBS	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Baixo custo;</li> <li>- Facilidade de coleta e transporte;</li> <li>- Estabilidade em temperatura ambiente;</li> <li>- Correlação direta com a concentração plasmática;</li> <li>- Pouco invasiva</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Interferência do hematócrito;</li> <li>- Quantificação em picogramas;</li> <li>- Dificuldade de padronizar o volume de coleta;</li> </ul>
Matrizes de queratina (cabelo e unha)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Facilidade de coleta;</li> <li>- Larga janela de detecção (até semanas);</li> <li>- Marcação de temporalidade do uso;</li> <li>- Detecção de substâncias na forma inalterada;</li> <li>- Possibilidade de redução das análises de acompanhamento</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Possibilidade de remoção por estética;</li> <li>- Efeito mascarante de agentes cosméticos;</li> <li>- Variabilidade interindividual na distribuição das substâncias ao longo da matriz;</li> <li>- Dificuldade de quantificação para uso agudo;</li> </ul>
Fluido Oral	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Detecção de uso agudo de substâncias dopantes;</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Falso-Negativo para íons básicos devido</li> </ul>

	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Facilidade de coleta;</li> <li>- Coleta não invasiva;</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>manipulação do pH da saliva com suco cítrico, por exemplo;</li> </ul>
Ar exalado	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Amplo espectro de detecção;</li> <li>- Facilidade de obtenção;</li> <li>- Detecção de uso agudo de substâncias dopantes;</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Poucos estudos sobre a relação da concentração no ar exalado com a concentração plasmática;</li> <li>- Quantificação em picogramas;</li> </ul>

O Fluido Oral, por sua vez, pode preencher lacunas analíticas das outras matrizes biológicas, sendo demonstrado em estudos científicos a excelente viabilidade desta matriz para detectar e quantificar moléculas de pequena massa molecular, lipofílicos e básicos, como é o caso de algumas drogas de abuso (anfetaminas, cocaína e narcóticos), cujo uso é proibido apenas dentro da competição. O fluido oral, neste sentido, pois possui baixa janela de detecção e, portanto, é capaz de identificar o uso agudo destas substâncias. Além disso, o fluido oral é capaz de preencher a lacuna de identificação de testosterona quando administrada por via transdérmica, visto que nestes casos a concentração no fluido oral aumenta muito em relação ao basal e, portanto, pode ser uma prova direta do uso de testosterona exógena.

O ar exalado, apesar de pouco estudado, também pode ser útil para a análise de diversas substâncias proibidas, demonstrando amplo espectro de detecção destas substâncias. Porém, suas vantagens em relação ao sangue e a urina ainda permanecem pouco elucidadas.

De modo geral, diversos estudos têm sido publicados a respeito do uso de matrizes alternativas na análise de *doping*, e, diante da evolução dos equipamentos e técnicas analíticas, métodos mais sensíveis estão se tornando acessíveis aos laboratórios, abrindo um leque de possibilidades ao uso de matrizes alternativas para suprir as desvantagens atualmente enfrentadas na utilização de urina e sangue e democratizar a análise de *doping* para todas as

esferas do esporte, de modo que as competições se tornem cada vez mais justas para todos os atletas.

## 6. BIBLIOGRAFIA

ALARANTA A, ALARANTA H, HOLMILA J, PALMU P, PIETILA K, HELENIUS I. Self-reported attitudes towards doping: differences between type of sport. **Int J Sports Med** vol.27, p. 842–846, 2006.

ANIZAN, S. et al. The Potential Role of Oral Fluid in Antidoping Testing. **Clinical Chemistry**, vol. 60, n. 2, p. 307 – 322, 2014.

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

BROWN H.G., PERRETT D. Detection of Doping in Sport: Detecting Anabolic-androgenic Steroids in Human Fingernail Clippings. **Medico-Legal Journal**. Vol. 79, n.2, p.67–69, 2011.

CHOI M.H., YOO Y. S., CHUNG B.C. Measurement of testosterone and pregnenolone in nails using gas chromatography–mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, Vol. 754, p.495–501, 2001.

DENNIFF P, SPOONER N. The effect of hematocrit on assay bias when using DBS samples for the quantitative bioanalysis of drugs. **Bioanalysis**. Vol. 2, n.8, p. 1385–1395, 2010.

DESHMUKH N., HUSSAIN I., BARKER J., PETROCZI A., NAUGHTON D. Analysis of anabolic steroids in human hair using LC–MS/MS. **Steroids**. Vol. 75, p.710–714, 2010.

EIBAK L, HEGGE A, RASMUSSEN K, PEDERSEN-BJERGAARD S, GJELSTAD A. Alginate and chitosan foam combined with electromembrane extraction for dried blood spot analysis. **Anal. Chem.** Vol. 84, n.20, p. 8783–8789, 2012.

FERRO P. et al. Evaluation of fibronectin 1 in one dried blood spot and in urine after rhGH treatment. **Drug Test. Analysis**, Vol. 9, p. 1011–1016, 2017.

