

Aspectos analíticos do controle da dopagem de agentes anabolizantes em urina de atletas: avaliação de critérios de positividade

Eliane Granuzzio Castilho, Elizabeth de Souza Nascimento*

Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo

O abuso dos esteróides anabólicos androgênicos (EAA) está em constante ascensão, tanto nos esportes profissionais como nos esportes praticados nas academias. Essas substâncias são banidas pelo Comitê Olímpico Internacional (COI), sendo que este comitê recomenda que a metodologia usada na detecção e quantificação desses compostos em amostras biológicas dos atletas seja a cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC/MS). Nesse trabalho foram avaliados, por técnica de extração líquido/líquido e posterior identificação em GC/MS-SIM, 15 EAA, dos quais três foram quantificados. Os critérios de correlação entre os íons mais característicos dos EAA analisados foram definidos como segue: os de intensidade relativa maior que 20% podem apresentar uma variação de até 30%; os de intensidade relativa entre 10 e 20% podem apresentar uma variação de até 50% e os de intensidade relativa menor que 10% podem apresentar uma variação de até 90%. Com a aplicação dos critérios anteriores, foi possível confirmar os resultados obtidos em oito amostras de urina de atletas, nos quais foi constatado o uso dos EAA, ficando evidenciada a importância da aplicação desses critérios de positividade na comprovação inequívoca da presença de tais substâncias em amostras biológicas.

Unitermos:

- Esteróides anabolizantes
- Doping
- GC/MS
- Urina

*Correspondência:

E. S. Nascimento
Departamento de Análises Clínicas e
Toxicológicas
FCF/USP
Av. Lineu Prestes, 580, bloco 13B.
05389-970
São Paulo - Brasil
E-mail: esnasci@usp.br

INTRODUÇÃO

O uso da testosterona e dos esteróides anabólicos androgênicos é proibido pelo Comitê Olímpico Internacional e pelas federações esportivas nacionais e internacionais. Os ensaios para a detecção dos esteróides anabólicos tiveram início em 1976, nos Jogos Olímpicos de Montreal, sendo que a testosterona passou a ser analisada em 1984, nos Jogos Olímpicos de Los Angeles (Schänzer, Donike, 1993; Yesalis, 1993).

O início do uso dos esteróides anabólicos (EAA) no esporte ocorreu em 1950 e foi atribuído aos atletas russos levantadores de peso, mas foi em 1964 que um padrão de uso dessas substâncias tornou-se comum entre atletas que participavam de competições que exigiam força (Yesalis *et al.*, 1993).

As principais razões para a rápida propagação do uso dos EAA podem estar relacionadas à possibilidade de melhor desenvolvimento da força física, além de afetar as enzimas e os hormônios envolvidos no anabolismo

protéico. Explicam, também, o crescimento do uso dos esteróides em outras modalidades esportivas, nos quais o desempenho está diretamente relacionado à força física (Frenkl, 1991).

O uso de drogas no esporte não é novo, mas poucas têm despertado a imaginação do público como os esteróides anabólicos (Dawson, 2001).

O Comitê Olímpico Internacional (COI) considera três princípios básicos que justificam a luta contra a dopagem no esporte:

- Proteção da saúde dos atletas;
- Defesa da ética médica e do esporte;
- Chances iguais para todos os competidores.

A dopagem foi definida na “World Conference Against Doping”, em Lausanne, em 1999, como sendo:

“Uma atividade que contraria os princípios fundamentais do Olimpismo, da ética médica e do esporte, sendo, portanto, proibido. Assim, é proibido recomendar, propor, autorizar, tolerar ou facilitar o uso de substâncias ou métodos que entrem em confronto com o conceito de doping, bem como traficar essas substâncias” (Rivier, 2000).

Um programa eficiente antidopagem inclui métodos confiáveis de detecção de agentes farmacológicos proibidos. De acordo com a última publicação da lista oficial e atualizada anualmente pelo Comitê Olímpico Internacional, somente 128 compostos são citados como exemplos. Existem mais de 1000 substâncias químicas, que, em teoria, poderiam, direta ou indiretamente, ser consideradas em relação à melhora de desempenho (Rivier, 2000).

Dentre essas substâncias, os esteróides anabólicos androgênicos, encontram-se na classe de substâncias proibidas e as concentrações urinárias de substâncias endógenas, acima das quais é considerado doping, são:

- Epitestosterona: 200 nanogramas/mililitro
- 19-norandrosterona (homem): 2 nanogramas/mililitro
- 19-norandrosterona (mulher): 5 nanogramas/mililitro
- T/E razão: >6 (IOC).

Rotineiramente são empregados nos laboratórios antidopagem do COI, disseminados por vários países, vários métodos para a detecção dos esteróides anabólicos androgênicos. Os laboratórios devem padronizar técnicas que permitam gerar evidências analíticas suficientes para demonstrar a presença ou ausência de compostos proibidos na urina dos atletas testados. A análise deve estar direcionada à obtenção das melhores sensibilidades e seletividades em termos de detecção e quantificação, quando aplicável. As técnicas de cromatografia a gás acoplada ao espectrômetro de massas são as ferramentas necessárias para atingir este desempenho (Saugy *et al.* 2000).

