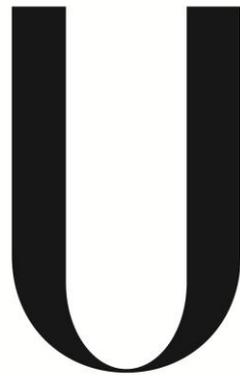


UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA E BIOQUÍMICA



LISBOA

UNIVERSIDADE
DE LISBOA

MICRO-EXTRAÇÃO ADSORTIVA APLICADA NA ANÁLISE DE
ESTERÓIDES ANABÓLICOS EM CONTEXTO DE CONTROLO ANTI-
DOPING

Samir Marcos Esmail Ahmad

Mestrado em Bioquímica

Bioquímica

2013

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA E BIOQUÍMICA



LISBOA

UNIVERSIDADE
DE LISBOA

MICRO-EXTRAÇÃO ADSORTIVA APLICADA NA ANÁLISE DE
ESTERÓIDES ANABÓLICOS EM CONTEXTO DE CONTROLO ANTI-
DOPING

Samir Marcos Esmail Ahmad

Mestrado em Bioquímica

Bioquímica

Dissertação orientada pelo

Professor Doutor José Manuel Florêncio Nogueira

2013

Aos amores da minha vida

O único lugar onde o sucesso vem antes do trabalho é no dicionário.

Albert Einstein

Agradecimentos

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer ao Professor Doutor José Manuel Florêncio Nogueira a oportunidade de fazer parte do seu grupo de investigação e de poder desenvolver este trabalho com autonomia. Agradeço-lhe também pelos conselhos, disponibilidade, rigor e paciência.

Ao Dr. João Ruivo, do Laboratório de Análises de Dopagem, Instituto Português do Desporto e da Juventude, I.P., o meu sincero apreço pelo fornecimento dos padrões estudados neste trabalho, assim como pela sua disponibilidade.

O meu profundo agradecimento vai para o Doutor Nuno Neng e para o Doutorando Carlos Almeida que me souberam acolher muito bem no laboratório, e que a boa disposição, disponibilidade, amizade e óptimos conselhos revelaram ser imprescindíveis para a conclusão deste trabalho.

Aos restantes colegas e amigos do “nosso” laboratório e do laboratório vizinho, João Rodrigo Bernarda, Isabela Silva, Bruno Calado, Sofia Alves e Tiago Jorge, o meu muito obrigado pela boa disposição e amizade.

O meu mais sincero agradecimento vai para os meus grandes amigos, José, Paulo, Nelson, João Rafael, Hugo e Vanessa, que sempre estiveram ao meu lado.

Muito obrigado à Dona Delfina, ao Sr. José Manuel, à Dona Alice e ao Sr. Armando por me terem recebido tão bem nas vossas vidas e por me apoiarem.

À minha grande família, obrigado por fazerem parte da minha vida.

Para aquela pessoa para qual não há agradecimento suficiente, a minha grande paixão, Susana Fonseca, queria agradecer pelo amor que me dá e que espero vir a retribuir constantemente para o resto das nossas vidas. Esta frase fará sempre parte da nossa existência: “amo-te hoje, mais do que ontem, e menos que amanhã”.

O maior agradecimento vai para os meus pais e irmãos, que sempre foram o meu pilar central, e sem os quais não imagino que este trabalho seria possível. Aos meus irmãos, Adhil e Aminah, os quais sempre amarei, obrigado pela força, compreensão, amor e amizade. À minha querida mãe, a maior pessoa que alguma vez conhecerei, Idália Marcos, muito obrigado pelo amor incondicional e constante sacrifício de me aturar.

Resumo

A testosterona é uma das substâncias mais abusadas por atletas em todo o mundo. Por forma a controlar a sua administração exógena, a Agência Mundial de Antidopagem (WADA) produziu diretivas para se proceder à respetiva análise, que combinam um passo de extração e outro de derivatização, que permitam a análise posterior por cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massa. No entanto, face ao elevado tempo despendido, assim como à utilização de solventes orgânicos tóxicos, é necessário o desenvolvimento de métodos analíticos alternativos que permitam a diminuição do consumo de solventes e eliminação do passo de derivatização, mantendo ou melhorando o desempenho analítico.

O presente trabalho consistiu no desenvolvimento, otimização, validação e aplicação de um método inovador, alicerçado na tecnologia de amostragem por flutuação, para a determinação de testosterona e epitestosterona em matrizes de urina. Por conseguinte, recorreu-se à técnica de micro-extração adsortiva em barra seguida de dessorção líquida e análise por cromatografia líquida de alta eficiência com deteção por rede de díodos (BA μ E-LD/HPLC-DAD).

Para otimização da metodologia desenvolvida, foram efetuados diversos estudos sistemáticos a vários parâmetros experimentais, tendo-se verificado que o co-polímero modificado à base de pirrolidona e divenilbenzeno (P1) demonstrava melhor seletividade comparativamente com outras fases. Em condições experimentais otimizadas (extração: 16 h (1000 rpm), pH 5,5; retro-extração: acetonitrilo (30 min), sob tratamento ultrassónico) foi possível obter recuperações médias de 92,1 e 93,4 % para testosterona e epitestosterona, respetivamente. O método revelou ainda, excelente linearidade ($r^2 > 0,9978$) na gama compreendida entre 1,4 e 16,0 μ g/L, tendo-se alcançado, para ambos os compostos, limites de deteção e de quantificação de 0,40 e 1,32 μ g/L, respetivamente.

O recurso ao método de adição padrão permitiu a aplicação da presente metodologia a amostras de urina, demonstrando bom desempenho analítico para a determinação dos compostos em estudo. A metodologia proposta (BA μ E(P1)-LD/HPLC-DAD) revelou ainda ser uma estratégia alternativa para a análise de testosterona e epitestosterona como ferramenta para análise de rotina em contexto de controlo anti-*doping*, apresentando como principais vantagens a utilização de pequenas quantidades de amostra e solvente, tempo analítico reduzido e fácil manipulação, associada à rapidez, simplicidade e bom desempenho analítico.

Palavras-chave

Testosterona e epitestosterona

Amostras de urina

Controlo anti-*doping*

Micro-extração adsortiva em barra (BA μ E)

Cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por rede de díodos (HPLC-DAD)

Abstract

Testosterone is one of the most abused substances by athletes worldwide. In order to control its exogenous administration, the World Anti-Doping Agency (WADA) produced guidelines to proceed to its analysis, that combine an extraction followed by a derivatization step, which allows the analysis by gas chromatography coupled to mass spectrometry. However, in face of the long analytical process, as well as the usage of toxic organic solvents, it is necessary to develop alternative analytical methods that allow the diminishment of solvent consumption and elimination of the derivatization step, maintaining or improving the analytical performance.

The present work consisted in the development, optimization, validation and application of a novel method, based on the “Floating Sampling Technology”, for the determination of testosterone and epitestosterone in urine matrices. Thus, bar adsorptive micro-extraction technique was used, followed by liquid desorption and analysis by high performance liquid chromatography with diode array detection (BA μ E-LD/HPLC-DAD).

For optimization of the developed methodology, systematic studies have been performed to several experimental parameters, where the modified copolymer based on pyrrolidone and divenilbenzene (P1) presented better selectivity in comparison with other phases. Under optimized experimental conditions (extraction: 16 h (1000 rpm), pH 5.5; back-extraction: acetonitrile (30 min), under sonification), it was possible to obtain average efficiencies of 92.1 and 93.4 % for testosterone and epitestosterone, respectively. The method also revealed excellent linearity ($r^2 > 0.9978$) in the range between 1.40 and 16.0 μ g/L, having reached for both substances, limits of detection and quantification of 0.40 and 1.32 μ g/L, respectively.

The use of the standard addition method allowed the application of this methodology to urine samples, in which good analytical performance was achieved for the occurrence of the target compounds. The proposed method BA μ E(P1)-LD/HPLC-DAD proved to be a good alternative strategy for the analysis of testosterone and epitestosterone as a routine analytical tool in the context of anti-doping control, having as its main advantages the use of small amounts of sample and solvent, reduced analytical time and easy manipulation, associated with a fast, simple and good analytical performance.

Keywords

Testosterone and epitestosterone

Urine samples

Doping control

Bar adsorptive micro-extraction (BA μ E)

High performance liquid chromatography with diode array detection (HPLC-DAD)

Abreviaturas, acrónimos e símbolos

β /CD	β -ciclodextrinas
AC	Carvão ativado
ACN	Acetonitrilo
A μ E	Micro-extração adsortiva
BA μ E	Micro-extração adsortiva em barra
CE	Eletroforese capilar
CYP	Citocromo P 450
DAD	Detetor por rede de díodos
E	Epitestosterona
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
GC	Cromatografia em fase gasosa
H ⁺	Ião hidrogénio
H ₂ O	Água
HCl	Ácido clorídrico
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
HS	Espaço de cabeça
HSD	Hidroxiesteróide dehidrogenase
IOC	Comité Olímpico Internacional
IRMS	Espectrometria de massa de razão isotópica
K ⁺	Ião potássio
LD	Dessorção líquida
LLE	Extração líquido-líquido
LOD	Limite de deteção
LOQ	Limite de quantificação
LPME	Micro-extração em fase líquida
MeOH	Metanol
MIPs	Polímeros com impressão molecular
MS	Espectrometria de massa
MSA μ E	Micro-extração adsortiva em multi-esferas
Na ⁺	Ião sódio
NaCl	Cloreto de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio

P	Polímero
PA	Poliacrilato
PPY	Polipirrolidona
PPESK	Poli(ftalazina éter sulfona cetona)
PDMS	Polidimetilsiloxano
PS-DVB	Poliestireno-divinilbenzeno
PU	Poliuretano
PVA	Poli(vinilálcool)
RAM	Materiais de acesso restrito
RSD	Desvio padrão relativo
SAM	Método da adição de padrão
SBSE	Extração sortiva em barra de agitação
SPE	Extração em fase sólida
SPME	Micro-extração em fase sólida
T	Testosterona
T/E	Razão de testosterona/epitestosterona
TD	Dessorção térmica
UV	Ultravioleta
Vis	Visível
WADA	Agência Mundial de Antidopagem
α	Seletividade
λ	Comprimento de onda
σ	Desvio padrão
\bar{x}	Média
A_{Controlo}	Área do sinal do controlo
$A_{\text{Máxima}}$	Área máxima do sinal obtido
A_{Obtida}	Área do sinal obtido
c	Concentração
c_S	Concentração relativa de um componente na fase estacionária
c_M	Concentração relativa de um componente na fase móvel

c_{PDMS}	Concentração do analito na fase de PDMS
c_{W}	Concentração do analito na fase aquosa
K	Coefficiente de distribuição
$K_{\text{O/W}}$	Coefficiente de distribuição octanol-água
$K_{\text{PDMS/W}}$	Coefficiente de distribuição PDMS-água
k'	Fator de capacidade
m_{PDMS}	Massa do analito na fase de PDMS
m_{W}	Massa do analito na fase aquosa
N	Eficiência
pH	Simétrico do logaritmo decimal da concentração em hidrogeniões
$\text{p}K_a$	Simétrico do logaritmo decimal da constante de acidez
r^2	Coefficiente de determinação
R_s	Resolução
t_{M}	Tempo morto
t_{R}	Tempo de retenção
t_{R}'	Tempo de retenção ajustado
v	Volume
V_{PDMS}	Volume em PDMS
V_{W}	Volume de amostra aquosa
W	Largura do pico
%	Porcentagem
°C	Graus Celsius
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µm	Micrómetro
cm	Centímetro
g	Grama
h	Hora
L	Litro
m/z	Razão massa/carga

M	Molar
min	Minuto
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mM	Milimolar
mm	Milímetro
mUA	Miliunidade de absorvância
ng	Nanograma
nm	Nanómetro
rpm	Rotações por minuto
s	Segundo

Índice

Índice de figuras.....	xxi
Índice de tabelas.....	xxv
1. Introdução.....	1
1.1 Esteróides androgénicos e anabólicos – testosterona e epitestosterona	4
1.2 Metodologias analíticas.....	8
1.3 Técnicas de extração sortiva	10
1.3.1 Extração sortiva em barra de agitação (SBSE)	11
1.3.2 Micro-extração adsortiva em barra (BA μ E).....	14
1.4 Técnicas cromatográficas	16
1.4.1 Aspectos históricos	16
1.4.2 Descrição geral e conceitos teóricos	16
1.4.3 Cromatografia líquida de alta eficiência	19
1.5 Objetivos.....	21
2. Parte experimental	23
2.1 Reagentes, materiais e amostras.....	25
2.2 Instrumentação	26
2.3 Método experimental.....	26
2.3.1 Preparação das soluções padrão	26
2.3.2 Condições instrumentais	27
2.3.3 Calibração instrumental.....	27
2.3.4 Preparação das barras de BA μ E	27
2.3.5 Ensaio de otimização e validação	27
2.3.6 Ensaio de aplicação a amostras reais	29
3. Discussão de resultados.....	31
3.1 Condições instrumentais	33
3.2 Seleção do sorvente para BA μ E.....	36
3.3 Processo de otimização de BA μ E(P1)-LD.....	39
3.3.1 Otimização da retro-extração	39

3.3.1.1 Efeito do tipo de solvente	39
3.3.1.2 Efeito do tempo de retro-extração	40
3.3.1.3 Efeito de evaporação	41
3.3.1.4 Efeito de memória	42
3.3.2 Otimização de BA μ E(P1).....	42
3.3.2.1 Efeito da velocidade de agitação	42
3.3.2.2 Efeito do tempo de equilíbrio.....	43
3.3.2.3 Efeito de pH da matriz	44
3.3.2.4 Efeito do modificador orgânico	45
3.3.2.5 Efeito da força iônica.....	46
3.4 Validação do método BA μ E(P1)-LD/HPLC-DAD	48
3.5 Aplicação do método a amostras reais.....	50
4. Conclusões e perspectivas futuras.....	55
5. Referências bibliográficas	59
Anexos	I
I. Espectros de UV/VIS.....	III
II. Fórmulas utilizadas para o cálculo das recuperações	IV

Índice de figuras

1. Introdução

Figura 1.1 – Estrutura geral dos esteróides (a) juntamente com a correspondente numeração de carbonos (b). Adaptado de [7]	4
Figura 1.2 – Proposta da via de síntese biológica da T e os enzimas envolvidos na mesma. As setas mais largas dizem respeito às vias mais relevantes no Homem. Legenda: CYP – citocromo P450; HSD – Hidroxiesteróide dehidrogenase. Adaptado de [8].	5
Figura 1.3 – Estruturas químicas de T (a) e E (b). Adaptado de [9].	5
Figura 1.4 – Proposta da via de síntese da E. As setas mais largas dizem respeito às vias provavelmente predominantes no Homem. Legenda: HSD – Hidroxiesteróide dehidrogenase. Adaptado de [8]	6
Figura 1.5 – Proposta dos principais produtos do metabolismo da T. A percentagem por cima das setas indica qual a proporção aproximada de T que é convertida nesses compostos. Adaptado de [8].	8
Figura 1.6 - Representação esquemática dos constituintes de uma barra de agitação usada na SBSE. Adaptado de [34]	11
Figura 1.7 – Modos de extração em SBSE: imersão (a) e espaço de cabeça (b). Adaptado de [24]	11
Figura 1.8 - Recuperações teóricas de SPME (PDMS: 0,5 μ l) e SBSE (PDMS: 50 μ l) em função do coeficiente de partição de octanol-água em idênticas condições experimentais. Adaptado de [36].	13
Figura 1.9 – Representação esquemática e imagens de BA μ E (a) e MSA μ E (b). Legenda: 1 - fase extrativa; 2 – suporte de polipropileno; 3 - fase extrativa; 4 – suporte de polipropileno; 5 – fita adesiva; 6 – esfera de polistireno coberta com fase extrativa; 7 – fio. Adaptado de [29].	15
Figura 1.10 – Representações esquemáticas e imagens exemplificativas de BA μ E (a) e MSA μ E (b). Legenda: 1 – vórtex; 2 – amostra; 3 – barra de agitação magnética de Teflon; 4 – vial de extração; 5 – dispositivo de micro-extração em barra; 6 - dispositivo de micro-extração em multi-esferas. Adaptado de [29]	15

Figura 1.11 - Representação da eluição de dois componentes (A e B) e respectivos parâmetros de retenção. Adaptado de [49].....18

Figura 1.12 - Esquema simplificado de um sistema de HPLC convencional. Legenda: 1 – Reservatório de fase móvel; 2 – Desgaseificador; 3 – Bomba; 4 – Amostrador automático e injetor; 5 – Coluna; 6 – Detetor; 7 – Coletor; 8 – Sistema de aquisição de dados. Adaptado de [50].....20

3. Discussão de resultados

Figura 3.1 - Cromatograma obtido por HPLC-DAD relativo à mistura de T e E (1 mg/L) em condições instrumentais otimizadas.....34

Figura 3.2 - Curvas de calibração instrumental obtidas para T e E.....35

Figura 3.3 – Percentagem de recuperação de T e E nos diferentes ACs como fases sorventes. Condições do ensaio: 25 mL de água ultra-pura fortificada com 8 µg/L; extração: 3 h (1000 rpm), pH 5,5; retro-extração: MeOH:ACN (1:1, v:v; 1,5 mL, 30 min sob tratamento ultrassônico; análise realizada por HPLC-DAD.....37

Figura 3.4 - Percentagem de recuperação de T e E nos diferentes polímeros como fases sorventes. Condições do ensaio: 25 mL de água ultra-pura fortificada com 8 µg/L; extração: 3 h (1000 rpm), pH 5,5; retro-extração: MeOH:ACN (1:1, v:v; 1,5 mL), 30 min sob tratamento ultrassônico; análise realizada por HPLC-DAD.....38

Figura 3.5 - Percentagem de recuperação de T e E usando AC1 e P1 como fases sorventes. Condições do ensaio: 25 mL de água ultra-pura fortificada com 8 µg/L; extração: 3 h (1000 rpm), pH 5,5; retro-extração: MeOH:ACN (1:1, v:v; 1,5 mL), 30 min sob tratamento ultrassônico; análise realizada por HPLC-DAD.39

Figura 3.6 - Percentagem de recuperação de T e E usando diferentes solventes de retro-extração. Condições do ensaio: 25 mL de água ultra-pura fortificada com 8 µg/L; extração: 3 h (1000 rpm), pH 5,5; retro-extração: 1,5 mL, 30 min sob tratamento ultrassônico; análise realizada por HPLC-DAD..40

Figura 3.7 - Percentagem de recuperação de T e E usando diferentes tempos de retro-extração. Condições do ensaio: 25 mL de água ultra-pura fortificada com 8 µg/L;

extração: 3 h (1000 rpm), pH 5,5; retro-extração: ACN (1,5 mL); análise realizada por HPLC-DAD..	41
Figura 3.8 - Percentagem de recuperação de T e E usando diferentes velocidades de agitação. Condições do ensaio: 25 mL de água ultra-pura fortificada com 8 µg/L; extração: 3 h, pH 5,5; retro-extração: ACN (1,5 mL), 30 min sob tratamento ultrassónico; análise realizada por HPLC-DAD..	43
Figura 3.9 - Percentagem de recuperação de T e E usando diferentes tempos de equilíbrio. Condições do ensaio: 25 mL de água ultra-pura fortificada com 8 µg/L; extração: 1000 rpm, pH 5,5; retro-extração: ACN (1,5 mL), 30 min sob tratamento ultrassónico; análise realizada por HPLC-DAD.....	44
Figura 3.10 - Percentagem de recuperação de T e E usando diferentes valores de pH. Condições do ensaio: 25 mL de água ultra-pura fortificada com 8 µg/L; extração: 16 h (1000 rpm); retro-extração: ACN (1,5 mL), 30 min sob tratamento ultrassónico; análise realizada por HPLC-DAD.....	45
Figura 3.11 - Percentagem de recuperação de T e E usando diferentes níveis de modificador orgânico. Condições do ensaio: 25 mL de água ultra-pura fortificada com 8 µg/L; extração: 16 h (1000 rpm), pH 5,5; retro-extração: ACN (1,5 mL), 30 min sob tratamento ultrassónico; análise realizada por HPLC-DAD.....	46
Figura 3.12 - Percentagem de recuperação de T e E usando diferentes níveis de força iónica. Condições do ensaio: 25 mL de água ultra-pura fortificada com 8 µg/L; extração: 16 h (1000 rpm), pH 5,5; retro-extração: ACN (1,5 mL), 30 min sob tratamento ultrassónico; análise realizada por HPLC-DAD.....	47
Figura 3.13 – Curvas de calibração obtidas para T e E pelo método dos mínimos quadrados.....	49
Figura 3.14 – Cromatogramas relativos à amostra A, branco (sem hidrólise), fortificada a 16 µg/L e sem fortificação, obtidos por BAµE(P1)-LD/HPLC-DAD.....	51
Figura 3.15 – Cromatogramas relativos à amostra B, branco (sem hidrólise), fortificada a 16 µg/L e sem fortificação, obtidos por BAµE(P1)-LD/HPLC-DAD.....	52
Figura 3.16 - Curvas de calibração em urina de para T e E obtidos pelo método de adição padrão (SAM) para a amostra A.....	53

Figura 3.17 - Curvas de calibração em urina de para T e E obtidos pelo método de adição padrão (SAM) para a amostra B.....53

Anexos

Figura I – Espectro de UV/Vis da E..... III

Figura II – Espectro de UV/Vis da T..... IV

Índice de tabelas

3. Discussão de resultados

Tabela 3.1 – Tempos de retenção (t_R), limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ), gama linear e coeficiente de determinação (r^2) para T e E analisados por HPLC-DAD.....	35
Tabela 3.2 – Condições otimizadas para o método desenvolvido por BA μ E(P1)-LD/HPLC-DAD.....	47
Tabela 3.3 - Recuperações médias dos analitos nas condições otimizadas obtidas por BA μ E(P1)-LD/HPLC-DAD.....	48
Tabela 3.4 - LODs e LOQs para os analitos estudados, obtidos na validação do método BA μ E(P1)-LD/HPLC-DAD.....	48
Tabela 3.5 - Parâmetros relativos à gama dinâmica de trabalho para a presente metodologia.....	49
Tabela 3.6 - Ensaios de precisão obtidos por BA μ E(P1)-LD/HPLC-DAD fortificadas com 8 μ g/L em condições experimentais otimizadas.....	50
Tabela 3.7 – Parâmetros relativos às curvas de regressão obtidas por SAM e a razão T/E para as amostras de urina.	53

1. Introdução

A prática de administração de compostos que aumentam o desempenho desportivo remonta à Grécia Antiga. Porém, a palavra “*doping*” surge apenas pela primeira vez em 1889, no dicionário Inglês, para descrever a prática de “*dopar*” os cavalos de corrida com uma mistura que incluía ópio [1].

