

CENTRO FEDERAL DE EDUCAÇÃO TECNOLÓGICA DE MINAS GERAIS (CEFET-MG)
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MULTICÊNTRICO EM QUÍMICA DE MINAS GERAIS

Jhonatan Bispo de Oliveira

DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA ANÁLISE IT -SPME
***(in tube)* DE ESTEROIDES PARA APLICAÇÃO EM ANTIDOPING**

Belo Horizonte (MG)

2021

Jhonatan Bispo de Oliveira

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA ANÁLISE IT -SPME
(*in tube*) DE ESTEROIDES PARA APLICAÇÃO EM ANTIDOPING**

**Trabalho de conclusão de curso
apresentado como requisito para a
obtenção do título de Mestre em
Química.**

**Orientador: Prof. Dr. Patterson Patrício
de Souza.**

CEFET-MG

Belo Horizonte (MG)

2021

Jhonatan Bispo de Oliveira

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA ANÁLISE IT -SPME
(*in tube*) DE ESTEROIDES PARA APLICAÇÃO EM ANTIDOPING**

**Dissertação de curso Mestrado em Química do
Programa de Pós-graduação Multicêntrico em
Química de Minas Gerais
CEFET-MG**

Belo Horizonte, 08 dezembro de 2021

**Prof. Dr. Patterson Patricio de Souza
(orientador – CEFET-MG)**

**Prof. Dr. Ildefonso Binatti
(avaliador – CEFET-MG)**

**Prof^a. Dr^a. Ana Maria de Resende Machado
(avaliador – CEFET-MG)**

**Prof^a. Dra. Zenilda de Lourdes Cardeal
(avaliador – UFMG)**

“Por isso nunca ficamos desanimados, mesmo que o nosso corpo vá se gastando, o nosso espírito vai se renovando dia a dia. E essa pequena e passageira aflição que sofreremos vai trazer uma glória enorme e eterna, muito maior do que o sofrimento. Porque nós não prestamos atenção nas coisas que se vêem, mas nas que não se vêem. Pois o que pode ser visto dura apenas um pouco, mas o que não pode ser visto dura para sempre”

2 Coríntios 4:16-18

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus que permitiu que tudo isso acontecesse. Ao longo de minha vida, e não somente nestes anos como universitário/acadêmico, mas em todos os momentos é o maior Mestre que alguém pode ter. Agradeço a Deus pela oportunidade e ter me mostrado o caminho para entrar no mestrado, e descobrir uma paixão por pesquisar e ensinar.

Agradeço ao Cefet-MG, onde tenho muito a agradecer pelos seis anos que estive nessa instituição, agradecer pela estrutura, corpo docente e pelas experiências que foram proporcionadas nesse período. Agradeço a todos os professores por me proporcionar o conhecimento e vivência. Agradecimento mais do que especial ao meu orientador Patterson que abriu as portas para mim nos projetos e sempre me apoiou, incentivou e se empenhou para que eu pudesse realizar todos os trabalhos, um verdadeiro companheiro, mestre e com toda certeza um amigo para toda vida.

Aos meus pais, Donizete e Vilcivane, a quem dedico esse trabalho, que apesar de todas as dificuldades sempre me fortaleceram e me apoiaram em todos os momentos e que, para mim, foram muito importantes e essenciais para que eu conquistasse esse sonho. Obrigada a minha irmã que me apoiou e sempre me teve como inspiração! Aos meus avós, tios e tias, primos e familiares que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação e com contribuições valiosas, o meu muito obrigado!

Obrigado aos meus amigos por toda força e companheirismo! Dedico um agradecimento especial ao meu amigo Venilton, que me auxiliou em toda parte estrutural do meu trabalho, sempre sendo carinhoso e disposto ajudar, de todo coração meu eterno obrigado!

RESUMO

DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA ANÁLISE IT -SPME (*in tube*) DE ESTEROIDES PARA APLICAÇÃO EM ANTIDOPING

Na análise *antidoping*, o desenvolvimento de metodologias alternativas ao GC-MS se torna uma constante necessidade, seja para diminuir o limite de detecção, ou tornar as análises mais baratas. Este trabalho traz a proposta de método empregando uma nova técnica de extração e pré-concentração, microextração em fase sólida em tubo (IT-SPME) sendo uma técnica eficiente, robusta e limpa. Também, o emprego do novo detector em cromatografia o detector ionização de descarga de barreira dielétrica (BID) como detector universal, tendo como vantagem a sensibilidade em baixas concentrações e estabilidade de tempo prolongado. O presente trabalho teve como objetivo a validação de uma metodologia para a detecção de esteroides anabolizantes, em especial ésteres de testosteronas livres (que não são metabolizados) em urina. No estudo foram usados padrões de testosteronas, isocrapoato, fempropionato e decanoato em soluções de urina de recém-nascido. O método analítico validado baseou na extração de esteroides por meio do IT-SPME por imersão e apresentou limites de detecção que variaram 0,5 - 2,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ e limites de quantificação que variaram de 1,0 - 5,0 $\mu\text{g L}^{-1}$, ou seja, adequados para a aplicação em programas de controle de dopagem no esporte. As curvas analíticas apresentaram valores de coeficiente de determinação superiores a 0,9900. Com reprodutibilidade e repetitividade com coeficientes de variação inferiores a 20 %. Também obteve níveis de recuperação próximas ao 100 % e alta estabilidade de estocagem com perdas inferiores a 40 %. A nova metodologia é uma alternativa viável, barata, rápida e segura para extração e pré-concentração para ésteres de testosteronas para análise por cromatografia gasosa com detecção BID e FID, além de ser uma aplicação inovadora, que redefine a função do *liner* (câmara de injeção) no equipamento.

Palavras-chave: *antidoping*, BID, FID, esteroides, testosteronas, IT-SPME, validação

ABSTRACT

DEVELOPMENT OF AN ANALYTICAL METHOD FOR IT-SPME (in tube) ANALYSIS OF STEROIDS FOR ANTI-DOPING APPLICATION

In anti-doping analysis, the development of alternative methodologies to GC-MS becomes a constant necessity, either to reduce the detection limit or to make the analysis cheaper. This work brings the proposal of a method employing a new technique of extraction and pre-concentration, solid phase microextraction in tube (IT-SPME) being an efficient, robust and clean technique. Also, the use of the new detector in chromatography, the dielectric barrier discharge ionization detector (BID) as a universal detector, with the advantage of sensitivity at low concentrations and long-term stability, in addition to comparing with the FID. The present work aimed to validate a methodology for the detection of anabolic steroids, especially free testosterone esters (which are not metabolized) in urine. In the study, standards of testosterone, isocaproate, phenylpropionate and decanoate in newborn urine solutions were used. The validated analytical method was based on steroid extraction using IT-SPME by immersion and presented detection limits ranging from 0.5-2.0 $\mu\text{g L}^{-1}$ and quantification limits ranging from 1.0-5.0 $\mu\text{g L}^{-1}$, that is, suitable for application in doping control programs in sports. The analytical curves presented coefficient of determination values above 0.9900. With reproducibility and repeatability with coefficients of variation below 20%. It also achieved recovery levels close to 100% and high storage stability with losses below 40%. The new methodology is a viable, cheap, fast and safe alternative for extraction and pre-concentration of testosterone esters for analysis by gas chromatography with BID and FID detection, in addition to being an innovative application that redefines the function of the liner in the equipment.

Keywords: anti-doping, BID, FID, steroids, testosterone, IT-SPME, validation

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Estrutura básica dos esteroides anabolizantes.	5
Figura 2 - Modificações estruturais que podem ser feitas para mudanças farmacológicas - Adaptado. [20].....	7
Figura 3 – Estruturas dos componentes da Durasteston®, (a) propionato de testosterona, (b) isocaproato de testosterona, (c) fempropionato de testosterona, (d) decanoato de testosterona.	8
Figura 4 - Esquema de divisão e funcionamento do BID - Adaptado. [29]	10
Figura 5 - Comparação de cromatogramas para quatro grupos com o BID e o FID a 100 mg L ⁻¹ : alcanos e aromáticos - Adaptado.[32]	11
Figura 6 - Cromatogramas do padrão medido com concentração de 100 ppm de cada componente. O BID mostra respostas para todos os analitos de interesse enquanto o detector TCD mostrou apenas para o gás inorgânico da matriz e o ar contaminantes (nitrogênio) - Adaptado.[33].....	11
Figura 7 - (A) Um cromatograma de uma análise típica de água no mel de trigo sarraceno usando o GC-TCD. (B) Um cromatograma de uma análise típica de água no mel de trigo sarraceno usando o GC-BID - Adaptado.[34]	12
Figura 8 - Esquema do dispositivo comercial genérico para SPME - Adaptado.[57]....	16
Figura 9 - Esquema do sistema IT-SPME-LC – Adaptado.[61]	19
Figura 10 - Esquema da armadilha tubular Tenax GC – Adaptado.[67].....	20
Figura 11 - Aparato para extração ACIT-SPME-GC. (a) fotografia. (b) diagrama da seção. (c) processo de fabricação – Adaptado.[53]	21
Figura 12 - Fotografia do dispositivo ACIT-SPME-GC com lâminas de vidros revestidas – Adaptado.[71].....	21
Figura 13 - Fotografia do dispositivo IT-FLEX, revestimento interno com PDMS. (a) Visão superior. (b) visão lateral. (c) diagrama da seção.....	22
Figura 14 - Fotografia do protótipo de secagem do <i>liner</i>	27
Figura 15 – Etapas de amostragem e injeção no cromatógrafo gasoso; a) câmara de injeção (<i>liner</i>); b) amostrador para extração IT-SPME por imersão; c) injetor do cromatógrafo gasoso; d) inserção do dispositivo IT-Flex no injetor.....	29

Figura 16 - Espectro de absorção no infravermelho do filme de PDMS.....	34
Figura 17 - Análise termogravimétrica do filme polimérico de PDMS.	35
Figura 18 - Cromatograma das testosteronas obtido com o método desenvolvido por meio da análise GC-BID.	36
Figura 19 - Imagem da espessura do filme de PDMS no <i>liner</i>	38
Figura 20 - Comparativo dos <i>liners</i> em relação às testosteronas.	39
Figura 21 - Gráfico exemplificando o teste da cinética de extração dos liners para testosteronas.	41
Figura 22 - Cromatogramas obtidos em análise com detector BID e FID.	42
Figura 23 - Comparativo dos detectores em relação às testosteronas.	43
Figura 24 - Comparativo a fim de avaliar seletividade do método.	44
Figura 25 - Concentração dos ésteres de testosteronas subsequente a injeção intramuscular – Adaptado. [96]	46
Figura 26 - Resultado gráfico do ensaio de estabilidade das testosteronas no BID.	50
Figura 27 - Resultado gráfico do ensaio de estabilidade das testosteronas no FID.....	51
Figura 28 - Espectro de massas obtido referente ao isocaproato de testosterona.....	63
Figura 29 - Espectro de massas obtido referente ao fempropionato de testosterona.	63
Figura 30 - Espectro de massas obtido referente ao decanoato de testosterona.....	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Comparação dos detectores para cromatografia gasosa disponíveis no mercado.[35].....	12
Tabela 2 - Técnicas usadas no preparo de amostras de matrizes aquosas para análises em cromatografia. gasosa.	15
Tabela 3 - Testosteronas em estudo e com suas respectivas estruturas, tempos de retenção, íons monitorados, Kovats teóricos e calculados e erro do Kovats.	37
Tabela 4 - Gasto para produção do dispositivo IT-Flex.	38
Tabela 5 - Resultados dos testes estatísticos para média e variância (n = 3).	40
Tabela 6 - Resultados dos testes estatísticos para média e variância (n = 3).	43
Tabela 7 - Limites de detecção e quantificação das testosteronas avaliadas.....	45
Tabela 8 - Detalhes de trabalhos com análises de testosteronas.....	46
Tabela 9 - Parâmetros de linearidade para as testosteronas, com homoscedasticidade validada.....	47
Tabela 10 - Resultados dos ensaios de inexatidão intra e inter-ensaio para cada testosterona.	48
Tabela 11 - Resultados dos ensaios de precisão intra e inter-ensaio para cada testosterona.	49
Tabela 12 - Resultados dos ensaios de recuperação para cada testosterona.....	49

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

WADA	<i>World Antidoping Agency</i> (Agência Mundial Antidoping)
COI	Comitê Olímpico Internacional
CV	Coeficiente de Variação
GC	<i>Gas Chromatography</i> (Cromatografia gasosa)
LC	<i>Liquid Chromatography</i> (Cromatografia líquida)
MS	<i>Mass Spectrometry</i> (Espectrometria de massas)
SIM	<i>Single Ion Monitoring</i> (Monitoramento de único íon)
ABCD	Autoridade Brasileira de Controle Antidopagem
CBJD	Código Brasileiro de Justiça Desportiva
EAAs	Esteroides Anabolizantes Andrógenos
A	Androsterona
Etio	Etiocolanolona
T	Testosterona
E	Epitestosterona
BID	<i>Barrier Ionization Discharge</i> (Ionização de Descarga de Barreira Dielétrica)
FE	Fase estacionária
FM	Fase móvel
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência)
FID	<i>Flame Ionization Detector</i> (Detector por Ionização de Chama)
TCD	<i>Thermal Conductivity Detector</i> (Detector por Condutividade Térmica)
ECD	<i>Electron Capture Detector</i> (Detectores por Captura de Elétrons)
LQ	Limite de Quantificação
LD	Limite de Detecção
HS	<i>Headspace</i>

SPME	<i>Solid Phase Micro Extration</i> (Microextração em Fase Sólida)
IT-SPME	<i>In-Tube Solid Phase Micro Extration</i> (Microextração em Fase Sólida em Tubo)
K	Coeficiente de partição
TEOS	Tetraetilortossilicato
MTEOS	Trimetoxietilsilano
PDMS	Polidimetilsiloxano
PDMS-DVB	Divinilbenzeno-polidimetilsiloxano
PS-DVB	Poliestireno-divinilbenzeno
OTT	<i>Open Tubular Trapping</i> (Aprisionamento Tubular Aberto)
TP	<i>Testosterone Propionate</i> (propionato de testosterona)
TPh	<i>Testosterone Phenylpropionate</i> (fempropianato de testosterona)
TI	<i>Testosterone Isocaproate</i> (isocaproato de testosterona)
TD	<i>Testosterone Decanoate</i> (decanoato de testosterona)
ToF	<i>Time of Fly</i> (Tempo de voo)
HS-IT-SPME	<i>Headspace In-Tube Solid Phase Micro Extration</i> (Headspace Microextração em Fase Sólida em Tubo)
HS-SPME	<i>Headspace Solid Phase Micro Extration</i> (Headspace Microextração em Fase Sólida em Tubo)
ACIT-SPME	<i>Array Capillary In-Tube Solid Phase Micro Extration</i> (Microextração em Fase Sólida em Matriz Capilar em Tubo)
LLE	<i>Liquid-Liquid Extraction</i> (Extração Líquido-Líquido)
SPE	<i>Solid-Phase Extraction</i> (Extração por fase sólida)
SDME	<i>Single-Drop Microextraction</i> (Microextração em gota única)
DLLME	<i>Dispersive Liquid-Liquid Microextraction</i> (Microextração líquido-líquido dispersiva)
SBSE	<i>Stir Bar Sorptive Extraction</i> (Extração sortiva em barra de agitação)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 Controle de <i>doping</i> e Agência Mundial Antidoping	3
2.2 Esteroides Anabolizantes Andrógenos	5
2.4. Detector por ionização de descarga de barreira dielétrica	9
2.5 Preparo de amostras para análises de esteroides anabolizantes andrógenos em cromatografia gasosa.....	13
2.5.1 Microextração em fase sólida.....	16
2.5.2 Microextração em fase sólida em tubo.....	18
2.6 Validação de métodos analíticos.....	22
3 MATERIAIS E MÉTODOS	26
3.1 Preparo do IT-Flex para análise de esteroides	26
3.1.1 Extração do polidimetilsiloxano (PDMS).....	26
3.1.2 Análise termogravimétrica	27
3.1.3 Espectroscopia na região do infravermelho	27
3.1.4 Revestimento do <i>liner</i> e tratamento térmico	27
3.1.5 Avaliação da espessura do filme interno do <i>liner</i>	28
3.2 Preparo de solução estoque de testosterona	28
3.3 Otimização do parâmetro da técnica de extração e pré-concetação IT-SPME	28
3.4 Avaliação da equivalência dos <i>liners</i> produzidos	29
3.5 Análise cromatográfica GC-BID, GC-FID e GC-MS	29
3.6 Comparação GC-BID X GC-FID e parâmetros de validação analítica	30
3.6.1 Seletividade	31
3.6.2 Limite de detecção (LD) e quantificação (LQ) instrumental	31
3.6.3 Linearidade.....	31
3.6.4 Precisão e inexatidão	31

3.6.5 Recuperação	32
3.6.6 Estabilidade	32
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES	33
4.1 Caracterização da fase polimérica extratora	33
4.2 Perfil cromatográfico e identificação dos esteroides anabolizantes andrógenos	35
4.3 Avaliação da montagem e do revestimento dos dispositivos	37
4.4 Estudo da cinética da absorção de extração da fase polimérica.....	40
4.5 Comparação GC-BID X GC-FID.....	42
4.5.1 Validação Analítica	44
5 CONCLUSÕES.....	52
REFERÊNCIAS	53
ANEXOS	63

1 INTRODUÇÃO

No mundo esportivo a competitividade entre os atletas de alto nível está sendo acirrada com o avanço tecnológico, melhorando os materiais para a prática de esporte, surgimento de tratamentos mais eficientes na recuperação muscular e fisiológica e desenvolvimento de treinamentos mais eficientes e específicos. Mesmo com diversos recursos disponíveis, alguns atletas ou instituições buscam alternativas químicas para o aperfeiçoamento esportivo, fazendo o uso de por exemplo, esteroides anabólicos andrógenos. Contudo, a *World Antidoping Agency* (Agência Mundial Antidoping - WADA) proíbi o uso desses compostos alegando que é uma forma de ter vantagem sobre outros competidores.

Com intuito averiguar e até inibir o uso de substâncias proibidas, o código *antidoping* da WADA determinou e criou métodos analíticos que poderiam ser aplicados para detecção desses compostos ilícitos. Esses métodos analíticos se tornam importante para jurisdição esportiva, com os resultados do *antidoping* os órgãos responsáveis podem tomar as ações cabíveis em punições e sanções desportivas e financeiras aos responsáveis pelos atos ilegais.

Devido austeridade do processo de dopagem, os métodos analíticos devem ser desenvolvidos de forma criteriosa apresentando resultados inequívocos, para evitar injustiças, prejuízos econômicos e jurídicos. Com isso, no processo de desenvolvimento analítico a validação é usada com intuito de garantir que os parâmetros de desempenho definidos estão otimizados e estejam de acordo com as legislações.[1]

A cromatográfica gasosa (GC) é uma técnica empregada na análise *antidoping* de compostos voláteis e semi-voláteis. Existem mais de 60 detectores no mercado, e na grande maioria existe a desvantagem na seletividade restrita de cada uma, para resolução desse problema, surgiu recentemente o novo detector por ionização de descarga de barreira dielétrica (BID), onde ocorre a ionização de todos os compostos em um plasma de hélio, sendo considerado um detector universal, robusto e com alta sensibilidade.[3]

Mesmo com todo potencial das técnicas cromatográficas, ainda há a desvantagem da impossibilidade de inserir amostra diretamente no cromatógrafo, podendo acarretar danos na coluna cromatográfica (perda de fase móvel ou obstrução). Portanto, houve a necessidade de adicionar uma etapa no desenvolvimento analítico para

extração e pré-concentração dos analitos de matrizes complexas, em muitos casos deixando cromatogramas mais limpos de interferentes e aumentando a sensibilidade. Existem diversas técnicas para essa etapa de preparo de amostras, algumas empregam fase líquida para extração, fase sólida e até versões miniaturizadas, com intuito de reduzir a produção de artefatos no processo.[4] Nesse trabalho, para etapa de extração e pré-concentração foi usado um dispositivo IT-Fex, que se fundamenta na microextração em fase sólida em tubo (IT-SPME, do inglês *in-tube solid phase micro extration*). O dispositivo foi confeccionado com um revestimento polimérico interno, obtido de um adesivo comercial, de um *liner* que se utiliza no injetor do cromatógrafo gasoso.[5]

Esse trabalho teve como objetivo geral desenvolver e otimizar uma nova metodologia de análise de esteroides anabólicos andrógenos em urina, no caso do trabalho ésteres de testosteronas, para futura aplicação em estudos sobre *antidoping*. Com o intuito de desenvolver futuras pesquisas no tema, o trabalho tem como objetivos específicos:

- Avaliar o revestimento do dispositivo IT-Flex em análise *antidoping*.
- Aplicar os detectores BID e FID como possíveis detectores para análises relacionados a dopagem.
- Executar todas as etapas da validação de métodos de acordo com a legislação vigente dos órgãos responsáveis.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Nesse tópico do trabalho foi tratado todo embasamento teórico, com conceitos já fundamentados que foram essenciais para execução dessa dissertação. Foram abordados os assuntos: Agência Mundial de *antidoping* e controle dopagem no esporte além das legislações vigentes; esteroides anabolizantes, dentre eles os analitos de interesse. Métodos de análise empregados por laboratórios de dopagem, técnicas de preparo de amostras que são aplicados e todo processo e parâmetros de validação de métodos.

2.1 Controle de *doping* e Agência Mundial *Antidoping*

Sempre em meios esportivos e competitivos, alguns indivíduos tendem a tirar vantagens sobre os demais, a fim de vencer as competições em disputa. Para alcançar essa superioridade diversas técnicas foram aplicadas ao decorrer da história para melhora do desempenho. Os primeiros registros, datado dos Jogos Olímpicos da antiguidade, relatam o uso de dietas especiais, como ingestão de fontes mais eficientes de carboidratos e proteínas. Posteriormente, houve o avanço e desenvolvimentos de treinos específicos, fortalecimento muscular e controle cardiorrespiratório. Recentemente, a indústria esportiva trouxe outro avanço, vestuários e instrumentos que favorecem a prática do esporte, resultando melhora na aerodinâmica, diminuição do atrito, melhor aderência em superfícies, melhora na transpiração, dentre outras melhorias que estão disponíveis a todos.[6]

Com ápice do desenvolvimento tecnológico e de técnicas, os atletas buscam métodos farmacológicos para melhorar ainda mais o desempenho. Contudo, o uso de drogas intensificadoras é prejudicial para o atleta, podendo acarretar mudanças irreversíveis na sua fisiologia, além de deixar o esporte injusto já que nem todos tem o acesso a esses meios. Para maioria dos especialistas esportivos o uso desses agentes farmacológicos é um debate polêmico e controverso, as confederações e comitês sempre buscam evitar, e tentam controlar do uso dessas drogas, e em caso de detecção e provada a presença desses agentes farmacológicos, punir juridicamente e esportivamente o usuário, equipes e confederações.[7]

A discussão sobre o controle e investigação do *doping* no esporte fortaleceu após o escândalo no Tour da França de corrida de bicicleta em 1999, que levou o Comitê Olímpico Internacional (COI) convocar a primeira conferência sobre *doping* no esporte.