Além dos aspectos esportivos existe a questão da saúde dos atletas: as conseqüências do abuso de drogas são sempre muito sérias. A luta contra esse abuso deve, portanto, envolver vários aspectos, tais como, o farmacológico e o médico, as medidas repressivas de controles e sanções e as medidas preventivas, que constituem o papel fundamental do conhecimento toxicológico (Benzi, 1988).

O critério usado para a espectrometria de massas pelos laboratórios credenciados pelo COI, segundo Frans Delbeke do Departamento de Controle de Dopagem do laboratório “Vakgroep Farmacologie und Toxicologie” da Universidade de Ghent na Bélgica, consiste dos seguintes parâmetros:

- O espectro de massas desenvolvido no modo “full scan” é melhor do que no modo SIM;
- São necessários três íons característicos (SCAN; SIM);
- Todos os íons característicos com uma intensidade maior que 10% no padrão de referência necessitam estar presente no espectro do analito (“full scan”);
- A abundância relativa de íons que não fazem parte do espectro do analito não deverá ser maior que 25%;
- O critério de tolerância para espectrometria de massas de baixa resolução (GC/MS ou LC/MS): absoluta 5% ou relativa 20%.

Segundo de Ruig (1989), o critério de qualidade para a detecção dos analitos utilizando o método de GC/MS de baixa resolução consiste na avaliação da intensidade relativa dos íons detectados no analito que podem ter uma variação de até 10% quando o modo de impacto de elétrons é usado e 20% para o modo de ionização química, sempre quando comparado à intensidade relativa dos íons do padrão de referência.

Nesse trabalho são estudadas 15 substâncias, que fazem parte da lista de substâncias proibidas pelo COI. Dentre essas, são quantificadas a testosterona, a epitestosterona e a norandrosterona.

A identificação desses compostos baseia-se na comparação dos espectros de massas, ou perfil dos íons selecionados e o tempo de retenção dos derivados trimetilsilila (TMS) dos esteróides, e seus metabólitos, com os dados correspondentes obtidos das substâncias de referência.

O critério de identificação dos compostos utilizado nesse trabalho teve como prioridade a correspondência inequívoca entre os íons de cada substância analisada monitorados no modo SIM e é o mesmo utilizado no laboratório do Jôquei Clube de Hong Kong (comunicação pessoal). A correlação entre a intensidade das massas dos íons deverá obedecer aos seguintes limites:

- A intensidade relativa dos íons do espectro desenvolvido no modo SIM pode ter variação de 30%, quando

apresentar intensidade maior que 20% do pico base que é considerado 100%;

- A variação pode ser de 50%, quando a intensidade relativa dos íons ficar entre 10 e 20% do pico base, que é considerado 100%;
- A variação pode ser de 90%, quando a intensidade relativa do íon for menor que 10% do pico base, que é considerado 100%.

Para estabelecer esses valores são necessários estudos com padrão de referência..

O objetivo do presente trabalho é o de avaliar os critérios de correlação anteriormente descritos em amostras de urina de atletas sabidamente usuários dessas substâncias.

CASUÍSTICA E MÉTODOS

Casuística

As amostras analisadas nesse estudo são provenientes de atletas que participavam ou não de competições e que praticavam várias modalidades esportivas como o fisiculturismo, o jiu-jitsu e a musculação.

O questionário respondido pelos atletas considerava dados pessoais como: a idade, altura e peso; o esporte pra-

ticado, a frequência, duração, objetivo; suplementos alimentares ingeridos; esteróides utilizados, composição, esquema dos 2 últimos ciclos de uso dos anabólicos, início do ciclo atual, data da última dose, objetivo do uso; ingestão de bebidas alcoólicas, frequência e consumo; hábito de fumar; outras substâncias relacionadas ao esporte, dose, frequência; histórico de doenças; data e hora da coleta.

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP e só participaram os atletas que concordaram em responder o questionário e assinar o termo de consentimento.

A Tabela I apresenta o perfil dos esportistas analisados, em relação à frequência, duração, suplementação alimentar, uso e motivo de uso dos esteróides anabólicos androgênicos.