Os esteróides anabólicos e androgénicos, nomeadamente a testosterona (T), aparecem como agentes *dopantes* de eleição, sendo um dos casos mais mediáticos o do ciclista Lance Armstrong [2]. Estes compostos, para além de existirem endogenamente, dificultando a sua deteção, apresentam propriedades tentadoras para alguns atletas, que incluem o aumento da massa muscular, por efeito anabólico [3].

Por forma a responder ao fenómeno de *doping*, foi criada a Organização Mundial de Antidopagem (WADA), que impõe periodicamente controlos anti-*doping* aos atletas, estando incluído o controlo da administração de esteróides anabolizantes, como é o caso da T.

A amostra preferencial para a análise de T e seus derivados nos atletas é a urina, uma vez ser uma matriz mais fácil de manipular comparativamente com o sangue, sendo igualmente uma abordagem não invasiva, onde são eliminados teores compatíveis com as técnicas instrumentais vigentes [4]. De forma a proceder-se à sua deteção e quantificação são normalmente necessárias várias etapas [5] que requerem muito tempo de análise e consumo elevado de solventes, fundamentalmente para a extração dos compostos em estudo, recorrendo à tradicional extração líquido-líquido (LLE) ou mesmo à mais recentemente introduzida, extração em fase sólida (SPE).

Nos últimos anos as técnicas baseadas em sorção têm demonstrado ser uma alternativa credível para a micro-extração de compostos ao nível vestigial.

A técnica de micro-extração adsortiva (A μ E) tem vindo a demonstrar a sua versatilidade e robustez para a análise de vários compostos em matrizes aquosas, podendo ser uma alternativa viável para a extração de T e seus derivados em urina.

Nos próximos capítulos será abordada informação relevante para o enquadramento teórico desta temática, com ênfase em esteróides androgénicos e anabólicos como a T e a epitestosterona (E), as técnicas de extração sortiva, na qual se destaca a técnica de A μ E, e nos métodos convencionais de separação analítica com ênfase para a cromatografia líquida de alta performance (HPLC).

1.1 Esteróides androgénicos e anabólicos – testosterona e epitestosterona

A T é a principal hormona sexual masculina. A sua síntese química, realizada por Ruzicka e Weltstein, permitiu a estes investigadores a obtenção do prémio Nobel da Química em 1939 [6]. A estrutura química é similar à dos restantes esteróides, apresentando um núcleo com quatro anéis de carbono, três ciclohexanos e um ciclopentano, e grupos funcionais adicionais ligados a estes anéis (figura 1.1).

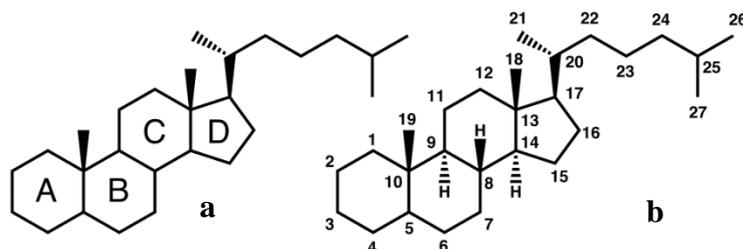


Figura 1.1 – Estrutura geral dos esteróides (a) juntamente com a correspondente numeração de carbonos (b). Adaptado de [7]

O colesterol é o precursor dos cinco grupos principais das hormonas esteróides, dependendo do recetor a que se ligam, nomeadamente, glucocorticóides, mineralocorticóides, androgénios, estrogénios e progestagénios. As hormonas esteróides têm 21 ou menos carbonos. Pregnenolona, um precursor de todas as outras hormonas esteróides, é a primeira hormona esteróide sintetizada a partir do colesterol através da quebra da ligação entre C20 e C22 (figura 1.2). A pregnenolona é convertida em progesterona, um grande precursor de outros quatro grupos e hormonas esteróides. O cortisol é produzido a partir da progesterona, que metaboliza gordura e proteína em glicogénio por forma a manter níveis normais de glucose no sangue [7]. A progesterona pode ser convertida em androstenediona depois de alguns passos intermediários, que resultam na quebra de ligação na posição C17, originando em androgénios C19. A T (figura 1.3) é sintetizada a partir da androstenediona através da redução do grupo ceto na posição C17.

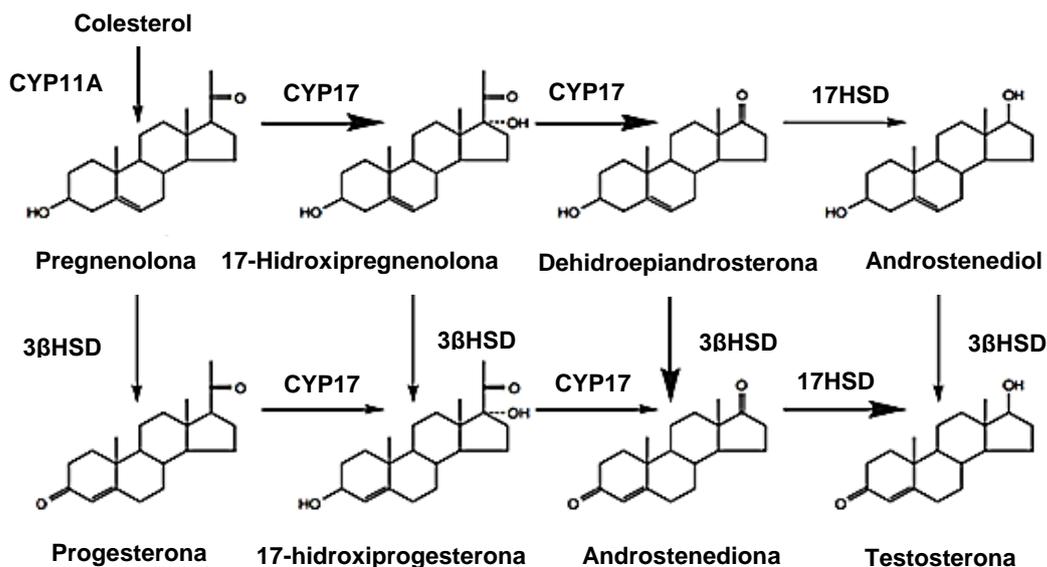


Figura 1.2 – Proposta da via de síntese biológica da T e os enzimas envolvidos na mesma. As setas mais largas dizem respeito às vias mais relevantes no Homem. Legenda: CYP – citocromo P450; HSD – Hidroxiesteróide dehidrogenase. Adaptado de [8].

A T, assim como os restantes compostos do grupo dos androgénios, são responsáveis pelo desenvolvimento dos caracteres sexuais secundários no homem. Os seis androgénios são a dehidroepiandrosterona, a androstenediona, o androstenediol, a T, a androsterona e a dihidrotestosterona. A dehidroepiandrosterona é um dos andrógenos derivados da pregnenolona sem a conversão da progesterona, resultado de uma via de síntese diferente da T. A dehidroepiandrosterona apresenta a mesma massa molecular que a T, e a estrutura mais similar com a da T entre os androgénios.

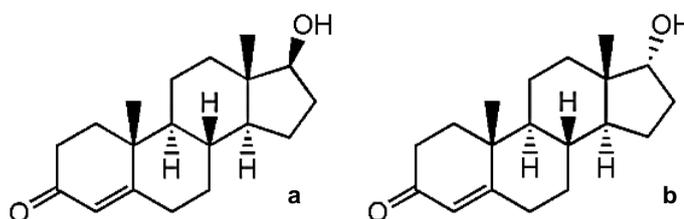


Figura 1.3 – Estruturas químicas de T (a) e E (b). Adaptado de [9].

A epitestosterona (E), um epímero da T na posição C17 (figura 1.3), é uma forma inativa da T, não apresentando nenhum efeito anabólico nem androgénico. Ainda não se conhece por completo o papel fisiológico deste composto, nem qual a via de síntese da mesma [10]. No entanto, estudos recentes mostraram que metade da E existente no organismo é produzida nos intestinos, e acumula-se no fluido cístico mamário e na próstata. São também conhecidos efeitos neuroprotetivos e atividade anti-androgénica por parte deste composto [11]. Pensa-se ainda que a E seja produzida através de duas diferentes vias de síntese que envolvem 4-androstenediona e dehidroepiandrosterona, e 17 α -hidroxiesteróide dehidrogenase como catalisador enzimático (figura 1.4), tendo sido demonstrado como marginal a produção de E a partir de T [11].

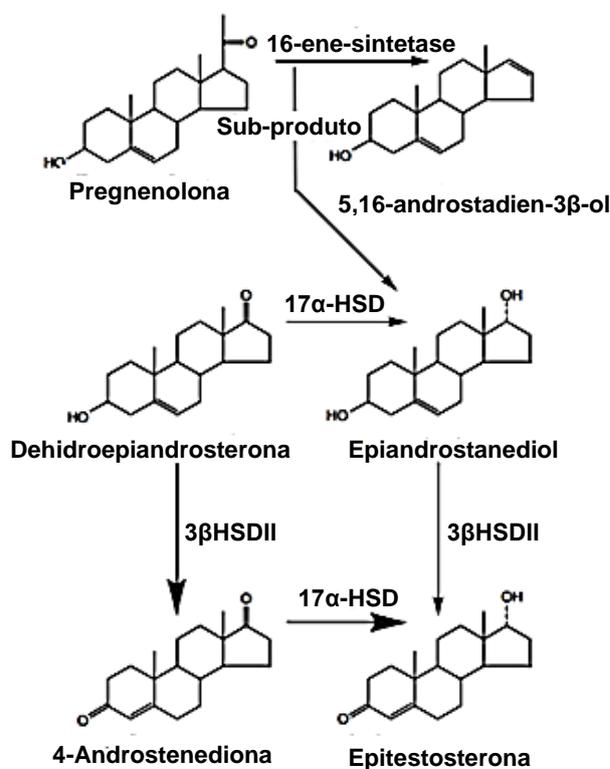


Figura 1.4 – Proposta de via de síntese da E. As setas mais largas dizem respeito às vias provavelmente predominantes no Homem. Legenda: HSD – Hidroxiesteróide dehidrogenase. Adaptado de [8].

A razão entre T e E (T/E) que se encontra naturalmente presente nos fluidos biológicos humanos é aproximadamente 1:1 [10], existindo, no entanto, algumas exceções. Neste sentido, foi observado que existem indivíduos com baixos níveis de E, nomeadamente os de origem asiática. Foi igualmente demonstrado que o consumo de

determinados xenobióticos, como por exemplo, elevadas doses de etanol, influencia este marcador. Também, a administração de androstenediona aumenta a excreção de E, baixando a razão T/E, e o consumo de dehidroepiandrosterona aumenta-a [11].

O principal local de metabolismo androgénico encontra-se no fígado, nomeadamente nos microssomas, uma vez ser particularmente rico em enzimas catabólicas esteróides. A T é submetida a um extenso metabolismo de fase I (figura 1.5) tornando-o mais polar e solúvel em água. Este processo envolve a oxidação do grupo 17-hidroxilo a androstenediona, a redução do anel A para se obter 5a- e 5b-androstanediona, em seguida, a ação da 3a- e 3b- hidroxisteróide desidrogenase para formar os metabolitos tetra-hidro-17-oxosteróide, androsterona e etiocolanolona, como principais metabolitos, e, em muito menor grau, epiandrosterona. Os isómeros 5a e 5b-androstanediol-3a e 17b-androstanediol são igualmente metabolitos secundários da T, sendo uma proporção muito pequena convertida em estradiol [12].

Os compostos androgénicos presentes na urina apresentam-se quase totalmente conjugados. As reações da fase II dizem respeito a reações que originam compostos conjugados com ácido glucurónico ou sulfato, sendo os primeiros presentes maioritariamente na urina. A conjugação dos compostos androgénicos ao ácido glucurónico ou sulfato é principalmente realizada por sistemas de enzimas no fígado, embora esses sistemas também estejam presentes em outros tecidos, nomeadamente o rim e o intestino. Estas reações tornam os metabolitos esteróides ainda mais solúveis em água. Uma pequena fração de metabolitos dos compostos androgénicos é excretada através da bÍlis para o intestino delgado, embora os conjugados sulfato possam ser reabsorvidos como parte da circulação entero-hepática. O facto dos conjugados sulfatados apresentarem uma forte ligação à albumina que se encontra no sangue pode explicar a razão de serem tão rapidamente excretados em relação aos conjugados glucurónicos [12].

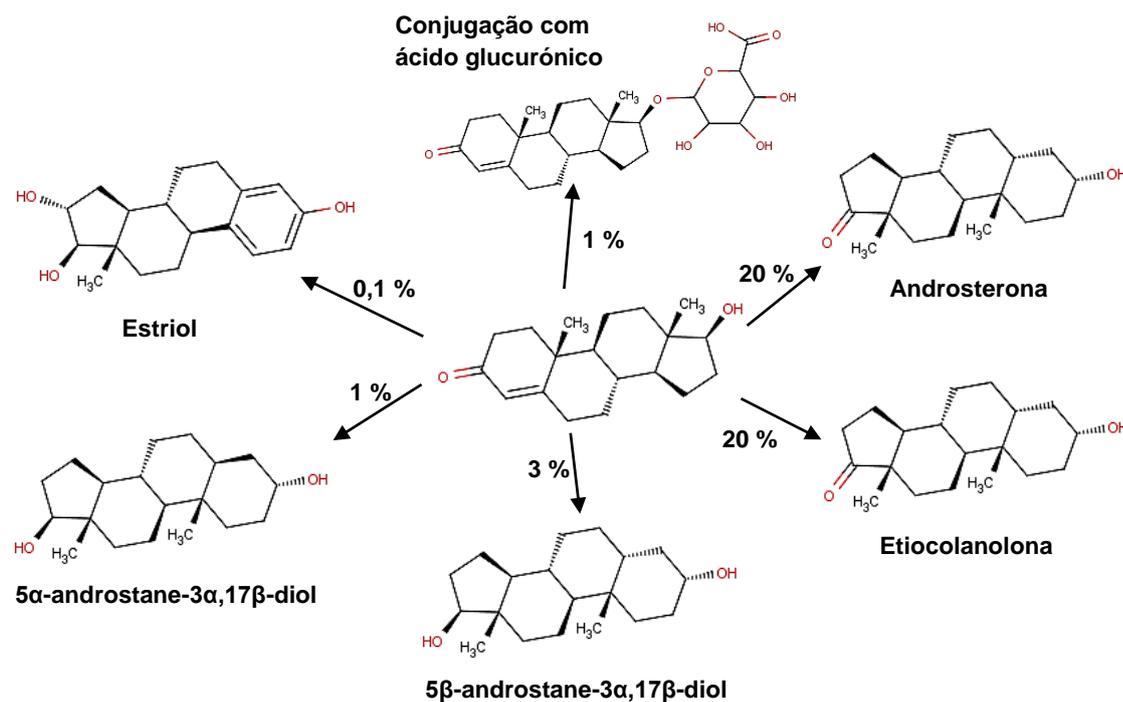


Figura 1.5 – Proposta dos principais produtos do metabolismo da T. A percentagem por cima das setas indica qual a proporção aproximada de T que é convertida nesses compostos. Adaptado de [8].

1.2 Metodologias analíticas

A partir dos anos 50 do século passado verificou-se o aparecimento de casos de *doping* relacionados com esteróides anabólicos. Isto deveu-se essencialmente pela descoberta da síntese química da T e suas propriedades anabólicas [1]. Contudo, o consumo destas substâncias é difícil de detetar uma vez existem endogenamente, nomeadamente a T e E. Em 1975 o Comité Olímpico Internacional (IOC) adicionou os esteróides anabólicos à lista de substâncias proibidas [13], não existindo à altura métodos analíticos que permitissem avaliar a sua administração. Os trabalhos de Donike *et al.* [13] permitiram estabelecer a razão T/E em urina acima de 6 como marcador da administração de T exogenamente, uma vez a E não ser um metabolito da anterior. Este conceito permitiu à Comissão Médica do IOC, em 1982, adicionar T à lista de substâncias proibidas, usando como único método de controlo o marcador T/E acima de 6 [13].

No entanto, este marcador foi, e continua a ser, bastante controverso, uma vez existem diversos fatores endógenos, exógenos e outros, que o influenciam. Incluem-se nos fatores endógenos a idade e fase do desenvolvimento, doenças endocrinológicas, origem étnica, ciclo menstrual, ritmo circadiano, gravidez, assim como o exercício físico.

Quanto aos fatores exógenos, podem ser a ingestão de contraceptivos orais; administração de cetoconazole, assim como a ingestão de etanol e outros xenobióticos. Ainda, outros fatores incluem a má refrigeração (acima dos 4°C) e acondicionamento das amostras, e degradação microbiológica e enzimática das mesmas [14]. Por estas razões, e embora a razão T/E ainda seja hoje usada pelo IOC e pelo WADA, é ainda adotado um exame ao perfil de esteróides, consistindo na análise de rotina contínua da urina dos atletas envolvidos antes, durante e após as competições. As diretivas do WADA para a fase de *screening* apresentam os seguintes critérios para amostras de urina [15]:

- Razão de T/E igual ou acima de 4;
- Concentração de T ou E (equivalente ao glucuronido) superior a 200 µg/L;
- Concentração de androsterona ou etioconalona (equivalente ao glucuronido) superior a 10 000 µg/L;
- Concentração de dehidroepiandrosterona (equivalente ao glucuronido) superior a 100 µg/L.

As amostras que apresentem pelo menos um dos critérios acima assinalados devem ser posteriormente analisadas por cromatografia em fase gasosa com interfase de combustão, associado a um espectrômetro de massa de razão isotópica (GC/C/IRMS).

No entanto, diversos outros trabalhos têm sido publicados, no qual descrevem métodos alternativos para a análise de esteróides anabólicos. Estes incluem ensaios imunológicos, nomeadamente ensaios imunoenzimáticos (ex., ELISA, *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) [16] e imunossensores [17]; e métodos de separação instrumental, nomeadamente a eletroforese capilar (CE) [9], e técnicas cromatográficas no qual se incluem a GC [18] e a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) [19,20,21], podendo a informação estrutural ser obtida através da hifenação com espectrometria de massa (MS) [22,23].

Todavia, antes da análise instrumental, é necessário um passo prévio para extração e concentração dos analitos orgânicos das matrizes envolvidas. Como consequência, os compostos são isolados seletivamente da matriz e a concentração dos mesmos é aumentada por forma a diminuir os limites analíticos e a tornar possível a identificação e/ou quantificação dos mesmos [24]. Este processo tem sido maioritariamente realizado, nas últimas décadas, com recurso à extração líquido-líquido (LLE) e extração em fase sólida (SPE). No entanto, estes processos, em particular a LLE, consomem uma grande

quantidade de solventes, sendo na atualidade uma técnica ambientalmente pouco favorável [25]. Por forma a dar resposta a uma política de “química verde” dos laboratórios, foram adotadas técnicas de preparação de amostra que minimizem ou eliminem o consumo de solventes. Algumas destas técnicas têm vindo a ser empregues para a extração de T e outros compostos derivados, como é o caso da micro-extração em fase líquida (LPME) [26], e técnicas de extração sortiva como a micro-extração em fase sólida (SPME) [27] e a extração sortiva em barra de agitação (SBSE) [21]. Estas últimas, para além de reduzirem a manipulação analítica, proporcionam significativa sensibilidade na recuperação de analitos alvo, elevada reprodutibilidade, rapidez, baixo custo e facilidade de automatização [25,28-33].