Diferentemente de casos anteriores de dopagem, que no geral eram casos isolados e deliberadamente dos atletas ou equipes, as investigações nesse caso determinaram que o uso de substâncias de melhora física e rendimento era algo já difundida e institucionalizada no ciclismo profissional europeu, ou seja, diversos atletas em diferentes equipes da Europa apresentaram em seu organismo compostos com tais características. Como o ciclismo é um esporte olímpico, o COI não encontrou outra alternativa em intervir. Como consequência houve a criação da WADA, sendo um órgão interno ligado ao COI responsável pela elaboração dos códigos e legislações, que tem como objetivo coordenar uma luta efetiva contra o *doping*. [8]

O Código Mundial Antidopagem foi a primeira tentativa do COI junto com federações esportivas, de padronizar as normas internacionais, que envolviam determinar as substâncias consideradas proibidas para prática esportiva. A identificação por teste analíticos e não analíticos, poderiam implicar automaticamente em punições, suspensões até banimento do atleta no devido esporte. [9]

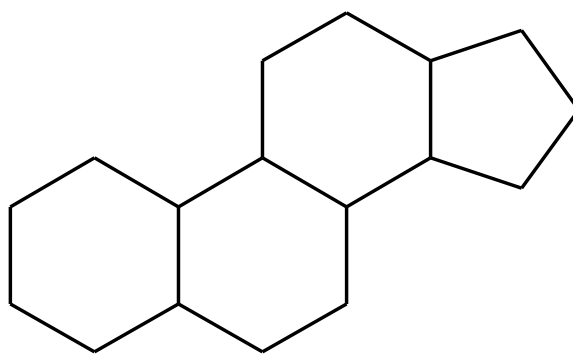
O Código abrange todos os pontos necessários para o desenvolvimento analíticos para *antidoping*, incluindo etapas como, procedimentos de recolhimento de amostra, preparo de provas e testes de detecção. Lista de métodos que podem ser empregados, além de listar laboratórios credenciados, e procedimentos para futuros credenciamentos. Há especificidade para identificação nas técnicas analíticas empregadas, como cromatografia gasosa (GC, do inglês *gas chromatography*) e cromatografia líquida (LC, do inglês *liquid chromatography*) e com a espectrometria de massas (MS, do inglês *mass spectrometry*) como detector para as duas técnicas. Critérios usados, por exemplo, para MS são, utilização preferencial no modo *full scan*; necessários três íons característicos que podem ser selecionados no modo monitoramento de único íon (SIM, do inglês *single ion monitoring*); íons característicos com uma intensidade maior que 10% devem estar presentes nos espectros do padrão de referência e analito; a abundância relativa de íons indesejáveis não deverá ser maior que 25%; o critério de tolerância para espectrometria de massas de baixa resolução absoluta 5% ou relativa 20% dos fragmentos alvos. [10,11]

2.2 Esteroides Anabolizantes Andrógenos

Dentre dos inúmeros compostos e classes de substâncias proibidas pela WADA para o uso no esporte, há um grupo de substâncias que se destacam no cenário da dopagem, os esteroides anabolizantes andrógenos (EAAs). Esses compostos podem ser definidos como:

“Os esteroides anabolizantes androgênicos (EAAs) representam um grupo de compostos naturais e sintéticos formados pela testosterona e seus derivados, esteroides são um grande grupo de substâncias que apresentam uma estrutura básica comum formada por 3 anéis com 6 átomos de carbono (Figura 1) ligados a um anel com outros 5 átomos de carbono (ciclopentano). Os principais secretores de hormônios esteroides são: glândula supra-renal, testículos, ovário e placenta.”[12]

Figura 1 - Estrutura básica dos esteroides anabolizantes.



Atualmente, para testes de *doping* são analisadas amostras de urina, afim, de haver a detecção dos esteroides livres (não metabolizados) e os respectivos metabolitos conjugados. O perfil cromatográfico de uma análise de *doping* é caracterizado por um “perfil de esteroides”, onde há presença de marcadores específicos, sendo esteroides livres produzidos pelo organismo (endógenos): androsterona (A), eticolanolona (Etio), 5 α -Androstano-3 α -17 β -diol (5 α Adiol), 5 β -Androstano-3 α -17 β -diol (5 β Adiol), testosterona (T) e epitestosterona (E) com seus respectivos metabolitos. Também são

avaliadas as razões de concentrações entre esses compostos: T/E; A/T; A/Etio; 5 α Adiol/5 β Adiol; 5 α Adiol/E. Qualquer administração de um EAA causa alteração do perfil cromatográfico, com o aparecimento dos anabolizantes livres e respectivos metabolitos, além do aumento ou redução na concentração dos esteroides endógenos. Além disso, alteração do perfil pode ocorrer por uma série de razões, incluindo: administração de gonadotrofina coriônica humana em homens; administração de inibidores da aromatase e anti-estrogênicos; a administração de inibidores de 5 α -redutase (finasterida); ingestão de álcool; a administração de cetoconazol ou outros compostos semelhantes; o uso de agentes mascaradores e diuréticos.[13,14]

Portanto, as metodologias podem mudar com o tipo de substância alvo e parâmetros de comparação, para alcançar comprovação inequívoca de *doping*. Em alguns casos são necessários detecção de um ou dois principais metabólitos dos EAAs. Dependendo do esteroide (para esteroides sintetizados) a análise qualitativa, apenas a detecção, já é suficiente, mas a detecção de esteroides naturais (esteroides que são estruturalmente idênticos aos produzidos pelo organismo) requer quantificação, pois existem faixas de concentrações para ser considerado *doping*, em alguns casos a concentração pode chegar a uma faixa de 2 a 10 ng mL⁻¹. [15,16]

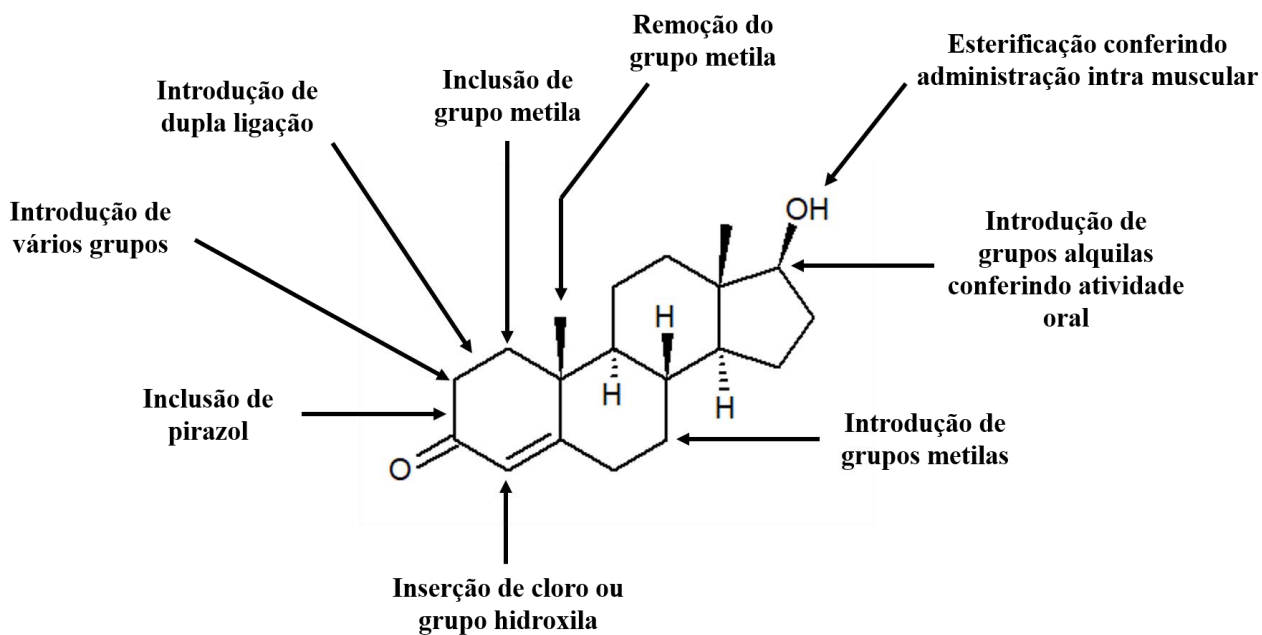
Um dos esteroides anabolizantes onde é necessário análises qualitativas e quantitativas é a testosterona e seus derivados. É um dos principais hormônios masculinos, sendo produzido naturalmente tendo ação no desenvolvimento de tecidos da próstata e testículos, além de características sexuais secundárias, massa muscular, maturação dos ossos e o crescimento do cabelo corporal.[17]

Os estudos sobre a testosterona, começaram no século XIX para uso farmacológico desse esteroide, observando seus efeitos rejuvenescedores. Foi isolado em 1935, inicialmente de testículos bovinos e posteriormente de excreções urinárias de homens adultos. A partir da década de 50, as testosteronas começaram a ser sintetizadas em forma de ésteres, nessas conformações estruturais, percebeu-se melhor absorção pelos tecidos corporais e efeitos semelhantes ou até superiores no metabolismo humano.[18]

As modificações são realizadas e testadas até hoje, em muitos casos, planejadas para que dificultem a detecção dos métodos analíticos no *doping*. Introduzindo em suas estruturas mudanças que proporcionam características antes não eram observadas, como, administração de forma injetável (no século XX, maioria dos esteroides eram ingeridos

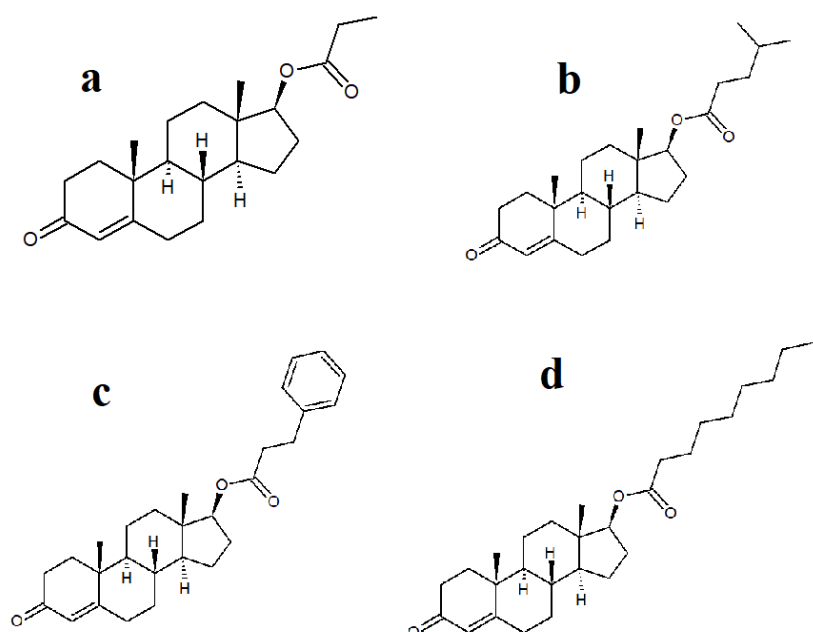
de forma oral), desativação do anabolizante em algumas passagens metabólicas (evitando oxidações) e melhora na absorção e interação nos tecidos musculares, aumentando o comprimento da cadeia (permitindo que ação farmacológica seja sentida durante maiores ciclos).[19] É mostrado na Figura 2 as principais modificações estruturais que são feitas na testosterona.

Figura 2 - Modificações estruturais que podem ser feitas para mudanças farmacológicas - Adaptado. [20].



Um exemplo de esteroides modificadas é o medicamento Durasteston® (composição: óleo de amendoim, álcool benzílico, propionato de testosterona, fempropionato de testosterona, isocaproato de testosterona, decanoato de testosterona), que legalmente tem o uso veterinário e terapêutico restrito, porém difundida e administrada no fisiculturismo. Esse medicamento é uma mistura de quatro testosteronas esterificadas, que já são usadas separadamente em tratamentos desde da década de 60.[21] Sendo aplicado principalmente como estimulante de angiogênese nos testículos de jovens na puberdade.[22] Suas estruturas podem ser observadas na Figura 3.

Figura 3 – Estruturas dos componentes da Durasteston®, (a) propionato de testosterona, (b) isocaproato de testosterona, (c) fempropionato de testosterona, (d) decanoato de testosterona.

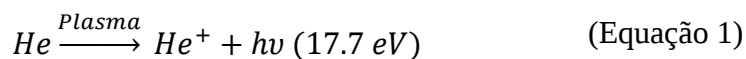


Com a mistura desses ésteres, o Durasteston® apresenta resultados e rápido e prolongados, diminuindo os ciclos de administração e evitando dependência química. A mistura dos ésteres permite que o medicamento tenha características oleosas, podendo ser injetado intramuscular e não havendo rejeição do organismo. O propionato (TP) e isocaproato (TI) apresentam respostas fisiológicas, crescimento muscular e aceleração metabólica, devido a sua estrutura, fazendo com que a absorção seja acelerada pelas células musculares.[23] Quanto o fempropionato (TPh ou fenilpropionato) já age na inibição de hormônios antidiuréticos, ocorrendo maior perda de água pelo organismo, auxiliando da definição corporal de atletas.[24] A cadeia estendida do decanoato (TD) fornece a característica de estabilidade química maior em relação aos demais, permanecendo por mais tempo no corpo e tendo o crescimento muscular prolongado em um intervalo de 4-6 semanas, finalizando o ciclo de administração após seis semanas.[25] Este trabalho foi desenvolvido com intuito de validar um método de análise para os ésteres de testosteronas: isocaproato, fempropionato e decanoato de testosteronas, sendo que eram os padrões analíticos disponíveis. O propionato de testosterona não estava disponível no laboratório.

2.4. Detector por ionização de descarga de barreira dielétrica

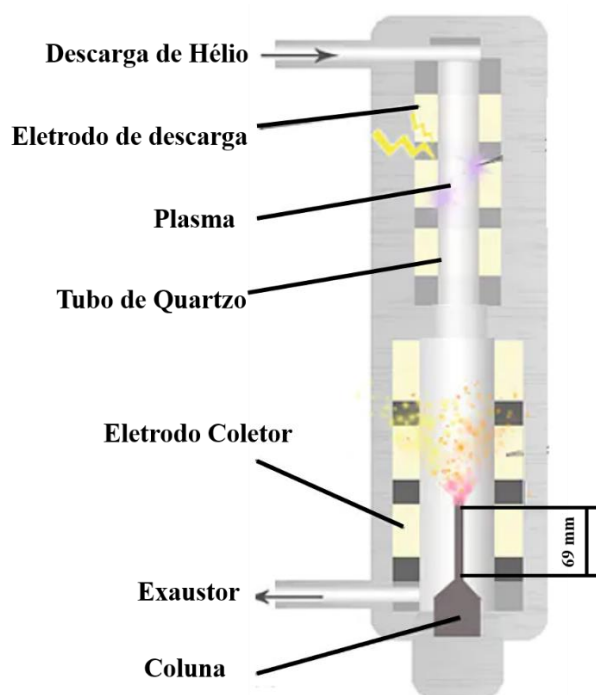
O sucesso da moderna cromatografia gasosa deve-se a alta eficiência de separação, flexibilidade, e a sensibilidade na análise de compostos voláteis e semivoláteis, que são analitos de interesse em análises ambientais, alimentos, farmacêuticos e biológicos. Outro fator de vantagem para a cromatografia gasosa é disponibilidade de inúmeros detectores sensíveis e seletivos que, ou, pelo contrário, universalmente aplicável. Porém, a universalidade dos detectores pode trazer consigo a perda de sensibilidade com a mudança das classes dos compostos. Pode-se citar o detector por ionização de chama (FID, do inglês *flame ionization detector*), que é considerado um detector universal sendo mais sensível a hidrocarbonetos, contudo, com a adição de heteroátomos há perda de sensibilidade e não há detecção de gases inorgânicos. O detector por condutividade térmica (TCD, do inglês *thermal conductivity detector*), também um detector universal, mais sensível a gases inorgânicos e diminuição dessa sensibilidade a vapores orgânicos. Detectores seletivos como por captura de elétrons (ECD, do inglês *electron capture detector*), onde há detecção de compostos com presença de átomos eletronegativos (nitrogênio e halogênios). Essa peculiaridade dos detectores pode dificultar o planejamento de análises completa, em alguns casos é necessário configurar o equipamento para utilização de dois ou mais detectores em série ou, realizar maior número de análises em equipamentos diferentes [26].

Um novo detector que pode ser empregado para análise de traços de vários tipos de compostos, atuando como detector universal, é o detector de descarga de ionização por barreira (BID, do inglês *barrier ionization discharge detector*). No BID (Figura 4) a amostra é ionizada por um plasma de hélio de 17,7 eV, que é gerado pela aplicação de uma alta tensão dielétrica através de eletrodos revestidos de quartzo na presença de gás hélio de alta pureza, posteriormente, os analitos eluidos da coluna entram em contato com o plasma, são ionizados e liberam corrente elétrica, que é coletada e convertida em sinal no sistema de dados.[27] O mecanismo de ionização no BID se baseia na movimentação dos elétrons induzida pela descarga elétrica nos eletrodos, fazendo com que haja excitação e formação do plasma de hélio (He). Essa formação do hélio emite radiação ($h\nu$) que ioniza os analitos (A) de interesse, consequentemente os analitos ionizados colidem com eletrodo coletor, gerando o sinal cromatográfico. As equações referentes ao mecanismo estão descritas nas Equações 1 e 2.



[28]

Figura 4 - Esquema de divisão e funcionamento do BID - Adaptado. [29]



O plasma de hélio gerado neste processo possui baixa temperatura e, de acordo com relatos da literatura, o aumento da temperatura no tubo de quartzo após a formação do plasma não ultrapassa 5 °C.[30] Não há contato do plasma com as paredes de quartzo, isso devido ao campo eletromagnético aplicado para sua formação, proporcionando vantagens no uso do BID, como, simples instalação e manutenção, poder trabalhar em baixas temperaturas, baixo consumo de energia, longa vida útil, operação em pressão atmosférica e estabilidade a longo prazo.[31]

Além disso, GC-BID é conhecido por fornecer sensibilidade significativamente aumentada comparado aos demais detectores quanto injeção automática, podendo alcançar a faixa de $\mu\text{L L}^{-1}$. Trabalho de Antoniadou, Zachariadis e Rosenberg (2019) [32] observaram sensibilidade duas vezes maior do que o FID para compostos orgânicos como alcanos e aromáticos (Figura 5). Em comparação com TCD, Leißing e colaboradores (2020) [33] verificaram maiores sensibilidade de gases inorgânicos e vapores orgânicos

de baixa massa molar (Figura 6), Frink e Armstrong (2016) [34] estudaram a melhora de resolução para quantificação de água em méis (Figura 7).