Soluções-padrão e reagentes

- Padrão de boldenona, 100 µg/mL; 5β-Androst-1-en-17β-ol-3-ona, 5 µg/mL; 1-metilen-5α-androstan-3α-ol-17-ona, 20 µg/mL; testosterona, 100 mg/µL; epitestosterona, 1 mg/mL, gentilmente fornecidos pelo Prof. Dr. Franz T. Delbeke do Departamento de Farmacologia, Farmácia e Toxicologia do laboratório

TABELA I - Perfil dos esportistas analisados, em relação à frequência, duração, suplementação alimentar, uso e motivo de uso dos EAA

	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3	Amostra 4	Amostra 5	Amostra 6	Amostra 7	Amostra 8
Idade (anos)	22	28	22	28	25	33	27	34
Esporte praticado	Musculação	Musculação	Musculação	Musculação	Jiu-Jitsu	Fisiculturismo	Musculação	Musculação
Frequência	5 dias/sem.	4 dias/sem.	5 dias/sem	5 dias/sem	Todos os dias	5 a 6 dias/sem.	5 dias/sem.	3 dias/sem.
Duração	2 h	3 h	2 h	2 h	1h 30 min	3 h	2 horas	2 h
Suplementos Alimentares	Não	- Amino fuel - Albumina	Não	- Amino fluid - Carb up	Massa 1000	- Whey protein - BCAA - creatina	- creatina	- Amino 2500 - creatina
EAA	- Deposteron (200 mg)	- Equifort - Durateston	- Deposteron (200 mg) - Equifort (50 mg) - Winstrol (50 mg)	- Equifort - Durateston	- Primobolam - Winstrol	- Winstrol - Durateston - Deposterom rom	- Testex (250 mg) - Deca (200 mg)	Winstrol
Motivo do uso do EAA	Ganho de massa muscular	Definição muscular	Ganho de massa muscular	Força, potência, aumento de massa	Aumento de massa muscular	Definição e aumento de massa muscular	Aumento de massa muscular	Ganho de massa muscular
Duração do ciclo	2 meses	2 meses	2 meses	3 semanas	2 meses	1 mês	2 meses	2 meses
Frequência do ciclo	—	—	—	—	2 vezes/ano	2 vezes/ano	2 vezes/ano	1 vez/ano
Ingestão de bebidas alcoólicas	Não	Não	Não	Não	Não	1 taça de vinho/mês	5 latas de cerveja/semana	Final de semana
Hábito de fumar	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Sim
Outras substâncias relacionadas ao esporte	Nenhuma	Nenhuma	Cinomel	Thiomucase	Nenhuma	-Prosta-glandina -Lipostabil	Nenhuma	Nenhuma

- credenciado pelo Comitê Olímpico Internacional da Bélgica.
- Padrão de fluoximesterona; 9 α -fluoro-18-nor-17,17-dimetil-androst-4,13-dien-11 β -ol-3-ona; 9 α -fluoro-17 α -metil-androst-4-ena-3 α ,6 β ,11 β ,17 β -tetrol; metenolona; 17 α -metiltestosterona (padrão interno); 3'-OH-estanozolol; 16 β OH-estanozolol; oximesterona; norandrosterona (5 α -estran-3 α -ol-17-ona); noreticolanona (5 β -estran-3 α -ol-17-ona); 17 α -etil-5 β -estrane-3 α -17 β -diol; 1 mg/mL, Radian Analytical Products.
 - Metanol p.a, Merck[®]
 - MSTFA (*N*-metil-*N*-trimetilsililtrifluoroacetamida), 5 g, Sigma[®] (M-7891)
 - Etanotiol (C₂H₅SH), 97%, Aldrich Chemical Company, Inc.[®]
 - Iodeto de amônio (NH₄I), Fluka[®]
 - Éter *terc*-butilmetílico, p.a., Merck[®] (1.01849.1000)
 - Sulfato de sódio anidro (Na₂SO₄), Química Moderna[®]
 - Bicarbonato de sódio (NaHCO₃), Merck[®]
 - Carbonato de potássio (K₂CO₃), Merck[®]
 - Ácido clorídrico (HCl), p.a., Merck[®]
 - Acetato de sódio (CH₃COONa), Synth[®]
 - β -glicuronidase *E. coli*, 250.000 unidades, Sigma[®] (G7396)

Cromatógrafo a Gás acoplado a Espectrômetro de Massas e condições cromatográficas

Espectrômetro de massas Hewlett Packard[®], modelo 5972, acoplado ao cromatógrafo a gás Hewlett Packard[®], modelo 6890, acoplado ao computador Hewlett-Packard[®],

modelo Vectra XM com Chem Station para integração e processamento dos cromatogramas e espectros.

Preparação das amostras

Hidrólise enzimática

Em um tubo de centrífuga foram colocados 5 ml de urina, 2 ml do tampão fosfato e 40 mL da enzima β -glicuronidase *E. coli*. Essa mistura foi aquecida a 55 °C por 1 hora. Após esta etapa, o tubo foi resfriado à temperatura ambiente.

Extração líquido-líquido

As amostras hidrolisadas foram alcalinizadas com o tampão sólido para o ajuste de pH entre 9 e 10, 50 mL do padrão 17 α -metiltestosterona (padrão interno) e 10 ml do éter *terc*-butilmetílico para a extração. O tubo foi agitado por 15 minutos e centrifugado por 5 minutos a 350 g. O sobrenadante foi retirado e colocado em um frasco contendo sulfato de sódio anidro e, em seguida, foi transferido para o vial onde o solvente foi evaporado a 40 °C, sob corrente de nitrogênio.