1.3 Técnicas de extração sortiva

As técnicas baseadas em extração sortiva mais recentes e crescentemente disponíveis dizem respeito ao SPME e SBSE. Na extração sortiva os analitos são extraídos de uma matriz (líquida ou gasosa) para um polímero líquido imiscível. Em contraste com a extração adsorptiva, em que os solutos migram para a fase sorvente, na extração adsorptiva o analito interage com locais ativos na superfície da mesma. Assim, a quantidade total de fase extrativa é importante na extração adsorptiva, não apenas a área superficial. O processo de extração é controlado pelo coeficiente de partição dos analitos entre a fase polimérica e a matriz da amostra, sendo por isso um fenómeno de equilíbrio. Ambas as técnicas de extração sortiva (SPME e SBSE) podem ser utilizadas diretamente na matriz da amostra assim como no espaço de cabeça (HS), podendo ser usadas várias vezes consecutivas sem demonstrar sinais evidentes de deterioração do material polimérico [25,28-33].

A fase mais usada para extração sortiva é o polidimetilsiloxano (PDMS), material comum das fases estacionárias das colunas capilares de GC, sendo termoestável, mais inerte do que os materiais adsorventes convencionais, possui excelentes propriedades de difusão e pode ser usado para uma variedade alargada de temperaturas (-20 e 320 °C) [33].

1.3.1 Extração sortiva em barra de agitação (SBSE)

Em SPME a quantidade de PDMS é muito limitada, sendo uma fibra típica constituída por cerca de 0,5 μL de fase extrativa. Consequentemente, a eficiência de extração para solutos que são parcialmente solúveis em água pode ser bastante baixa. Por outro lado, para compostos muito apolares, competição pode ocorrer entre a fase aquosa, a fibra de SPME, parede de vidro do *vial* de extração, e a superfície barra de agitação de teflon usados para agitar as amostras [27,30]. Por forma a colmatar estas limitações, Sandra e colaboradores introduziram SBSE como técnica alternativa ao SPME para enriquecimento de compostos orgânicos de matrizes aquosas [33], registada com a denominação Twister. Em SBSE, uma barra de agitação, constituída por um magnete envolto numa fina película de vidro revestido por um filme de 24 a 126 μL de PDMS (figura 1.6), é colocada sob agitação num recipiente apropriado, por forma a promover o movimento de rotação na matriz líquida para que seja feita a extração dos analitos para a camada polimérica, em condições experimentais otimizadas (figura 1.7).

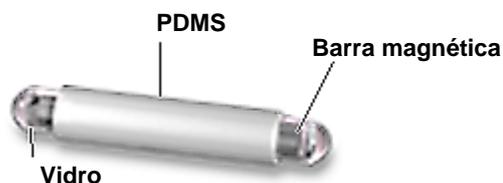


Figura 1.6 - Representação esquemática dos constituintes de uma barra de agitação usada na SBSE. Adaptado de [34]

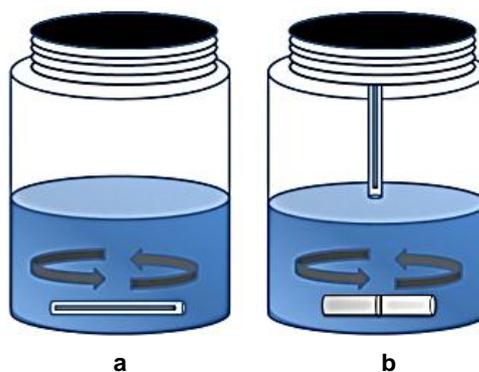


Figura 1.7 – Modos de extração em SBSE: imersão (a) e espaço de cabeça (b). Adaptado de [25]

Tal como as outras técnicas de extração (ex. SPME), as condições experimentais de SBSE têm de ser otimizadas para cada tipo específico de aplicação. Para além das características de polaridade dos analitos e da fase de revestimento, a eficiência de recuperação é igualmente influenciada por parâmetros como o tempo de extração, a velocidade de agitação, temperatura, força iónica, pH e características de polaridade do meio, no sentido do analito com interesse atingir o equilíbrio de distribuição entre a matriz da amostra e o revestimento polimérico [25].

A teoria de SBSE é similar à de SPME, na medida em que são ambas metodologias de extração sortiva estática envolvendo o mesmo polímero. Estas são técnicas de equilíbrio, e para amostras de água, a extração de compostos da fase aquosa para a fase extrativa é controlada pelo coeficiente de partição dos compostos entre estas duas fases ($K_{\text{PDMS/W}}$). Estudos indicam que existe uma correlação entre este coeficiente de partição e o coeficiente de distribuição octanol-água ($K_{\text{O/W}}$) [31,32]. Assim, o coeficiente de distribuição entre o PDMS e a água ($K_{\text{PDMS/W}}$) é definido pela razão entre a concentração do analito na fase de PDMS (C_{PDMS}) e na fase aquosa (C_{W}), depois de atingido o equilíbrio da extração, tal como é descrito pela equação (1):

$$K_{\text{O/W}} \approx K_{\text{PDMS/W}} = \frac{C_{\text{PDMS}}}{C_{\text{W}}} = \frac{m_{\text{PDMS}}}{m_{\text{W}}} \times \frac{V_{\text{W}}}{V_{\text{PDMS}}} \quad (1)$$

onde m_{PDMS} é a massa do analito na fase de PDMS, m_{W} a massa do analito na fase aquosa, V_{W} o volume de amostra na fase aquosa e V_{PDMS} o volume em PDMS [31–33].

Tendo em conta a equação (1), verifica-se que o $K_{\text{O/W}}$ de cada composto determina de modo significativo a eficiência de extração em SPME e SBSE. No entanto, como a quantidade de PDMS é muito superior em SBSE do que em SPME, prevê-se melhor eficiência de extração para a primeira, sob condições semelhantes (figura 1.8). Devido à maior capacidade, SBSE apresenta melhores e maiores recuperações que a SPME, especialmente para compostos apolares. Consequentemente, esta metodologia permite um aumento de sensibilidade num fator compreendido entre 50 e 250 quando comparado com SPME [35].

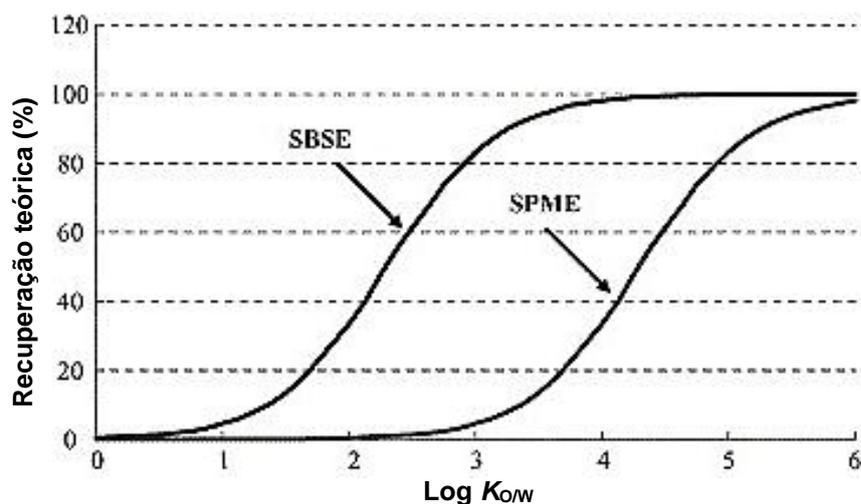


Figura 1.8 - Recuperações teóricas de SPME (PDMS: 0,5 μ l) e SBSE (PDMS: 50 μ l) em função do coeficiente de partição de octanol-água em idênticas condições experimentais. Adaptado de [36].

De uma forma genérica, compostos com $\log K_{ow}$ acima de 3 podem apresentar boas eficiências de extração com SBSE. No entanto, para compostos com $\log K_{ow}$ igual ou inferior a 3, esta técnica já não será a mais indicada. Ou seja, a SBSE apresenta-se como uma boa técnica de extração apenas para compostos apolares [29].

Neste sentido, a principal desvantagem de SBSE prende-se com a extração de compostos polares ($\log K_{ow}$ igual ou abaixo de 3) ou termolábeis. Posteriormente, têm surgido fases e formas de revestimento para barra de SBSE para além de PDMS, nomeadamente o *dual-phase*, que foi introduzido pela combinação de PDMS e carvão ativado [37], o co-polímero PDMS-poli(etilenoglicol) (EG/Silicone, PDMS(EG)) e o co-polímero poli(acrilato)-poli(etilenoglicol) (Acrylate, PDMS/PA) [34], mas continuam a não apresentar boas eficiências de extração para compostos mais polares [38,39]. Também, usando a tecnologia de sol-gel, outros grupos químicos foram introduzidos na rede de PDMS, incluindo β -ciclodextrinas (β /CD), divinilbenzeno (DVB) e poli(vinilálcool) (PVA), obtendo-se melhor eficiência de extração para compostos polares, embora se tenha observado fissuras no polímero devido à fricção com o *vial*, levando à degradação da barra ao longo do tempo [29]. Outros materiais como os materiais de acesso restrito (RAMs), polímeros com impressão molecular (MIPs), materiais monolíticos, poli(ftalazina éter sulfona cetona) (PPESK), polipirrolidona (PPY) e poliuretanos (PU) foram propostas como fase polimérica para a extração de compostos polares, em alternativa ao SBSE(PDMS) [29,49].

Neste contexto, é de extrema importância o desenvolvimento de metodologias alternativas que recorram a dispositivos contendo materiais com propriedades de sorção e que promovam melhores eficiências de extração.

1.3.2 Micro-extração adsortiva em barra (BA μ E)

Por forma a colmatar as limitações de SBSE, nomeadamente em relação ao PDMS e à fixação de matérias adsorptivas na barra, foi proposto e desenvolvido a técnica de micro-extração adsortiva, tendo sido adotadas duas configurações geométricas, nomeadamente, em barra (BA μ E) e em multi-esferas (MSA μ E) – figura 1.9; não havendo evidência de diferenças significativas entre um e outro formato geométrico [35].

Estes dispositivos são preparados manualmente por fixação térmica dos materiais adsorventes ou com adesivos. A barra é preparada por cobertura de tubos cilíndricos de polipropileno (15 mm em comprimento e 3 mm em diâmetro) com adesivos. As multi-esferas são preparadas através da cobertura do material adsorvente de 5 a 10 esferas de polistireno ligadas por um fio, seguido de tratamento térmico (2 horas), resultando em esferas com diâmetro de aproximadamente 2 mm. A quantidade de adsorvente fixado, dependente do tipo de material de extração e da configuração adoptada, e pode ir de 1 a 5 mg. Estes dispositivos são colocados num *vial* de extração contendo a amostra (normalmente com 20 a 30 mL) e auxílio de uma barra de agitação magnética de Teflon. O mecanismo de agitação promove a flutuação da barra até que se atinja o equilíbrio (figura 1.10), sendo uma vantagem em relação ao SBSE.

Os materiais adsorptivos disponíveis para esta técnica incluem carvões ativados, alumina, sílica, polistireno-divinilbenzeno (PS-DVB), pirrolidona modificada e polímeros à base de alumina e sílica. Isto porque materiais sólidos conseguem adsorver facilmente moléculas polares, uma vez possuem uma vasta área específica e nanoporos com sítios ativos, onde interações eletrostáticas e/ou dispersivas (propriedades de “adsorção-dessorção”) ocorrem. Um bom exemplo são os carvões ativados, que apresentam superfícies específicas que podem ir até aos 1500 m²/g, obtendo-se capacidades adsorptivas que vão desde os 100 aos 500 μ g/mg, dependendo do pH_{PZC} (pH do ponto de carga zero) e da textura. Por outro lado, materiais poliméricos atuam do tipo fase reversa, retendo os analitos de acordo com ligações π - π , ligações por pontes de

hidrogénio, interações dipolo-dipolo e interações iónicas, sendo a extração igualmente condicionada pela área superficial e tamanho das partículas dos mesmos [29].

Por forma otimizar a extração é necessário ter em conta parâmetros experimentais como o tempo de equilíbrio entre as fases, a velocidade de agitação e características da matriz, isto é, o pH, polaridade e força iónica.

Trabalhos recentes, desenvolvidos com recurso a esta técnica, permitem verificar que apresenta excelentes resultados para a extração de uma gama alargada de compostos (polares e apolares) numa variedade de matrizes aquosas [35,40-43].

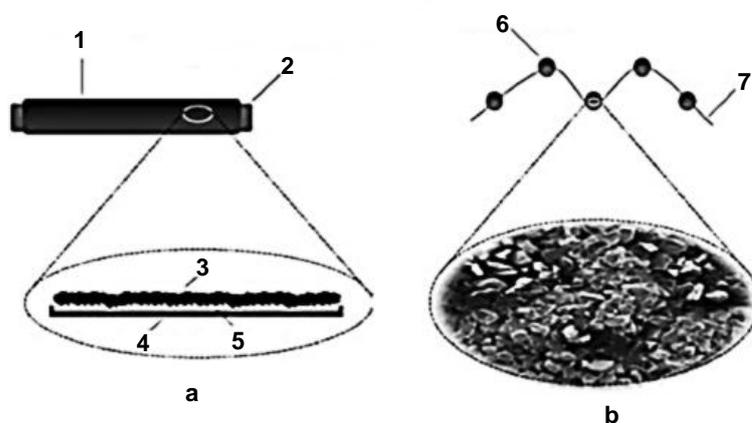


Figura 1.9 – Representação esquemática e imagens BAμE (a) e MSAμE (b). Legenda: 1 – fase extrativa; 2 – barra de polipropileno; 3 - fase extrativa; 4 – suporte de polipropileno; 5 – fita adesiva; 6 – esfera de polistireno coberta com fase extrativa; 7 – fio.
Adaptado de [29].

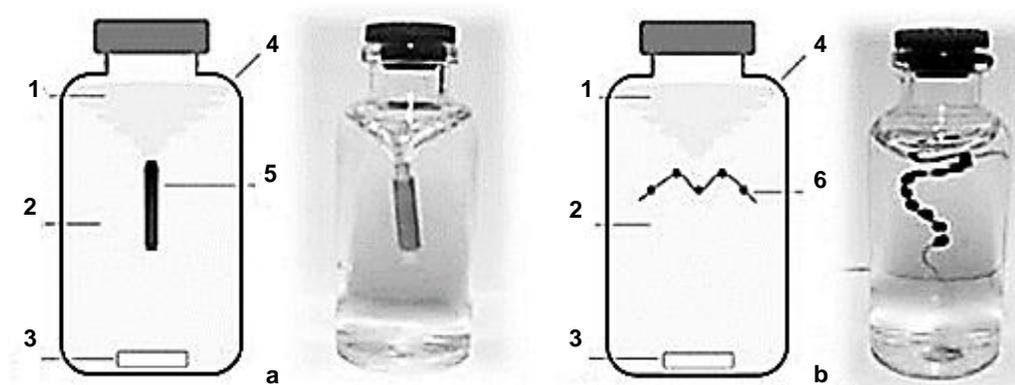


Figura 1.10 – Representações esquemáticas e imagens exemplificativas de BAμE (a) e MSAμE (b). Legenda: 1 – vórtex; 2 – amostra; 3 – barra de agitação magnética de Teflon; 4 – vial de extração; 5 – dispositivo de micro-extração em barra; 6 - dispositivo de micro-extração em multi-esferas. Adaptado de [29]

1.4 Técnicas cromatográficas

De modo a proceder-se à identificação dos componentes de uma mistura, é necessário realizar a separação dos mesmos com recurso a técnicas cromatográficas ou eletroforese capilar.

1.4.1 *Aspetos históricos*

O termo “cromatografia” foi introduzido e utilizado pela primeira vez pelo botânico russo Mikhail S. Tswett em 1906 no jornal da sociedade alemã de botânica. M.S. Tswett aplicou a técnica para separar diversos pigmentos de plantas, principalmente clorofilas e xantofilas, através da passagem de soluções numa coluna de vidro empacotada com carbonato de sódio. As espécies separadas apareciam como bandas coradas na coluna resultando assim o termo “cromatografia” escolhido para o método (do grego “chroma” que significa cor e “graphein” que significa escrita) [44-46].

As técnicas cromatográficas têm-se imposto como principal técnica de separação no último século devido à grande necessidade dos cientistas terem métodos capazes de caracterizar diversos tipos de misturas complexas. A importância destas técnicas foi reconhecida pela atribuição do prémio Nobel da Química à dupla A.J.P. Martin e R.L.M. Synge em 1952, pelo desenvolvimento teórico da cromatografia de partição. Desde então, a cromatografia tem tido um papel decisivo nas diversas descobertas científicas realizadas [6].

1.4.2 *Discricção geral e conceitos teóricos*

Por forma a compreender o método cromatográfico é necessário ter em conta uma série de conceitos básicos. Dado que existem atualmente dezenas de manuais que descrevem os conceitos de cromatografia de forma exaustiva, nesta secção apresentar-se-á resumidamente alguns dos aspetos teóricos considerados mais relevantes [47-49].

A cromatografia engloba um conjunto de métodos de separação nos quais os componentes duma mistura se distribuem entre duas fases, uma fase estacionária sólida ou líquida (fixada numa coluna ou numa superfície sólida) através da qual é percorrida por uma fase móvel, que pode ser líquida, gasosa ou um fluido supercrítico.

A separação resulta das diferenças de velocidade dos componentes arrastados pela fase móvel, ocasionadas pelas diferentes interações com a fase estacionária, promovendo distribuições diferenciadas no equilíbrio entre as fases móvel e estacionária. As concentrações relativas de um componente na fase estacionária (c_S) e na fase móvel (c_M) relacionam-se através do coeficiente de distribuição (K), dado pela equação (2):

$$K = \frac{c_S}{c_M} \quad (2)$$

Quanto maior for o valor de c_S , maior será o valor de K , significando que maior será a interação com a fase estacionária. Os componentes com um valor de K elevado mover-se-ão mais lentamente ao longo da coluna, podendo assim ser separados dos componentes com um valor de K mais baixo. Uma separação não pode ser efetuada sem haver diferenças na distribuição entre os componentes. A migração diferencial dependerá, portanto, das variáveis experimentais que afetam a distribuição, isto é, das características das fases móvel e estacionária envolvidas, assim como de outros fatores experimentais.

Considerando uma mistura de dois componentes, a separação numa coluna só se efetuará se forem diferencialmente retidos pela fase estacionária, sendo necessários volumes diferentes de fase móvel para eluir cada componente individualmente (figura 1.11).

Um composto não retido será eluído no tempo morto (t_M), enquanto um composto retido eluirá posteriormente, atravessando a coluna num tempo de retenção (t_R) superior, sendo o tempo de retenção ajustado (t'_R) o tempo que o composto despense na fase estacionária.

Uma medida do grau de retenção é designada por fator de capacidade (k') que pode ser calculado a partir da equação (3), desde que a velocidade de fluxo se mantenha constante:

$$k' = \frac{t_R - t_M}{t_M} \quad (3)$$

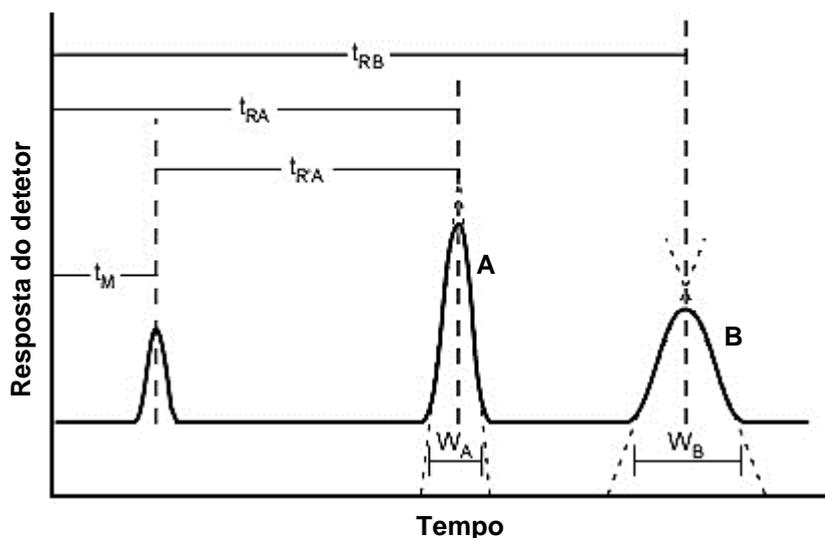


Figura 1.11 - Representação da eluição de dois componentes (A e B) e respectivos parâmetros de retenção. Adaptado de [49]

A separação de dois compostos adjacentes pode exprimir-se através do fator de separação ou de seletividade (α), que está relacionado com a fase estacionária e condições de operação, traduzindo-se pela razão entre os fatores de capacidade de dois compostos adjacentes, equação (4):

$$\alpha = \frac{k'_B}{k'_A} \quad (4)$$

Sendo a cromatografia um fenómeno de transferência de massa, a eficiência de uma coluna cromatográfica pode ser expressa pelo número de pratos teóricos (N), grandeza que exprime o número de equilíbrios que ocorrem durante a separação, sendo tanto maior quanto maior for N, e que pode ser calculada pela equação (5), em que W é a largura da base de um pico simétrico:

$$N = 16 \times \left(\frac{t_R}{W}\right)^2 \quad (5)$$

O objetivo das aplicações cromatográficas consiste em separar todos os componentes de uma dada mistura, sendo a medida de separação entre dois compostos designada por resolução (R_S). Desta forma, pode recorrer-se a uma expressão que exprime a R_S em termos dos três fatores fundamentais, ou seja, seletividade (α), fator de capacidade (k') e eficiência (N), como é ilustrado na equação (6) [47-49]:

$$R_S = \frac{1}{4} \times \sqrt{N} \times \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \times \left(\frac{k'_B}{(k'_B + 1)} \right) \quad (6)$$

Qualquer pico com formato gaussiano ocorre separação completa ou resolução entre eventuais picos adjacentes sempre que R_S seja superior ou igual a 1,5.