Figura 5 - Comparação de cromatogramas para quatro grupos com o BID e o FID a 100 mg L^{-1} : alcanos e aromáticos - Adaptado.[32]

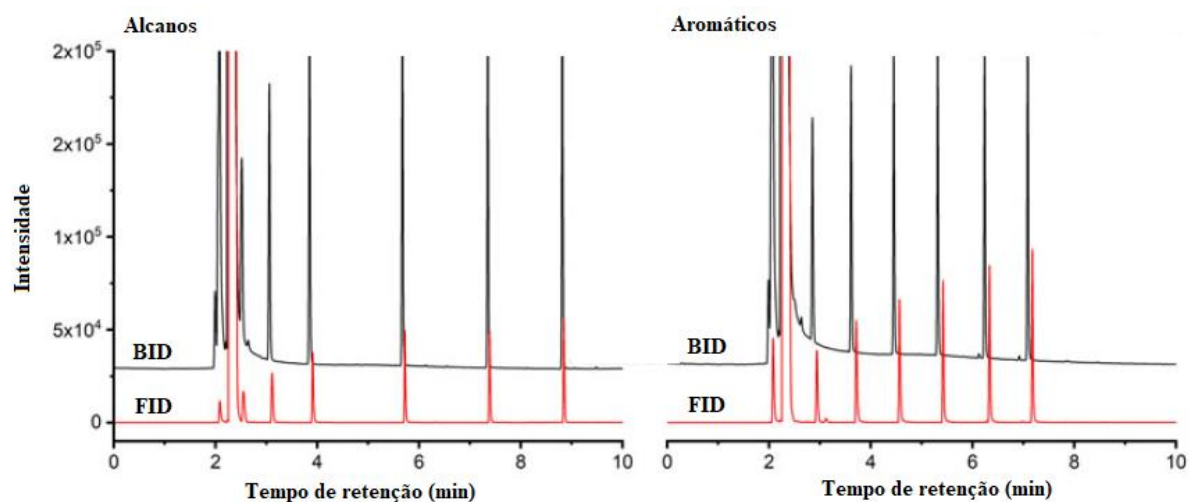


Figura 6 - Cromatogramas do padrão medido com concentração de 100 ppm de cada componente. O BID mostra respostas para todos os analitos de interesse enquanto o detector TCD mostrou apenas para o gás inorgânico da matriz e o ar contaminantes (nitrogênio) - Adaptado.[33]

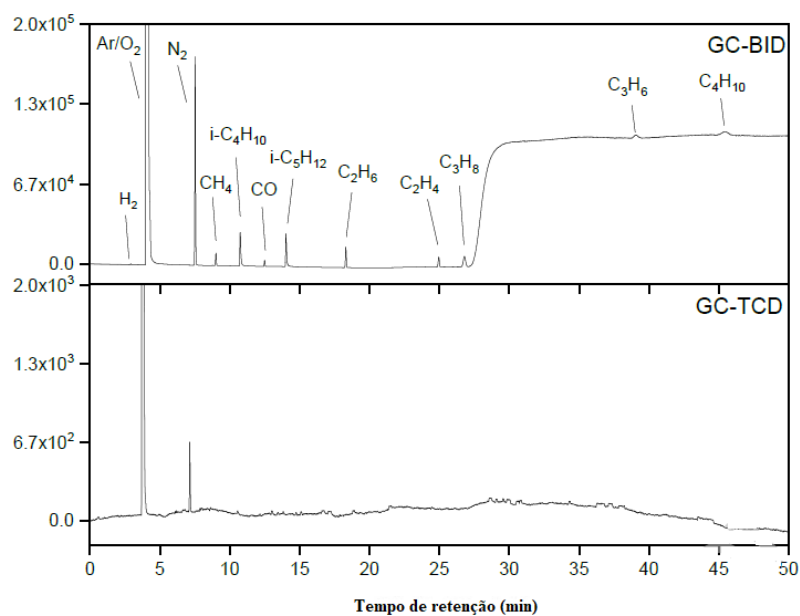
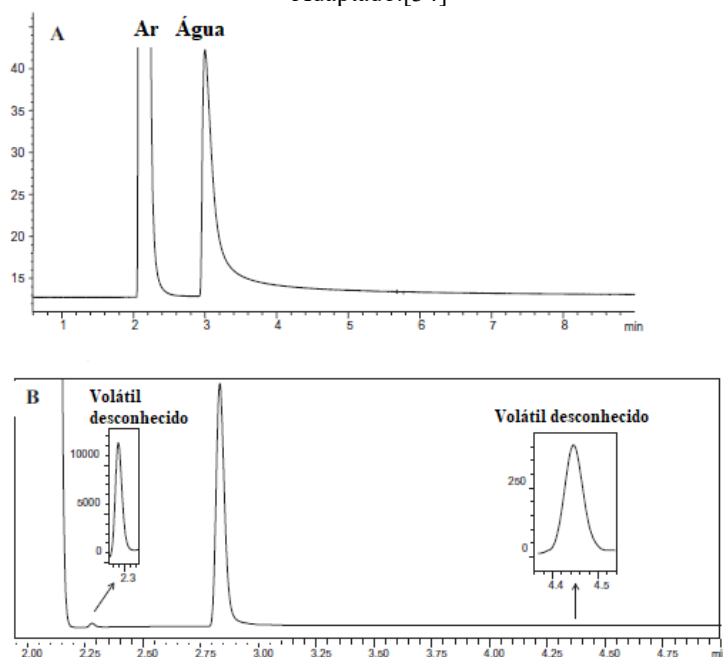


Figura 7 - (A) Um cromatograma de uma análise típica de água no mel de trigo sarraceno usando o GC-TCD. (B) Um cromatograma de uma análise típica de água no mel de trigo sarraceno usando o GC-BID - Adaptado.[34]



O BID tem a capacidade de ionizar e detectar todas as classes de moléculas, com exceção do próprio hélio e neônio, devido ao mecanismo empregado no plasma de hélio, tendo característica de um detector universal com boa sensibilidade para grande maioria dos compostos voláteis. Na Tabela 1 é comparado aplicabilidade do BID com os demais detectores disponíveis no mercado.

Tabela 1 - Comparação dos detectores para cromatografia gasosa disponíveis no mercado.[35]

Detector	Sigla	Gases	Compostos com alta resposta
Ionização de chama	FID	Hidrogênio	Hidrocarbonetos
Espectrômetro de massas	MS	Hélio	Compostos Orgânicos no geral
Condutividade térmica	TCD	Hélio	Gases inorgânicos
Captura de elétrons	ECD	Nitrogênio	Compostos com nitrogênio e halogênios
Nitrogênio-fósforo	NPD	Nitrogênio, hidrogênio e hélio	Compostos com nitrogênio e fósforo
Fotométrico de chama	FPD	Nitrogênio, hidrogênio, ar sintético e hélio	Compostos com enxofre e fósforo
Fotoionização	PID	Nitrogênio e hélio	Compostos orgânicos com insaturações
Ionização de descarga de barreira dielétrica	BID	Hélio ultra puro	Não há especificação, incluindo compostos inorgânicos

2.5 Preparo de amostras para análises de esteroides anabolizantes andrógenos em cromatografia gasosa

Em toda história da cromatografia a gás e todo seu potencial desenvolvido: melhora nas colunas, criação de novas fases estacionárias, evolução na purificação das fases móveis e detectores, há uma desvantagem que ainda persiste: injeção direta das amostras aquosas. Devido à complexidade das matrizes, a aplicação direta de amostras aquosas, acarretam danos ao equipamento que prejudicam análise cromatográfica, dentre os quais pode-se destacar: sangramento da coluna, perda da capacidade de separação, aumento do ruído, perda da reprodutibilidade e repetitividade, além de contaminação no detector comprometendo o seu uso. Com isso, surgiu a necessidade de adicionar uma etapa no processo de análise cromatográfica: o preparo de amostras.[36]

O preparo de amostras compreende em uma etapa analítica bastante significativa onde ocorre limpeza da amostra (*clean-up*), extração e enriquecimento dos analitos de interesse e em alguns casos conversão dos compostos. A limpeza consiste na remoção de potenciais interferentes, que seriam prejudiciais a separação e detecção. A extração do analito na matriz permite melhor seletividade do processo. O enriquecimento fornece aumento da concentração do analito, especialmente em análise onde há baixas concentrações, e, portanto, possibilita o aumento sensibilidade do ensaio. Por fim, a conversão dos analitos auxilia na mudança de alguma característica física ou química da substância que podem facilitar a volatilização, estabilidade térmica e detectabilidade. No geral, essa etapa adicional do método trouxe robustez e reprodutibilidade aos ensaios independentemente de variação das características das matrizes das amostras.[37]

Para entender qualquer técnica de extração, primeiro é necessário discutir alguns princípios básicos que governam todos os procedimentos e a termodinâmica de extração. Dentre eles, cinco propriedades do analito que são importantes para uma extração, pressão de vapor, solubilidade, massa molar, hidrofobicidade e ionização de compostos ácidos. Essas propriedades essenciais determinam a cinética dos compostos durante a extração analítica e auxiliam entender o comportamento dos analitos entre as fases que se encontram, possibilitando otimizar todo o processo de preparo de amostra: esses fatores auxiliam na seleção da técnica de extração, característica do dispositivo e condições operacionais para uma determinada aplicação.[38]

A volatilização de um composto químico da superfície de um líquido é um processo de particionamento, pelo qual a substância se distribui entre a fase líquida e a fase gasosa. Compostos orgânicos voláteis exibem a maior tendência de cruzar a interface líquido-gás, quando isso ocorre, a concentração do analito orgânico na solução é reduzida.[39]

Pressão de vapor é o equilíbrio químico do analito com o líquido e com a fase gasosa a uma determinada temperatura. A pressão de vapor de produtos químicos varia amplamente de acordo com o grau de atrações intermoleculares entre moléculas semelhantes: quanto mais forte a atração intermolecular, menor a magnitude da pressão de vapor. Sendo uma propriedade regida pela constante de distribuição do analito entre a matriz da amostra e a fase de extração.[39]

Solubilidade é a quantidade máxima (em gramas) que um composto pode ser dissolvido na fase líquida a uma determinada temperatura. A solubilidade depende de outras propriedades como polaridade, estrutura química e cinética de equilíbrio que podem determinar a seletividade da técnica.[39]

A hidrofobicidade é uma propriedade relacionada a polaridade dos componentes para avaliar a miscibilidade do sistema. Ionização ácida e básica é a propriedade substancial da hidrofobicidade, que pode influenciar a miscibilidade e a força iônica do sistema, que podem estimular a transferência dos compostos orgânicos para a fase extratora. Tais propriedades influenciam na escolha das fases extratoras que consigam limpar, extrair e enriquecer a amostra, a fim de otimizar essa etapa desafiadora da extração.[39]

Técnicas de extração para o preparo de amostras são pesquisadas e aprimoradas com intuito de serem acessíveis economicamente, rápidas e respeitando alguns princípios da Química Verde (diminuição no volume de resíduos tóxicos até mesmo a descontinuação). Existem diversos métodos que possibilitam a transferência dos compostos orgânicos da matriz aquosa para uma fase extratora. Inicialmente as técnicas se baseavam na partição líquido-líquido entre a fase aquosa com fase de extração orgânica, essa sendo levada ao cromatógrafo para análise. Posteriormente, surgiram técnicas de extração em fase sólida que se baseavam nos mecanismos de dessorção e adsorção empregando mudança de solventes ou temperatura. Depois, houve o desenvolvimento de técnicas miniaturização, que permitiram a redução do volume da

amostra, enriquecimento dos analitos e proporcionou métodos mais baratos e práticos no cotidiano nos laboratórios.[40] Na Tabela 2 são apresentadas algumas técnicas de preparo de amostras empregadas para análises cromatográficas.

Tabela 2 - Técnicas usadas no preparo de amostras de matrizes aquosas para análises em cromatografia. gasosa.

Técnica	Sigla	Mecanismo	Dispositivo	Referência
Extração Líquido-Líquido	LLE	Partição líquido-líquido	Emprego de solvente orgânico em contato com a fase aquosa, adição de sais para aumento da força iônica	[41,42]
Extração por fase sólida	SPE	Adsorção e dessorção	Emprego de um cartucho para extração da fase aquosa, uso de solvente orgânico para eluição dos analitos	[43,44]
Microextração em gota única	SDME	Partição líquido-líquido ou líquido-gás	Emprego de uma gota de fase extratora suspensa na ponta de uma agulha e exposta no sistema com a fase aquosa	[45,46]
Microextração líquido-líquido dispersiva	DLLME	Partição líquido-líquido	Emprego de microlitros de solvente orgânico como fase extratora, fase aquosa e de solvente dispersor (para facilitar a migração dos analitos)	[47,48]
Microextração em fase sólida	SPME	Partição ou adsorção	Emprego haste recoberto com filme de polímero sorvente ou sólidos adsorventes, depois dessorção térmica	[49,50]
Extração sortiva em barra de agitação	SBSE	Partição ou adsorção	Emprego de uma barra de agitação revestida por um polímero em contato com a fase aquosa, depois dessorção térmica ou química	[51,52]
Microextração em fase sólida em tubo	IT-SPME	Partição ou adsorção	Emprego de um tubo de borossilicato revestido internamente por um polímero em contato com a fase aquosa, depois dessorção térmica.	[53,54]

LLE - *Liquid-Liquid Extraction*; SPE - *Solid-phase extraction*; SDME - *Single-drop microextraction*; DLLME - *Dispersive Liquid-Liquid Microextraction*; SBSE - *Stir Bar Sorptive Extraction*.

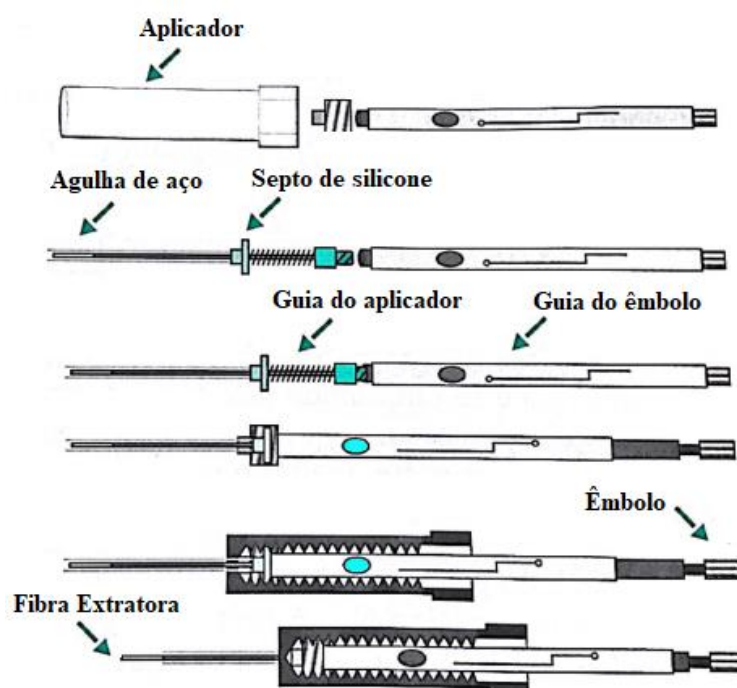
A WADA não especifica a técnica de preparo de amostras para análises de EAAs em seu código internacional. O único requisito para o uso das técnicas é que as mesmas sigam as especificidades do processo de validação de métodos. O principal ponto para essa validação é linearidade do ensaio como um todo (preparo de amostra, separação cromatográfica e detecção), que deve abranger as faixas de concentração dos marcadores normalmente encontradas em homens e mulheres (por exemplo: o limite de quantificação (LQ) para testosterona (T) não deve ser maior que 2 ppb). O código exige também uma etapa na análise dos metabólitos que envolve: hidrólise enzimática β -glucuronidase purificada de *E. coli*; hidrólise completa dos esteroides urinários glicoconjugados deve

ser controlada com alfa-glicoronídeo, e derivatização para controle através do monitoramento dos analitos com tetrametilsilano. A agência mundial estimula o desenvolvimentos e aperfeiçoamento de novos métodos para processos *antidoping*, isso impulsionou o crescimento de número de trabalhos na área.[55]

2.5.1 Microextração em fase sólida

Dentre das inúmeras técnicas de preparo de amostras, a microextração em fase sólida (SPME, do inglês *solid phase micro extration*) é mais disseminada entre os laboratórios *antidoping* certificados pela WADA, principalmente na análise de esteroides e outros estimulantes. O dispositivo de SPME foi desenvolvido em 1990 por Arthur e Pawliszyn, que consiste em o uso de uma fibra polimérica revestindo a ponta de uma haste que está dentro da agulha (Figura 8), podendo ser colocada diretamente em contato com amostra, no modo de imersão ou sistema *headspace*. [56] Essa fibra depois de exposta permite a sorção e extração dos compostos de interesse. Após a etapa de pré-concentração a fibra é exposta novamente no injetor do GC, onde os analitos são dessorvidos termicamente, como pode ser observado na Figura 8, onde é mostrado a montagem do dispositivo SPME, com o mecanismo de exposição e retração da fibra polimérica para extração.

Figura 8 - Esquema do dispositivo comercial genérico para SPME - Adaptado.[57]



A estrutura da fibra de SPME é anexada a uma haste de metal que é posicionada dentro de uma agulha de aço inoxidável, garantindo a praticidade do método de amostragem devido a força mecânica aplicada e usos sucessivos. Essa estrutura permite que a fase revestida possa ser exposta e retraída de acordo com as necessidades, controlado o tempo de extração e eliminando contaminantes, devido a retração da fibra antes da retirada do frasco. O suporte, por um parafuso, permite que indique a profundidade da agulha no injetor de equipamentos cromatográficos. Desse modo, o dispositivo demonstra vantagens operacionais e o torna bastante atraente para ensaios analíticos além de obter algumas características fundamentais da Química Verde, como: rapidez e operacionalidade simples; não exige modificação do equipamento para uso; redução do número de etapas na amostragem das amostras diminuindo erros operacionais; diminuição no uso de solventes orgânicos tóxicos simplificando o gerenciamento de resíduos; reduzindo a possibilidade de contaminação e elevando detectabilidade e sensibilidade dos detectores de GC.[58]

Porém, o SPME traz consigo um longo tempo de desenvolvimento do método para avaliar e otimizar as condições experimentais visando melhores seletividade e sensibilidade. As principais condições operacionais para um método empregando SPME são:

- Fibra do SPME: a fibra deve ter afinidade com os analitos de interesse, deve ser compatível a matriz, a fim de evitar degradação do polímero extrator. A espessura deve ser adequada a aplicação, uma vez que pode influenciar a eficiência da extração e dessorção térmica.[59]
- Modo de operação: Se deve ser usado em aplicação direta na amostra ou modo *headspace*, esse fator deve levar em consideração a complexidade da matriz e pressão de vapor dos respectivos analitos.[59]
- Tempo de extração: O tempo de exposição da fibra deve ser igual ou maior que ao tempo de equilíbrio do analito entre as fases do sistema.[59]
- Temperatura: a temperatura afeta a posição dos equilíbrios, do modo que, o aumento da temperatura auxilia na transferência de massa entre as fases, portanto, faz com que os equilíbrios sejam atingidos mais rapidamente.[59]

- Condicionamento do meio: Adição de eletrólitos (sais, ácidos e base) intensificam a força iônica da matriz aquosa deslocando o equilíbrio de volatilização e sorção pela fibra aumentando a eficiência da extração.[59]

2.5.2 Microextração em fase sólida em tubo

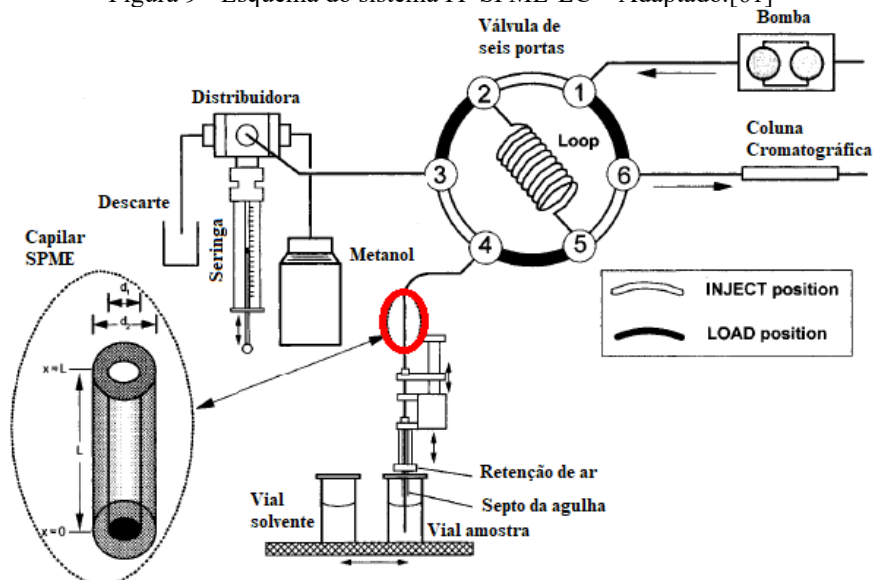
A microextração em fase sólida em tubo (IT-SPME, do inglês *in-tube solid phase micro extraction*) é uma técnica de pré-concentração de voláteis e semivoláteis em que se emprega revestimentos poliméricos de capilares e microcapilares e posterior dessorção dos analitos para análise em GC ou LC. Esse método é anterior aos primeiros estudos desenvolvidos por Pawlinszyn nos anos 1990, porém a intensificação da comercialização das fibras de SPME contribuiu para a substituição ao IT-SPME em estudos e aplicações.[60]

O sistema IT-SPME foi desenvolvido baseado em técnica capilar de SPME em tubo (coluna de GC) e, inicialmente, para acoplamento on-line em cromatógrafos líquidos com a intenção de miniaturização, automação, alto desempenho, e redução do consumo de solventes. Configuração instrumental do IT-SPME-LC, emprega um pedaço de coluna GC (SPME em tubo), onde a amostra aquosa aspirada do frasco de amostra através a coluna GC e distribuída de volta para o frasco (posição injetar) pelo movimento da seringa. Após a etapa de extração, a válvula de seis portas é mudada para a posição de dessorção líquida dos analitos utilizando de metanol de outro frasco através do capilar SPME. O volume é transferido para o loop. Depois de mudar a válvula para a posição injetar o eluente de dessorção é encaminhado para coluna cromatográfica.[61] É detalhado na Figura 9 o sistema de IT-SPME utilizando o capilar SPME em tubo.

É observado que há necessidade da realização de pesquisas para desenvolvimento de configurações de fácil instalação, manuseamento e manutenção para que sejam disponibilizados comercialmente. Essa necessidade surge pela ampliada aplicação da técnica para análise de compostos voláteis e semivoláteis, que pode ser aplicada na determinação de pesticidas, poluentes ambientais, drogas, contaminantes em alimentos, fármacos, antidepressivos, compostos aromáticos, carcinogênicos, alcaloides, hormônios e aflatoxinas. Em comparação as fibras convencionais de SPME, a

microextração em tubo apresenta baixa fragilidade e a alta capacidade de sorção e menor tempo de análise, devido o acoplamento direto à coluna cromatográfica. [54,62–64]

Figura 9 - Esquema do sistema IT-SPME-LC – Adaptado.[61]

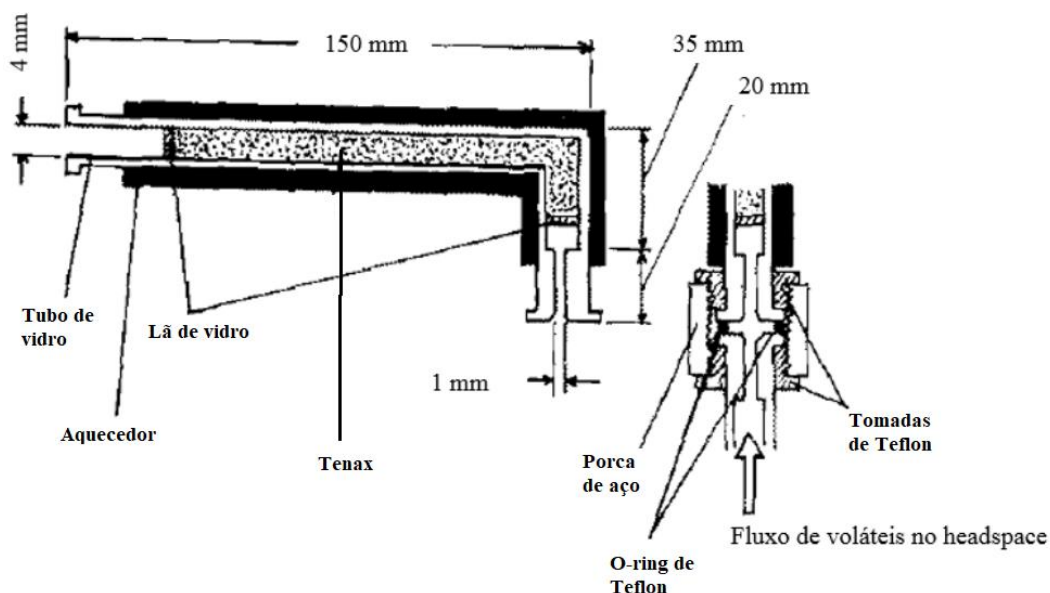


Mesmo não sendo uma técnica difundida comercialmente, existem pesquisas sobre capilares extratoras com novas fase para revestimento. Trabalhos como o de Mora *et al.* (2019) [65], apresentam polímeros como tetraetilortossilicato (TEOS) e trimetoxietilsilano (MTEOS) modificados com nanopartículas de SiO_2 e TiO_2 para uso em IT-SPME-LC, e encontradas eficiências semelhantes com capilares disponíveis comercialmente revestidos como polidimetilsiloxano-divinilbenzeno (PDMS-DVB) e poliestireno-divinilbenzeno (PS-DVB). Em revisões, como realizado por Moliner-Martinez e colaboradores (2015) [66] salientam inovações em relação aos revestimentos, com uso de novos materiais, como: polímeros de impressão molecular, nanomateriais, imunosorventes e líquidos iônicos. Nesse trabalho os autores comentam sobre a técnica de aprisionamento tubular aberto (OTT) sendo uma configuração para acoplamento e aplicação em GC.