Processo de derivação

O processo de derivação foi realizado adicionando 40 mL do agente de derivação (MSTFA/NH₄I/etanotiol) e permanecendo na barra de aquecimento por 2 horas a 80 °C; posteriormente 2 mL dessa mistura foram injetados no GC/MS.

Curva de calibração

Curvas padrão de testosterona, epitestosterona e da

TABELA II - Parâmetros cromatográficos utilizados nas análises de esteróides anabólicos por GC/MS

Coluna	Hewlett Packard [®] ultra 1 metilsilicone (17m x 200 mm x 0,11 mm nominal)		
Gás carreador	Hélio		
Pressão	9,2 psi		
Fluxo	0,6 mL/min constante		
Velocidade	39 cm/s		
Injetor	modo: splitless pressão: 9,2 psi fluxo total : 52,8 mL/min		
Temperaturas:	Injetor		
	Forno		
		Tempo (min)	Tempo de corrida (min)
	Temperatura inicial 120 °C	0	0
	70 °C.....182 °C		0,89
	4 °C.....235 °C		14,14
	30 °C.....300 °C	3	19,31

Fonte: Delbeke et al, 1995.

19-norandrosterona nas concentrações de 2 ng/mL; 50 ng/mL; 150 ng/mL e 250 ng/mL foram preparadas, em 3 replicatas, para permitir a quantificação desses anabólicos nas amostras de urina dos atletas. Esse procedimento foi acompanhado por uma amostra de referência negativa, em duplicata.

Critérios para a evidência de positivos

Os critérios para a evidência de positivos estão de acordo com o “Standard Operating Procedures”, preconizado por Terance Wan, do laboratório do Jôquei Clube de Hong Kong, em 1997 (comunicação pessoal).

O Quadro 1 resume os critérios empregados nesse trabalho.

QUADRO 1- Critérios para a evidência de positividade

Intensidade relativa (%)	Limite (%)
> 20	30
10 – 20	50
< 10	90

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Resultado da validação dos critérios de positividade

- *Limite de detecção*: O limite de detecção das 15 substâncias analisadas nesse estudo foi de 0,5 ng/μL. Nessa

concentração, todos os padrões apresentaram-se de acordo com os critérios de positividade.

- *Limite de quantificação*: O limite de quantificação da 19-norandrosterona, epitestosterona e testosterona foi de 2 ng/mL.
- *Especificidade*: Esse parâmetro permitiu estabelecer a capacidade de resolução do sistema entre a substância inalterada e seus produtos de biotransformação ou compostos interferentes, através do tempo de retenção relativo ao padrão interno. Nas condições cromatográficas padronizadas todos os esteróides anabólicos e o padrão interno apresentaram uma separação satisfatória.
- *Estabilidade do agente de derivação*: A estabilidade do agente de derivação foi de 5 horas, respeitando os critérios para a evidência de positivos.
- *Linearidade dos padrões*: A Tabela III apresenta o resultado da linearidade de cada esteróide anabolizante utilizada na determinação da porcentagem entre os íons. Cada ponto corresponde à média dos valores encontrados na análise de seis injeções do mesmo analito em quatro concentrações distintas.

Testosterona, epitestosterona e 19-NA, foram quantificadas através das curvas de linearidade de concentrações de 2 ng/mL até 250 ng/mL, em que os R² foram respectivamente 0,9947, 0,9963 e 0,9961.

As Tabelas IV a XI apresentam os resultados dos critérios de correlação entre os íons obtidos após a análise das 8 amostras de urina de atletas usuários de esteróides anabólicos.

TABELA III - Resultados da linearidade dos esteróides anabólicos androgênicos determinada em quatro concentrações distintas

EAA	Equação da reta	r ²
Boldenona	Y= 0,173x-0,0315	0,9922
5β-androst-1-en-17β-ol-3-ona	Y= 1,3634x-0,005	0,9969
Epitestosterona	Y= 0,3623x+0,0193	0,9932
9α-fluoro-18nor-17,17-dimetil-androst-4,13-dieno-11β-ol-3-ona	Y= 1,4821x+0,0154	0,9769
9α-fluoro-17α-metil-androst-4-eno-3α,6β,11β,17β-tetrol	Y= 0,0946x-0,0035	0,9883
Fluoximesterona	Y= 0,0155x+0,0012	0,9928
Metenolona	Y= 18,63x-3,0231	0,9908
1-metilen-5α-androstan-3α-ol-17-ona	Y= 0,1336x+0,0506	0,9792
Norandrosterona	Y= 0,3318x+0,0118	0,9992
Noreticolanolona	Y= 0,8017x+0,0773	0,9979
17α-etil-5β-estrano-3α,17β-diol	Y= 3,3182x-0,329	0,9967
Oximesterona	Y= 0,1483x+0,003	0,9928
Testosterona	Y= 0,5706x-0,0006	0,995
3'-hidroxiestanozolol	Y= 0,0959x+0,0318	0,9858
16β-hidroxiestanozolol	Y= 0,2537x-0,431	0,9328