Genericamente, as técnicas cromatográficas podem ser classificadas relativamente à forma física pelo qual as fases móvel e estacionária entram em contacto. Isto é, numa forma planar, no qual a fase móvel é mantida num prato ou numa folha de papel e a fase móvel move-se pela fase estacionária por capilaridade ou gravidade, ou em coluna, no qual a fase móvel é mantida num tubo estreito pelo qual a fase móvel é forçada a passar sob pressão. No entanto, outra classificação é possível, tendo em consideração três critérios, nomeadamente a natureza física da fase móvel, o suporte da fase estacionária e a natureza do mecanismo de separação.

1.4.3 Cromatografia líquida de alta eficiência

Na cromatografia líquida em coluna clássica, o movimento da fase móvel ocorre por ação da gravidade, sendo a separação lenta. No entanto, com recurso à moderna instrumentação cromatográfica, a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) permite alcançar melhor resolução para além da maior rapidez associada.

Os componentes básicos de um sistema de HPLC são constituídos por uma bomba que propulsiona o eluente proveniente de reservatórios, um sistema de injeção para a introdução da amostra, uma coluna para separação e um detetor que permite registar a separação, controlados com recurso a *software*, permitindo análise qualitativa e quantitativa dos analitos em estudo.

A figura 1.12 ilustra um esquema simplificado de um sistema de HPLC convencional. Utilizam-se ainda diversas vezes, como acessórios, coletores de frações e dispositivos para condicionamento da coluna.

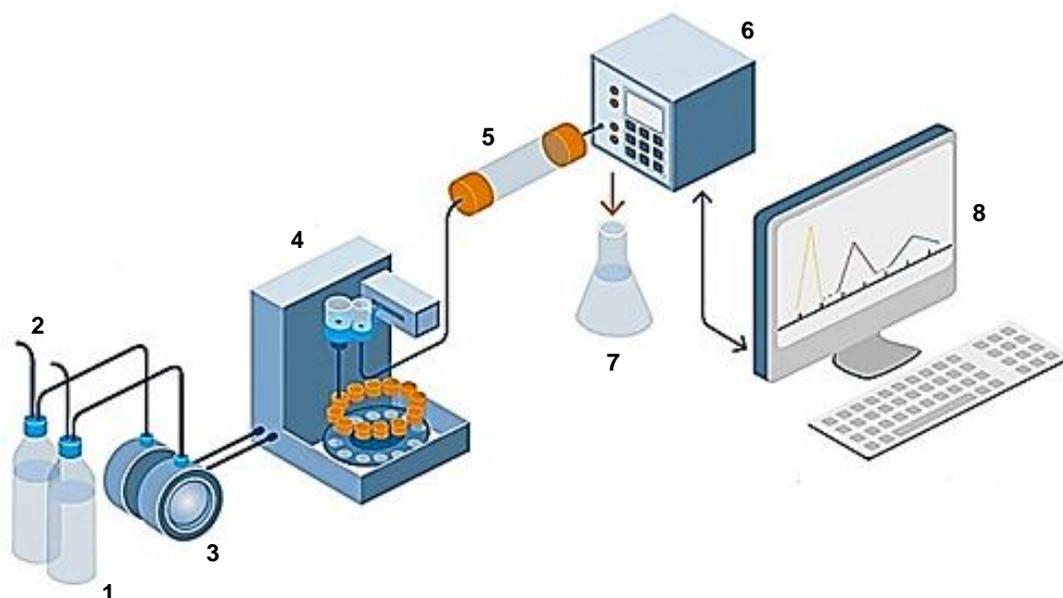


Figura 1.12 - Esquema simplificado de um sistema de HPLC convencional. Legenda: 1 – Reservatório de fase móvel; 2 – Desgaseificador; 3 – Bomba; 4 – Amostrador automático e injetor; 5 – Coluna; 6 – Detetor; 7 – Coletor; 8 – Sistema de aquisição de dados.

Adaptado de [50]

Na HPLC, o(s) reservatório(s) para a fase móvel devem ser o mais inertes possíveis, equipados com um sistema que permita desgaseificar a fase móvel, uma vez que a análise pode ser prejudicada pela presença de gases dissolvidos.

As análises cromatográficas por HPLC podem ser efetuadas mantendo a composição da fase móvel constante ou variável, designando-se por eluição isocrática ou por gradiente, respetivamente. A fase móvel é impulsionada por uma bomba, sendo as recíprocas as mais vulgares, podendo o sistema de funcionamento ser isocrático, binário ou quaternário.

No sistema de injeção, a amostra é introduzida com o auxílio de uma seringa convencional e válvulas especiais que permitem grande precisão e exatidão. Existem dois modos de injeção, o modo de injeção “stop-flow” e o modo de injeção que consiste no sistema de “loop”, mais vulgarmente usado, encontrando-se na atualidade automatizado.

É nas colunas cromatográficas que é efetuada a separação dos analitos da amostra. As colunas utilizadas em HPLC são vulgarmente em aço inoxidável contendo um enchimento com partículas de diâmetro compreendido entre 3 e 5 μm . As colunas analíticas usuais têm cerca de 5 a 25 cm em comprimento e 3 a 5 mm de diâmetro interno. Dependendo do tipo de análise ou amostras a estudar, são por vezes usadas pré-colunas colocadas à entrada da coluna analítica, que têm como finalidade aumentar o tempo de vida da mesma, retendo eventuais impurezas. Consoante a polaridade das partículas usadas no enchimento das colunas, estas podem ser classificadas em fase normal para um enchimento com partículas de características mais polares, e em fase reversa, para partículas com características apolares, sendo as últimas as mais vulgarmente usadas e, na sua grande maioria, constituídas por metil, octil e octadecilsilica.

Os compostos separados na coluna cromatográfica são posteriormente detetados por um dispositivo adequado. Há uma grande variedade de sistemas de deteção que se baseiam tanto em propriedades físicas como nas propriedades químicas dos solutos, podendo ainda basear-se na variação das propriedades físicas da fase móvel como é, por exemplo, o índice de refração. Um dos detetores mais comuns em HPLC é o ultravioleta-visível (UV/vis), podendo operar com comprimento de onda variável ou múltiplo. Ultimamente, o recurso a detetores por rede de díodos (DAD), cujo princípio de funcionamento permite o varrimento espectral em simultâneo, obtendo-se vantagens qualitativas, em particular para identificação. Outros detetores muito usados são a fluorescência, eletroquímico, condutividade e, na atualidade, o acoplamento a MS.

1.5 Objetivos

O presente trabalho tem como principal finalidade o desenvolvimento de um método analítico alternativo e ambientalmente viável para a determinação vestigial de T, E e conseqüente razão T/E em contexto de controlo anti-*doping*. Para tal, considera-se os seguintes objetivos:

- Aplicação da técnica de micro-extração adsortiva em barra, seguida de retro-extração líquida e análise por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por rede de díodos (BA μ E-LD/HPLC-DAD);
- Avaliação e seleção do material adsortivo (carvões ativados ou polímeros) para a extração dos analitos de interesse em alternativa ao PDMS usado em SBSE;
- Otimização e validação da metodologia desenvolvida;
- Aplicação do método analítico em matrizes de urina;
- Comparação da metodologia desenvolvida com outras técnicas vigentes, nomeadamente SBSE.

2. Parte experimental

2.1 Reagentes, materiais e amostras

O metanol (MeOH, 99,8 %) e acetonitrilo (ACN, 99,8 %) foram obtidos da Fisher (R.U.). O cloreto de sódio (NaCl, 99,5 %) foi adquirido da Merck (Alemanha), o hidróxido de sódio (NaOH, 98,0 %) foi obtida da AnalaR (BDH Chemicals, R.U.) e o ácido clorídrico (HCl) a 37 % foi fornecido pela Panreac (Espanha). Água ultra-pura foi obtida pelo sistema de purificação de água Milli-Q (Milipore, Bedford, MA, E.U.A.).

Os ACs comerciais em pó, CN1 (AC1; área superficial: 1400 m²/g; pH_{pzc}: 6,4), CA1 (AC2; área superficial: 1400 m²/g; pH_{pzc}: 2,2), SX1 (AC3; área superficial: 900 m²/g; pH_{pzc}: 8,4), SX Plus (AC4; área superficial: 1100 m²/g; pH_{pzc}: 7,5) e B TEST EUR (AC5; área superficial: 1500 m²/g; pH_{pzc}: 8,5) foram fornecidos pela Cabot Norit (Texas, E.U.A.) e cedidos pela Salmon & Cia. Lda. (Portugal). O co-polímero modificado de pirrolidona e divinilbenzeno de fase reversa Strata™-X (P1; tamanho das partículas: 33 µm; tamanho dos poros: 85 Å; área superficial: 800 m²/g; estabilidade de pH: 1-14) foi fornecido pela Phenomenex (Torrance, CA, E.U.A.). O co-polímero de divinilbenzeno e pirrolidona de troca catiónica Oasis® MCX (P2; tamanho das partículas: 60 µm; tamanho dos poros: 80 Å; área superficial: 830 m²/g; estabilidade de pH: 0-14) e o co-polímero de divinilbenzeno e pirrolidona de troca aniónica Oasis® MAX (P3; tamanho das partículas: 30 µm; tamanho dos poros: 80 Å; área superficial: 830 m²/g; estabilidade de pH: 0-14) foram adquiridos da Waters (Franklin, MA, E.U.A.). O polímero de estireno-divinilbenzeno (DVB) Strata® SDBL (P4; tamanho das partículas: 100 µm; tamanho dos poros: 260 Å; área superficial: 500 m²/g; estabilidade de pH: 1-14) e o polímero com ciano Strata® CN (P5; tamanho das partículas: 55 µm; tamanho dos poros: 70 Å; área superficial: 500 m²/g; estabilidade de pH: 1-14) foram fornecidos pela Phenomenex (Torrance, CA, E.U.A.).

Os padrões de testosterona (T, 99 %, Sigma-Aldrich, Alemanha) e epitestosterona (E, 99 %, Narl, Áustria) foram fornecidos pelo laboratório de análises de dopagem (Instituto Português do Desporto e Juventude, I. P.).

Foi utilizado uma micro-pipeta de 5 mL (VWR International, Portugal), micro-seringas de 10, 50, 200 e 500 µL (Hamilton, E.U.A.), *vials* de vidro de 2 e 25 mL (VWR International, Portugal) e respetivas tampas e encapsuladores (Agilent Technologies, Alemanha) e barras de agitação de teflon (Gerstel, Alemanha). Foram ainda usados materiais comuns de laboratório.

As amostras de urina foram obtidas pela manhã, de um homem saudável com 25 anos (amostra A) e de um homem saudável de 26 anos (amostra B). Foram depois filtradas com recurso a filtros de papel qualitativo com 125 mm de diâmetro (Cat No 1001 125, WhatmanTM, R.U.) e guardada a 4°C. As amostras foram analisadas no mesmo dia em que foram obtidas.

2.2 Instrumentação

Os estudos foram realizados com recurso a um sistema cromatográfico de HPLC, LC Agilent série 1100 (Agilent Technologies, Waldbronn, Alemanha), equipado com um degaseificador a vácuo (G1322A), amostrador automático (G1313A), compartimento de coluna com termostato (G1316A), bomba quaternária (G1311A) e detetor por rede de díodos (G1315B). A análise foi efetuada numa coluna Tracer Excel 120 ODS-A, 150 mm × 4.0 mm, com tamanho das partículas de 5 µm (Teknokroma, Espanha). A aquisição de dados e o controlo instrumental foi efetuado com recurso ao *software* LC3D ChemStation (versão Rev.A. 10.02[1757], Agilent Technologies).

Usou-se ainda uma balança analítica (Mettler Toledo AG135, Suíça), uma placa de agitação múltipla com quinze posições (Variomag H+P Labortechnik AG Multipoint 15, Alemanha), um banho de ultrassons equipado com termostato (Branson®3510 E-DTH, EUA), um vórtex (Velp, Itália), evaporadores (Sigma-Aldrich, Alemanha) e um medidor de pH (Metrohm 744, Suíça).

2.3 Método experimental

2.3.1 Preparação das soluções padrão

As soluções *stock* individuais de T e E (1 g/L) foram preparadas em MeOH e guardadas a 4°C. Os padrões mistura de 1 mg/L foram preparados diariamente em MeOH e usadas para os ensaios de adição de padrão. Para a calibração instrumental e validação do método, foram usados padrões mistura preparados através das soluções *stock* dissolvidas em MeOH.

2.3.2 Condições instrumentais

As análises foram realizadas por HPLC-DAD recorrendo-se ao seguinte gradiente de separação: 0 min: MeOH:H₂O (50:50, v:v); 0-30 min: MeOH:H₂O (53:47, v:v); 30-35 min MeOH:H₂O (50:50, v:v). O volume de injeção selecionado foi 15 µL com uma velocidade de injeção de 200 µL/min. O fluxo de fase móvel foi 0,8 mL/min e o comprimento de onda (λ) selecionado foi 247 nm.

2.3.3 Calibração instrumental

Para efeitos de identificação, recorreu-se aos parâmetros de tempo de retenção e espectros do UV/vis das amostras puras contendo ambos os compostos. De forma a obter os limites de deteção (LOD) e de quantificação (LOQ) instrumentais, realizou-se diluições sucessivas de uma solução de mistura de padrão até se obter uma razão sinal/ruído de 3:1 e 10:1, respetivamente.

Para a obtenção das curvas de calibração e respetivo estudo da linearidade, preparou-se padrões com 12 níveis de concentração (150, 200, 400, 600, 800, 1000, 1200, 1400, 1600, 1800, 2000 e 2200 µg/L). Estes padrões foram preparados a partir das soluções *stock* de mistura de 10 e 1 µg/L, e os estudos realizados foram sempre em triplicado.

2.3.4 Preparação das barras de BAµE

As barras de extração adsortiva foram preparadas no laboratório conforme descrito anteriormente [35]. Estas consistem em cilindros em polipropileno (15 mm de comprimento e 3 mm de diâmetro) revestidos com adesivo, sendo de seguida cobertas com os adsorventes (carvão ativado ou polímero). Antes da utilização, as barras eram previamente condicionadas em água ultra-pura sob agitação durante 10 minutos, repetindo-se este passo duas vezes.

2.3.5 Ensaios de otimização e validação

Os ensaios de otimização e validação foram efetuados medindo 25 mL de água ultra-pura para um *vial* de vidro apropriado, colocando-se de seguida a barra de extração e uma barra magnética, sendo selado com recurso a um encapsulador. Posteriormente, a

solução aquosa era fortificada com 200 µL da solução padrão mistura de modo a obter uma concentração final de 8 µg/L. A extração era promovida através da agitação da barra magnética durante um determinado período de tempo à temperatura ambiente. Após a extração, o *vial* era aberto, retirava-se a barra de extração e colocava-se num *vial* de vidro (2 mL) contendo 1,5 mL de solvente orgânico, de modo a efetuar a retro-extração com auxílio de tratamento ultrassónico. A barra era retirada do *vial*, com recurso a uma pinça limpa, e o extrato orgânico era evaporado até à secura sob corrente suave de azoto (< 99,5 %). Os analitos eram seguidamente redissolvidos em 200 µL de MeOH e o *vial* selado. Por fim, o *vial* era colocado no amostrador automático para posterior análise por HPLC-DAD.

Por forma a otimizar a eficiência da extração, estudaram-se diversos parâmetros, seguindo uma estratégia de otimização univariável (OVAT, [25]), de acordo com trabalhos realizados anteriormente [20,21,32,35]. Desta forma, os ensaios de otimização foram realizados tendo em conta o solvente para dessorção (MeOH, ACN, MeOH:ACN (50:50, v:v)), o tempo de dessorção (15, 30, 45 e 60 min), a velocidade de agitação (750, 1000 e 1250 rpm), o tempo de extração (1, 2, 3 e 16 h), pH (2, 5,5, 8 e 12), o modificador orgânico (0, 5, 10,15 e 20 % em MeOH, v:v) e a força iónica (0, 5, 10,15 e 20 % em NaCl, p:v) da matriz.

Para avaliar as eventuais perdas dos analitos por evaporação foram medidos 200 µL de solvente orgânico para um *vial*, tendo o solvente sido fortificado com 3 níveis de concentração (500, 1000 e 1500 µg/L) usando uma solução mistura contendo os dois analitos. Realizou-se um tratamento ultrassónico durante 15 min, após o qual as amostras eram levadas à secura por evaporação sob corrente suave de azoto, sendo de seguida redissolvidas em 200 µL de MeOH. Todos os ensaios foram realizados em triplicado, tendo-se efetuado igualmente ensaios em branco, ou seja, sem fortificação da amostra.

Para os estudos de validação do método, efetuaram-se ensaios com diferentes níveis de fortificação (1,4 – 16 µg/L), seguindo-se o procedimento anteriormente descrito em condições otimizadas. Para os cálculos das recuperações (anexo II), foi feita a comparação das áreas dos picos obtidas em cada ensaio com as dos picos dos padrões controlo.

2.3.6 Ensaios de aplicação a amostras de urina

Depois de obtidas as amostras de urina, procedeu-se à hidrólise ácida dos compostos presentes nas mesmas. Para este propósito, num balão de vidro, adicionou-se 30 mL de amostra, 20 mL de HCl (2 M) e uma barra de agitação. O balão de vidro era colocado num banho de areia (80°C), até cobrir metade da superfície do mesmo. A hidrólise foi efetuada durante 4 horas. O balão de vidro era então retirado do banho de areia e adicionado aproximadamente 25 mL de NaOH 1 M (dependendo da amostra) até o pH 6-7. Perfez-se o volume com água ultra-pura até 90 mL. Recorreu-se à calibração pelo método da adição de padrão (SAM) para quantificação dos esteróides em estudo (T e E) nas amostras reais.

Em cada ensaio, por forma a extrair os analitos de interesse, 3 mL da solução de urina hidrolisada e 22 mL de água ultra-pura eram adicionados num *vial* de vidro apropriado, fortificados com 200 µL da solução padrão mistura para a concentração desejada (4 - 16 µg/L), seguindo-se o procedimento descrito anteriormente sob condições experimentais otimizadas. Ensaios em branco foram igualmente realizados com as amostras reais utilizando o procedimento descrito, sem fortificação.

3. Discussão de resultados

3.1 Condições instrumentais

O primeiro passo do presente trabalho consistiu em estabelecer as condições instrumentais adequadas. Para tal, recorreu-se a soluções individuais de T e E, e solução mistura de ambos os compostos, contendo 1 mg/L (em MeOH).

Para se proceder à identificação de compostos por HPLC-DAD é necessário ter em conta os tempos de retenção de cada composto assim como os espectros do UV/vis dos mesmos. Deste modo, e tendo em conta a literatura, definiu-se que o comprimento de onda a usar seria 245 nm para os dois compostos [20,51]. No entanto, depois de analisados os espectros do UV/vis dos analitos com interesse (anexo I), observou-se que ambos possuem uma absorvância máxima aos 247 nm, ficando definido este comprimento de onda a usar ao longo do trabalho.

Para o estudo dos tempos de retenção dos compostos foi necessário determinar diversos parâmetros experimentais, nomeadamente a composição e fluxo de fase móvel, e volume e velocidade de injeção. Tendo em conta trabalhos anteriormente realizados [20], sabia-se que para o tipo de coluna usada neste trabalho (fase reversa), uma fase móvel de 60:40 (MeOH:H₂O, v:v) com um fluxo de 0,5 mL/min poderia fornecer uma separação satisfatória dos compostos em interesse. Foi demonstrado que para se conseguir uma resolução razoável e análise rápida dos compostos, assim como picos com formato gaussiano, a melhor solução seria usar um gradiente de fase móvel, tal como descrito no ponto 2.3.2. Isto porque estes compostos, como são epímeros um do outro, a separação isocrática é bastante dificultada. Assim, usando um gradiente de fase móvel, estes analitos ficam retidos na coluna quando a concentração em MeOH é de 50 %, eluindo progressivamente quando ocorre um aumento em MeOH. Por forma a acelerar as análises cromatográficas, aumentou-se o fluxo de fase móvel para 0,8 mL/min, tendo-se obtido boa resolução.