No geral, a IT-SPME foi estudada mais amplamente para acoplamento em cromatógrafos líquidos e eram encontradas dificuldades para aplicação em cromatografia gasosa, principalmente na transferência dos analitos do aparato para o equipamento. O primeiro sistema de capilar aberto (Figura 10) foi desenvolvido no final dos anos 1970, onde utilizava o Tenax (polímero porosos de alta estabilidade térmica adequado para a

dessorção) em um tubo de vidro em “L”. Esse aparato permitiu diferentes análise com injeção direta, extração direta por Tenax, extração por Tenax em *headspace* para um sistema seco, extração por Tenax em headspace para um sistema aquoso. [67]

Figura 10 - Esquema da armadilha tubular Tenax GC – Adaptado.[67]



Em 1985, foi desenvolvido capilares para análise de gases, no trabalho de Grob e Habick (1985) fizeram diferentes tipos de revestimentos adsorventes e empacotamento de colunas capilares de GC. Foram utilizadas colunas revestidas com filme polimérico, carvão derretido e embalada com carvão e selada com lã de vidro. A amostragem se baseava em inserção de alíquota gasosa (*headspace*) por meio de uma seringa, após a adsorção a armadilha é colocada dentro do injetor onde os analitos são desorvidos termicamente. [68]

Entre os anos 1980 e início dos anos 1990 as pesquisas em IT-SPME-GC se baseavam no desenvolvimento de novos revestimentos, embalagens, comprimento dos capilares e diferentes configurações de acoplamento ao cromatógrafo gasoso.[69] Os maiores avanços na técnica foram o uso da câmara de injeção (*liner* - componente que protege a parte interna do injetor) do GC para montagem de novos dispositivos. O primeiro denominado como microextração em fase sólida em matriz capilar em tubo (ACIT-SPME, do inglês *array capillary in-tube solid phase micro extraction*), onde há inserção de capilares revestido com fase extratora em *liners* com estrangulamento

permitindo extração direta e *headspace* dos analitos em fase aquosas (Figura 11). O número de capilares usados permitem maiores superfícies para extração e melhorando também a termodinâmica de dessorção dentro do injetor do cromatógrafo.[53,70] Recentemente, surgiu uma nova configuração da técnica com inserção de lâminas de vidro revestidas com um gel de PDMS para amostragem de drogas e compostos voláteis explosivos (Figura 12). No geral, os dispositivos, com capilares e com lâminas, são expostos a amostra onde ocorre a pré-concentração e extração dos analitos, posteriormente, o *liner* é inserido no injetor do GC onde ocorre a dessorção dos compostos injeção na coluna.[71]

Figura 11 - Aparato para extração ACIT-SPME-GC. (a) fotografia. (b) diagrama da seção. (c) processo de fabricação – Adaptado.[53]

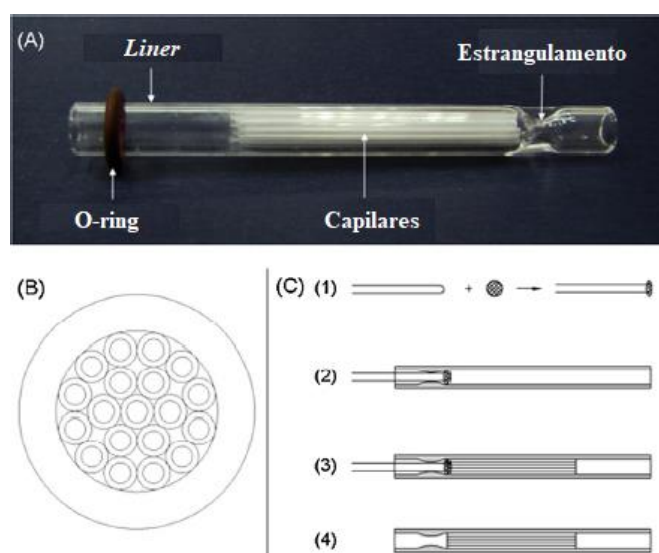
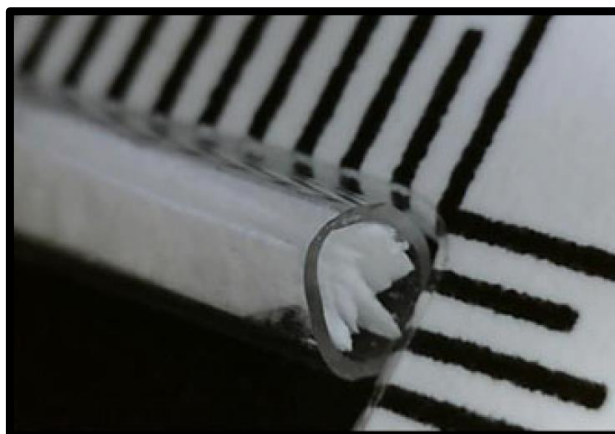


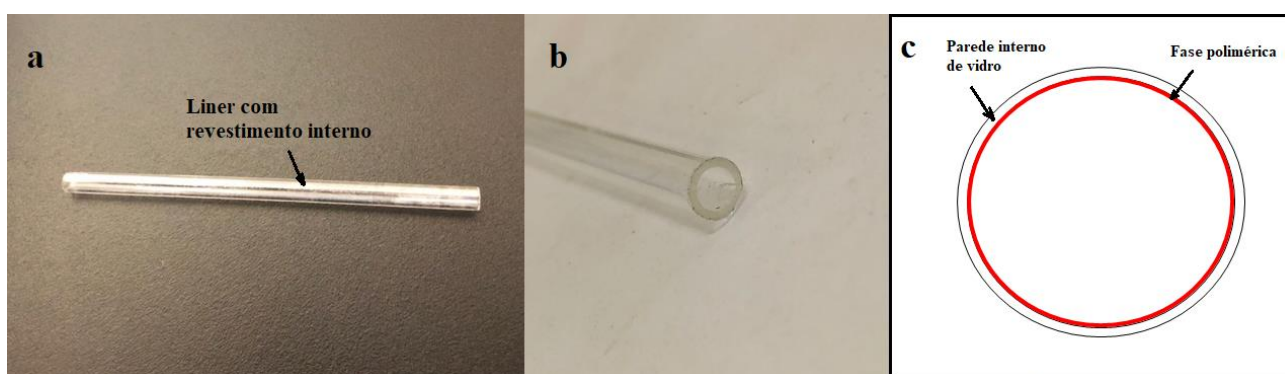
Figura 12 - Fotografia do dispositivo ACIT-SPME-GC com lâminas de vidros revestidas – Adaptado.[71]



Os dispositivos IT-SPME são avanços tecnológicos importantes para o preparo de amostra, porém, apresetam uma desvantagem: ambos dispositivos depois de inseridos no injetor não dessorviam totalmente os analitos na injeção na coluna, causando alargamento dos picos e até picos duplos. Isso ocorre devido a distribuição do polímero dentro do *liner*, já que das formas propostas não ocorre um aquecimento uniforme, impedindo a dessorção e vaporização dos analitos.[71]

Com isso, no ano de 2018 os pesquisadores do IntechLab (Laboratório de Ciências Integradas) desenvolveram uma nova configuração para o IT-SPME denominado IT-Flex.[5] Nessa nova apresentação o *liner* é revestido internamente com uma película de fase polimérica absorvente (Figura 13) para extração de compostos, podendo ser o PDMS ou poliacrilato. Dessa forma, o polímero extrator é distribuído uniformemente por toda a superfície do tubo de borossilicato, sendo assim, há um aumento da área superficial, consequentemente, maior disponibilidade de moléculas de PDMS, fazendo que haja um aumento considerável da capacidade extratora do *liner*. Outra vantagem é quanto a dessorção dos analitos. Como o polímero está distribuído igualmente na parede interna do tubo, na inserção do injetor toda fase polimérica é aquecida de forma uniforme, permitindo assim, dessorção completa dos analitos durante a injeção na coluna cromatográfica.

Figura 13 - Fotografia do dispositivo IT-FLEX, revestimento interno com PDMS. (a) Visão superior. (b) visão lateral. (c) diagrama da seção.



2.6 Validação de métodos analíticos

Após o desenvolvimento de um método analítico e que seu uso seja rotina em um laboratório com certificação adequada, é imprescindível que este esteja validado de

acordo com os órgãos responsáveis (Anvisa, INMETRO, ISSO, Programa Internacional de Controle de Drogas das Nações Unidas), mostrando dessa forma, que o método está conforme a legislação vigente, assim, garantindo comparabilidade, rastreabilidade e confiabilidade. Essa validação garante que o processo num todo (amostragem, análise e detecção) sempre esteja com a mesma qualidade, da mesma forma, e estar de acordo com os limites de tolerância, estabelecido pelos órgãos fiscalizadores. Métodos não validados e fora das especificações não são confiáveis, podendo prejudicar a confiabilidade dos métodos ou das instituições certificadas para a execução dos testes.[72]

Para validar um processo, sistema, metodologia ou equipamento são necessários uma série de certificações e documentos, e que englobe todos os processos desde a calibração de equipamentos, controle de qualidade conforme legislações, condições ambientais, aquisição de insumos e treinamento dos analistas. Para métodos que envolvem análises cromatográficas os parâmetros de validação analítica são a seletividade/especificidade, linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção, limite de quantificação e robustez.[73]

- Seletividade/especificidade: é o parâmetro do que garante que o sinal (picos cromatográficos) provenha apenas do analito de interesse, mesmo que haja outros componentes na amostra. É comum que seja feito todo procedimento com amostras branco, amostras enriquecidas com padrão do analito e padrões em diferentes concentrações.[74,75]
- Linearidade é a capacidade de uma metodologia analítica demonstrar que os sinais analíticos são diretamente proporcionais à concentração do analito, em intervalos específicos de concentração, podendo ser obtido por meio de padronização interna ou externa. Realizar ensaios com no mínimo cinco concentrações diferentes do composto de interesse em soluções preparadas, em triplicata no mínimo e, a partir dos cinco pontos deve realizar uma projeção gráfica em forma de reta.[74,75]
- Precisão: a precisão pode ser obtida de duas formas, repetitividade, quando são feitas análises sucessivas pelo o mesmo laboratório em intervalos de tempo (podendo ser dias ou semanas), e pela reprodutividade, que é quando ocorrem os mesmos resultados em diferentes laboratórios.[74,75]
- Exatidão: é aproximação dos valores entre resultados avaliados de forma individuais da análise em relação ao valor de referência, pode-se utilizar um

material de referência certificado, ensaios interlaboratoriais, ou por meio de ensaios de recuperação.[74,75]

- Limite de detecção (LD): é a menor concentração do analito, sendo determinado com base em condições experimentais estabelecidas. Na cromatografia, o limite de detecção é o sinal que é três vezes o ruído do equipamento.[74,75]
- Limite de quantificação (LQ): é a menor concentração do analito, sendo determinado com base em condições experimentais estabelecidas. Diferentemente do LD, o limite de quantificação é o sinal que é dez vezes o ruído do equipamento.[74,75]
- Robustez: a robustez é determinada com pequenas variações em condições analíticas. Em cromatografia gasosa, pode-se utilizar diferentes lotes de coluna, alterar temperatura do ambiente e modificar a velocidade de arraste.[74,75]
- Estabilidade: tem como finalidade garantir que a concentração da substância não sofra alterações, ou não há formação de novos artefatos, após períodos específicos de armazenamento. Na grande maioria dos estabilidade, são feitos ciclos congelamento e descongelamento.[74,75]
- Recuperação: é a quantidade de determinado analito, recuperado no processo, em relação à quantidade real presente na amostra. A recuperação é expressa como erro sistemático inerente ao processo.[74,75]

Para análise *antidoping* envolvendo esteroides anabolizantes andrógenos, a WADA sugere em seu código que sejam seguidas as especificações fornecidas pelo laboratório de ciência do Escritório das Nações Unidas sobre Crimes e Drogas (UNODC) no documento, “orientação para validação de metodologia analítica e calibração de equipamentos usados para teste de drogas ilícitas em apreensão materiais e espécimes biológicos”. Nesse documento especifica os parâmetros necessários para testes de triagem e comprovação. Para validação dos testes triagem são necessários: especificidade/seletividade, robustez e limite de detecção. Para testes de comprovação da dopagem são, especificidade/seletividade, limite de detecção, limite de quantificação, linearidade, precisão, inexatidão, recuperação e estabilidade.[75,76]

Existem na literatura inúmeros trabalhos que aplicam validação em *antidoping*, em diferentes matrizes, métodos de preparo e técnicas de separação e detecção.

Abushareeda e colaboradores (2017) [77] validaram métodos de cromatografia gasosa acoplado a espectrômetro de massas de alta resolução (comparando ToF com triplo quadrupolo) para análise de EAAs em urina. Strano-Rossi, Molaioni e Botrè (2005) [78] validaram SPME no preparo de amostras para determinação de estimulantes e narcóticos em urina. Gambelunghe *et al.* (2007) [79] desenvolveram uma nova metodologia em outra matriz, foi validado um método para análise de esteroides em cabelo, onde ocorre a digestão do cabelo e uma extração empregando SPE e análise em GC-MS/MS. Portanto, toda inovação ou mudança de metodologia deve ser submetido ao processo de validação, para garantir que seja adequado aos parâmetros de acordo com o código de dopagem.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Todos os equipamentos e vidrarias utilizadas para o desenvolvimento desse trabalho foram disponibilizados pelo laboratório IntechLab do Cefet-MG, e se encontram no prédio escolar do *Campus Nova Gameleira* do Cefet-MG em Belo Horizonte.

3.1 Preparo do IT-Flex para análise de esteroides

O preparo do *liner* para o processo de amostragem e pré-concentração foi dividido em: aquisição dos tubos de borossilicato (95,0 mm x 5,0 mm x 3,4 mm; vazado direto; *splitless*; R\$ 13,68) , lavagem em água Mili-Q® em ultrassonificação (lavadora ultrassônica L-220 da Schuster, com capacidade de 1,0 L e frequência de 20 kHz) por dois ciclos de 30 minutos e 50 °C. Após a lavagem, houve a secagem em estufa de secagem e esterilização (marca: Solab SL-100) por 5 horas, a massa dos tubos foram medidos e anotados. Posteriormente, houve o processo de extração do PDMS, revestimento dos tubos, secagem do tolueno residual e tratamento térmico do *liner*.

3.1.1 Extração do polidimetilsiloxano (PDMS)

A extração do polidimetilsiloxano (PDMS) ocorreu a partir do preparo de uma solução adicionando cerca de 5,0 g de um adesivo comercial de silicone (Silicone Acético Branco – Tekbond. Composição: Polidimetilsiloxano; Metiltriacetóxisilano; ácido acético; sílica; dimetilsiloxilano hidroxiterminado) em 25,0 mL de Tolueno P.A. (marca: Neon e lote: 49184), a mistura foi homogeneizada em agitador magnético durante quatro horas à temperatura ambiente e foi posteriormente centrifugada a 1500 rpm por 15 minutos. Após a decantação, o sobrenadante foi separado e uma fração da solução foi transferida em uma placa de Petri, para obtenção de um filme, que após o tratamento térmico foi levado para caracterização. O restante da solução foi levado em um béquer para estufa, onde ficou três horas à 100 °C, onde houve redução da metade do volume da solução.

3.1.2 Análise termogravimétrica

A análise termogravimétrica foi realizada no Laboratório de Caracterização de Materiais no *Campus* Nova Gameleira do Cefet-MG, no equipamento Shimadzu DTG-60H nas seguintes condições, massa: 10 mg; gás: nitrogênio; vazão: 50 mL/min; taxa de aquecimento: 10 °C/min; temperatura inicial: 25 °C; temperatura final: 900 °C.

3.1.3 Espectroscopia na região do infravermelho

A análise espectroscópica na região do infravermelho foi realizada no Laboratório de Caracterização de Materiais no *Campus* Nova Gameleira do Cefet-MG, no equipamento da Shimadzu Corporation, modelo IRPrestige-21, com transformada de Fourier FTIR-8400S e acessório ATR, nas seguintes condições, preparo de amostra: reflectância total atenuada (ATR); e faixa de trabalho 4000 – 400 cm^{-1} .

3.1.4 Revestimento do *liner* e tratamento térmico

Devido ao design do *liner* utilizado no cromatógrafo da Shimadzu resulta em um volume menor que o *liner* da Agilent, portanto, foram usados 100 μL da solução de PDMS para o revestimento (em trabalhos anteriores, com *liner* da Agilent eram utilizados 200 μL) [80]. Os 100 μL foram transferidos para o interior do tubo de borossilicato que foi posicionado no protótipo desenvolvido pelos pesquisadores do IntechLab para rotação do *liner* e garantir uniformidade do filme (Figura 14). Após 10 minutos de rotação, foi usado um soprador de calor auxiliar na secagem do filme durante 10 minutos.

Figura 14 - Fotografia do protótipo de secagem do *liner*.



Após a secagem do filme, o tubo revestido foi levado a estufa a 80 °C por 12 horas. Posteriormente, o *liner* foi levado a mufla (GP Científica) a 280°C por cinco horas, para garantir a degradação dos compostos residuais da cola e vaporização total do tolueno.[80]

3.1.5 Avaliação da espessura do filme interno do *liner*

Para identificar a espessura do polímero no *liner*, foi utilizado um Microscópio Digital Labomed CxRIII *Research Grade Laboratory* (número de série: 033490M) da marca *Microscope*, com ampliação de 10 vezes. Foram feitos cortes nas extremidades e no meio do *liner*, a fim, de garantir que a espessura do filme fosse igual em toda extensão do tubo de borossilicato.

3.2 Preparo de solução estoque de testosterona

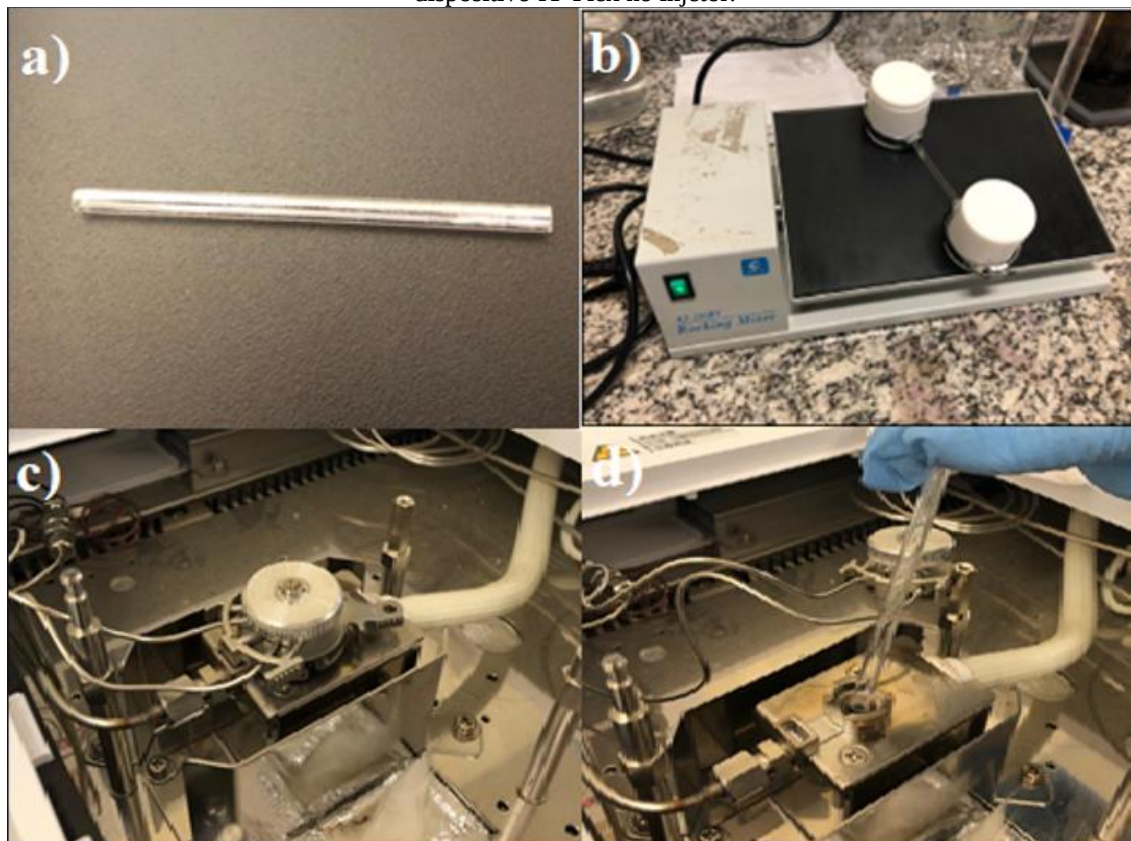
A solução estoque foi preparada a partir de padrão líquido, fornecido pela Polícia Federal de Minas Gerais, de mistura de ésteres testosteronas, fempropionato de testosterona (TPh), isocaproato de testosterona (TI) e decanoato de testosterona (TD). Foi preparada a solução estoque com a transferência de 100 µL da solução padrão para um balão volumétrico de 100,0 mL em tetraidrofurano HPLC, a fim de garantir a solubilização do padrão de testosteronas e facilitar a homogeneização em água. A solução foi transferida em um frasco de vidro âmbar e hermeticamente fechada. As demais soluções foram preparadas a partir dessa solução, porém, em matriz aquosa (água Mili-Q®).