TABELA IV - Resultado da correlação entre os íons na avaliação da presença de testosterona e epitestosterona na amostra 1

EAA	ÍONS	ÍONS
Testosterona		
TR = 12,729	m/z 432	m/z 417
Porcentagem	100%	14,33%
	Critério	50%
	Variação min. aceita	7,16%
	Variação max. aceita	21,50%
Amostra	100%	14,30%
Epitestosterona		
TR = 12,052	m/z 432	m/z 417
Porcentagem	100%	10,82%
	critério	50%
	Variação min. aceita	5,41%
	Variação max. aceita	16,23%
Amostra	100%	-

Quantificação da testosterona = 9,99 ng/mL; T/Epi = 9,99

TABELA V - Resultado da correlação entre os íons na avaliação da presença de testosterona, epitestosterona, boldenona e 5 β -androst-1-en-17 β -ol-3-ona na **amostra 2**

EAA	ÍONS	ÍONS	ÍONS
Testosterona			
TR = 12,752	m/z 432	m/z 417	
Porcentagem	100%	14,33%	
	critério	50%	
	Variação min. aceita	7,16%	
	Variação max. aceita	21,50%	
Amostra	100%	12,58%	
Epitestosterona			
TR = 12,085	m/z 432	m/z 417	
Porcentagem	100%	10,82%	
	Critério	50%	
	Variação min. aceita	5,41%	
	Variação max. aceita	16,23%	
Amostra	100%	5,36%	
Boldenona			
TR = 12,545	m/z 206	m/z 430	m/z 415
Porcentagem	100%	7,3%	3,2%
	critério	90%	90%
	Variação min. aceita	0,73%	0,32%
	Variação max. aceita	13,87%	6,08%
Amostra	100%	9,43%	3,68%
5β-androst-1-en-17β-ol-3-ona			
TR = 9,535	m/z 194	m/z 206	m/z 432
Porcentagem	100%	20,9%	5,9%
	critério	30%	90%
	Variação min. aceita	14,63%	0,59%
	Variação max. aceita	27,17%	11,21%
Amostra	100%	17,20%	4,77%

Quantificação da testosterona = 9,97 ng/mL, T/Epi = ?

TABELA VI - Resultado da correlação entre os íons na avaliação da presença de testosterona, epitestosterona, boldenona, 5 β -androst-1-eno-17 β -ol-3-ona, -3''-hidroxiestanozolol, 16 β -hidroxiestanozolol e 17 α -etil-5 β -estrano-3 α -17 β -diol na amostra 3

EAA	ÍONS	ÍONS	ÍONS	ÍONS
Testosterona TR = 12,729 Porcentagem	m/z 432 100% Critério	m/z 417 14,33% 50%		
	Varição min. aceita	7,16%		
	Varição max. aceita	21,50%		
Amostra	100%	16%		
Epitestosterona TR = 12,156 Porcentagem	m/z 432 100% Critério	m/z 417 10,82% 50%		
	Varição min. aceita	5,41%		
	Varição max. aceita	16,23%		
Amostra	100%	3,18%		
Boldenona TR = 12,719 Porcentagem	m/z 206 100% critério	m/z 430 7,3% 90%	m/z 415 3,2% 90%	
	Varição min. aceita	0,73%	0,32%	
	Varição max. aceita	13,87%	6,08%	
Amostra	100%	10.85%	4.23%	
5β-androst-1-eno-17β-ol-3-ona TR = 9,566 Porcentagem	m/z 194 100% critério	m/z 206 20,9% 30%	m/z 432 5,9% 90%	
	Varição min. aceita	14,63%	0,59%	
	Varição max. aceita	27,17%	11,21%	
Amostra	100%	18,95%	4,55%	
17α-etil-5β-estrano-3α,17β-diol TR = 13,238 Porcentagem	m/z 157 100% critério	m/z 331 5,8% 90%	m/z 421 2,8% 90%	
	Varição min. aceita	0,58%	0,28%	
	Varição max. aceita	11,02%	5,32%	
Amostra	100%	5,30%	0,09%	
16β-hidroxiestanozolol TR = 17,489 Porcentagem	m/z 218 100% critério	m/z 560 2,48% 90%	m/z 545 0,35% 90%	
	Varição min. aceita	0,25%	0,04%	
	Varição max. aceita	4,71%	0,67%	
Amostra	100%	2,03%	0,77%	
3'-hidroxiestanozolol TR = 16,936 Porcentagem	m/z 254 100% critério	m/z 545 9,28% 90%	m/z 560 5,59% 90%	
	Varição min. aceita	0,93%	0,56%	
	Varição max. aceita	17,63%	10,62%	
Amostra	100%	6,27%	4,23%	
19 - NA TR = 9,346 Porcentagem	m/z 405 100% critério	m/z 420 47,0% 30%	m/z 315 51,6% 30%	m/z 225 54,5% 30%
	Varição min. aceita	32,90%	36,12%	38,15%
	Varição max. aceita	61,10%	67,08%	70,85%
Amostra	100%	65,7%	24,57%	55,82%