O volume é um parâmetro importante para a determinação dos limiares analíticos, sendo decisivo para a sensibilidade instrumental do trabalho, pois de uma forma geral, quanto maior o volume de injeção, maior é a sensibilidade. Contudo, quando o volume é demasiado elevado, a coluna pode ficar sobrecarregada, podendo levar ao alargamento dos picos, resultando maioritariamente em *fronting* dos picos, e em alguns casos, em fenómenos de *tailing* dos mesmos [52]. Segundo trabalhos já publicados [20], fixou-se um volume de injeção de 20 µL e uma velocidade de injeção de 200 µL/min. No entanto,

os picos obtidos eram bastante largos e com um topo ligeiramente achatado. Por forma a contornar este problema, diminuiu-se o volume de injeção para 15 μL , obtendo-se boa sensibilidade e largura aceitável das bandas.

Depois de fixadas as condições instrumentais, a separação é efetuada em menos de 25 minutos para ambos os compostos (figura 3.1).

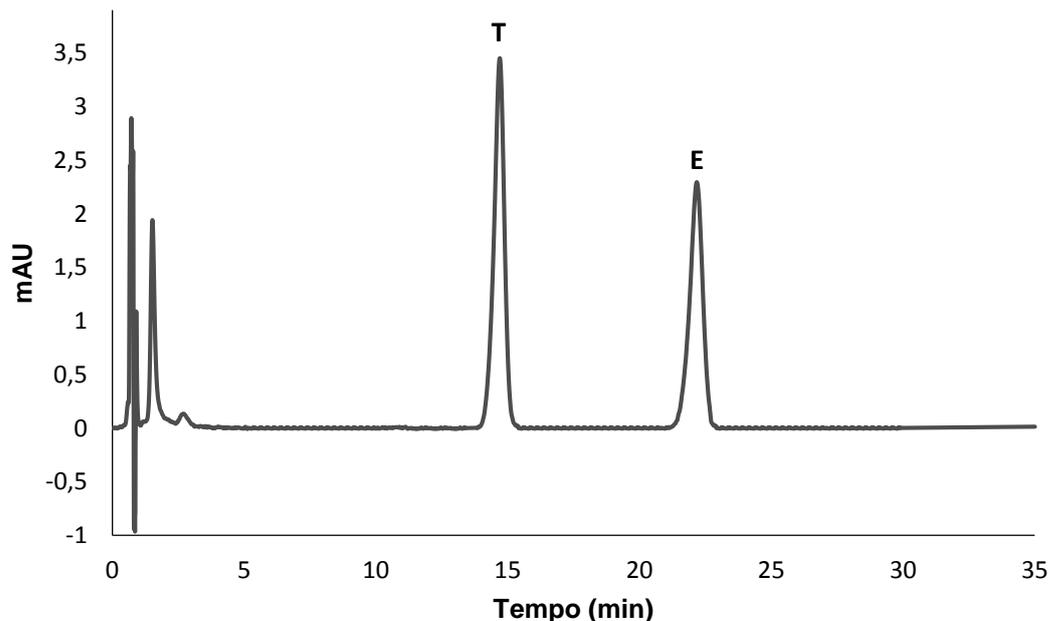


Figura 3.1 - Cromatograma obtido por HPLC-DAD relativo à mistura de T e E (1 mg/L) em condições instrumentais otimizadas.

De modo de determinar a precisão instrumental, injetou-se seis vezes consecutivas o padrão de mistura (1 mg/L), tendo-se procedido à análise por HPLC-DAD. A precisão analisada diz respeito ao desvio padrão relativo (RSD) das áreas dos picos obtido para ambos os compostos nas seis injeções. O RSD obtido foi inferior a 2,4 % para ambos compostos.

Os limites de deteção (LOD) e de quantificação (LOQ) foram igualmente obtidos a partir de diluições sucessivas do padrão de mistura (1 mg/L) inicial até se obter uma razão sinal/ruído de 3:1 e 10:1, respetivamente. A linearidade experimental foi estabelecida usando-se soluções padrão com doze níveis de concentração, compreendidas entre 150,0 e 2200,0 $\mu\text{g/L}$, e analisados em triplicado. A aplicação do método dos mínimos quadrados

aos dados obtidos permitiu calcular as equações da reta e os coeficientes de determinação para cada composto (figura 3.2).

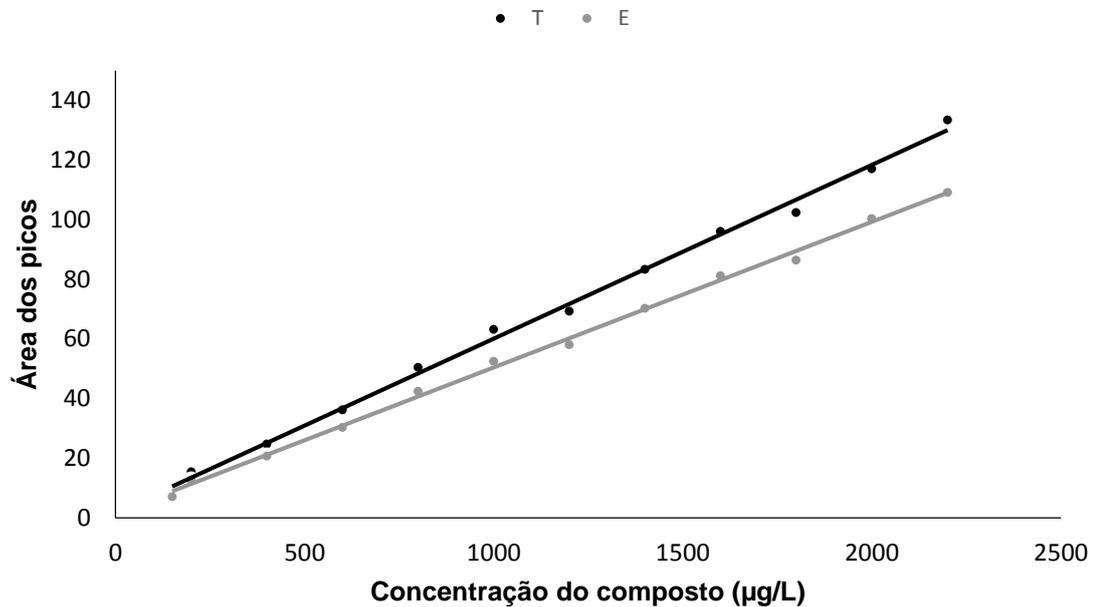


Figura 3.2 - Curvas de calibração instrumental obtidas para T e E.

Os resultados obtidos demonstram excelente gama de linearidade, obtendo-se coeficientes de determinação de 0,9971 e 0,9979 para T e E, respetivamente (tabela 3.1).

Tabela 3.1 – Tempos de retenção (t_R), limites de deteção (LOD) e de quantificação (LOQ), gama linear e coeficiente de determinação (r^2) para T e E analisados por HPLC-DAD.

Compostos	t_R (min)	LOD (µg/L)	LOQ (µg/L)	Gama Linear (µg/L)	r^2
T	14,8	30	100	150,0 – 2200,0	0,9971
E	22,4	40	132	150,0 – 2200,0	0,9979

Verifica-se assim que a resposta instrumental é a adequada no sentido de desenvolver a metodologia que se propõe.

3.2 Seleção do sorvente para BA μ E

Após a calibração instrumental, procedeu-se à seleção do sorvente a ser usado para micro-extração dos compostos alvo em estudo. Neste sentido, foram selecionados cinco polímeros e cinco carvões ativados para serem testados como fases extrativas.

Os ensaios foram realizados em triplicado para cada material sorvente, usando-se condições experimentais padrão (extração: 3 h (1000 rpm), pH 5,5; retro-extração: MeOH:ACN (1:1, v:v; 1,5 mL), 30 min sob tratamento ultrassónico).

Tendo em conta a figura 3.3, verifica-se que o AC que apresentou melhores resultados foi AC1, permitindo obter recuperações de 72,4 e 74,5 % para T e E, respetivamente. Este resultado pode dever-se às propriedades deste material sorvente que apresenta pH_{pzc} idêntico ao valor de pH empregue nestes ensaios, assim como uma elevada área superficial. Ou seja, a pH 5,5 a área superficial deste material encontra-se maioritariamente neutra, potenciando interações eletroestáticas e/ou dispersivas com os compostos em estudo [41], que não se encontram ionizados [56]. Este facto parece igualmente explicar as elevadas eficiências de extração de AC2, que também apresenta pH_{pzc} similar, mas menor área superficial, culminando em menor recuperação que AC1. Por outro lado, embora os restantes ACs apresentem elevadas áreas superficiais, encontram-se parcialmente carregados positivamente ou negativamente para o valor de pH dos ensaios, e por conseguinte, dificultando as interações eletroestáticas e/ou dispersivas com os compostos em estudo [41].

Por observação da figura 3.4, verifica-se que P1 foi o polímero que apresentou melhores resultados, permitindo obter recuperações médias de 73,1 e 69,5 % para T e E, respetivamente. Os materiais poliméricos atuam, neste caso, com interações do tipo fase reversa [41], retendo os analitos de acordo com ligações π - π , por pontes de hidrogénio, interações dipolo-dipolo, hidrofóbicas e/ou iónicas [29]. Neste caso, P1 parece interagir com os compostos analisados por pontes de hidrogénio e interações hidrofóbicas, pois ambos encontram-se neutros no pH empregue nos ensaios, podendo ocorrer interações por pontes de hidrogénio entre a pirrolidona do material polimérico e o grupo hidroxilo (OH) na posição C17, assim como interações hidrofóbicas entre o anel benzénico em P1 e os anéis ciclopentano e ciclohexano dos analitos em estudo (figura 1.3). No que diz respeito a P2 e P3, embora sejam constituídos pelo mesmo material polimérico que P1, o primeiro apresenta propriedades catiónicas, e o segundo propriedades aniónicas,

dificultando as interações hidrofóbicas entre as fases. P4, por possuir área superficial mais baixa que as anteriores, pode explicar eficiências de extração igualmente mais baixas, apresentando igualmente características bastante hidrofóbicas, não permitindo ligações por pontes de hidrogénio com o grupo hidroxilo (OH) na posição C17 de T e E (figura 1.3). Por outro lado, P5 apresenta recuperações baixas provavelmente devido à sua menor área superficial, como também devido ao facto dos grupos ciano serem bastante polares, dificultando interações hidrofóbicas com os analitos em estudo.

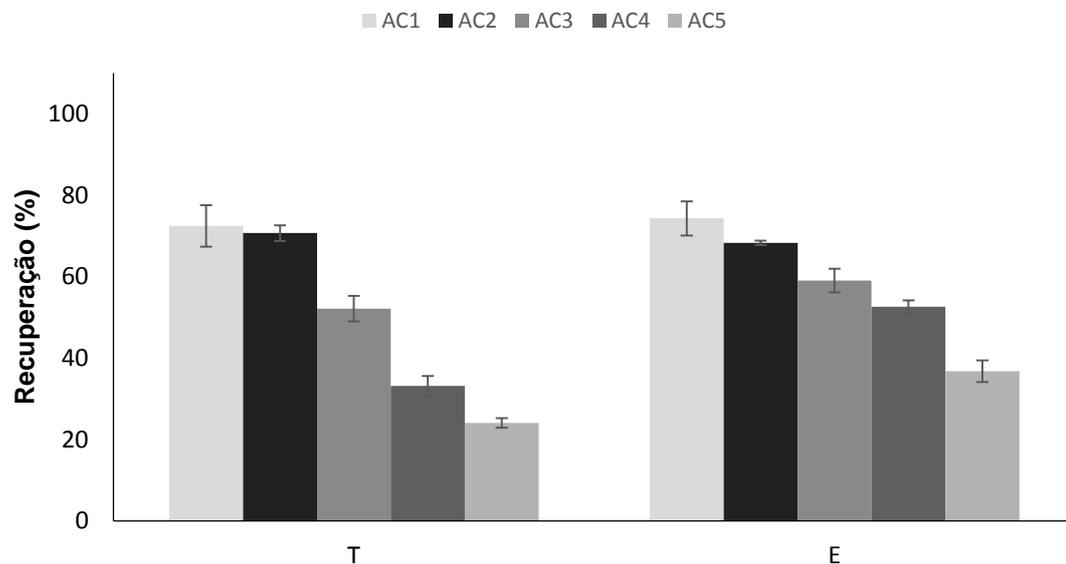


Figura 3.3 – Percentagem de recuperação de T e E nos diferentes ACs como fases sorventes. Condições do ensaio: 25 mL de água ultra-pura fortificada com 8 µg/L; extração: 3 h (1000 rpm), pH 5,5; retro-extração: MeOH:ACN (1:1, v:v; 1,5 mL), 30 min sob tratamento ultrassónico; análise realizada por HPLC-DAD.

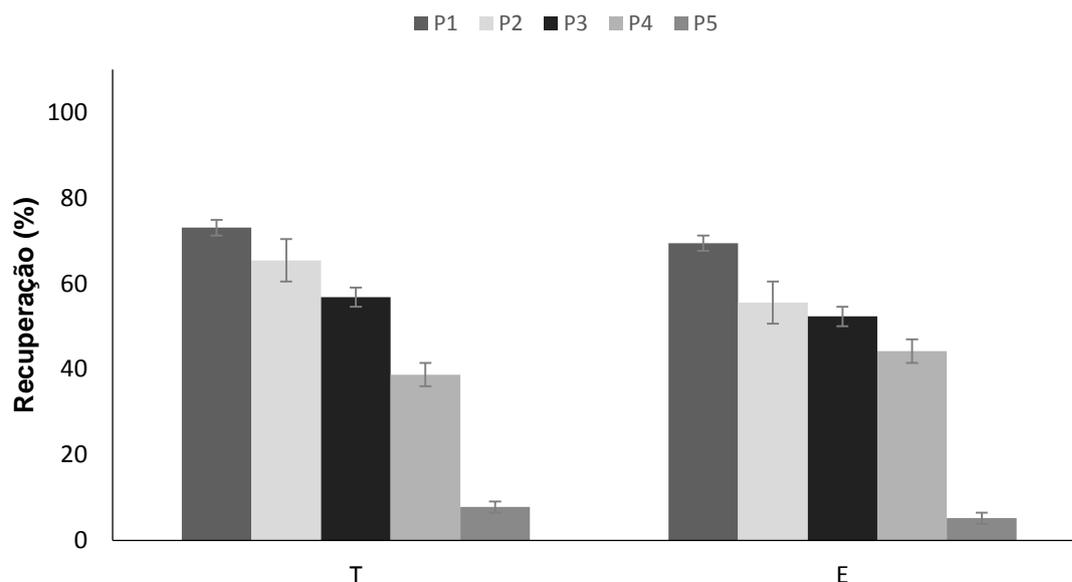


Figura 3.4 - Percentagem de recuperação de T e E nos diferentes polímeros como fases sorventes. Condições do ensaio: 25 mL de água ultra-pura fortificada com 8 $\mu\text{g/L}$; extração: 3 h (1000 rpm), pH 5,5; retro-extração: MeOH:ACN (1:1, v:v; 1,5 mL), 30 min sob tratamento ultrassônico; análise realizada por HPLC-DAD.

De modo a selecionar qual o material sorvente (P1 ou AC1) a ser utilizado para o restante trabalho, realizaram-se ensaios em triplicado com estas fases, usando as mesmas condições experimentais, à exceção do tempo de extração, que passou de 3 para 16 horas.

Verificou-se ainda que ambos os materiais adsorventes apresentavam níveis de recuperação muito semelhantes para T e E, demonstrando que diversas formas de interação com os materiais sorventes podem ocorrer, dependendo essencialmente das propriedades das fases extrativas, dos analitos com interesse e do pH da matriz. P1 permitiu obter uma recuperação de 93,9 e 87,8 % para T e E, respetivamente. AC1 permitiu obter uma recuperação de 88,8 e 92,9 % para T e E, respetivamente (figura 3.5).

Neste sentido, optou-se por continuar a otimização da extração e o restante trabalho com recurso a P1, uma vez este apresentar um RSD de 0,6 e 0,9 %, enquanto o AC1 apresentava um RSD de 6,1 e 7,4 % para T e E, respetivamente.

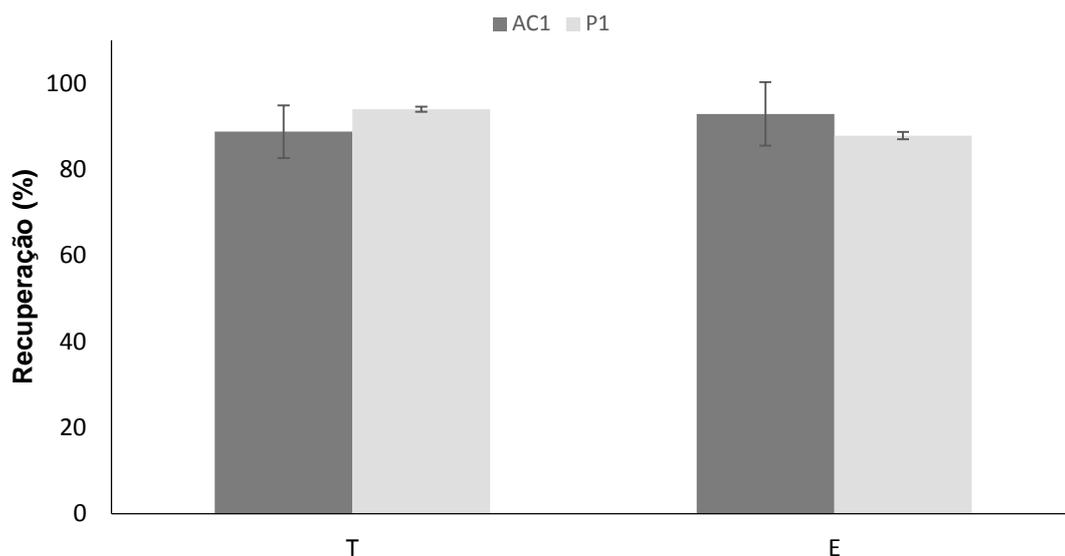


Figura 3.5 - Percentagem de recuperação de T e E usando AC1 e P1 como fases sorventes. Condições do ensaio: 25 mL de água ultra-pura fortificada com 8 $\mu\text{g/L}$; extração: 16 h (1000 rpm), pH 5,5; retro-extração: MeOH:ACN (1:1, v:v; 1,5 mL), 30 min sob tratamento ultrassônico; análise realizada por HPLC-DAD.

3.3 Processo de otimização de BA μ E(P1)-LD

No sentido de avaliar a influência de diversos parâmetros experimentais, foram estudados os seus efeitos tanto a nível da extração como da retro-extração [31–33,35, 43].

3.3.1 Otimização da retro-extração

Os parâmetros que podem influenciar a dessorção líquida são o tipo de solvente e o tempo de retro-extração, e o efeito de evaporação e de memória [31–33,35,43].

3.3.1.1 Efeito do tipo de solvente

O solvente de retro-extração deve ter a capacidade de quebrar as interações entre a fase extrativa dos dispositivos e os analitos, sem danificar a primeira, permitindo a transferência completa dos mesmos para a fase orgânica [21,43,52,54].

No sentido de analisar qual o melhor solvente para retro-extração, testou-se MeOH, ACN e mistura de MeOH:ACN (50:50, v:v), seguindo-se o protocolo do ponto 2.3.5 em condições experimentais padrão.

Os resultados obtidos mostravam que usando ACN como solvente de retro-extração se conseguia uma melhor recuperação para T, não existindo diferenças significativas para a extração de E usando os diferentes solventes para retro-extração (figura 3.6). A partir destes resultados, o ACN foi selecionado como solvente para retro-extração para a continuidade do trabalho, sendo espectável, pois é essa a recomendação do fabricante para a recuperação dos compostos retidos na fase extrativa empregue [55].

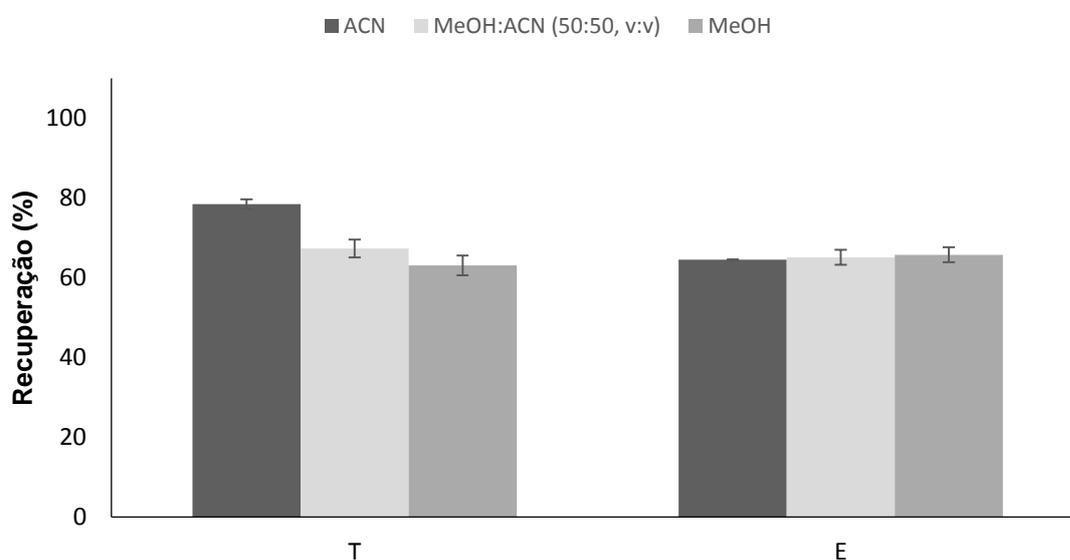


Figura 3.6 - Percentagem de recuperação de T e E usando diferentes solventes de retro-extração. Condições do ensaio: 25 mL de água ultra-pura fortificada com 8 µg/L; extração: 3 h (1000 rpm), pH 5,5; retro-extração: 1,5 mL, 30 min sob tratamento ultrassónico; análise realizada por HPLC-DAD.