3.3 Otimização do parâmetro da técnica de extração e pré-concentração IT-SPME

A técnica IT-SPME foi aplicada diretamente a amostra, portanto, o parâmetro para otimização é o tempo de contato da matriz aquosa com a fase extratora. Foram colocados 25,0 mL da solução (TI: 120 ppb; TPh: 120 ppb; TD: 200 ppb) no amostrador (Figura 15 - b), esse volume foi escolhido para garantir preenchimento total durante a etapa de extração, e foram testados os tempos de 2,5; 5; 10; 15; 20 e 25 min. Após o tempo de extração ser atingido, o *liner* foi secado com auxílio de um compressor de gás de baixa pressão por 10 segundos e em seguida foi inserido no injetor do cromatógrafo

(Figura 15 – d), já na temperatura de injeção (330 °C), para dessorção dos esteroides e injeção na coluna cromatográfica.

Figura 15 – Etapas de amostragem e injeção no cromatógrafo gasoso; a) câmara de injeção (*liner*); b) amostrador para extração IT-SPME por imersão; c) injetor do cromatógrafo gasoso; d) inserção do dispositivo IT-Flex no injetor.



3.4 Avaliação da equivalência dos *liners* produzidos

Foram medidas as massas de dois *liners* antes do processo de revestimento e posteriormente o tratamento térmico na mufla, e posteriormente, foram medidas as massas novamente para comparação das massas depositadas. Para avaliar a capacidade extratora utilizou-se uma solução de 60 ppb dos esteroides, foram realizadas triplicatas para cada *liner* para avaliar a equivalência dos dispositivos através do teste T, para média, e teste F para variância.

3.5 Análise cromatográfica GC-BID, GC-FID e GC-MS

Para validação de método em GC-BID foi utilizado cromatógrafo gasoso Shimadzu Nexis-2030 contendo coluna capilar de sílica fundida HP-5MS (5% difenil e

95% polidimetilsiloxano), de 30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 μm de espessura do filme e com detector BID. As condições definidas para a realização das análises cromatográfica foram as seguintes: hélio como gás de arraste, com velocidade linear 43,2 cm s^{-1} por 12,10 minutos, aumento da velocidade de 40 $\text{cm s}^{-1} \text{min}^{-1}$ até 86,4 cm s^{-1} por 2,82 minutos; temperatura do injetor de 330 °C, modo de injeção *splitless*, com pressão extra de injeção de 400 kPa, fluxo de coluna de 1,77 mL min^{-1} ; aquecimento com temperatura programada inicial de 200 °C por 1 min, aumento de 30 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$ até 270 °C por 5 min, aquecimento de 10 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$ até 290 °C por 1 min e finalizando 40 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$ até 310 °C por 4,17 min; detector BID ajustado com fluxo de hélio 50 mL min^{-1} e temperatura do plasma de 320 °C; para o detector FID ajustado com fluxo de hidrogênio 32 mL min^{-1} e fluxo de ar sintético 200 mL min^{-1} , com nitrogênio como gás de *make-up* com fluxo 24 mL min^{-1} , e temperatura da chama de 320 °C.

Para identificação das testosteronas foi aplicado o método de Kovats, segundo o qual, houve injeção de uma mistura de alcanos C7 até C30 (Sigma-Aldrich, 49451-U, lote: LRAC7901) nas condições cromatográficas de análise, possibilitando a comparação do Kovats calculado com Kovats teóricos. Para confirmação foi utilizado o cromatógrafo gasoso Agilent Technologie/Modelo: 7890B, acoplado ao detector de massas (Agilent Technologies 5977B inert MSD Triple-Axis Detector) no modo *full scan*, contendo coluna capilar de sílica fundida HP-5MS (5% difenil e 95% polidimetilsiloxano), de 30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 μm de espessura do filme. As condições definidas para a realização das análises cromatográfica foram as seguintes: hélio como gás de arraste, com velocidade linear 43,2 cm s^{-1} por 12,10 minutos, aumento da velocidade de 40 $\text{cm s}^{-1} \text{min}^{-1}$ até 86,4 cm s^{-1} por 2,82 minutos; temperatura do injetor de 330 °C, modo de injeção *splitless*, com pressão extra de injeção de 400 kPa, fluxo de coluna de 1,77 mL min^{-1} ; aquecimento com temperatura programada inicial de 200 °C por 1 min, aumento de 30 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$ até 270 °C por 5 min, aquecimento de 10 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$ até 290 °C por 1 min e finalizando 40 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$ até 310 °C por 4,17 min.

3.6 Comparação GC-BID X GC-FID e parâmetros de validação analítica

Para avaliar a performance do GC-BID e GC-FID utilizou-se uma solução de 120 ppb dos esteroides, em que foram realizadas triplicatas para cada técnica, e essa comparação se deu através do teste T, para média, e teste F para variância. A validação

dos métodos para análise GC-BID e GC-FID seguiu os critérios definidos no “Guia para validação de métodos analíticos” e “*Bioanalytical methods validation for human studies*”. Os parâmetros avaliados foram: especificidade/seletividade, limite de detecção, limite de quantificação, linearidade, precisão, inexatidão, recuperação e estabilidade.

3.6.1 Seletividade

Para avaliar seletividade dos métodos, comparou-se os cromatogramas de análises de padrão em água Mili-Q®, amostras de referência obtidas pela adição de padrões de esteroides anabolizante em urina obtida de criança com idade inferior a 03 anos de vida e amostra de urina sem adição de padrão.

3.6.2 Limite de detecção (LD) e quantificação (LQ) instrumental

Inicialmente, foram realizadas 10 extrações em urina para o cálculo da altura média do ruído do BID e do FID. O limite de detecção foi determinado através de diluições sucessivas das soluções enriquecidas com padrões até o sinal dos analitos chegarem ao valor três vezes maiores que o ruído do equipamento. Para o limite de quantificação, foram realizadas diluições sucessivas das soluções enriquecidas com padrões até o sinal dos analitos chegarem ao valor 10 vezes maiores que o ruído do equipamento.

3.6.3 Linearidade

Sendo relação entre a resposta do equipamento cromatográfico e a concentração padrões, foram realizadas 3 replicatas das soluções padrão em urina nas concentrações de 20, 40, 60, 80, 100 ppb, obtendo uma regressão linear. Também foram realizados testes estatísticos de resíduos e heteroscedasticidade.

3.6.4 Precisão e inexatidão

Para avaliar a precisão foram realizadas seis réplicas no mesmo dia (para avaliação de teste intra), de soluções de baixa concentração (SBC) 3 ppb, para o BID, e 15 ppb, para o FID, solução de média concentração (SMC) 30 ppb e solução de alta

concentração (SAC) 90 ppb. Os ensaios foram repetidos em dias diferentes em um período de três semanas (para avaliação de teste inter). A inexatidão intra e inter ensaios foi avaliada comparando os valores reais de concentração com os valores determinados pela curva de linearidade, para esse teste foram utilizados soluções 30, 60 e 90 ppb.

3.6.5 Recuperação

Para o teste de recuperação, inicialmente foram analisados padrões de esteroides em urina com 60 ppb de concentração. Posteriormente, foram adicionados quantidade específica de padrões para que as soluções tivessem concentrações de 70, 80 e 90 ppb. As soluções enriquecidas foram submetidas a etapa de extração e análise cromatográfica. Logo após, a recuperação foi avaliada através da comparação entre as razões de áreas das amostras enriquecidas com as amostras de 60 ppb de concentração.

3.6.6 Estabilidade

A estabilidade foi avaliada realizando triplicatas de soluções onde foram adicionados padrões de esteroides anabólicos para uma concentração 30 ppb. Foram analisadas em cromatografia gasosa nas amostras: logo após o preparo, um dia em temperatura ambiente, quatro dias as -20°C e depois de três ciclos de congelamento.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

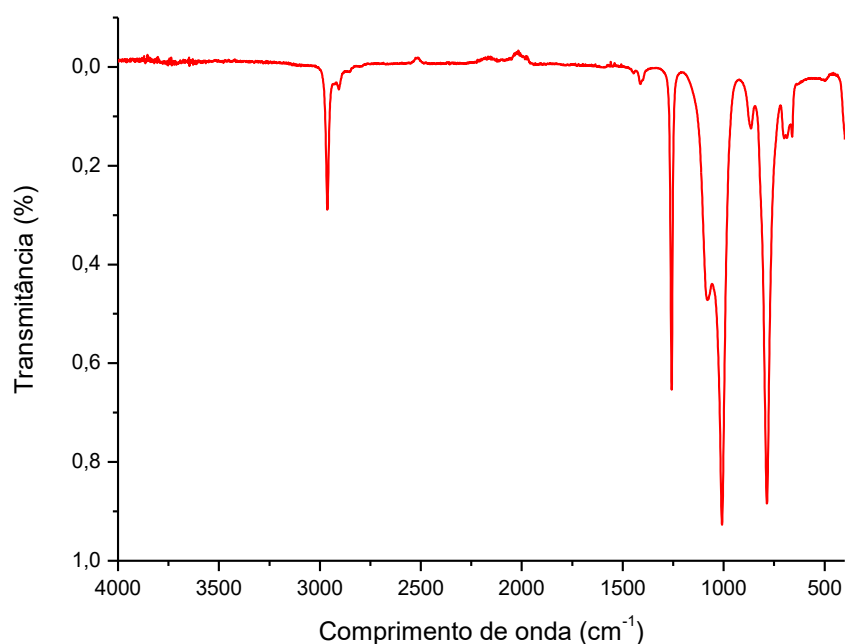
Esse capítulo do presente trabalho serão apresentados todos os resultados observados durante o projeto. Nas próximas páginas serão apresentados: caracterização do PDMS como fase polimérica extratora do IT-SPME, avaliação dos dispositivos produzidos, além do resultado do desenvolvimento do método cromatográfico e a proposta da atuação para o *liner* para teste *antidoping*, atribuindo a essa técnica um potencial no desenvolvimento e validação analítica.

4.1 Caracterização da fase polimérica extratora

Antes de preparar o revestimento dos dispositivos em tubo com a fase polimérica, foram realizados testes de caracterização a fim de garantir a presença do PDMS no extrato da cola comercial. A análise de espectroscópica na região do infravermelho foi realizada com intuito de verificar a presença dos grupos funcionais do polímero. Na análise termogravimétrica foi possível observar a temperatura de degradação, garantindo uma temperatura segura trabalho no injetor do cromatógrafo, sem que houvesse interferência na qualidade do revestimento *liner*. Na Figura 18 é apresentado o espectro do filme de PDMS. No banco de dados do NIST não há padrão de referência de espectro de absorção no infravermelho do PDMS. Por isso a identificação das principais bandas foi feita por meio de comparação com espectros da literatura.

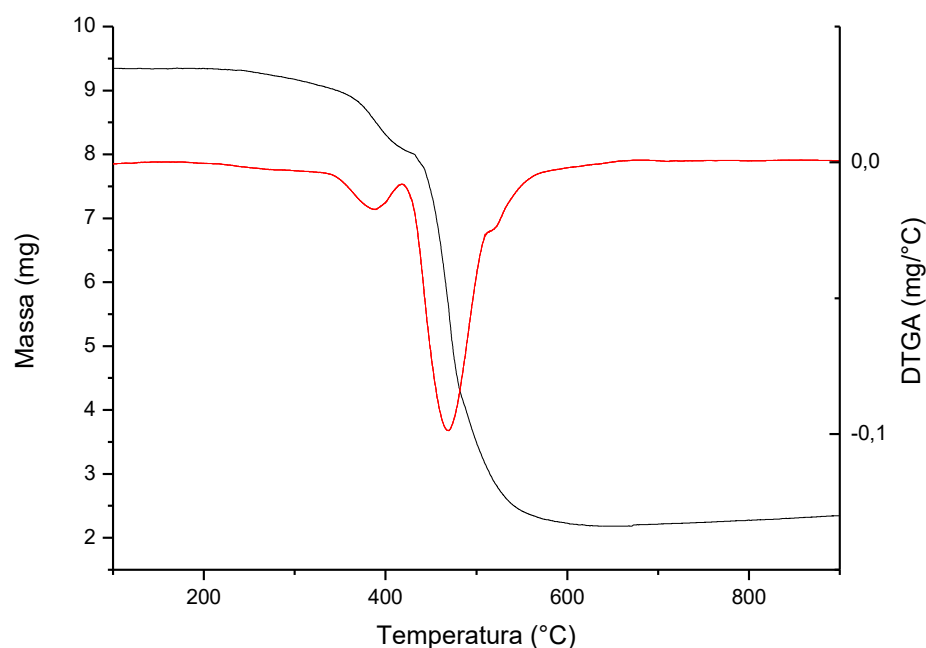
Os comprimentos de onda característicos do polidimetilsiloxano são as seguintes vibrações: as bandas de absorção em torno de 1200, 1080 e 802 cm^{-1} são referentes as vibrações das ligações com o silício do PDMS. A banda em 1200 cm^{-1} refere-se à vibração de deformação angulares simétrica C – H na ligação com Si – CH₃. A banda de 1080 cm^{-1} é causada ao estiramento assimétrico Si – O – Si. Por fim, a banda em 802 cm^{-1} indica o estiramento da ligação Si – CH. As bandas em torno de 2960 a 2850 cm^{-1} são causadas pelas vibrações axiais assimétrica dos átomos de hidrogênio ligados aos carbonos. [81–83]

Figura 16 - Espectro de absorção no infravermelho do filme de PDMS.



Na análise termogravimétrica da solução de PDMS em tolueno (Figura 17) é possível observar uma única perda de massa no filme polimérico após o tratamento térmico. Na Figura 19 é possível observar pela 1ª derivada (DTGA) que existem duas perdas de massas, a primeira com início em torno de 400 °C e segunda perda em 420 °C. A perda em torno de 400°C caracteriza o início da degradação oxidativa do PDMS, tal temperatura. A perda em 420 °C caracteriza a degradação completa do PDMS até o núcleo de sílica. Tais temperaturas foram observadas por Zhang em colaboradores (2017) [84] em estudos de modificação de estrutura polimérica. Desta forma, foi possível garantir a presença única do PDMS após o tratamento térmico e a qualidade do amostrador na injeção no cromatógrafo a temperatura de 330°C.

Figura 17 - Análise termogravimétrica do filme polimérico de PDMS.



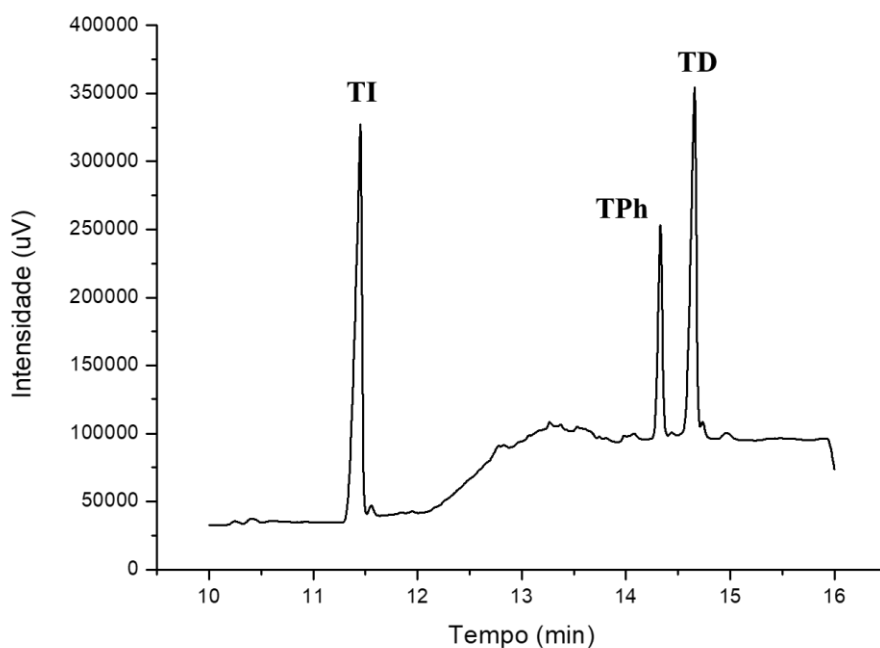
4.2 Perfil cromatográfico e identificação dos esteroides anabolizantes andrógenos

Em relação à análise cromatográfica, buscou-se desenvolver um método em que houvesse melhor resolução entre os compostos, definição dos picos cromatográficos e tempo de análise condizentes com a literatura e testes de *doping*. O método final consistiu em 16,00 minutos para eluição dos esteroides. Além da programação de temperatura que é empregada normalmente, foi também utilizada a opção fornecida pelo cromatógrafo, *high pressure injection*, onde foi adicionada uma pressão extra de 400 kPa por um minuto, esse artifício auxiliou na eluição mais rápida dos compostos, na definição dos picos e garantiu a injeção de todos os compostos depois da dessorção da fase polimérica.

É apresentado na Figura 18, o exemplo de um cromatograma padrão das três testosteronas em estudo. Durante o desenvolvimento do método cromatográfico, buscou-se a separação dos picos cromatográficos, evitando sobreposição de picos e até co-eluição das substâncias. A análise cromatográfica procurou uma resolução ($R = [2 \times (tr_{analito\ b} - tr_{analito\ a})] / (W_a + W_b)$) entre os picos igual ou superior a 1,5, que de acordo com as teorias cromatográficas garante a separação entre os compostos.[85] Com isso, a resolução entre o primeiro e segundo picos foi igual a 14,89, entre o segundo

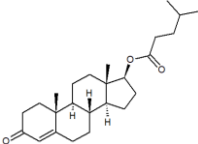
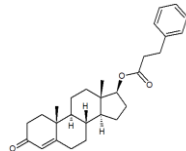
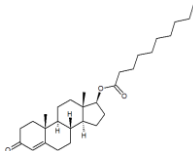
e terceiro foi de 2,02, portanto no método aplicado foi possível obter total separação entre os ésteres de testosteronas.

Figura 18 - Cromatograma das testosteronas obtido com o método desenvolvido por meio da análise GC-BID.



Foi realizada análise em GC-MS para identificação das testosteronas no espectrômetro de massas, avaliando a similaridade dos espectros obtidos (podem ser encontrados em ANEXOS na pág. 64) com a biblioteca do equipamento, além de comparar os íons com maior abundância com a literatura. Também foi considerado o índice de retenção pela expressão de Krats dos esteroides para garantir a ordem de eluição dos compostos, em teoria quanto menor o índice (em colunas apolares) menor o tempo de retenção, ou seja, eluição mais rápida. Também foi realizado o cálculo do erro do índice de retenção para confirmação da identidade das testosteronas, erros menores 3,00% entre os índices calculado e teórico são aceitáveis. Na Tabela 3, foram ordenados os resultados cromatográficos e da espectrometria de massas, além de confirmar a eluição das testosteronas em colunas apolares, com erros menores que 0,5 %, como a que foi utilizada neste trabalho.

Tabela 3 - Testosteronas em estudo e com suas respectivas estruturas, tempos de retenção, íons monitorados, Kovats teóricos e calculados e erro do Kovats.

Esteroides Anabolizante	Sigla	Estrutura	TR (min)	Íons monitorados (m/z)	IRT	IRC	EIR(%)
Isocaproato de Testosterona	TI		11,362	147; 124; 81	2612	2617	0,19
Fempropionato de Testosterona	TPh		14,283	271; 105; 91	3051	3037	0,46
Decanoato de Testosterona	TD		14,568	155; 147; 124	3074	3072	0,07

TR – Tempo de Retenção; IRT – Índice de Retenção Teórico; IRC – Índice de Retenção Calculado; EIR – Erro do Índice de Retenção.

O perfil cromatográfico segue o esperado de acordo com os valores de Kovats, tendo os tempos de retenção de 11,362; 14,283 e 14,568 minutos, sendo respectivamente o, isocaproato de testosterona, fempropionato de testosterona e o decanoato de testosterona. Essa ordem de eluição das testosteronas em cromatografia gasosa também foi observado na literatura em trabalhos com anabolizantes de Neves e Caldas (2017) e Van Thuyne e Delbeke (2004).[86,87] Para a identificação dos compostos por espectro de massas foi considerado que a similaridade mínima com a biblioteca do equipamento deveria ser no mínimo 40%. No estudo dos espectros de massas dessas testosteronas, trabalhos de la Torre *et. al* (1995) e Gaillard *et. al* (1999) encontraram os mesmos fragmentos listados na tabela 3.[88,89]

4.3 Avaliação da montagem e do revestimento dos dispositivos

A montagem dos dispositivos IT-Flex com revestimento polimérico a partir de um adesivo comercial foi uma alternativa barata, efetiva e comercialmente interessante,

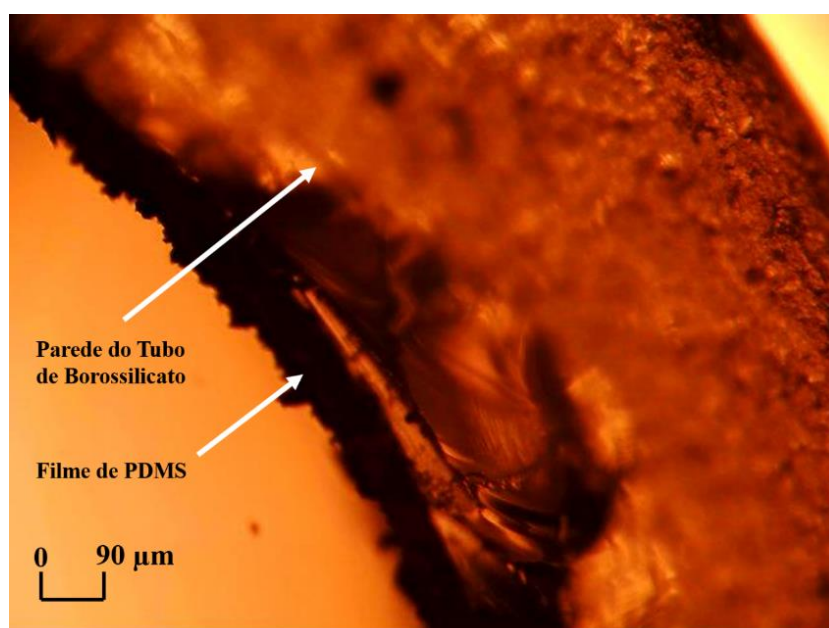
com custo de produção por dispositivo de R\$ 22,80 (Tabela 4). O dispositivo foi de simples montagem, sendo que utilizou solvente comum em laboratórios químicos; adesivo de silicone já consolidado no mercado; e fácil acesso aos tubos de borossilicatos com o design necessário. O *liner* revestido é dispositivo mais barato que as fibras de SPME que estão no mercado atualmente, fibras de PDMS comercializadas pela Sigma-Aldrich, por exemplo, podem chegar a valores de R\$ 4200. [90]

Tabela 4 - Gasto para produção do dispositivo IT-Flex.