Quantificação da testosterona= 21,50 ng/mL; T/Epi = 21,50

TABELA VII - Resultado da correlação entre os íons na avaliação da presença de testosterona, boldenona, 5 β -androst-1-en-17 β -ol-3-ona,-3'-hidroxiestanozolol e 16 β -hidroxiestanozolol na **amostra 4**

EAA	ÍONS	ÍONS	ÍONS
Testosterona			
TR = 12,744	m/z 432	m/z 417	
Porcentagem	100%	14,33%	
	critério	50%	
	Variação min. aceita	7,16%	
	Variação max. aceita	21,50%	
Amostra	100%	14,36%	
Boldenona			
TR = 12,596	m/z 206	m/z 430	m/z 415
Porcentagem	100%	7,3%	3,2%
	critério	90%	90%
	Variação min. aceita	0,73%	0,32%
	Variação max. aceita	13,87%	6,08%
Amostra	100%	17,26%	4,0%
5β-androst-1-en-17β-ol-3-ona			
TR =9,552	m/z 194	m/z 206	m/z 432
Porcentagem	100%	20,9%	5,9%
	critério	30%	90%
	Variação min. aceita	14,63%	0,59%
	Variação max. aceita	27,17%	11,21%
Amostra	100%	120,31%	3,99%
16β-hidroxiestanozolol			
TR = 17,474	m/z 218	m/z 560	m/z 545
Porcentagem	100%	2,48%	0,35%
	critério	90%	90%
	Variação min. aceita	0,25%	0,03%
	Variação max. aceita	4,71%	0,67%
Amostra	100%	2,03%	7,11%
3'-hidroxiestanozolol			
TR = 16,916	m/z 254	m/z 545	m/z 560
Porcentagem	100%	9,28%	5,59%
	critério	90%	90%
	Variação min. aceita	0,93%	0,56%
	Variação max. aceita	17,63%	10,62%
Amostra	100%	5,96%	3,67%

Quantificação = 113,96 ng/mL; T/Epi = 113,96

TABELA VIII - Resultado da correlação entre os íons na avaliação da presença de testosterona, epitestosterona, 16 β -hidroxiestanozolol, 3'-hidroxiestanozolol, metenolona e 1-metilen-5 α -androstan-3 α -ol-17-ona na **amostra 5**

EAA	ÍONS	ÍONS	ÍONS
Testosterona			
TR = 12,770	m/z 432	m/z 417	
Porcentagem	100%	14,33%	
	critério	50%	
	Varição min. aceita	7,16%	
	Varição max. aceita	21,50%	
Amostra	100%	16,79%	
Epitestosterona			
TR = 12,107	m/z 432	m/z 417	
Porcentagem	100%	10,82%	
	critério	50%	
	Varição min. aceita	5,41%	
	Varição max. aceita	16,23%	
Amostra	100%	7,67%	
16β-hidroxiestanozolol			
TR = 17,483	m/z 218	m/z 560	m/z 545
Porcentagem	100%	2,48%	0,35%
	critério	90%	90%
	Varição min. aceita	0,25%	0,03%
	Varição max. aceita	4,71%	0,67%
Amostra	100%	2,06%	0,76%
3'-hidroxiestanozolol			
TR = 16,924	m/z 254	m/z 545	m/z 560
Porcentagem	100%	9,28%	5,59%
	critério	90%	90%
	Varição min. aceita	0,93%	0,56%
	Varição max. aceita	17,63%	10,62%
Amostra	100%	6,34%	4,05%
Metenolona			
TR = 13,291	m/z 195	m/z 208	m/z 446
Porcentagem	100%	23,8%	1,9%
	critério	30%	90%
	Varição min. aceita	16,66%	0,19%
	Varição max. aceita	30,94%	3,61%
Amostra	100%	22,71%	2,42%
1-metilen-5α-androstan-3α-ol-17-ona			
TR = 11,612	m/z 431	m/z 446	m/z 341
Porcentagem	100%	70%	33,2%
	critério	30%	30%
	Varição min. aceita	49%	23,24%
	Varição max. aceita	91%	43,16%
Amostra	100%	69,60%	50,58%

Quantificação da testosterona= **5,26 ng/mL**Quantificação da epitestosterona = **5,47 ng/mL**

T/Epi = 0,96

TABELA IX - Resultado da correlação entre os íons na avaliação da presença de testosterona, epitestosterona, 3'-hidroxiestanozolol, 16 β -hidroxiestanozolol e 19-NA na **Amostra 6**