3.3.1.2 Efeito do tempo de retro-extração

A retro-extração implica a transferência quantitativa dos analitos da fase extrativa para o solvente orgânico, pelo que o tempo de atuação deve de ser o suficiente para que seja completa, evitando assim fenómenos de memória. Neste sentido, estudou-se o efeito da dessorção líquida ao fim de 15, 30, 45 e 60 minutos sob tratamento ultrassónico, usando ACN como solvente de retro-extração (figura 3.7).

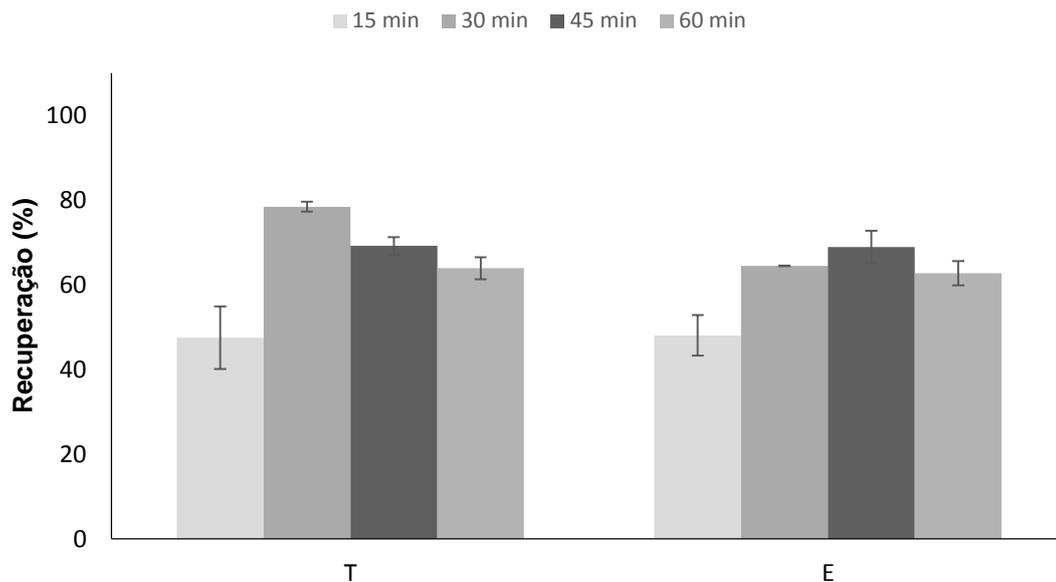


Figura 3.7 - Percentagem de recuperação de T e E usando diferentes tempos de retro-extração. Condições do ensaio: 25 mL de água ultra-pura fortificada com 8 $\mu\text{g/L}$; extração: 3 h (1000 rpm), pH 5,5; retro-extração: ACN (1,5 mL); análise realizada por HPLC-DAD.

Os resultados mostram que retro-extração durante 15 e 60 minutos apresentam as recuperações mais baixas para os dois analitos., sugerindo que 15 min de retro-extração não era tempo suficiente para quebrar a maioria das ligações entre os compostos e o dispositivo, com passagem para a fase orgânica. Por outro lado, 60 min de tratamento ultrassónico aumenta a temperatura dos *vials*, podendo levar à degradação do dispositivo, originando menores recuperações [35]. No entanto, sonificação durante 30 e 45 min apresentaram melhores resultados de recuperação para a T e E. Neste sentido, optou-se por seleccionar uma retro-extração líquida de 30 min para o restante trabalho uma vez, (i) a diferença das percentagens de recuperação de T entre 30 e 45 min ser maior do que para E para o mesmo tempo; (ii) o RSD ser maior para a recuperação de ambos os analitos com retro-extração durante 45 min; (iii) pretende-se tornar a análise o mais célere possível.

3.3.1.3 Efeito de evaporação

Durante o processo de evaporação à secura de solvente de retro-extração e subsequente redissolução em solvente adequado à injeção em HPLC-DAD, é possível

ocorrer perdas de analitos, principalmente dos compostos mais voláteis. Apesar dos analitos em estudo não serem considerados voláteis, realizou-se o estudo em triplicado usando soluções mistura dos analitos com três níveis de concentração (500, 1000 e 1500 µg/L), conforme descrito no ponto 2.3.5. Da análise por HPLC-DAD, verificou-se a ausência de perdas dos analitos em estudo nos três níveis de concentração estudados, e assim sendo este não é o passo limitativo da metodologia. Por conseguinte, este procedimento foi usado em todas as experiências seguintes.

3.3.1.4 Efeito de memória

O efeito de memória pode dever-se à escolha de um solvente de retro-extração inadequado e/ou de um tempo de dessorção insuficiente. No sentido de verificar que o solvente e o tempo de retro-extração selecionados permitem uma dessorção completa dos analitos, efetuou-se uma segunda retro-extração. Esta consistiu em colocar o dispositivo, após a primeira retro-extração, num novo *vial*, adicionar 1,5 mL do solvente de retro-extração (ACN) e submeter durante mais 15 min a um tratamento ultrassónico. Da análise por HPLC-DAD desta segunda retro-extração não se observaram sinais dos analitos em estudo, ou seja, sendo mesmo abaixo dos LOD instrumentais. Assim sendo, o solvente e tempo de retro-extração estabelecidos anteriormente revelaram-se adequados para uma dessorção eficaz.

3.3.2 Otimização de BAµE(P1)

Depois de otimizado o processo de retro-extração, procedeu-se à otimização da extração por BAµE. Os parâmetros analisados que podem influenciar este tipo de extração são: o tempo de equilíbrio, velocidade de agitação, pH da matriz, modificador orgânico e força iónica [25,29,31–33,43].

3.3.2.1 Efeito da velocidade de agitação

A velocidade de agitação promove a transferência de massa dos analitos presentes na matriz para a fase extrativa da barra. Este parâmetro é estudado uma vez poder acelerar

a extração, ou seja, a cinética de equilíbrio entre as fases. Este facto pode ser explicado pela diminuição da espessura da camada limite entre a barra de agitação e a solução matriz. No entanto, velocidades muito elevadas podem ter um efeito nulo ou negativo na extração, devido à falta de homogeneidade na agitação e na formação de bolhas de ar aquando da agitação [25,33].

Por forma a testar o efeito da velocidade na extração, estudaram-se três velocidades distintas, nomeadamente, 750, 1000 e 1250 rpm. De acordo com os resultados obtidos e representados na figura 3.8, a velocidade de agitação de 1000 rpm foi a que apresentou as melhores recuperações médias tanto para T como para E, tendo sido seleccionada para o restante trabalho.

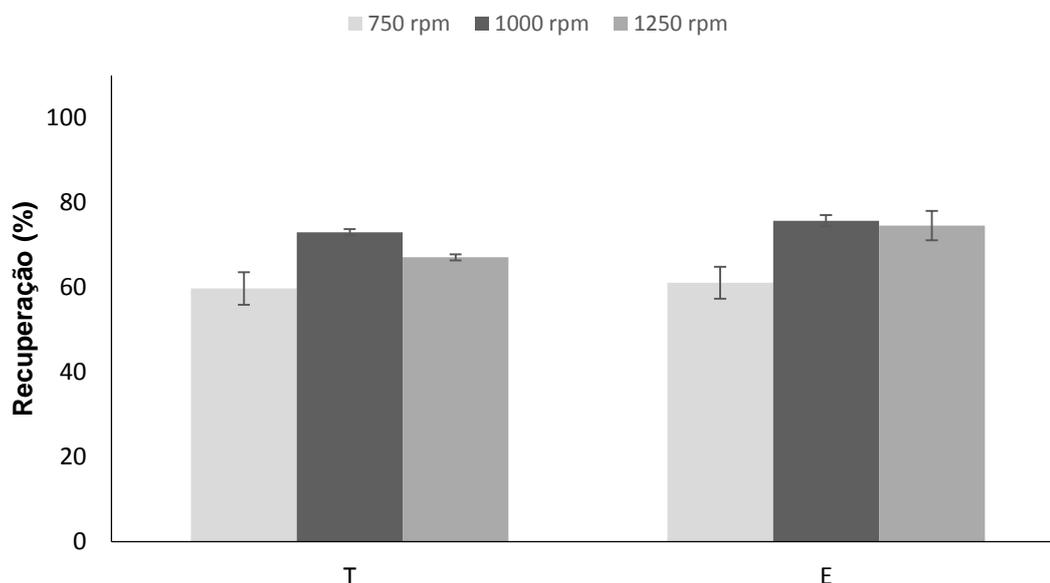


Figura 3.8 - Percentagem de recuperação de T e E usando diferentes velocidades de agitação. Condições do ensaio: 25 mL de água ultra-pura fortificada com 8 $\mu\text{g/L}$; extração: 3 h, pH 5,5; retro-extração: ACN (1,5 mL), 30 min sob tratamento ultrassónico; análise realizada por HPLC-DAD.

3.3.2.2 Efeito do tempo de equilíbrio

A metodologia aqui desenvolvida é dependente do tempo que se demora a alcançar o equilíbrio de extração entre as fases em questão. Na prática, é o tempo que cada analito demora a ser extraído da fase aquosa para a fase extrativa. Tanto este parâmetro como a

velocidade de agitação estão diretamente relacionados com o coeficiente de difusão dos compostos e conseqüentemente com a cinética do processo. Este parâmetro afeta a velocidade de transferência entre as fases, uma vez que os compostos que apresentem coeficientes de difusão reduzidos necessitam de maior tempo para atingir o equilíbrio [25,33].

Por forma a estudar este parâmetro, realizaram-se extrações com 1, 2, 3 e 16 horas. Dos resultados obtidos (figura 3.9) é demonstrado que uma extração de 16 horas foi a que apresentou melhor desempenho para os dois analitos em estudo, apresentando recuperações médias de aproximadamente 90 %. Embora o tempo de extração seja longo, esta metodologia tem a vantagem de poder ser utilizada durante a noite.

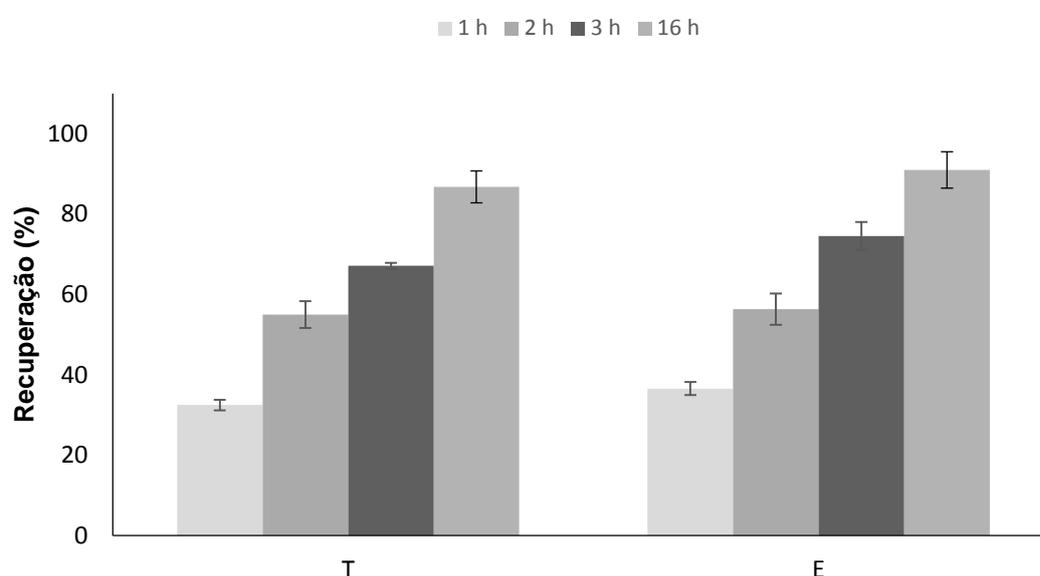


Figura 3.9 - Percentagem de recuperação de T e E usando diferentes tempos de equilíbrio. Condições do ensaio: 25 mL de água ultra-pura fortificada com 8 µg/L; extração: 1000 rpm, pH 5,5; retro-extração: ACN (1,5 mL), 30 min sob tratamento ultrassônico; análise realizada por HPLC-DAD.

3.3.2.3 Efeito de pH da matriz

O pH da matriz pode modificar os analitos ou as condições da amostra, podendo influenciar o equilíbrio [25,33]. Por forma a determinar se o pH da matriz tem influência na recuperação dos analitos em questão, estudaram-se quatro valores de pH: 2, 5,5, 8 e 12.

Os resultados obtidos e reproduzidos na figura 3.10 mostram que o pH da matriz não influencia significativamente a recuperação destes compostos, embora para valores de pH mais extremos ocorresse um ligeiro decréscimo na recuperação, uma vez o adesivo tender a degradar-se e a fase extrativa não se manter no tubo de polipropileno que o suporta [35]. No entanto, este resultado era espectável, uma vez tanto a T como a E não serem espécies ionizáveis [56].

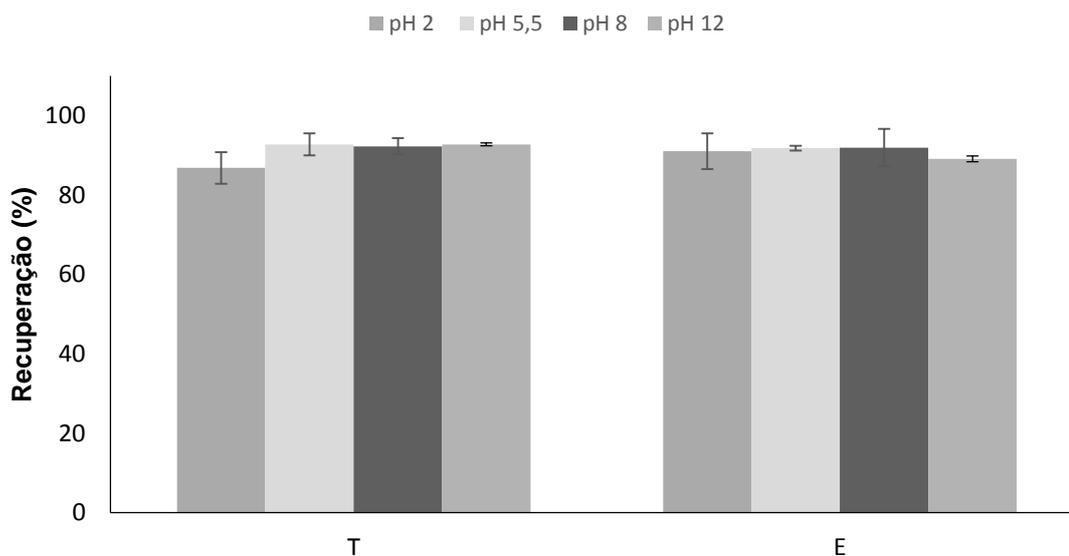


Figura 3.10 - Percentagem de recuperação de T e E usando diferentes valores de pH. Condições do ensaio: 25 mL de água ultra-pura fortificada com 8 $\mu\text{g/L}$; extração: 16 h (1000 rpm); retro-extração: ACN (1,5 mL), 30 min sob tratamento ultrassónico; análise realizada por HPLC-DAD.

3.3.2.4 Efeito do modificador orgânico

A adição de modificador orgânico é estudada nesta metodologia pois pode minimizar a adsorção dos analitos às paredes do vidro, sendo MeOH o solvente mais usado para determinar este efeito [25]. No entanto, a adição deste pode aumentar a adição de solutos na fase aquosa, e assim, minimizar a eficiência na extração. Para compostos com elevado $\log K_{O/W}$ ($> 5,0$) a adição de MeOH minimiza a adsorção dos analitos no vidro do *vial*, enquanto que para compostos com $\log K_{O/W}$ mais baixo ($< 2,5$) a adição de MeOH aumenta a solubilidade dos analitos na solução [25].

Por forma a estudar a influência da adição de modificador orgânico na eficiência de extração, foram realizados ensaios com adição de 0, 5, 10, 15 e 20 % em MeOH (v/v) às amostras de água ultra-pura fortificada com os compostos. Os resultados mostram que o aumento da adição de modificador orgânico diminui o desempenho da recuperação para ambos os analitos (figura 3.11). Estes resultados demonstram que a adição de MeOH aumenta a afinidade dos analitos para a matriz, dificultando assim a sua transferência para o sorvente. Neste sentido, a adição de modificador orgânico foi desprezada.

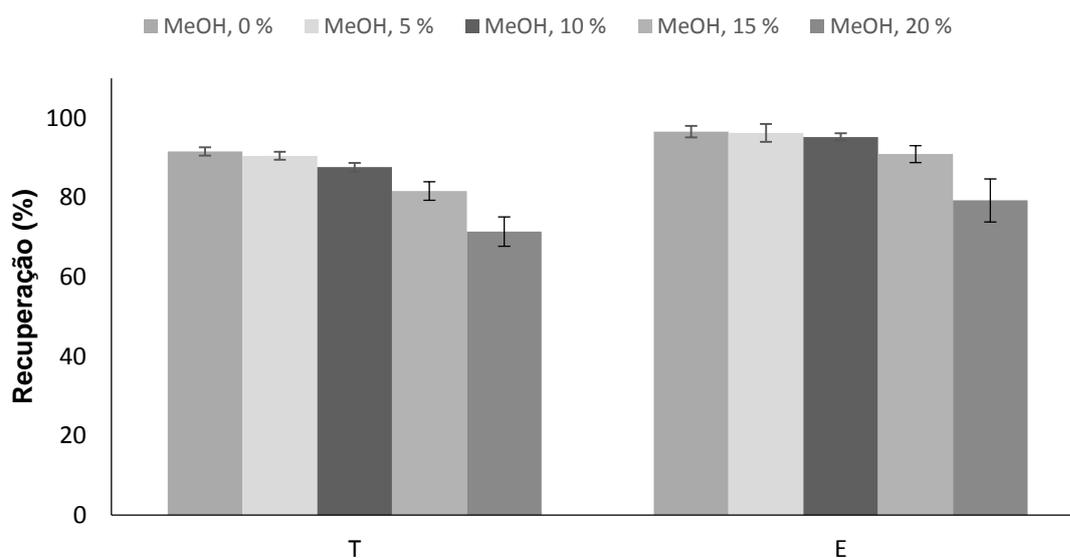


Figura 3.11 - Percentagem de recuperação de T e E usando diferentes níveis de modificador orgânico. Condições do ensaio: 25 mL de água ultra-pura fortificada com 8 µg/L; extração: 16 h (1000 rpm), pH 5,5; retro-extração: ACN (1,5 mL), 30 min sob tratamento ultrassônico; análise realizada por HPLC-DAD.

3.3.2.5 Efeito da força iónica

Para este tipo de metodologia a adição de eletrólitos fortes, como o NaCl, modifica a força iónica da matriz o que pode levar ao aumento ou diminuição da eficiência de extração dependendo do tipo de compostos e da fase extrativa usadas. Para compostos com um baixo log K_{OW} a força iónica, que é controlada normalmente pela adição de NaCl, é deveras importante. Este procedimento pode promover o efeito de *salting out*, pelo aumento da eficiência de extração dos compostos mais hidrofílicos [25,57].

Por forma a estudar este parâmetro foram realizados ensaios com adição de 0, 5, 10, 15 e 20 % de NaCl (p/v) em amostras de água fortificada com os compostos. Seria de esperar que a adição de sal aumentasse a eficiência de extração, pois tanto a T como a E

(figura 1.3) apresentam características ligeiramente polares ($\log K_{OW}$ de 3,27 para ambos compostos [58]). No entanto, os resultados mostram que o aumento da adição de sal inerte diminui o desempenho de recuperação para ambos analitos (figura 3.12). Este fenômeno pode ser explicado pela ocupação da área superficial da fase polimérica pelos íons de sal, o que diminui a área superficial disponível para interagir com os analitos em estudo [57].

Concluiu-se que, para o presente trabalho, a adição de NaCl afeta ainda que ligeiramente negativamente a eficiência de extração, sendo desprezada para o restante trabalho.