Material	Valor do material (R\$)	Quantidade gasta	Valor total (R\$)
Tubo de borossilicato	12,00/unidade	Unidade	13,68
Adesivo comercial	9,50/50 g	5 g	0,95
Tolueno	327,00/Litro	25 mL	8,18
Total			22,80

Para verificação da espessura do filme polimérico, foi obtido uma foto com o microscópio de bancada (Figura 19) após o tratamento térmico. Verificou-se que a espessura do filme era de aproximadamente de 80 μm . Esse valor está de acordo com o as espessuras das fibras de SPME que variam de 7 a 100 μm . [90]

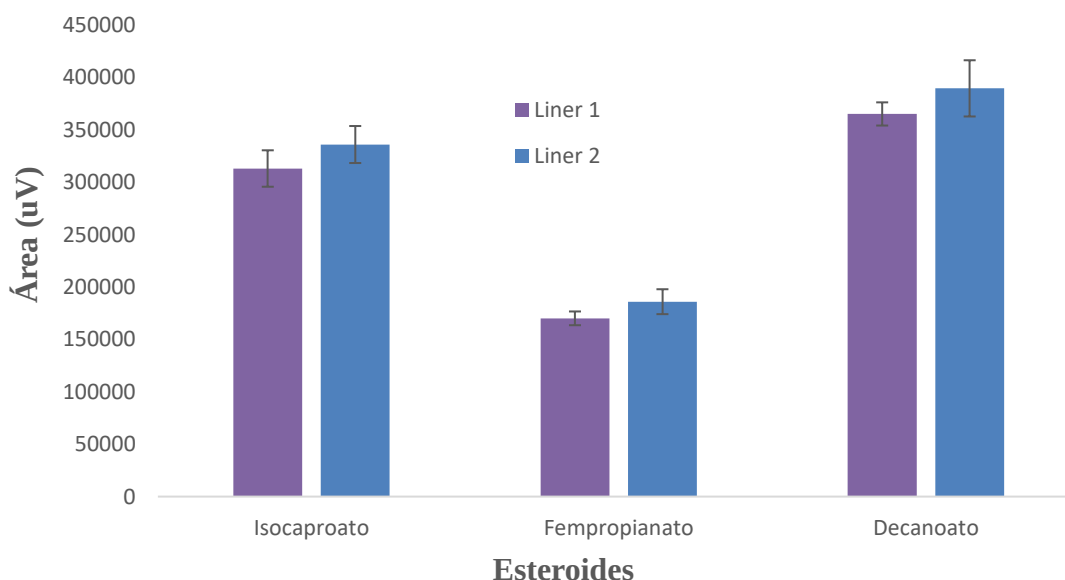
Figura 19 - Imagem da espessura do filme de PDMS no *liner*.



A fim de avaliar o processo de revestimento, foram comparados dois dispositivos preparados. Foi comparado a massa depositada de PDMS e sua ação extratora. Essa etapa do trabalho teve como objetivo verificar a equivalência dos *liners* como dispositivos de pré-concentração e extração. Em relação a massa depositada, ambos *liners* tiveram resultados próximos, o primeiro teve 25 mg e o segundo teve 23 mg de PDMS depositado. E também pode-se dizer que os dispositivos não perderam sua capacidade de extração durante o trabalho, já que foram realizadas mais de 300 injeções e manteve-se a qualidade das análises.

Para comparar a ação extratora dos dispositivos, comparou-se graficamente os resultados das triplicatas da amostragem com cada *liner*. Na Figura 20 é possível perceber que intensidade da média das triplicatas dos sinais dos esteroides tem valores próximos, porém, não iguais, isso pode ter acontecido devido à distribuição do PDMS na parede interna do *liner*, onde pode ter influenciado na extração e dessorção dos analitos. Ambos *liners* também apresentam intervalos de desvios visualmente semelhantes de intervalo. Portanto, havia indícios que os dois dispositivos apresentam ação extratora e de pré-concentração equivalentes.

Figura 20 - Comparativo dos *liners* em relação às testosteronas.



Para confirmar as hipóteses de equivalência entre os *liners*, foram realizados testes estatísticos para verificar a semelhança entre os amostradores. Foi feito teste T para

verificação da semelhança estatística das médias e o teste F para semelhança de variâncias para o comportamento de cada testosterona. Para os dois testes, se o resultado final fosse maior que 0,05 pode-se afirmar a semelhança estatística entre os dispositivos. Na tabela 5 é apresentado os resultados que confirmam que, mesmo com massas de PDMS depositadas diferentes, os *liners* tem ação extratora estatisticamente semelhante, portanto, podem ser usados para obtenção de mesmos resultados nas análises.

Tabela 5 - Resultados dos testes estatísticos para média e variância (n = 3).

Esteroides Anabolizante	Teste T	p-value (T) > 0,05	Teste F	p-value (F) > 0,05
Isocaproato de Testosterona	0,4923	Possuem média semelhantes	0,1844	Possuem variâncias semelhantes
Fempropionato de Testosterona	0,2336	Possuem média semelhantes	0,1129	Possuem variâncias semelhantes
Decanoato de Testosterona	0,1451	Possuem média semelhantes	0,2186	Possuem variâncias semelhantes

4.4 Estudo da cinética da absorção de extração da fase polimérica

O método de preparo de amostras depende de princípios fundamentais dos equilíbrios termodinâmicos dos analitos entre a fase extratora e a amostra. Sendo assim, para a validação do método proposto e para fornecer resultados satisfatórios, foi necessário determinar o tempo ótimo de extração no IT-SPME, ou seja, o tempo que houve um equilíbrio na curva de extração das testosteronas.

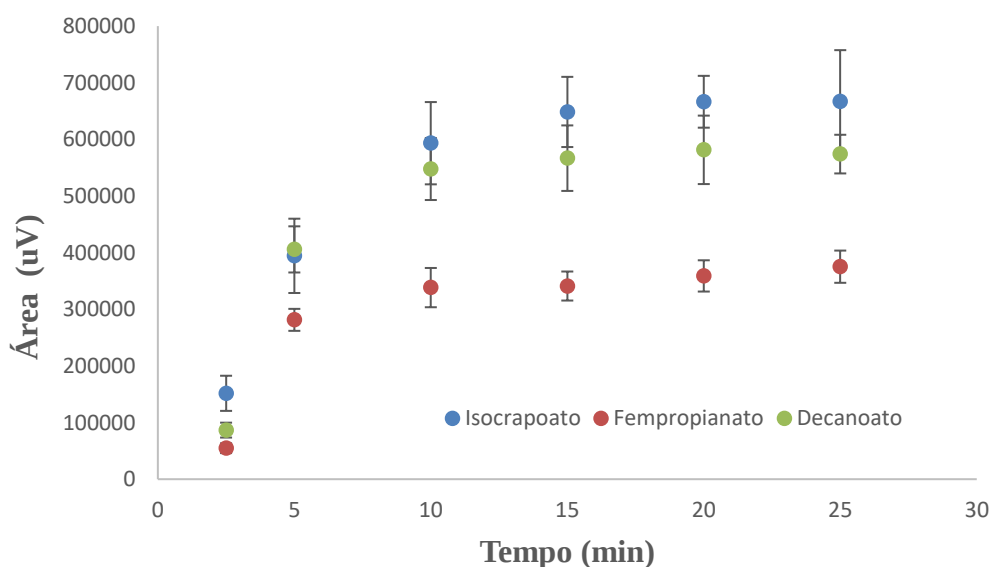
Foram testados tempos de fluxo de 2,5; 5; 10; 15; 20 e 25 minutos, em triplicata, até encontrar o tempo mínimo necessário para o equilíbrio ser alcançado. É mostrado na Figura 21 as curvas cinéticas de extração dos esteroides. Pode-se observar que para as três curvas há o equilíbrio a partir dos 15 minutos de contato da solução com a fase extratora, portanto, 20 minutos foi o tempo escolhido para garantir a extração dos analitos em estudos.

Existe dificuldade para comparação desse tempo com a literatura, já que equilíbrio depende da natureza do analito, do sorvente e da matriz a ser analisada. Mas

existem trabalhos que empregam fibras de SPME de diferentes fases poliméricas para extração de esteroides anabolizantes. Carpinteiro e colaboradores (2004), por exemplo, usam fibras de poliacrilato, PDMS e misturas de PDMS-DVB para esse tipo de análise, onde o tempo de extração é de 40 minutos. Chopra *et. al* (2014) empregam também fibra de PDMS-DVB, imergindo-a na solução, que alcançam tempo de extração de 60 minutos.[91,92]

Quando comparado o tempo de extração determinado no neste trabalho, percebe-se uma redução de 50 a 75% no tempo do preparo da amostra, sendo uma vantagem em métodos analíticos, podendo resultar um número maior de análises. Outra vantagem obtida pela extração empregando o *liner* em relação as demais metodologias apresentadas na literatura é a dispensabilidade da adição de sais, ajuste de pH ou processo de derivatização para extração, preparos que são essenciais nos principais trabalhos envolvendo anabolizantes.

Figura 21 - Gráfico exemplificando o teste da cinética de extração dos liners para testosteronas.

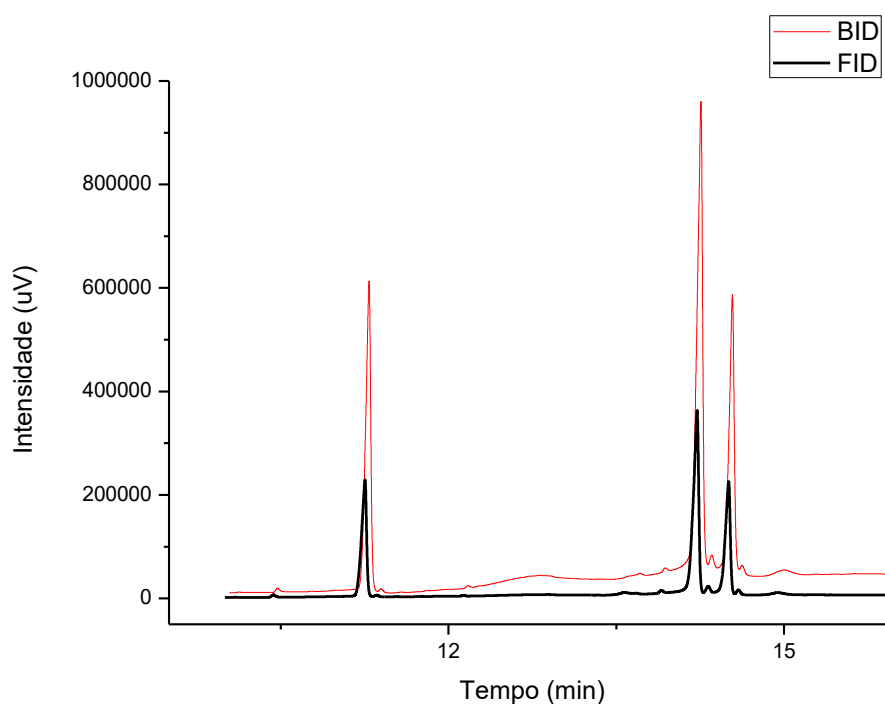


Pode ser observado que houve alta repetibilidade e baixa variação dos valores, esse sendo uma questão que possivelmente pode ter sido resolvida de trabalhos anteriores. Anteriormente, após a extração havia excesso da amostra nas gotículas residuais da solução aquosa no interior do *liner*. Com auxílio de um compressor de gás de baixa pressão foi possível retirar as gotículas em excesso, permitindo a injeção do *liner* no injetor do GC praticamente seco.[80,93–95]

4.5 Comparação GC-BID X GC-FID

A fim de avaliar a performance dos dois detectores disponíveis, BID e FID, foram realizadas injeções dos esteroides nas mesmas condições cromatográficas para as duas técnicas. Devido a universalidade e alta sensibilidade aos compostos fornecida pelo BID, teoricamente estaria em vantagem ao FID, porém, devido a estrutura das testosteronas (presença de muitos carbonos, 26 a 29 átomos de carbonos na estrutura) o FID se torna um candidato a análise de *antidoping*. São mostrados na Figura 22, os cromatogramas obtidos em análise com o detector BID e FID nas mesmas condições e mesmas concentrações dos analitos.

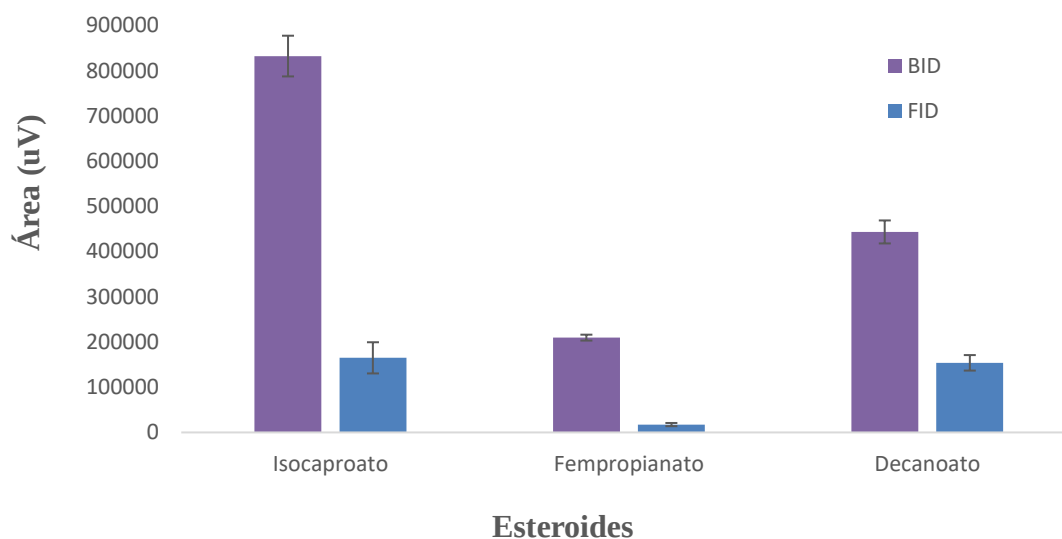
Figura 22 - Cromatogramas obtidos em análise com detector BID e FID.



Visualmente percebe-se maior sensibilidade do BID em comparação ao FID. Para garantir essa observação e comparar a detectabilidade das técnicas, comparou-se graficamente os resultados das triplicatas da amostragem com *liner* para o BID e FID. Na Figura 23 é possível perceber que intensidade da média das triplicatas dos sinais dos esteroides no BID são realmente altos em relação ao FID, reforçando o que foi visualizado na Figura 24. Também, ambos detectores apresentam intervalos de desvios visualmente

semelhantes, portanto, há indícios que as duas técnicas respondem bem ao dispositivo IT-Flex.

Figura 23 - Comparativo dos detectores em relação às testosteronas.



Para confirmar as hipóteses levantadas anteriormente, foram realizados testes estatísticos para verificar a semelhança entre os detectores. Na tabela 6 são apresentados os resultados que confirmam que, o BID e FID tem performance diferentes (médias diferentes) e que o BID tem maior sensibilidade. E também, as duas técnicas obtiveram variâncias iguais, confirmando a estabilidade da detecção e a boa resposta ao dispositivo de extração IT-Flex.

Tabela 6 - Resultados dos testes estatísticos para média e variância (n = 3).

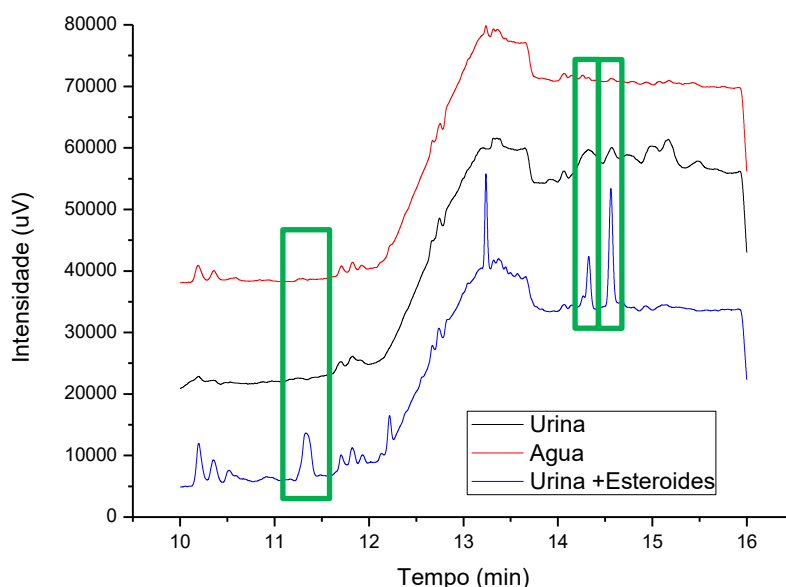
Esteroides Anabolizante	Teste T	<i>p-value</i> (T) > 0,05	Teste F	<i>p-value</i> (F) > 0,05
Isocaproato de Testosterona	$3,315 \times 10^{-5}$	Possuem média diferentes	0,3761	Possuem variâncias semelhantes
Fempropionato de Testosterona	$1,4629 \times 10^{-6}$	Possuem média diferentes	0,2266	Possuem variâncias semelhantes
Decanoato de Testosterona	$8,1626 \times 10^{-5}$	Possuem média diferentes	0,3121	Possuem variâncias semelhantes

4.5.1 Validação Analítica

Foi realizada a análise, por GC-BID, das soluções de urina de recém nascidos (menos interferentes quanto alimentação e medicamentos) enriquecidas com esteroides. A matriz da urina permitiu a detecção e a quantificação de substâncias anabolizantes em todas as amostras. Também foi possível determinar uma faixa linear de trabalho, além de avaliar a robustez do método através da precisão, inexatidão, estabilidade e recuperação.

O primeiro parâmetro da validação analítica realizado foi a seletividade de todo método, ou seja, provar que não há compostos, impureza ou outros fatores que possam influenciar na integração dos picos cromatográficos, consequentemente, para que não haja influência na quantificação e detecção das testosteronas. Na figura 24, são comparados os cromatogramas da água Mili-Q®, urina e esteroides. Nessa comparação foi percebido que não há picos nos cromatogramas, referente a urina e água, nos mesmos tempos de retenção das testosteronas, garantindo que não há interferências significativas na eluição dos compostos.

Figura 24 - Comparativo a fim de avaliar seletividade do método.



Foi observado um pico cromatográfico em torno de 13,00 minutos, pico com intensidade relativamente elevada, possivelmente era referente alguma contaminação do processo. Garantida a seletividade do método, foi determinado posteriormente os limites

de detecção e quantificação. Tais parâmetros foram possíveis de alcançar através de diluições sucessivas até valores de altura de pico três vezes maiores do ruído para LD e 10 vezes maiores para LQ [74,75]. Foram ordenados na Tabela 7 os valores de limites encontrados com amostragem utilizada no trabalho.

Tabela 7 - Limites de detecção e quantificação das testosteronas avaliadas.

Esteroides Anabolizante	Limite de detecção (ppb)		Limite de quantificação (ppb)	
	BID	FID	BID	FID
Isocaproato de Testosterona	0,5	1,2	1,0	3,0
Fempropionato de Testosterona	0,5	1,2	1,0	3,0
Decanoato de Testosterona	0,8	2,0	1,5	5,0

Houve diferenças nos limites de LD e LQ para os dois detectores, sendo que no BID os valores foram inferiores aos encontrados no FID. Os baixos valores de concentração encontrados de limites apresentam uma vantagem da metodologia nas análises *antidoping*. Segundo Forsdahl e colaboradores (2015) [96] apresentaram em seu trabalho que essas concentrações são observadas em usuários de Durasteston® após 22 dias, ou seja, há um aumento do intervalo para detecção após a injeção do medicamento (Figura 25). Da mesma forma, na literatura são encontrados limites semelhantes, há também limites menores, contudo, empregam etapas de derivação, adição de TMS na estrutura e uso de espectrômetros de massas. Como pode ser observado na Tabela 8, os limites que são menores dos encontrados no trabalho são aqueles que usam analisadores de massa de complexos, como o ToF (*time of fly*) e o triplo quadrupolo. Mas no geral, a aplicação do IT-SPME com BID e FID como detectores apresentaram resultados próximo ou até melhores aos de SPME e MS, comprovando que a metodologia aplicada pode ser uma alternativa possível e barata (em relação ao espectrômetro de massas) para testes de *doping*.

Figura 25 - Concentração dos ésteres de testosteronas subsequente a injeção intramuscular – Adaptado. [96]

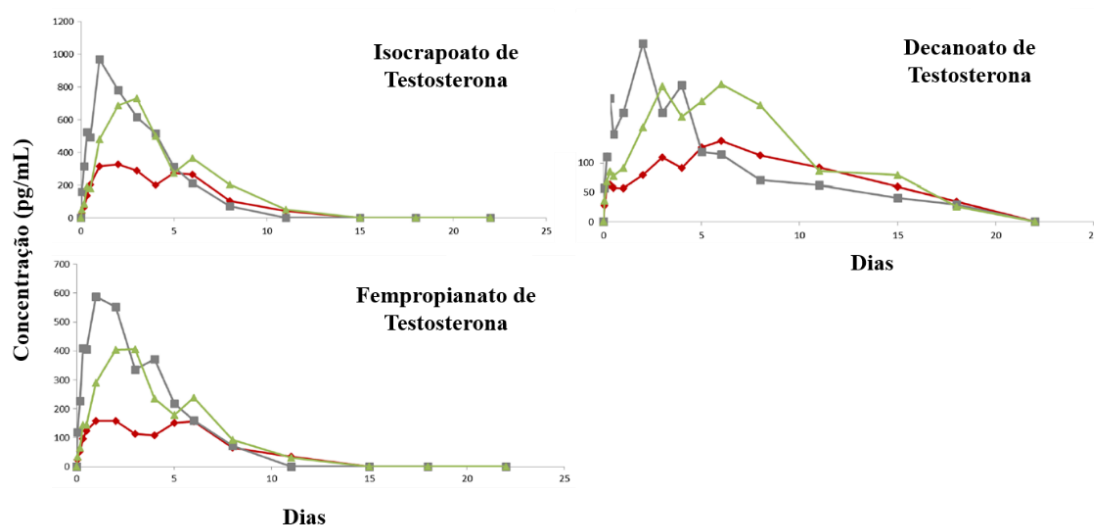


Tabela 8 - Detalhes de trabalhos com análises de testosteronas.