EAA	ÍONS	ÍONS	ÍONS	ÍONS
Testosterona				
TR = 12,739	m/z 432	m/z 417		
Porcentagem	100%	14,33%		
	Critério	50%		
	Varição min. aceita	7,16%		
	Varição max. aceita	21,50%		
Amostra	100%	14,46%		
Epitestosterona				
TR = 12,139	m/z 432	m/z 417		
Porcentagem	100%	10,82%		
	critério	50%		
	Varição min. aceita	5,41%		
	Varição max. aceita	16,23%		
Amostra	100%	23,71%		
16β-hidroxiestanozolol				
TR = 17,483	m/z 218	m/z 560	m/z 545	
Porcentagem	100%	2,48%	0,35%	
	critério	90%	90%	
	Varição min. aceita	0,25%	0,03%	
	Varição max. aceita	4,71%	0,67%	
Amostra	100%	1,92%	0,67%	
3'-hidroxiestanozolol				
TR = 16,917	m/z 254	m/z 545	m/z 560	
Porcentagem	100%	9,28%	5,59%	
	critério	90%	90%	
	Varição min. aceita	0,93%	0,56%	
	Varição max. aceita	17,63%	10,62%	
Amostra	100%	5,21%	3,35%	
19 – NA				
TR = 9,337	m/z 405	m/z 420	m/z 315	m/z 225
Porcentagem	100%	47,0%	51,6%	54,5%
	critério	30%	30%	30%
	Varição min. aceita	32,90%	36,12%	38,15%
	Varição max. aceita	61,10%	67,08%	70,85%
Amostra	100%	96,55%	70,93%	37,49%

Quantificação da testosterona = 361,39 ng/mL

T/Epi = 361,39

TABELA X - Resultado da correlação entre os íons na avaliação da presença de testosterona, epitestosterona, 19-NA e noreticolanolona na **Amostra 7**

EAA	ÍONS	ÍONS	ÍONS	ÍONS
Testosterona				
TR = 12,767	m/z 432	m/z 417		
Porcentagem	100%	14,33%		
	critério	50%		
	Variação min. aceita	7,16%		
	Variação max. aceita	21,50%		
Amostra	100%	16,13%		
Epitestosterona				
TR = 12,206	m/z 432	m/z 417		
Porcentagem	100%	10,82%		
	critério	50%		
	Variação min. aceita	5,41%		
	Variação max. aceita	16,23%		
Amostra	100%	16,13%		
19 – NA				
TR = 9,359	m/z 405	m/z 420	m/z 315	m/z 225
Porcentagem	100%	47,0%	51,6%	54,5%
	critério	30%	30%	30%
	Variação min. aceita	32,90	36,12	38,15
	Variação max. aceita	61,10	67,08	70,85
Amostra	100%	55,33%	37,65%	41,25%
Noreticolanolona				
TR = 10,151	m/z 405	m/z 315	m/z 420	
Porcentagem	100%	93,1%	57,3 %	
	critério	30%	30%	
	Variação min. aceita	65,17%	40,11%	
	Variação max. aceita	121,03%	74,49%	
Amostra	100%	87,37%	70,37%	

Quantificação da testosterona = **8,85 ng/mL**; Quantificação da epitestosterona = **154,47 ng/mL**; T/Epi = **0,057**
 Quantificação da 19-NA = **20,50 ng/mL**

TABELA XI - Resultado da correlação entre os íons na avaliação da presença de 16 β -hidroxiestanozolol na **Amostra 8**

EAA	ÍONS	ÍONS	ÍONS
16β-hidroxiestanozolol			
TR = 17,525	m/z 218	m/z 560	m/z 545
Porcentagem	100%	2,48%	0,35%
	Critério	90%	90%
	Variação min. aceita	0,25%	0,03%
	Variação max. aceita	4,71%	0,67%
Amostra	100%	2,04%	0,68%
3'-hidroxiestanozolol			
TR = 16,973	m/z 254	m/z 545	m/z 560
Porcentagem	100%	9,28%	5,59%
	critério	90%	90%
	Variação min. aceita	0,93%	0,56%
Variação max. aceita	17,63%	10,62%	
Amostra	100%	5,28%	3,92%

TABELA XII - Incidência dos esteróides e seus metabólitos detectados em urina de fisiculturistas e atletas de outras modalidades

EAA	Amostras								Total
	1	2	3	4	5	6	7	8	
Testosterona	x		x	x		x			4
Boldenona		x	x						2
5 β -androst-1-en-17 β -ol-3-ona		x	x						2
19-NA							x		1
Noreticolanolona							x		1
Metenolona					x		x		2
3'-hidroxiestanozolol			x	x	x	x		x	5
16 β -hidroxiestanozolol						x			1

Foram consideradas como positivas as amostras cujos resultados encontravam-se de acordo com os critérios de correlação entre os íons estabelecidos nesse trabalho. Os resultados encontram-se sumarizados na Tabela XII.

Dentro do universo avaliado, pode-se perceber que os esteróides mais comumente utilizados pelos atletas são: estanozolol; testosterona; boldenona; metenolona e nandrolona.

Na amostra 2, cujos resultados são apresentados na Tabela V, a porcentagem do íon 417 da epitestosterona encontra-se fora da variação permitida, porém com um resultado muito próximo, gerando dúvidas na interpretação dos resultados. Nesse caso seria aconselhável a repetição da análise, o que não foi possível pelo pequeno volume de amostra obtido.