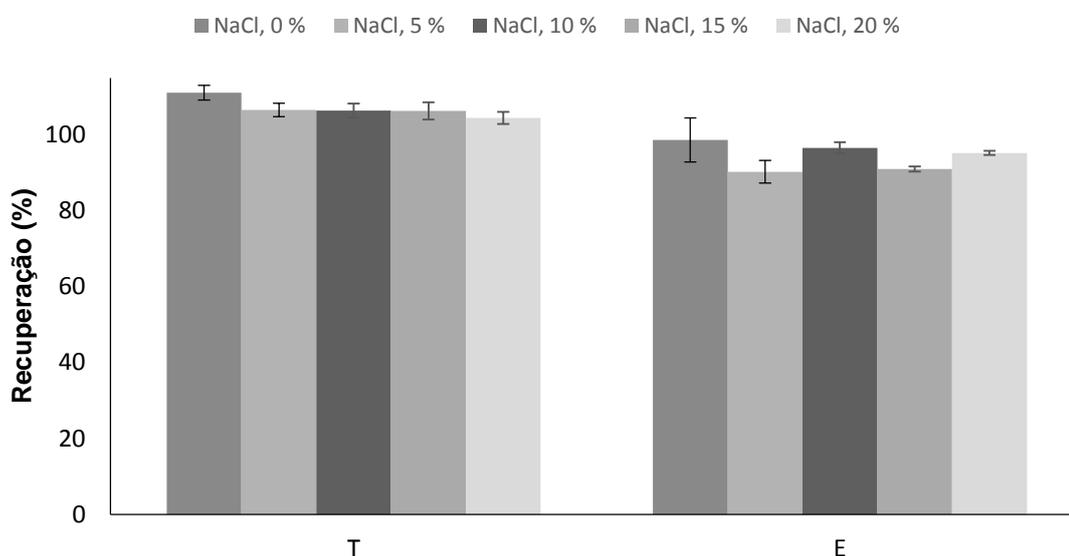


Figura 3.12 - Percentagem de recuperação de T e E usando diferentes níveis de força iônica. Condições do ensaio: 25 mL de água ultra-pura fortificada com 8 $\mu\text{g/L}$; extração: 16 h (1000 rpm), pH 5,5; retro-extração: ACN (1,5 mL), 30 min sob tratamento ultrassônico; análise realizada por HPLC-DAD.

A conclusão da otimização dos parâmetros para esta metodologia permitiu obter as melhores condições para a extração e retro-extração dos analitos em estudo. Estas encontram-se resumidas na tabela 3.2, sendo as condições empregues para os estudos posteriores.

Tabela 3.2 – Condições otimizadas para o método desenvolvido por BA μ E(P1)-LD/HPLC-DAD.

Condições experimentais otimizadas	
Tempo de equilíbrio (h)	16
Velocidade de agitação (rpm)	1000
pH da matriz	5,5
MeOH (%)	-
NaCl (%)	-
Tempo de retro-extração (min)	30
Solvente de retro-extração	ACN

A otimização destes parâmetros permitiu obter recuperações médias compreendidas entre 92 e 93 % para os dois analitos em estudo (tabela 3.3), obtendo-se melhores eficiências de extração comparativamente com trabalhos realizados anteriormente [20], no qual foi otimizado um método de análise de T por SBSE(PU), tendo sido obtido eficiências de extração médias de 49,7 %.

Tabela 3.3 – Recuperações médias dos analitos nas condições otimizadas obtidas por BA μ E(P1)-LD/HPLC-DAD.

Composto	Recuperação (%) \pm RSD (%) (n = 3)
T	92,1 \pm 6,7
E	93,4 \pm 2,5

3.4 Validação do método BA μ E(P1)-LD/HPLC-DAD

Depois de realizada a otimização experimental, procedeu-se à validação da metodologia, nomeadamente, limiares analíticos, linearidade da gama dinâmica de trabalho e precisão associada.

Os limiares analíticos deste método para os dois compostos estudados foram verificados com recurso ao LOD e LOQ, para uma razão sinal/ruído de 3:1 e 10:1, respetivamente (tabela 3.4). Verifica-se que os limiares obtidos para estes compostos apresentam a mesma ordem de grandeza com o encontrado na literatura para trabalhos

com recurso a SBSE [59], embora estes autores tenham usado análise por GC-MS com recurso a derivatização prévia.

Tabela 3.4 – LODs e LOQs para os analitos estudados, obtidos na validação do método BA μ E(P1)-LD/HPLC-DAD.

Composto	LOD ($\mu\text{g/L}$)	LOQ ($\mu\text{g/L}$)
T	0,4	1,32
E	0,4	1,32

A linearidade da gama dinâmica de trabalho foi igualmente avaliada com recurso ao método dos mínimos quadrados, tendo as regressões lineares sido aplicadas no intervalo de concentrações compreendidas entre 1,4 e 16,0 $\mu\text{g/L}$ (envolvendo dez níveis de concentrações, cada uma analisada em triplicado) – figura 3.13.

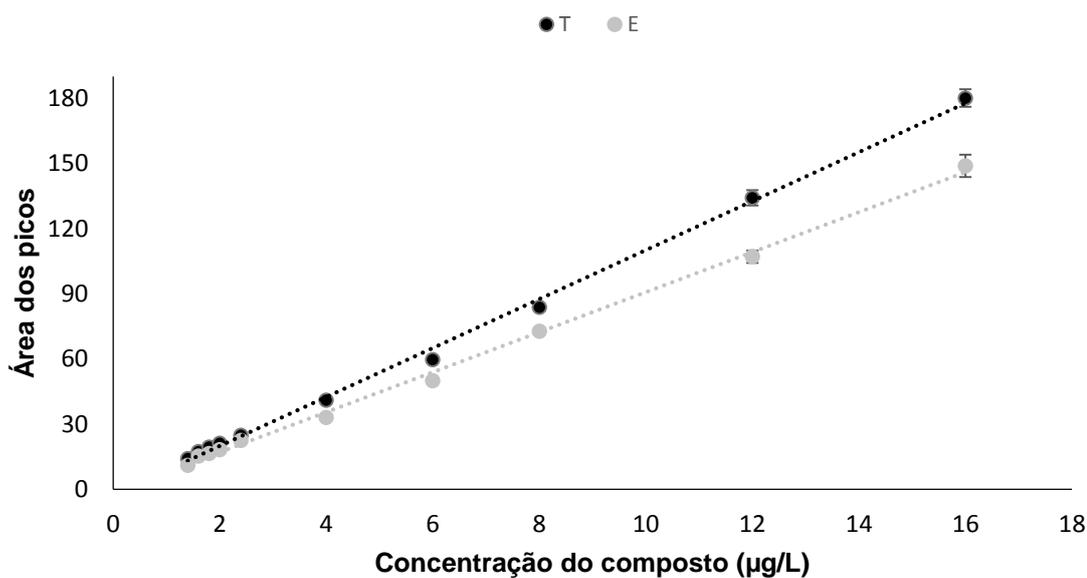


Figura 3.13 – Curvas de calibração obtidas para T e E pelo método dos mínimos quadrados.

As curvas de regressão linear no intervalo de concentrações estudado, bem como os respetivos coeficientes de determinação (r^2), são apresentados na tabela 4.5, verificando-se boa linearidade ($r^2 \geq 0,9978$)

Tabela 3.5 - Parâmetros relativos à gama dinâmica de trabalho para a presente metodologia.

Composto	Gama linear ($\mu\text{g/L}$)	a	b	r^2
T	1,4 – 16,0	11,275	2.6677	0,9978
E	1,4 – 16,0	9,2077	1,282	0,9978

A precisão do método foi avaliada em termos de repetibilidade e de precisão intermédia, com recurso a ensaios fortificados na ordem dos 8 $\mu\text{g/L}$. A repetibilidade foi avaliada por via de ensaios realizados no mesmo dia (3 réplicas). Por sua vez, a precisão intermédia foi avaliada com recurso a ensaios realizados em dias diferentes (3 réplicas em 3 dias consecutivos). Os resultados são apresentados na tabela 3.6 e indicam RSD inferiores a 8 %, e que de acordo com os requerimentos da Directiva 98/83/EC para os compostos orgânicos, uma metodologia proposta é considerada aceitável sempre que o RSD se encontre abaixo de 25 % [60].

Tabela 3.6 – Ensaios de precisão obtidos por BA μ E(P1)-LD/HPLC-DAD fortificadas com 8 $\mu\text{g/L}$ em condições experimentais otimizadas.

Composto	Recuperação (%) \pm RSD (%)	
	Precisão intermédia ($n = 9$)	Repetibilidade ($n = 3$)
T	95,7 \pm 7,4	99,7 \pm 2,4
E	94,3 \pm 1,7	99,5 \pm 5,6

3.5 Aplicação do método a amostras de urina

O presente trabalho propõe o recurso de HPLC-DAD em combinação com BA μ E(P1) e retro-extração líquida para a análise e quantificação de T, E e consequente estimativa de razão T/E como forma alternativa de *screening* para controlo anti-doping para a administração de T.

Por forma a determinar a concentração de T e E nas amostras de urina analisadas, foi necessário recorrer a um passo de hidrólise dos conjugados destes compostos e posteriormente ao SAM. Sendo a urina uma matriz muito complexa [61], o SAM permite compensar possíveis efeitos de matriz, nomeadamente a existência de interferentes e

assim, minimizar prováveis erros [25]. Neste método, as amostras foram fortificadas com concentrações conhecidas dos analitos em estudo. Assim, para as amostras de urina estudadas, depois de realizada a hidrólise, foram usados quatro níveis de fortificação (4, 8, 12 e 16 $\mu\text{g/L}$), sendo igualmente realizados ensaios em branco, ou seja, amostras de urina que não foram sujeitas a hidrólise e ensaios sem fortificação da amostra. As figuras 3.14 e 3.15 dizem respeito a cromatogramas relativos às amostras de urina estudadas.

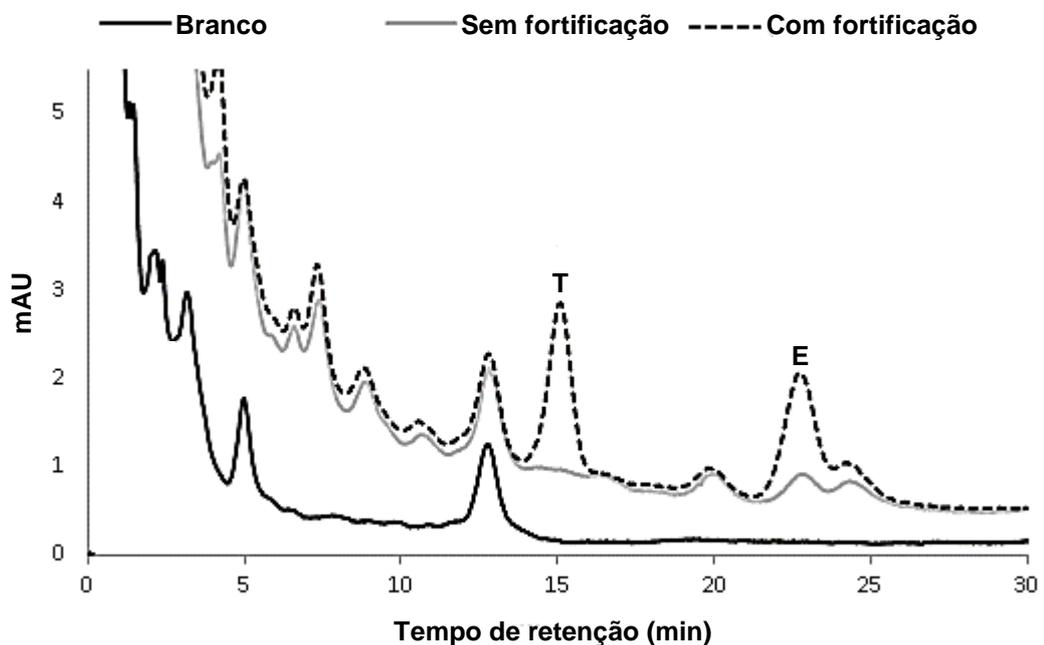


Figura 3.14 – Cromatogramas relativos à amostra A, branco (sem hidrólise), fortificada a 16 $\mu\text{g/L}$ e sem fortificação, obtidos por BA μ E(P1)-LD/HPLC-DAD.

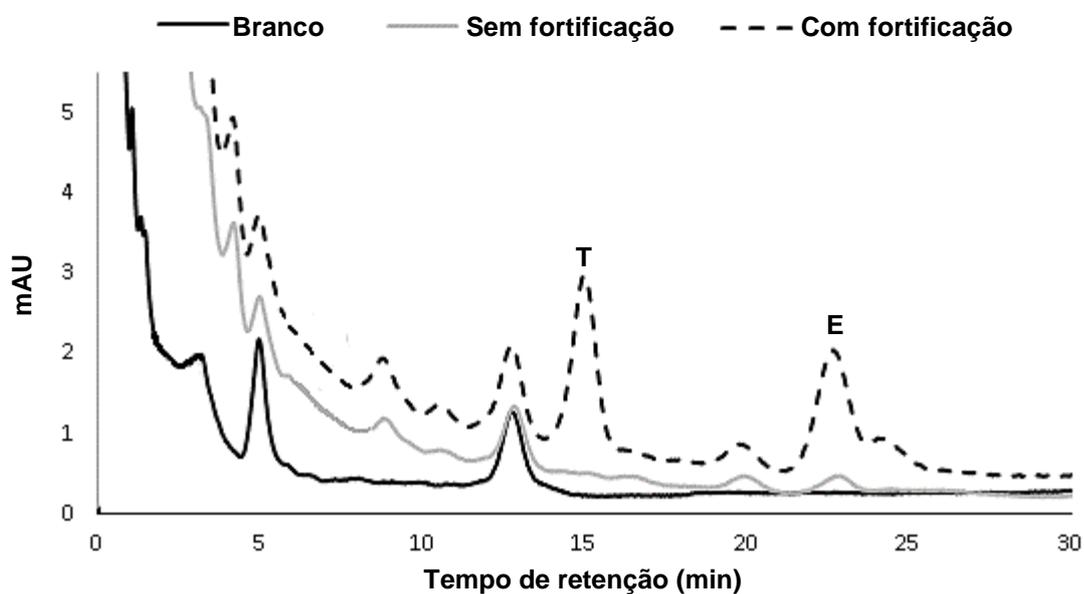


Figura 3.15 – Cromatogramas relativos à amostra B, branco (sem hidrólise), fortificada a 16 $\mu\text{g/L}$ e sem fortificação, obtidos por BA $\mu\text{E(P1)}$ -LD/HPLC-DAD.

Os resultados obtidos permitem observar que o passo de hidrólise foi efetuado com sucesso, e sem o qual a análise destes compostos, e a consequente construção das curvas de regressão para os mesmos nas duas amostras, através do método dos mínimos quadrados (figuras 3.16 e 3.17), não teria sido possível.

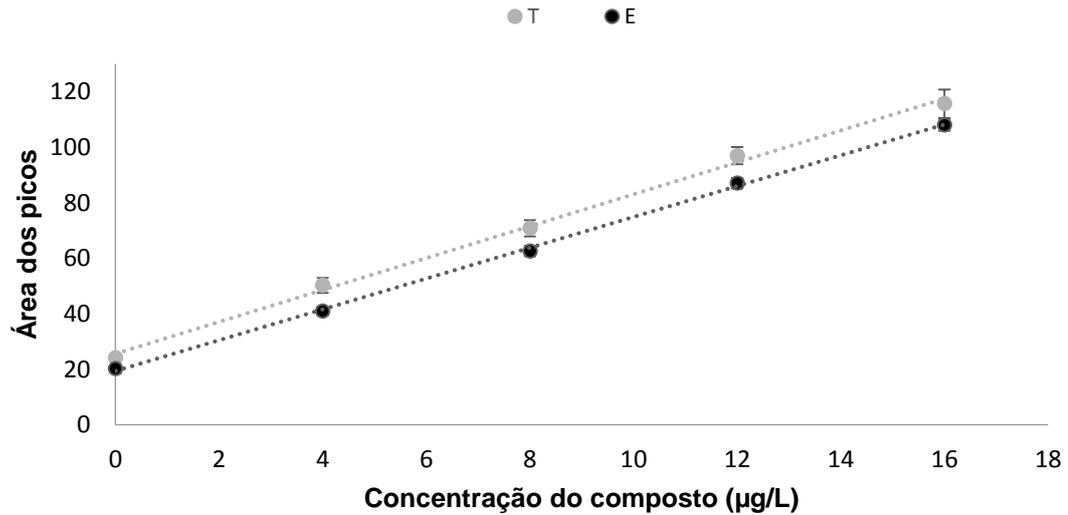


Figura 3.16 - Curvas de calibração em urina de para T e E obtidos pelo método de adição padrão (SAM) para a amostra A.

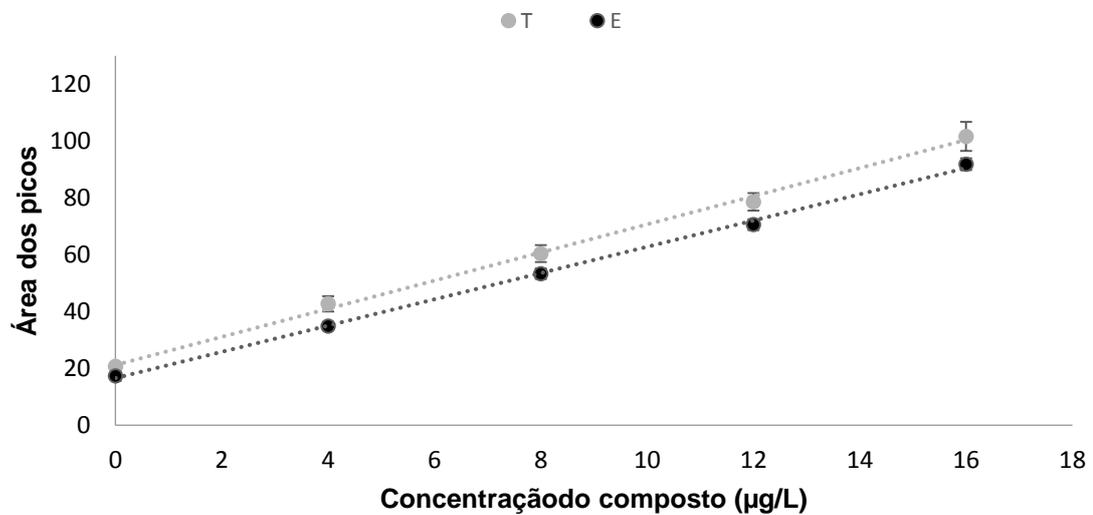


Figura 3.17 - Curvas de calibração em urina de para T e E obtidos pelo método de adição padrão (SAM) para a amostra B.

Nesta perspectiva, observa-se que se conseguiu boa linearidade e excelentes coeficientes de determinação para os dois compostos (tabela 3.7), demonstrando que a metodologia proposta conjuga bem o SAM, embora se tenha verificado ligeiros efeitos de matriz. Todavia, este resultado era esperado pois a urina é uma matriz bastante

complexa e possui elevadas quantidades de íons, como sódio e cloro [61], podendo apresentar elevada força iônica, diminuído a eficiência de extração, conforme ficou demonstrado anteriormente (figura 3.12).

A concentração em T e E presentes nas amostras estudadas, assim como a razão T/E, encontram-se em linha com o que é descrito na literatura para um indivíduo caucasiano [22,59,62].

Tabela 3.7 – Parâmetros relativos às curvas de regressão obtidas por SAM e a razão T/E para as amostras de urina

Amostra	Composto	a	b	r^2	Concentração ($\mu\text{g/L}$)	Razão T/E
A	T	5,745	25,653	0,9973	$117,1 \pm 2,6$	1,28 - 1,40
	E	5,548	19,437	0,9992	$87,6 \pm 1,9$	
B	T	4,949	21,179	0,9977	$106,9 \pm 2,4$	1,14 - 1,24
	E	4,619	16,615	0,9987	$89,9 \pm 2,0$	

4. Conclusões e perspectivas futuras

O presente trabalho propõe uma nova metodologia, (BA μ E(P1)-LD/HPLC-DAD), para a determinação de testosterona e epitestosterona em amostras de urina que poderá ser empregue como ferramenta para análise de rotina em contexto de controlo anti-*doping*.

Numa primeira fase, verificou-se que o sistema analítico usado (HPLC-DAD) era apropriado para a análise de ambos os esteróides. A otimização dos parâmetros instrumentais permitiu resolução dos dois compostos num tempo analítico inferior a 25 min, tendo-se encontrado LODs de 30 e 40 μ g/L e LOQs de 100 e 132 μ g/L para testosterona e epitestosterona, respetivamente. Verificou-se ainda boa precisão (RSD < 2,4 %) e excelente linearidade ($r^2 > 0,9971$) na gama de trabalho compreendida entre 150,0 e 2200,0 μ g/L.

De seguida, começou por se seleccionar o sorvente mais adequado. Dos oito materiais sorventes testados, que incluíram carvões ativados e polímeros, o que apresentou melhor seletividade foi o co-polímero modificado de estireno-divenilbenzeno e pirrolidona de fase reversa StrataTM-X (P1).

Posteriormente, estudou-se a otimização da metodologia desenvolvida, tendo consistido no estudo de diversos parâmetros que podem afetar quer a micro-extração quer a retro-extração dos compostos em estudo. As condições otimizadas para extrair os esteróides foram 16 h de tempo de equilíbrio (1000 rpm), pH 5,5 e 30 min para retro-extração usando ACN sob tratamento ultrassónico. Verificou-se ainda a ausência de perdas significativas através do passo de evaporação do solvente e a inexistência de “carry-over”, não sendo por isso um passo limitativo na metodologia desenvolvida. A otimização permitiu alcançar recuperações médias de 92,1 e 93,4 % para testosterona e epitestosterona, respectivamente, em amostras de água fortificada para um nível de 8,0 μ g/L.