Autores	LD	LQ	Preparo da amostra	Instrumentação	Referência
Castilho e Nascimento (2003)	0,5 ppb	1 ppb	Hidrolise enzimática e derivação com TMS, extração com SPME	GC/MS, quadrupolo como analisador de massas	[10]
Hintikka <i>et. al</i> (2013)	0,01 ppb	-	Hidrolise enzimática e derivação com TMS, extração com SPME	GC/MS, triplo quadrupolo como analisador de massas	[97]
Van Thuyne e Delbeke (2004)	5 ppm	-	Extração líquido-líquido	GC/MS, quadrupolo como analisador de massas	[87]
Neves <i>et. al</i> (2017)	-	1,28 ppm	Extração líquido-líquido	GC/MS, quadrupolo como analisador de massas	[86]
Chopra <i>et. al</i> (2014)	1 ppb	-	Extração com SPME	GC/MS, quadrupolo como analisador de massas	[92]
Gomes <i>et. al</i> (2013)	0,02 ppb	0,62 ppb	Extração com SPME	GCxGC/MS, ToF (<i>time of fly</i>) como analisador de massas	[98]

As curvas de calibração foram feitas tendo como base a “Guia para validação de métodos analíticos” e “*Bioanalytical methods validation for human studies*” tendo os níveis definidos também de acordo com a literatura, sendo as concentrações de 20, 40, 60, 80 e 100 ppb. São apresentados na Tabela 9 os respectivos coeficientes angulares e lineares e os coeficientes R^2 para cada esteroides.

Tabela 9 - Parâmetros de linearidade para as testosteronas, com homoscedasticidade validada.

Esteroides Anabolizante		Coeficiente angular	Coeficiente linear	Coeficiente de determinação (R^2)
Isocaproato de	BID	3877,7	24479	0,9954
Testosterona	FID	1855,4	44635	0,9919
Fempropionato de	BID	2263,6	14673	0,9915
Testosterona	FID	318,1	7018,3	0,9949
Decanoato de	BID	2638,7	10461	0,9935
Testosterona	FID	1918,6	22566	0,9930

Observou-se na Tabela 9 que as curvas de calibração para cada testosterona obtiveram linearidades satisfatórias para a faixa empregada, ou seja, para o isocaproato de testosterona 0,9954 e 0,9919; fempropionato de testosterona 0,9915 e 0,9949; decanoato de testosterona 0,9935 e 0,9930, para os detectores BID e FID, respectivamente. Pode-se considerar as linearidades adequadas, sendo que para construção das curvas foram analisados os três padrões em 5 diferentes níveis de concentração. A análise foi realizada em triplicata, totalizando 15 análises, isso contribuiu na verificação da correlação dos dados mesmos em concentrações no nível de $\mu\text{g L}^{-1}$. Contudo, pode-se observar que os coeficientes angulares obtidos no BID são maiores que os do FID, confirmando a maior sensibilidade no BID, ou seja, essa técnica responde melhor a pequenas variações de concentrações quanto comparada ao FID [32].

Para avaliar a concordância entre os valores determinados pelas curvas de calibração com os valores reais, foram analisadas amostras com concentrações 30, 60 e 90 ppb a fim de abranger toda curva. E também foi avaliado a robustez e estabilidade da curva realizando análise em dias e semanas diferentes. Os resultados dos coeficientes variações (CV) são apresentados na Tabela 10, em geral valores de coeficiente de variação menores de 20% foram considerados aceitáveis [10,11]. Pode-se perceber que

os valores intra e inter são próximos, confirmando a teoria da longa estabilidade do sinal do BID, também os baixos valores de CV indicam que o detector responde a baixas concentrações. Entretanto, o FID obteve valores CV maiores, indicando que o detector não mantém a estabilidade do sinal com o passar do tempo.

Tabela 10 - Resultados dos ensaios de inexatidão intra e inter-ensaio para cada testosterona.

Esteroides Anabolizante	Inexatidão intra-ensaios (%)		Inexatidão inter-ensaios (%)	
	BID	FID	BID	FID
30 ppb				
Isocaproato de Testosterona	2,62	-16,54	2,64	-16,32
Fempropionato de Testosterona	7,43	13,52	6,97	12,02
Decanoato de Testosterona	6,47	-10,04	8,37	-9,94
60 ppb				
Isocaproato de Testosterona	1,67	1,16	1,67	1,26
Fempropionato de Testosterona	-1,62	6,29	-1,52	6,29
Decanoato de Testosterona	1,14	3,97	1,38	4,01
90 ppb				
Isocaproato de Testosterona	-0,70	-4,09	-0,55	-4,01
Fempropionato de Testosterona	0,83	-4,79	0,89	-4,79
Decanoato de Testosterona	-4,03	-2,24	-4,01	-2,24

Quanto aos resultados de precisão, os mesmos são apresentados na Tabela 11. Os testes de precisão auxiliam na avaliação da repetitividade e reprodutibilidade dos métodos. Testes de precisão intra-ensaios estimam a repetitividade, que no geral, valores de CV menores que 20% foram considerados aceitáveis. Os maiores valores de variação são os de baixa concentração, tanto para BID e FID, isso pode ser explicado por estar fora da linearidade, portanto apresenta comportamento análogo ao esperado; em baixas concentrações, pequenas variações de sinais são mais comuns e podem interferir na análise. A reprodutibilidade (precisão inter-ensaio) segue o mesmo comportamento de repetitividade, garantindo a robustez do método e estabilidade do sinal do detector do BID. Quanto ao FID, no geral os valores de CV de reprodutibilidade foram maiores, confirmando o que foi avaliado no teste de inexatidão, que o sinal do detector não se mantém estável com o passar dos dias e semanas, sendo que os valores de CV são próximos a 20%, enquanto os valores do BID são menores que 15%

Tabela 11 - Resultados dos ensaios de precisão intra e inter-ensaio para cada testosterona.

Esteroides Anabolizante	Precisão intra-ensaios (%)		Precisão inter-ensaios (%)	
	BID	FID	BID	FID
Solução de baixa concentração (SBC)				
Isocaproato de Testosterona	12,34	12,94	13,98	18,09
Fempropionato de Testosterona	11,51	16,27	13,38	17,98
Decanoato de Testosterona	11,57	13,56	11,54	16,56
Solução de média concentração (SMC)				
Isocaproato de Testosterona	7,10	9,92	5,25	9,91
Fempropionato de Testosterona	7,26	15,86	6,82	14,98
Decanoato de Testosterona	7,59	9,79	7,45	10,06
Solução de alta concentração (SAC)				
Isocaproato de Testosterona	5,04	7,72	5,75	14,25
Fempropionato de Testosterona	6,96	14,50	7,35	19,60
Decanoato de Testosterona	5,42	10,50	5,61	16,73

Para avaliar as interferências durante o processo de pré-concentração e extração foi realizado o teste de recuperação utilizando uma série de amostras, com a mesma matriz, em que apenas variou-se a concentração do analito em proporções bem conhecidas que compreendiam a linearidade do método. São apresentados na Tabela 12 os resultados de recuperação do método, vale ressaltar que taxas de recuperação entre 80-120% foram considerados aceitáveis para *doping* [74,75], portanto para as testosteronas o IT-SPME teve êxito nas taxas de recuperação tanto para BID quanto para o FID.

Tabela 12 - Resultados dos ensaios de recuperação para cada testosterona.

Esteroides Anabolizante		Recuperação em 70 ppb (%)	Recuperação em 80 ppb (%)	Recuperação em 90 ppb (%)	Recuperação média (%)
Isocaproato de Testosterona	BID	103,50	102,76	98,39	101,55
	FID	117,29	94,21	106,37	105,96
Fempropionato de Testosterona	BID	94,07	99,66	99,74	97,83
	FID	108,10	92,39	105,40	101,97
Decanoato de Testosterona	BID	109,54	107,70	106,62	107,95
	FID	109,44	119,91	113,58	114,31

Por fim, o último parâmetro a ser avaliado na validação é a estabilidade das amostras quanto a estocagem. Dentro das legislações *antidopings* não pode haver queda maior que 40% na concentração dos analitos alvos da análise durante todo o teste. Para os testes no BID (Figura 26), as maiores perdas de componente foram: do isocaproato foi de 28% do antes do congelamento para quatro dias congelada, para as demais percebe-se uma pequena queda para as demais etapas; para o fempropianato foi de 25% do logo após o preparo para antes do congelamento, percebe-se uma pequena queda para os três ciclos de congelamento; para decanoato foi de 4% do logo após o preparo para antes do congelamento, demais percebe-se uma pequena queda para as demais etapas.

Para os testes no FID (Figura 27), as maiores perdas de componente foram: do isocaproato foi de 3% do antes do congelamento para quatro dias congelada, demais percebe-se uma pequena queda para as demais etapas; para o fempropianato foi de 18% do antes do congelamento para quatro dias congelada, demais percebe-se uma pequena queda para as demais etapas; para decanoato foi de 22% dos quatro dias congelada para os três ciclos de congelamento. Portanto, pode-se dizer que as duas metodologias apresentadas no trabalho têm boa resposta a mudança de estocagem das amostras e apresenta boa estabilidade.

Figura 26 - Resultado gráfico do ensaio de estabilidade das testosteronas no BID.

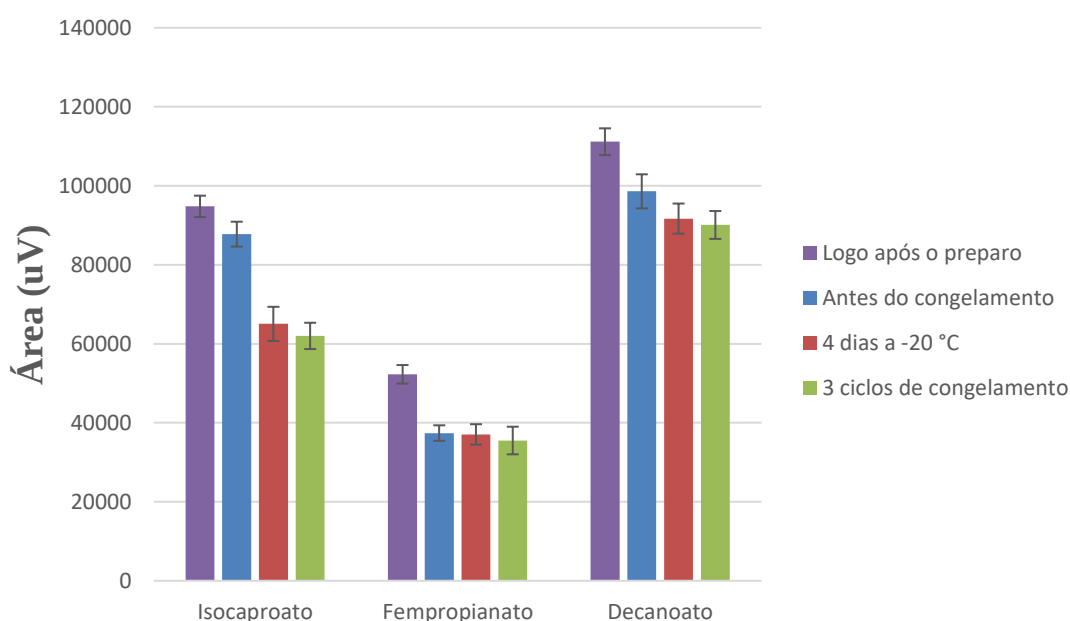
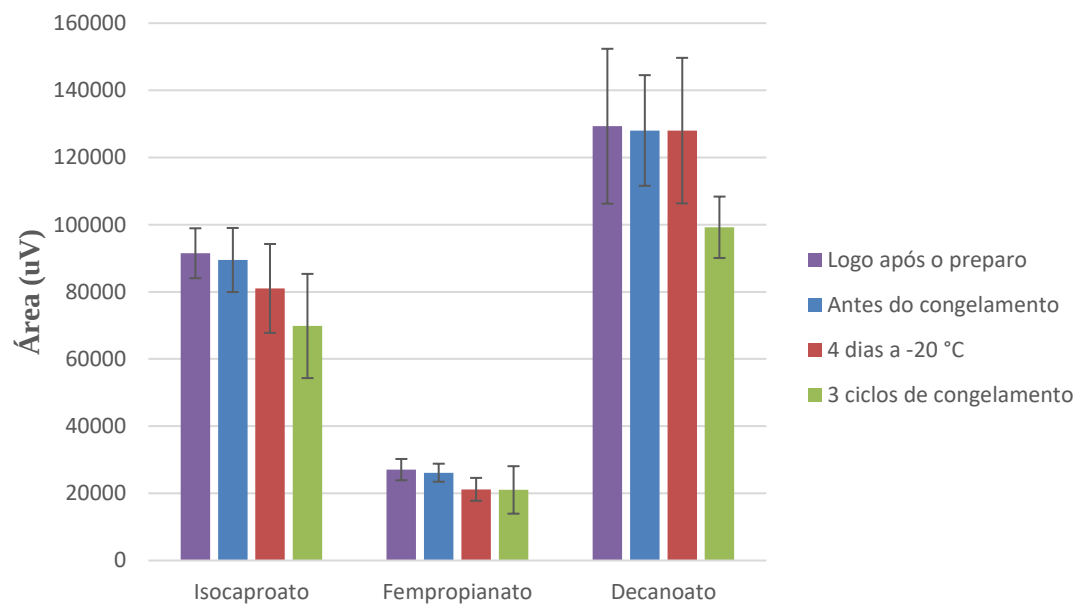


Figura 27 - Resultado gráfico do ensaio de estabilidade das testosteronas no FID.



5 CONCLUSÕES

O dispositivo para amostragem em IT-SPME apresentou alta eficiência para extração e pré-concentração dos ésteres de testosteronas em soluções de urina. A montagem dos dispositivos IT-Flex com revestimento polimérico a partir de um adesivo comercial se tornou uma alternativa barata, efetiva e comercialmente interessante, o custo de produção de cada dispositivo foi de R\$ 22,80.

Foi possível obter dois *liners* com ação extratora estatisticamente semelhante. O dispositivo teve a vantagem de suportar altas temperaturas, devido a estabilidade térmica do PDMS, o que garantiu a dessorção e volatilização total dos analitos no injetor do GC e manteve a qualidade dos *liners* durante o projeto, já que mais de 300 injeções foram feitas.

Quanto a análise cromatográfica, o dispositivo permitiu a obtenção de picos cromatográficos para as testosteronas com resolução adequada dentro das teorias cromatográficas. A técnica de amostragem por imersão e secagem utilizando o compressor permitiu valores ótimos de reprodutibilidade e repetitividade, com baixos valores de coeficientes de variação.

O dispositivo obteve resultados satisfatórios quanto a validação do método de acordo com as legislações vigentes *antidoping* tanto para o BID e FID. Obteve ótima seletividade, já que não houve a presença de interferentes da matriz, algo que foi confirmado no teste de recuperação, já que obteve taxas de recuperação próximos dos 100%. A metodologia proposta também conseguiu limites de detecção ($0,5\text{-}2,0\ \mu\text{g L}^{-1}$) e quantificação ($1,0\text{-}5,0\ \mu\text{g L}^{-1}$) baixos, podendo ser comparados com trabalhos que utilizam preparos de amostra complexa e espectrômetros de massas como detector. Além do uso do amostrador em tubo de borossilicato, vale ressaltar o emprego do BID como detector universal e que pode ser aplicado em análises de dopagem, com resultados superiores ao do FID. Com linearidades superiores a 0,9900 e reprodutibilidade e reprodutibilidade com coeficientes de variação menores que 20%, confirmam a estabilidade prolongada do plasma por dias e semanas.

No geral, o emprego do IT-SPME e BID/FID apresentaram uma metodologia promissora para análises *antidoping* e confirmam que poderá ter diversas aplicações em diversas áreas da química analítica.

REFERÊNCIAS

- [1] R. Faiss, J. Saugy, M. Saugy, Fighting Doping in Elite Sports: Blood for All Tests!, *Front. Sport. Act. Living*. 1 (2019) 1–5. <https://doi.org/10.3389/fspor.2019.00030>.
- [2] W. Abushareeda, A. Fragkaki, A. Vonaparti, Y. Angelis, M. Tsivou, K. Saad, S. Kraiem, E. Lyris, M. Alsayrafi, C. Georgakopoulos, Advances in the detection of designer steroids in anti-doping, *Bioanalysis*. 6 (2014) 881–896.
- [3] J. Sevcik, *Detectors in gas chromatography*, Elsevier, Nova Iorque, 1976. <https://doi.org/10.1007/bf02275970>.
- [4] J. Pawliszyn, *Sampling and Sample Preparation for Field and Laboratory: Fundamentals and New Directions in Sample Preparation*, Elsevier, Nova Iorque, 2002.
- [5] P.P. de Souza, P.S. de O. Patricio, E.F. Pedroso, G.S. Caldeira, M.L.S. do Couto, T.V. dos Santos, G.D. dos Reis, Dispositivo revestido internamente com fase polimérica absorvente para captura e pré-concitração de compostos orgânicos em solução, BR 102018073167-0 A2, 2020.
- [6] R.I.G. Holt, I. Erotokritou-Mulligan, P.H. Sönksen, The history of doping and growth hormone abuse in sport, *Growth Horm. IGF Res.* 19 (2009) 320–326. <https://doi.org/10.1016/j.ghir.2009.04.009>.
- [7] R.A. Vlad, G. Hancu, G.C. Popescu, I.A. Lungu, Doping in sports, a never-ending story?, *Adv. Pharm. Bull.* 8 (2018) 529–534. <https://doi.org/10.15171/apb.2018.062>.
- [8] D.V. Hanstad, I. Waddington, A. Smith, The establishment of the world anti-doping agency, *Int. Reviwn Sociol. Sport.* 43 (2008) 227–249. [10.1177/1012690208100552](https://doi.org/10.1177/1012690208100552).
- [9] World Anti-Doping Agency (WADA), Prohibited List, 2020.
- [10] E.G. Castilho, E.D.S. Nascimento, Aspectos analíticos do controle da dopagem de agentes anabolizantes em urina de atletas : avaliação de critérios de positividade, *Brazilian J. Pharm. Sci.* 39 (2003) 41–53.
- [11] M. Thevis, A. Thomas, M. Kohler, S. Beuck, W. Sch, Special Feature : Tutorial Emerging drugs : mechanism of action , mass spectrometry and doping control analysis, *J. Mass Spectrom.* 44 (2009) 442–460. <https://doi.org/10.1002/jms.1584>.
- [12] P. Rodrigo, R. Danielski, A. Czepielewski, Esteróides anabolizantes no esporte,

- Rev. Bras. Da Med. Do Esporte. 8 (2002) 235–243.
- [13] D. Thieme, P. Hemmersbach, Detecting the Administration of Endogenous Anabolic Androgenic Steroids, in: *Handb. Exp. Pharmacol.*, Springer, Amesterdã, 2010: pp. 77–98. <https://doi.org/10.1007/978-3-540-79088-4>.
 - [14] U. Mareck, H. Geyer, G. Opfermann, M. Thevis, W. Schanzer, Factors influencing the steroid profile in doping control analysis, *J. Mass Spectrom.* 43 (2008) 877–891. <https://doi.org/10.1002/jms>.
 - [15] WADA Laboratory Expert Group Approved, WADA Technical Document – TD2018MRPL, 2017. <https://www.wada-ama.org/en/what-we-do/science-medical/laboratories>.
 - [16] WADA Laboratory Committee Approved, WADA Technical Document – TD2010IDCR, 2010.
 - [17] E. Nieschlag, H.M. Behre, *Testosterone - Action, Deficiency, Substitution*, Cambridge University Press, Nova Iorque, 2012.
 - [18] J. Hoberman, *Testosterone Dreams - Rejuvenation, Aphrodisia, doping*, University of California Press, Los Angeles, 2013.
 - [19] N.T. Shahidi, A review of the chemistry, biological action, and clinical applications of anabolic-androgenic steroids, *Clin. Ther.* 23 (2001) 1355–1390. [https://doi.org/10.1016/S0149-2918\(01\)80114-4](https://doi.org/10.1016/S0149-2918(01)80114-4).
 - [20] A.T. Kicman, Pharmacology of anabolic steroids, *Br. J. Pharmacol.* 154 (2008) 502–521. <https://doi.org/10.1038/bjp.2008.165>.
 - [21] H.M. Behre, E. Nieschlag, Testosterone preparations for clinical use in males, in: *Testosterone - Action, Defic. Substit.*, University of California Press, Los Angeles, 2016: pp. 309–335.
 - [22] A. Teubner, K. Müller, C.P. Bartmann, H. Sieme, E. Klug, B. Zingrebe, H.A. Schoon, Effects of an anabolic steroid (Durateston) on testicular angiogenesis in peripubertal stallions, *Theriogenology*. 84 (2015) 323–332. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.03.022>.
 - [23] S. Bolour, G. Braunstein, Testosterone therapy in women: A review, *Int. J. Impot. Res.* 17 (2005) 399–408. <https://doi.org/10.1038/sj.ijir.3901334>.
 - [24] I. Pávó, C. Varga, M. Szücs, F. László, M. SzÉcsi, J. Gardi, F.A. László, Effects of testosterone on the rat renal medullary vasopressin receptor concentration and the antidiuretic response, *Life Sci.* 56 (1995) 1215–1222.