Ao analisarmos o espectro da 19-NA da amostra 6, observou-se muita semelhança ao padrão de referência e chegou-se até a quantificar o íon 405, quando foi obtido um valor de 5,03 ng/mL de urina, acima do valor permitido pelo COI. Porém, ao se aplicar os critérios de correlação propostos nesse trabalho, pode-se perceber que estes estavam totalmente fora dos parâmetros estabelecidos para essa substância e, dessa forma, concluiu-se que o resultado anterior estava incorreto.

Com o exemplo acima, pode-se perceber a importância do estabelecimento de critérios que possam auxiliar na interpretação dos resultados, assegurando a confiabilidade da análise e evitando um falso positivo e a punição indevida de um atleta.

De acordo com os dados apresentados na Tabela II, a idade dos atletas participantes variava de 22 e 34 anos, a maioria praticava musculação e não participavam de competições. O objetivo do uso dos esteróides era o mesmo para a maioria dos atletas, isto é, propiciar o aumento

de massa muscular; melhor definição da musculatura e diminuição da porcentagem de gordura. Apenas dois atletas relataram o uso dos EAA visando participar de competições de jiu-jitsu e fisiculturismo. A frequência dos treinamentos variaram de 4 a 7 vezes por semana e os ciclos de 3 a 8 semanas. Alguns atletas utilizaram até três EAA diferentes ao mesmo tempo, relataram um consumo moderado de bebida alcoólica e nenhum tinha o hábito de fumar. Dos participantes da pesquisa, 3 atletas relataram o uso de suplementos alimentares e de outras substâncias relacionadas ao esporte.

Após a avaliação dos resultados obtidos nas análises e da comparação posterior com os questionários de cada atleta, observou-se que houve alto grau de correlação entre os resultados e a declaração do uso das substâncias pelos participantes.

ABSTRACT

Positiveness criteria for analysis of anabolic steroids by GC/MS in the urine of athletes

The use of anabolic androgenic steroids (AAS) in sports is in a constant increase among professionals athletes and amateurs. These substances were banned by the International Olympic Committee and the doping control of this steroids are to be performed analysing biological samples taken from this athletes using gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC/MS). This paper evaluates 15 AAS by means of liquid extraction and subsequent GC/MS identification. Three of these AAS were also quantified. Correlation criteria among the AAS most characteristic ions were established for the evidence of positive samples: when comparing these ions to those in the reference spectrum, the ion with the highest

abundance is set as 100%. The relative intensity, compared to the same ion in the reference spectrum, higher than 20%, can alter up to 30%; between 10 e 20%, can alter up to 50% and lower than 10% can alter up to 90%. By using these criteria, it was possible to confirm the presence of AAE in eight urine samples taken from athletes who claimed the use of these compounds. It was also evident the importance of applying positiveness criteria when analysing the presence of these substances in biological samples.

UNITERMS: *Anabolic steroids. Doping. GC/MS. Urine.*

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BENZI, G. Doping: a pharmacological problem. *Pharmacol. Res. Commun.*, New York, v.20, n.3, p.169-182, 1988.
- DAWSON, R.T. Hormones and sport – Drugs in sport - the role of the physician. *J. Endocrinol.*, London, v. 170, p. 55-61, 2001.
- DELBEKE, F.T.; DESMET, N.; DEBACKERE, M. The abuse of doping agents in competing body builders in Flanders (1988-1993). *Int. J. Sports Med.*, Stuttgart, v.16, p.66-70, 1995.
- DE RUIJG, W.G. Quality criteria for the detection of nalytes in test samples with special reference to anabolic agents and related compounds. *Biom. Appl.*, Amsterdam, v.489, p. 89-93, 1989.
- FRENL, R.; JÁKÓ, P. The medical aspects of doping. *Ther. Hung.*, Budapest, v.39, n.1, p.3-10, 1991.
- International Olympic Commitee. Medical Commission. Prohibited classes of substances and prohibited methods. Disponível em: http://www.olympic.org/ioc/e/org/medcom/pdf/AprilList2000_e_.PDF Acesso em: 20 jul. 2001.
- RIVIER, L. Is there a place for hair analysis in doping controls? *Forensic Sci. Int.*, Shannon, v.107, p.309-323, 2000.
- SAUGY, M.; CARDIS, C.; ROBINSON, N.; SCHWEIZER, C. Test methods: anabolics. *Baillière's Clin. Endocrinol. Metabol.*, Lausanne, v.14, n.1, p.111-133, 2000.
- SCHÄNZER, W.; DONIKE, M. Metabolism of anabolic steroids in man: synthesis and use of reference substances for identification of anabolic steroid metabolites. *Anal. Chim. Acta*, Amsterdam, v.275, p.23-48, 1993.
- YESALIS, C.E., ed. *Anabolic steroids in sport and exercise*. Champaign: Human Kinetics, 1993. 325p.

Recebido para publicação em 24 de setembro de 2001.