HUDSON W, YONG B, BOGUSZEWSKI P. Analysis of clozapine, nortriptyline, paroxetine and zolpidem using dried blood spots. **Agilent Technologies**. Disponível em: <http://www.chem.agilent.com/Library/applications/5990-8033EN.pdf>. Acesso em: 07/setembro/2018.

INGELS A.S., WILLIE S.M., SAMYN N., LAMBERT W.E., STOVE C.P. Screening and confirmation methods for GHB determination in biological fluids. **Anal Bioanal Chem**, Vol. 406, n.15, p. 3553 – 3577, 2014.

KINTZ, P. et al. Use of Alternative Specimens: Drugs of Abuse in Saliva and Doping Agents in Hair. **Therapeutic Drug Monitoring**, vol. 24, p. 239 – 246, 2002.

KOJIMA A., NISHITANI Y., SATO M., KAGEYAMA S., DOHI M., OKANO M., Comparison of urine analysis and dried blood spot analysis for the detection of ephedrine and methylephedrine in doping control. **Drug Testing and Analysis**. Vol. 8, p.189-198, 2016.

MOREAU, R.L., SIQUEIRA M.E. Toxicologia Analítica: 2<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2016.

MURPHY S, WICKHAM K, LINDGREN B, SPECTOR L, JOSEPH A. Cotinine and trans 3'-hydroxycotinine in dried blood spots as biomarkers of tobacco exposure and nicotine metabolism. **J. Expo. Sci. Environ. Epidemiol.** Vol. 23, n.5, p. 513–518, 2013.

NETO, F. R. A. et al. Controle de dopagem no esporte: aspectos químicos e farmacológicos que afetam a detecção de drogas no cabelo. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, vol. 38, n. 3, p. 259 – 271, 2002.

POLET M., WILDE L., RENTERGHEM P., GANSBEKE W., EENOO P. Potential of saliva steroid profiling for the detection of endogenous steroid abuse: Reference thresholds for oral fluid steroid concentrations and ratios. **Analytica Chimica Acta**. Vol. 999, p.1-12, 2018.

POPOV TA. Human exhaled breath analysis. **Ann Allergy Asthma Immunol**. Vol. 106, p.451-456, 2011.

SADONES N., CAPIAU S., KESEL P.M.M., LAMBERT W.E., STOVE C.P. Spot them in the spot: analysis of abused substances using dried blood spots. **Bioanalysis**. Vol. 6, n.17, p.2211–2227, 2014.

SAUSSEREAU E, LACROIX C, GAULIER J, GOULLE J. On-line liquid chromatography /tandem mass spectrometry simultaneous determination of opiates, cocaine and amphetamines in dried blood spots. **J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.** p. 885–886, 2012.

SCHÖNFELDER M., HOFMANN H., SCHULZ, ENGL. T., KEMPER D., MAYR B. ET AL., Potential detection of low-dose transdermal testosterone administration in blood, urine, and saliva, **Drug Test. Anal**. Vol. 8 p.1186-1196, 2016.

STOVE C, INGELS A, DE KESEL P, LAMBERT W. Dried blood spots in toxicology: from the cradle to the grave? **Crit. Rev. Toxicol**. Vol. 42, n.3, p.230–243, 2012.

TAVARES, O. Doping: argumentos em discussão. **Movimento**, v.8, nº1, p 41- 55, 2002.

THEVIS, M. et al. Expanding analytical options in sports drug testing: Mass spectrometric detection of prohibited substances in exhaled breath. **Rapid Commun Mass Spectrom**, vol. 31, p. 1290 – 1296, 2017.

THIEME, D. Potential and limitations of alternative specimens in doping control. **Bioanalysis**, vol. 13, n. 4, p. 1613 – 1622, 2012.

THIEME, D., GROSSE J., SACHS H., MUELLER, R.K. Analytical strategy for detecting doping agents in hair. **Forensic Science International**. Vol.107, p.335–345, 2000.

TRETZEL, L. et al. Use of dried blood spots in doping control analysis of anabolic steroid esters. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. Vol. 96 p.21–30, 2014.

TRETZEL, L. et al. Dried blood spots (DBS) in doping controls: a complementary matrix for improved in- and out-of-competition sports drug testing strategies. **Anal. Methods**, vol. 7, p. 7596 – 7605, 2015.

W. VAN GANSBEKE, M. POLET, F. HOOGHE, C. DEVOS, P. VAN EENOO, Improved sensitivity by use of gas chromatography-positive chemical ionization triple quadrupole mass spectrometry for the analysis of drug related substances, **J. Chromatogr. B. Anal. Technol. Biomed. Life Sci.** Vol.1001 p.221-240, 2015.

## 7. ANEXOS

Não se aplica.

03/DEZ/18 Guilherme Fonseca

Data e assinatura do aluno(a)

04/12/18 Janne Ferreira

Data e assinatura do orientador(a)