- [https://doi.org/10.1016/0024-3205\(95\)00061-A](https://doi.org/10.1016/0024-3205(95)00061-A).
- [25] C.J. Hay, B.M. Brady, M. Zitzmann, K. Osmanagaoglu, P. Pollanen, D. Apter, F.C.W. Wu, R.A. Anderson, E. Nieschlag, P. Devroey, I. Huhtaniemi, W.M. Kersemaekers, A multicenter phase IIb study of a novel combination of intramuscular androgen (testosterone decanoate) and oral progestogen (etonogestrel) for male hormonal contraception, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 90 (2005) 2042–2049. <https://doi.org/10.1210/jc.2004-0895>.
 - [26] R. Pascale, M. Caivano, A. Buchicchio, I.M. Mancini, G. Bianco, D. Caniani, Validation of an analytical method for simultaneous high-precision measurements of greenhouse gas emissions from wastewater treatment plants using a gas chromatography-barrier discharge detector system, *J. Chromatogr. A.* 1480 (2016) 62–69. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2016.11.024>.
 - [27] M.J. Yoo, S.H. Jo, K.H. Kim, An advanced technique for rapid and accurate monitoring of gaseous formaldehyde using large-volume injection interfaced with gas chromatograph/barrier discharge ionization detector (LVI/GC/BID), *Microchem. J.* 147 (2019) 806–812. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2019.03.096>.
 - [28] R. Gras, J. Luong, M. Monagle, B. Winniford, Gas chromatographic applications with the dielectric barrier discharge detector, *J. Chromatogr. Sci.* 44 (2006) 101–107. <https://doi.org/10.1093/chromsci/44.2.101>.
 - [29] Shimadzu Corporation, Gas Chromatograph - Nexis GC-2030, 2020. file:///C:/Users/User/Desktop/C184-E043B.pdf.
 - [30] X. Jiang, Y. Chen, C. Zheng, X. Hou, Electrothermal vaporization for universal liquid sample introduction to dielectric barrier discharge microplasma for portable atomic emission spectrometry, *Anal. Chem.* 86 (2014) 5220–5224. <https://doi.org/10.1021/ac500637p>.
 - [31] S.H. Jo, K.H. Kim, The applicability of a large-volume injection (LVI) system for quantitative analysis of permanent gases O₂ and N₂ using a gas chromatograph/barrier discharge ionization detector, *Environ. Monit. Assess.* 189 (2017) 1–10. <https://doi.org/10.1007/s10661-017-6024-1>.
 - [32] M. Antoniadou, G.A. Zachariadis, E. Rosenberg, Investigating the performance characteristics of the barrier discharge ionization detector and comparison to the flame ionization detector for the gas chromatographic analysis of volatile and semivolatile organic compounds, *Anal. Lett.* 52 (2019) 2822–2839.

- <https://doi.org/10.1080/00032719.2019.1628247>.
- [33] M. Leißing, M. Winter, S. Wiemers-Meyer, S. Nowak, A method for quantitative analysis of gases evolving during formation applied on LiNi_{0.6}Mn_{0.2}Co_{0.2}O₂ || natural graphite lithium ion battery cells using gas chromatography - barrier discharge ionization detector, *J. Chromatogr. A.* 1622 (2020) 1–18. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2020.461122>.
 - [34] L.A. Frink, D.W. Armstrong, The utilisation of two detectors for the determination of water in honey using headspace gas chromatography, *Food Chem.* 205 (2016) 23–27. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.02.118>.
 - [35] R.F. do Nascimento, A.C.A. de Lima, P.G.A. Barbosa, V.P.A. da Silva, *Cromatografia gasosa Aspectos teóricos e práticos*, Imprensa Universitária, Fortaleza, 2018.
 - [36] J. Pawliszyn, Theory of Extraction, in: *Handb. Sample Prep.*, John Wiley & Sons, Hoboken, 2010: pp. 2–24.
 - [37] R.M. Smith, Before the injection - Modern methods of sample preparation for separation techniques, *J. Chromatogr. A.* 1000 (2003) 3–27. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(03\)00511-9](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(03)00511-9).
 - [38] J. Pawliszyn, Sample preparation: Quo vadis?, *Anal. Chem.* 75 (2003) 2543–2558. <https://doi.org/10.1021/ac034094h>.
 - [39] M.J.M. Wells, Principles of Extraction and the Extraction of Semivolatile Organics from Liquids, in: *Sample Prep. Tech. Anal. Chem.*, 2003: pp. 37–138. <https://doi.org/10.1002/0471457817.ch2>.
 - [40] J.R. Dean, *Extraction Techniques in Analytical Sciences*, John Wiley & Sons, Hoboken, 2009.
 - [41] S.C.N. Queiroz, C.H. Collins, I.C.S.F. Jardim, Métodos de extração e/ou concentração de compostos encontrados em fluidos biológicos para posterior determinação cromatográfica, *Quim. Nova.* 24 (2001) 68–76. <https://doi.org/10.1590/s0100-40422001000100013>.
 - [42] R.J. Flanagan, E. Cuypers, H.H. Maurer, R. Whelpton, Liquid–liquid extraction, in: *Fundam. Anal. Toxicol.*, John Wiley & Sons, Hoboken, 2020: pp. 98–106.
 - [43] L. Vidal, M.L. Riekkola, A. Canals, Ionic liquid-modified materials for solid-phase extraction and separation: A review, *Anal. Chim. Acta.* 715 (2012) 19–41. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2011.11.050>.

- [44] B. Buszewski, M. Szultka, Past, Present, and Future of Solid Phase Extraction: A Review, *Crit. Rev. Anal. Chem.* 42 (2012) 198–213. <https://doi.org/10.1080/07373937.2011.645413>.
- [45] M.A. Jeannot, F.F. Cantwell, Mass Transfer Characteristics of Solvent Extraction into a Single Drop at the Tip of a Syringe Needle, *Anal. Chem.* 69 (1997) 235–239. <https://doi.org/10.1021/ac960814r>.
- [46] M.A. Jeannot, A. Przyjazny, J.M. Kokosa, Single drop microextraction-Development, applications and future trends, *J. Chromatogr. A.* 1217 (2010) 2326–2336. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.10.089>.
- [47] S. Duarte, E. Freire, G. De Carvalho, R.D. Villa, D. De Química, U. Federal, D.M. Grosso, A. Fernando, B.B. Esperança, Microextração líquido-líquido dispersiva assistida por vórtex e ultrassom aplicada à determinação de agrotóxicos triazinas, triazinonas e o triazol flutriafol em água, *Quim. Nova.* 39 (2016) 925–931. <https://doi.org/10.5935/0100-4042.20160110>.
- [48] M.L. Martins, E.G. Primel, S.S. Caldas, O.D. Prestes, M.B. Adaime, R. Zanella, Microextração Líquido-Líquido Dispersiva (DLLME): fundamentos e aplicações, *Sci. Chromatogr.* 4 (2012) 35–51.
- [49] R.J. Flanagan, E. Cuypers, H.H. Maurer, R. Whelpton, Solid phase microextraction, in: *Fundam. Anal. Toxicol.*, John Wiley & Sons, Hoboken, 2020: pp. 108–109.
- [50] W.R. Barrionuevo, F.M. Lanças, Solid-phase extraction (SPE) and solid-phase microextraction of pyrethroids in water, *Quim. Nova.* 24 (2001) 172–175. <https://doi.org/10.1590/s0100-40422001000200003>.
- [51] F.M. Lancas, M.E.C. Queiroz, P. Grossi, I.R.B. Olivares, Recent developments and applications of stir bar sorptive extraction, *J. Sep. Sci.* 32 (2009) 813–824. <https://doi.org/10.1002/jssc.200800669>.
- [52] A. Prieto, O. Basauri, R. Rodil, A. Usobiaga, L.A. Fernández, N. Etxebarria, O. Zuloaga, Stir-bar sorptive extraction: A view on method optimisation, novel applications, limitations and potential solutions, *J. Chromatogr. A.* 1217 (2010) 2642–2666. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.12.051>.
- [53] X. Yan, D. Wu, H. Peng, K. Ding, C. Duan, Y. Guan, Array capillary in-tube solid-phase microextraction: A rapid preparation technique for water samples, *J. Chromatogr. A.* 1244 (2012) 69–76.

- <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.05.015>.
- [54] M. Fernández-Amado, M.C. Prieto-Blanco, P. López-Mahía, S. Muniategui-Lorenzo, D. Prada-Rodríguez, Strengths and weaknesses of in-tube solid-phase microextraction: A scoping review, *Anal. Chim. Acta.* 906 (2016) 41–57. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.12.007>.
 - [55] WADA Laboratory Expert Group, WADA Technical Document – TD2018EAAS, 2018. http://www.wada-ama.org/Documents/World_Anti-Doping_Program/WADP-IS-Laboratories/Technical_Documents/WADA-TD2014-EAAS-Endogenous-Anabolic-Androgenic-Steroids-Measurement-and-Reporting-EN.pdf.
 - [56] C.L. Arthur, J. Pawliszyn, Solid Phase Microextraction with Thermal Desorption Using Fused Silica Optical Fibers, *Anal. Chem.* 62 (1990) 2145–2148. <https://doi.org/10.1021/ac00218a019>.
 - [57] J. Pawliszyn, H.L. Lord, Solid-phase microextraction, in: *Handb. Sample Prep.*, John Wiley & Sons, Hoboken, 2010: pp. 81–101.
 - [58] S. Moldoveanu, V. David, Solid-phase microextraction (SPME), in: *Mod. Sample Prep. Chromatogr.*, Elsevier, Nova Iorque, 2014: pp. 266–278.
 - [59] J.R. Dean, Solid Phase Microextraction, in: *Extr. Techniques Anal. Sci.*, John Wiley & Sons, Hoboken, 2009: pp. 85–106.
 - [60] B. V. Burger, M. Le Roux, W.J.G. Burger, Headspace analysis: A novel method for the production of capillary traps with ultra-thick stationary phase layers, *J. High Resolut. Chromatogr.* 13 (1990) 777–779. <https://doi.org/10.1002/jhrc.1240131111>.
 - [61] R. Eisert, J. Pawliszyn, Automated In-Tube Solid-Phase Microextraction Coupled to High-Performance Liquid Chromatography, *Anal. Chem.* 69 (1997) 3140–3147. <https://doi.org/10.1021/ac970319a>.
 - [62] D.A. Lane, W.H. Schroeder, N. Douglas Johnson, S.C. Barton, G.H.S. Thomas, Development and evaluation of a novel gas and particle sampler for semivolatile chlorinated organic compounds in ambient air, *Environ. Sci. Technol.* 22 (1988) 941–947. <https://doi.org/10.1021/es00173a012>.
 - [63] H. Kataoka, Current developments and future trends in solid-phase microextraction techniques for pharmaceutical and biomedical analyses, *Anal. Sci.* 27 (2011) 893–905. <https://doi.org/10.2116/analsci.27.893>.

- [64] B.J.G. Silva, F.M. Lanças, M.E.C. Queiroz, In-tube solid-phase microextraction coupled to liquid chromatography (in-tube SPME/LC) analysis of nontricyclic antidepressants in human plasma, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 862 (2008) 181–188. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2007.12.006>.
- [65] P. Serra-Mora, P. García-Narbona, J. Verdú-Andrés, R. Herráez-Hernández, P. Campíns-Falcó, Exploring new extractive phases for in-tube solid phase microextraction coupled to miniaturized liquid chromatography, *Separations*. 6 (2019). <https://doi.org/10.3390/separations6010012>.
- [66] Y. Moliner-Martinez, R. Herráez-Hernández, J. Verdú-Andrés, C. Molins-Legua, P. Campíns-Falcó, Recent advances of in-tube solid-phase microextraction, *Trends Anal. Chem.* 71 (2015) 205–213. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.02.020>.
- [67] T. Tsugita, T. Imai, Y. Doi, T. Kurata, H. Kato, GC and GC-MS Analysis of Head space Volatiles by Tenax GC Trapping Techniques, *Agricultural Biol. Chem.* 43 (1979) 1351–1354.
- [68] K. Grob, A. Habich, Headspace gas analysis: the role and the design of concentration traps specifically suitable for capillary gas chromatography, *J. Chromatogr. A*. 321 (1985) 45–58. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)90422-4](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)90422-4).
- [69] B. V. Burger, Z. Munro, Headspace gas analysis. Quantitative trapping and thermal desorption of volatiles using fused-silica open tubular capillary traps, *J. Chromatogr. A*. 370 (1986) 449–464. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)94715-0](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)94715-0).
- [70] X. Yan, D. Wu, H. Meng, L. Hao, K. Ding, Y. Guan, Further investigation of array capillary in-tube solid-phase microextraction of trace organic pollutants in water samples, *Anal. Methods*. 6 (2014) 750–757. <https://doi.org/10.1039/c3ay41525b>.
- [71] W. Fan, J. Almirall, High-efficiency headspace sampling of volatile organic compounds in explosives using capillary microextraction of volatiles (CMV) coupled to gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) Microextraction Techniques, *Anal. Bioanal. Chem.* 406 (2014) 2189–2195. <https://doi.org/10.1007/s00216-013-7410-3>.
- [72] R. Ventura, J. Segura, C. Jimenez, Validation of qualitative chromatographic methods: strategy in antidoping control laboratories, *J. Chromatogr. B*. 767 (2002) 341–351.

- [73] M. Ribani, C.B. Grespan Bottoli, C.H. Collins, I.C.S. Fontes Jardim, L.F. Costa Melo, Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos, *Quim. Nova.* 27 (2004) 771–780. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422004000500017>.
- [74] M. da Saúde, Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos métodos analíticos, *Diário Of. [Da República Fed. Do Bras.* (2003) 1–20.
- [75] United Nations Office on Drugs and Crime, Guidance for the validation of analytical methodology and calibration of equipment used for testing of illicit drugs in seized materials and biological specimens, 2009.
- [76] F. and D.A. U.S. Department of Health and Human Services, Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry., 2018. <https://www.fda.gov/files/drugs/published/Bioanalytical-Method-Validation-Guidance-for-Industry.pdf>.
- [77] W. Abushareeda, E. Lyris, S. Kraiem, A. Al Wahaibi, S. Alyazidi, N. Dbes, A. Lommen, M. Nielen, P.L. Horvatovich, M. Alsayrafi, C. Georgakopoulos, Gas chromatographic quadrupole time-of-flight full scan high resolution mass spectrometric screening of human urine in antidoping analysis, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 1063 (2017) 74–83. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2017.08.019>.
- [78] S. Strano-Rossi, F. Molaioni, F. Botrè, Application of solid-phase microextraction to antidoping analysis: Determination of stimulants, narcotics, and other classes of substances excreted free in urine, *J. Anal. Toxicol.* 29 (2005) 217–222. <https://doi.org/10.1093/jat/29.4.217>.
- [79] C. Gambelunghe, M. Som mavilla, C. Ferranti, R. Rossi, K. Aroni, N. Manes, M. Bacci, Analysis of anabolic steroids in hair by GC/MS/MS, *Biomed. Chromatogr.* 21 (2007) 369–375. <https://doi.org/10.1002/bmc>.
- [80] G.S. Caldeira, Estudo da reprodução na confecção do dispositivo de captura IT-FEx com diferentes deposições de PDMS para análise de BTEX em águas subterrâneas, Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais, 2020.
- [81] A. Labouriau, J.D. Cox, J.R. Schoonover, B.M. Patterson, G.J. Havrilla, T. Stephens, D. Taylor, Mössbauer, NMR and ATR-FTIR spectroscopic investigation of degradation in RTV siloxane foams, *Polym. Degrad. Stab.* 92 (2007) 414–424. <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2006.11.017>.
- [82] F.A.B. Silva, F.A. Chagas-Silva, F.H. Florenzano, F.L. Pissetti,

- Poly(dimethylsiloxane) and Poly[vinyltrimethoxysilane-co-2-(dimethylamino) ethyl methacrylate] Based Cross-Linked Organic-Inorganic Hybrid Adsorbent for Copper(II) Removal from Aqueous Solutions, *J. Braz. Chem. Soc.* 27 (2016) 2181–2191.
- [83] L.R.L. Santos, C.E.B. Marino, I.C. Riegel-Vidotti, Silica/chitosan hybrid particles for smart release of the corrosion inhibitor benzotriazole, *Eur. Polym. J.* 115 (2019) 86–98. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2019.03.008>.
- [84] B. Zhang, P. Zhang, H. Zhang, C. Yan, Z. Zheng, B. Wu, Y. Yu, A Transparent, Highly Stretchable, Autonomous Self-Healing Poly(dimethyl siloxane) Elastomer, *Macromol. Rapid Commun.* 38 (2017) 1–9. <https://doi.org/10.1002/marc.201700110>.
- [85] B.R. Boqué, A. Maroto, J. Riu, F.X. Rius, Validation of Analytical Methods, *Grasas y Aceites.* 53 (2002) 128–143.
- [86] D.B. da J. Neves, E.D. Caldas, GC–MS quantitative analysis of black market pharmaceutical products containing anabolic androgenic steroids seized by the Brazilian Federal Police, *Forensic Sci. Int.* 275 (2017) 272–281. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2017.03.016>.
- [87] W. Van Thuyne, F.T. Delbeke, Validation of a GC-MS screening method for anabolizing agents in solid nutritional supplements, *Biomed. Chromatogr.* 18 (2004) 155–159. <https://doi.org/10.1002/bmc.303>.
- [88] X. de la Torre, J. Segura, A. Poletini, M. Montagna, Detection of testosterone esters in human plasma, *J. Mass Spectrom.* 30 (1995) 1393–1404. <https://doi.org/10.1002/jms.1190301004>.
- [89] Y. Gaillard, A. Balland, G. Pepin, Gas chromatographic – tandem mass spectrometric determination of anabolic steroids and their esters in hair Application in doping control and meat quality control, *J. Chromatogr. B.* 735 (1999) 189–205.
- [90] R.E. Shirey, SPME Commercial Devices and Fibre Coatings, Elsevier Inc., 2012. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-416017-0.00004-8>.
- [91] J. Carpinteiro, J.B. Quintana, I. Rodríguez, A.M. Carro, R.A. Lorenzo, R. Cela, Applicability of solid-phase microextraction followed by on-fiber silylation for the determination of estrogens in water samples by gas chromatography-tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A.* 1056 (2004) 179–185.

- <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2004.06.111>.
- [92] S. Chopra, P.C.F.L. Gomes, R. Dhandapani, N.H. Snow, Analysis of Steroids using Solid Phase Microextraction-Gas Chromatography-Mass Spectrometry-Mass Spectrometry (SPME-GC-MS-MS), *Sci. Chromatogr.* 6 (2014) 105–116. <https://doi.org/10.4322/sc.2014.024>.
 - [93] D.M. Sales, Novo dispositivo de preparo de amostras: validação de um método rápido, barato e ecológico para analisar amostras aquosas por cromatografia gasosa, Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais, 2020.
 - [94] G.D. dos Reis, Desenvolvimento de protótipo para amostragem estática e pré-concentração de compostos orgânicos em solução aquosa, Centro Federal de Educação Teconológica de Minas Gerais, 2013.
 - [95] G.P. Carmo, Prototipagem para análise de voláteis em headspace por cromatografia gasosa, Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais, 2021.
 - [96] G. Forsdahl, D. Erceg, T. Geisendorfer, M. Turkalj, D. Plavec, M. Thevis, L. Tretzel, G. Gmeiner, Detection of testosterone esters in blood, *Drug Test. Anal.* 7 (2015) 983–989. <https://doi.org/10.1002/dta.1914>.
 - [97] L. Hintikka, M. Haapala, T. Kuuranne, A. Leinonen, R. Kostiainen, Analysis of anabolic steroids in urine by gas chromatography-microchip atmospheric pressure photoionization-mass spectrometry with chlorobenzene as dopant, *J. Chromatogr. A.* 1312 (2013) 111–117. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.08.098>.
 - [98] P.C.F. Lima Gomes, B.B. Barnes, Á.J. Santos-Neto, F.M. Lancas, N.H. Snow, Determination of steroids, caffeine and methylparaben in water using solid phase microextraction-comprehensive two dimensional gas chromatography-time of flight mass spectrometry, *J. Chromatogr. A.* 1299 (2013) 126–130. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.05.023>.

ANEXOS

Figura 28 - Espectro de massas obtido referente ao isocraato de testosterona.

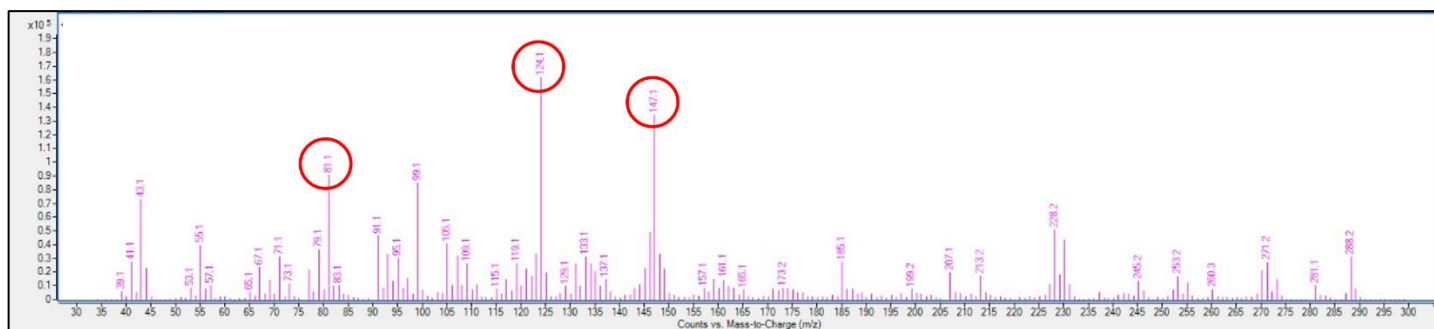


Figura 29 - Espectro de massas obtido referente ao fempropionato de testosterona.

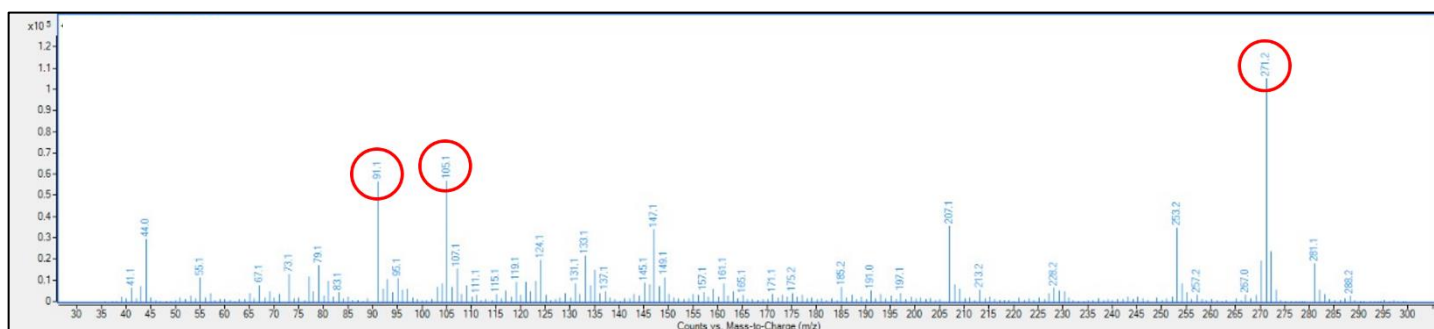


Figura 30 - Espectro de massas obtido referente ao decanoato de testosterona.