Do ponto de vista da validação analítica, obtiveram-se LODs e LOQs de 0,40 e 1,32 μ g/L, respetivamente para ambos compostos. A gama de trabalho estudada (1,4 – 16,0 μ g/L) demonstrou boa linearidade ($r^2 > 0,9978$), assim como precisão intermédia (RSD < 8 %) e de repetibilidade (RSD < 6 %) adequadas.

O método desenvolvido (BA μ E(P1)-LD/HPLC-DAD) foi posteriormente testado em duas matrizes de urina (A e B), tendo os estudos sido realizados em triplicado, com recurso ao método de adição de padrão, após a hidrólise ácida das amostras. Dos dados

obtidos, o método proposto permitiu observar efeitos de matriz negligenciável ($r^2 > 0,9973$) nas duas amostras estudadas, tendo em conta a complexidade das mesmas.

Conclui-se assim que a amostra A apresentava uma concentração em testosterona e epitestosterona de 117,1 e 87,6 $\mu\text{g/L}$, respetivamente, tendo a razão T/E ficado compreendida entre 1,28 e 1,40. Relativamente à amostra B, a mesma apresentava uma concentração de 106,9 e 89,9 $\mu\text{g/L}$ em testosterona e epitestosterona, respetivamente, tendo a razão T/E ficado compreendida entre 1,14 e 1,24. Os resultados obtidos permitiram ainda concluir que estas amostras estudadas não apresentavam valores acima do *cut-off* determinados pelo WADA para estes compostos (razão T/E ≥ 4).

Em suma, o objetivo do trabalho foi alcançado uma vez ter-se conseguido desenvolver e validar uma metodologia rápida e expedita para fácil determinação de testosterona e epitestosterona em amostras de urina, podendo ser empregue como método de rotina em contexto de controlo anti-*doping*. Verificou-se igualmente que o método proposto não necessita do passo derivatização, requerendo menor manipulação analítica, apresentando excelente reprodutibilidade, contrariamente a alguns dos métodos vigentes.

Para futuros trabalhos, sugere-se a implementação desta metodologia para determinações mais abrangentes, que incluam testosterona, epitestosterona, metiltestosterona, androsterona, eticolanolona, dehidroepiandrosterona e androstanedióis, que fazem parte do perfil de esteróides anabólicos analisados pelo WADA. Por outro lado, uma possível hifenização a MS ou *tandem* (LC-MS ou LC-MS/MS) tornaria esta metodologia ainda mais sensível e seletiva, culminando em maiores vantagens para laboratórios de controlo anti-*doping*.

5. Referências bibliográficas

- [1] R.K. Müller, History of Doping and Doping Control, in: D. Thieme, P. Hemmersbach (Eds.), *Doping Sports Biochem. Princ. Eff. Anal.*, Springer Berlin Heidelberg, 2010: pp. 1–23.
- [2] Usada.org - Lance Armstrong Receives Lifetime Ban And Disqualification Of Competitive Results For Doping Violations Stemming From His Involvement In The United States Postal Service Pro-Cycling Team Doping Conspiracy. Atualização em 2012. Acesso em Julho de 2013
<http://www.usada.org/media/sanction-armstrong8242012>
- [3] A.T. Kicman, Pharmacology of anabolic steroids, *Br. J. Pharmacol.* 154 (2008) 502–521.
- [4] C. Ayotte, Detecting the Administration of Endogenous Anabolic Androgenic Steroids, in: D. Thieme, P. Hemmersbach (Eds.), *Doping Sports Biochem. Princ. Eff. Anal.*, Springer Berlin Heidelberg, 2010: pp. 77–98.
- [5] M. Saugy, C. Cardis, N. Robinson, C. Schweizer, Test methods: anabolics, *Baillières Best Pr. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 14 (2000) 111–133.
- [6] Nobelprize.org - All Nobel Prizes in Chemistry. Atualização em 2013. Acesso em Julho de 2013.
http://nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/
- [7] J.M. Berg, J.L. Tymoczko, L. Stryer, The Biosynthesis of Membrane Lipids and Steroids, in: J.M. Berg, J.L. Tymoczko, L. Stryer (Eds.), *Biochemistry*, W H Freeman, 2002: pp. 1061-1103
- [8] A.T. Kicman, Biochemical and Physiological Aspects of Endogenous Androgens, in: D. Thieme, P. Hemmersbach (Eds.), *Doping Sports Biochem. Princ. Eff. Anal.*, Springer Berlin Heidelberg, 2010: pp. 25–64.
- [9] V. Bellemare, F. Faucher, R. Breton, V. Luu-The, Characterization of 17 α -hydroxysteroid dehydrogenase activity (17 α -HSD) and its involvement in the biosynthesis of epitestosterone, *Bmc Biochem.* 6 (2005) 12-23.

- [10] H.X. Chen, Q.P. Deng, L.W. Zhang, X.X. Zhang, Quantification of testosterone and epitestosterone in biological samples by capillary electrophoresis with immunoaffinity extraction, *Talanta*. 78 (2009) 464–470.
- [11] L. Stárka, Epitestosterone, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 87 (2003) 27–34.
- [12] T. Kuuranne, Phase-II Metabolism of Androgens and Its Relevance for Doping Control Analysis, in: D. Thieme, P. Hemmersbach (Eds.), *Doping Sports Biochem. Princ. Eff. Anal.*, Springer Berlin Heidelberg, 2010: pp. 65–75.
- [13] C. Saudan, N. Baume, N. Robinson, L. Avois, P. Mangin, M. Saugy, Testosterone and doping control, *Br. J. Sports Med.* 40 Suppl 1 (2006) i21–24.
- [14] D.H. van de Kerkhof, D. de Boer, J.H. Thijssen, R.A. Maes, Evaluation of testosterone/epitestosterone ratio influential factors as determined in doping analysis, *J. Anal. Toxicol.* 24 (2000) 102–115.
- [15] Wada-ama.org - Reporting and evaluation guidance for testosterone, epitestosterone, T/E ratio and other endogenous steroids. Atualização em 2004. Acesso em Julho de 2013
http://www.wada-ama.org/rtecontent/document/end_steroids_aug_04.pdf
- [16] E. a. S. Al-Dujaili, Development and validation of a simple and direct ELISA method for the determination of conjugated (glucuronide) and non-conjugated testosterone excretion in urine, *Clin. Chim. Acta.* 364 (2006) 172–179.
- [17] G. Conneely, M. Aherne, H. Lu, G.G. Guilbault, Development of an immunosensor for the detection of testosterone in bovine urine, *Anal. Chim. Acta.* 583 (2007) 153–160.
- [18] E. Venturelli, A. Manzari, A. Cavalleri, M. Benzo, G. Secreto, E. Marubini, Urinary Testosterone Measurement by Gas-Chromatography After Solid-Phase Extraction and High-Performance Liquid-Chromatography, *J. Chromatogr. Biomed. Appl.* 582 (1992) 7–12.
- [19] L. Xu, S. Qiu, C.J. Sun, Q.P. Deng, H.X. Chen, Y.L. Zhou, *et al.*, Determination of epitestosterone in human urine by off-line immunoaffinity solid-phase extraction

- coupled with high performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. B - Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 878 (2010) 1443–1448.
- [20] R.C.P. Sequeiros, N.R. Neng, F.C.M. Portugal, M.L. Pinto, J. Pires, J.M.F. Nogueira, Development and Application of Stir Bar Sorptive Extraction with Polyurethane Foams for the Determination of Testosterone and Methenolone in Urine Matrices, *J. Chromatogr. Sci.* 49 (2011) 297–302.
- [21] C. Almeida, J.M.F. Nogueira, Determination of steroid sex hormones in water and urine matrices by stir bar sorptive extraction and liquid chromatography with diode array detection, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 41 (2006) 1303–1311.
- [22] D.J. Borts, L.D. Bowers, Direct measurement of urinary testosterone and epitestosterone conjugates using high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry, *J. Mass Spectrom.* 35 (2000) 50–61.
- [23] G. de A. Cavalcanti, F.D. Leal, B.C. Garrido, M.C. Padilha, F.R. de A. Neto, Detection of designer steroid methylstenbolone in “nutritional supplement” using gas chromatography and tandem mass spectrometry: Elucidation of its urinary metabolites, *Steroids.* 78 (2013) 228–233.
- [24] R.M. Smith, Before the injection - modern methods of sample preparation for separation techniques, *J. Chromatogr. A.* 1000 (2003) 3–27.
- [25] A. Prieto, O. Basauri, R. Rodil, A. Usobiaga, L.A. Fernández, N. Etxebarria, et al., Stir-bar sorptive extraction: A view on method optimisation, novel applications, limitations and potential solutions, *J. Chromatogr. A.* 1217 (2010) 2642–2666.
- [26] C. He, S. Li, H. Liu, K. Li, F. Liu, Extraction of testosterone and epitestosterone in human urine using aqueous two-phase systems of ionic liquid and salt, *J. Chromatogr. A.* 1082 (2005) 143–149.
- [27] Y. Zhan, F.M. Musteata, F.A. Basset, J. Pawliszyn, Determination of free and deconjugated testosterone and epitestosterone in urine using SPME and LC-MS/MS, *Bioanalysis.* 3 (2011) 23–30.

- [28] F. Sanchez-Rojas, C. Bosch-Ojeda, J. Manuel Cano-Pavon, A Review of Stir Bar Sorptive Extraction, *Chromatographia*. 69 (2009) S79–S94.
- [29] J.M.F. Nogueira, Novel Sorption-Based Methodologies for Static Microextraction Analysis: A review on SBSE and related techniques, *Anal. Chim. Acta*. 757 (2012) 1-10.
- [30] 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.
- [31] E. Baltussen, C.A. Cramers, P.J.F. Sandra, Sorptive sample preparation - a review, *Anal. Bioanal. Chem.* 373 (2002) 3–22.
- [32] E. Baltussen, P. Sandra, F. David, C. Cramers, Stir bar sorptive extraction (SBSE), a novel extraction technique for aqueous samples: Theory and principles, *J. Microcolumn Sep.* 11 (1999) 737–747.
- [33] F. David, P. Sandra, Stir bar sorptive extraction for trace analysis, *J. Chromatogr. A*. 1152 (2007) 54–69.
- [34] Gerstel.org - Twister / Stir Bar Sorptive Extraction SBSE. Atualização em 2013. Acesso em Julho de 2013.
<http://www.gerstel.com/en/twister-stir-bar-sorptive-extraction.htm>
- [35] N.R. Neng, A.R.M. Silva, J.M.F. Nogueira, Adsorptive micro-extraction techniques--novel analytical tools for trace levels of polar solutes in aqueous media, *J. Chromatogr. A*. 1217 (2010) 7303–7310.
- [36] M. Kawaguchi, R. Ito, K. Saito, H. Nakazawa, Novel stir bar sorptive extraction methods for environmental and biomedical analysis, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 40 (2006) 500–508.
- [37] C. Bicchi, C. Cordero, E. Liberto, P. Rubiolo, B. Sgorbini, F. David, et al., Dual-phase twisters: A new approach to headspace sorptive extraction and stir bar sorptive extraction, *J. Chromatogr. A*. 1094 (2005) 9–16.
- [38] N. Gilart, N. Miralles, R.M. Marcé, F. Borrull, N. Fontanals, Novel coatings for stir bar sorptive extraction to determine pharmaceuticals and personal care products in

- environmental waters by liquid chromatography and tandem mass spectrometry, *Anal. Chim. Acta.* 774 (2013) 51–60.
- [39] Y. Nie, E. Kleine-Benne, Using Three Types of Twister Phases for Stir Bar Sorptive Extraction of Whisky, Wine and Fruit Juice. 2011
Acesso em Julho de 2013. <http://www.gerstel.de/pdf/p-gc-an-2011-03.pdf>
- [40] I. Rykowska, W. Wasiak, Advances in Stir Bar Sorptive Extraction Coating: A Review, *Acta Chromatogr.* 25 (2013) 27–46.
- [41] C. Almeida, J.M.F. Nogueira, Comparison of the selectivity of different sorbent phases for bar adsorptive microextraction — Application to trace level analysis of fungicides in real matrices, *J. Chromatogr. A.* 1265 (2012) 7–16.
- [42] N.R. Neng, J.M.F. Nogueira, Determination of short-chain carbonyl compounds in drinking water matrices by bar adsorptive micro-extraction (BA μ E) with in situ derivatization, *Anal. Bioanal. Chem.* 398 (2010) 3155–3163.
- [43] N.R. Neng, A.S. Mestre, A.P. Carvalho, J.M.F. Nogueira, Powdered activated carbons as effective phases for bar adsorptive micro-extraction (BA μ E) to monitor levels of triazinic herbicides in environmental water matrices, *Talanta.* 83 (2011) 1643–1649.
- [44] L.S. Ettre, *Chromatography: The separation technique of the 20th century*, *Chromatographia.* 51 (2000) 7–17.
- [45] L.S. Ettre, M.S. Tswett and the invention of chromatography, *Lc Gc Eur.* 16 (2003) 632-637.
- [46] J M F Nogueira, Mikhail S. Tswett Um legado para a cromatografia moderna, *Química.* (2006) 51–56.
- [47] J.W. Robinson, E.M.S. Frame, G.M.F. II, *Undergraduate Instrumental Analysis*, Taylor & Francis, 2004.
- [48] D.C. Harris, *Quantitative Chemical Analysis*, W. H. Freeman, 2003.
- [49] D.A. Skoog, F.J. Holler, S.R. Crouch, *Principles of Instrumental Analysis*, Thomson Brooks/Cole, 2007.

- [50] Hiq.linde-gas.com - High Performance Liquid Chromatography (HPLC) Atualização em 2013. Acesso em Julho de 2013.
http://www.http://hiq.linde-gas.com/international/web/lg/spg/like351gspg.nsf/docbyalias/anal_hplc
- [51] X.H. Qi, L.W. Zhang, X.X. Zhang, Simultaneous determination of nandrolone, testosterone, and methyltestosterone by multi-immunoaffinity column and capillary electrophoresis, *Electrophoresis*. 29 (2008) 3398–3405.
- [52] L.R. Snyder, J.J. Kirkland, J.L. Glajch, *Practical HPLC Method Development*, 2012.
- [53] P.M.A. do Rosário, J.M.F. Nogueira, Combining stir bar sorptive extraction and MEKC for the determination of polynuclear aromatic hydrocarbons in environmental and biological matrices, *Electrophoresis*. 27 (2006) 4694–4702.
- [54] P. Serôdio, J.M.F. Nogueira, Development of a stir-bar-sorptive extraction-liquid desorption-large-volume injection capillary gas chromatographic-mass spectrometric method for pyrethroid pesticides in water samples, *Anal. Bioanal. Chem.* 382 (2005) 1141–1151.
- [55] *Chromatography product guide*, Phenomenex, 2012/2013.
- [56] D.R. Mottram, A.J. George, Anabolic steroids, *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 14 (2000) 55–69.
- [57] F.C.M. Portugal, M.L. Pinto, J.M.F. Nogueira, Optimization of Polyurethane Foams for Enhanced Stir Bar Sorptive Extraction of Triazinic Herbicides in Water Matrices, *Talanta*. 77 (2008) 765–773.
- [58] US EPA - Estimation Programs Interface Suite™ for Microsoft® Windows, v4.11, Washington, 2012.
- [59] A. Stopforth, C.J. Grobbelaar, A.M. Crouch, P. Sandra, Quantification of testosterone and epitestosterone in human urine samples by stir bar sorptive extraction – thermal desorption – gas chromatography/mass spectrometry: Application to HIV-positive urine samples, *J. Sep. Sci.* 30 (2007) 257–265.

- [60] European Commission, Council Directive 98/93/EC, Off. J. Eur. Commun. L330 (1998) 32-54
- [61] H. Kirchmann, S. Pettersson, Human urine - Chemical composition and fertilizer use efficiency, Fertil. Res. 40 (1994) 149–154.
- [62] C.C. Wang, S.F. Cheng, H.L. Cheng, Y.L. Chen, Analysis of anabolic androgenic steroids in urine by full-capillary sample injection combined with a sweeping CE stacking method, Anal. Bioanal. Chem. 405 (2012) 1969–1976.

Anexos

Anexo I - Espetros de UV/VIS

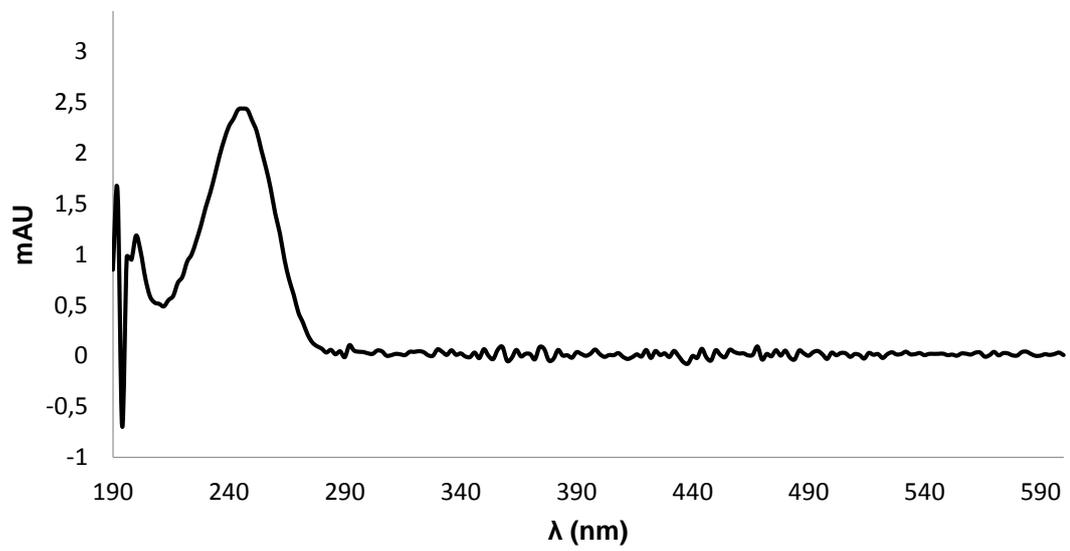


Figura I – Espetro de UV/vis da E.

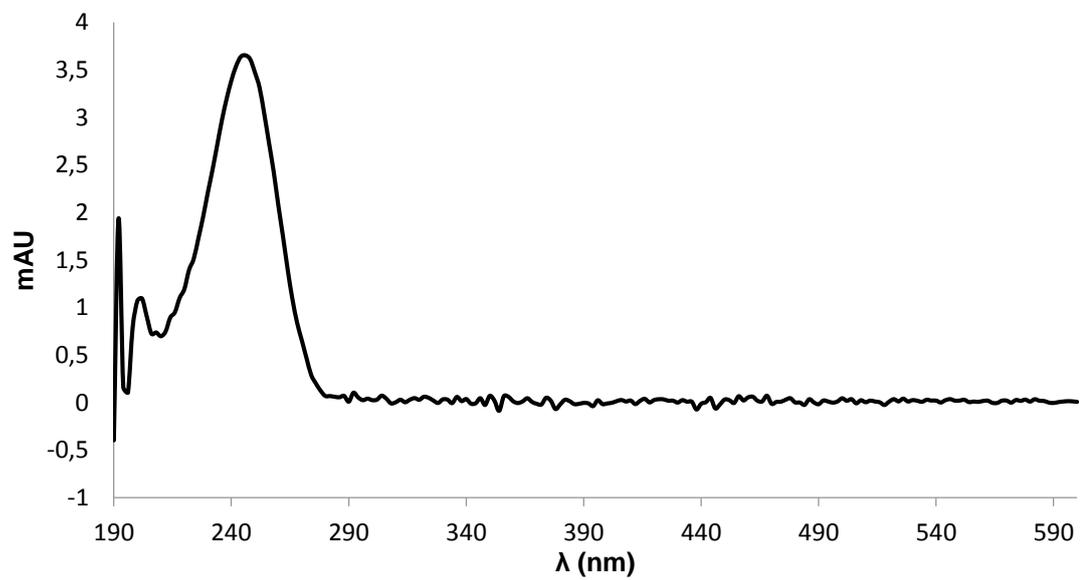


Figura II – Espetro de UV/vis da T.

Anexo II - Fórmulas utilizadas para o cálculo das recuperações

O cálculo da média (\bar{x}), desvio padrão (σ) e a aplicação do método dos mínimos quadrados (linearização), foram efetuados com recurso às funções pré-definidas no *software* Microsoft Excel. No caso do desvio padrão relativo (RSD) não se encontra pré-definido, sendo por isso utilizada a seguinte relação:

$$\text{RSD} = \left(\frac{\sigma}{\bar{x}} \right) \times 100\%$$

O cálculo da recuperação foi efetuado através da seguinte expressão:

$$\text{Recuperação} = \left(\frac{A_{\text{obt}}}{A_{\text{esp}}} \right) \times 100\%$$

em que A_{obt} é a área obtida e A_{esp} é a área esperada dos picos de cada composto.

