

**Universidade Federal de Minas Gerais**  
**Instituto de Ciências Exatas**  
**Departamento de Química**

**Diego Gomes Rocha**

**Determinação de Resíduos de Anabolizantes em Músculo, Pelo e Soro  
Bovino por LC-MS/MS: Desenvolvimento Analítico e Estudos *In Vivo***

**Belo Horizonte**  
**2020**

**UFMG/ICEX/DQ.1396  
T.634**

**Diego Gomes Rocha**

**Determinação de Resíduos de Anabolizantes em Músculo, Pelo e Soro Bovino por LC-MS/MS: Desenvolvimento Analítico e Estudos *In Vivo***

**Tese apresentada ao Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências – Química**

**Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Adriana Ferreira Faria  
Coorientador: Prof. Dr. Rodinei Augusti**

**Belo Horizonte  
2020**

Ficha Catalográfica

R672d Rocha, Diego Gomes  
2020 Determinação de resíduos de anabolizantes em  
T músculo, pelo e soro bovino por LC-MS/MS [manuscrito]  
: desenvolvimento analítico e estudos in vivo / Diego  
Gomes Rocha. 2020.  
[xv], 149 f. : il.

Orientadora: Adriana Ferreira Faria.  
Coorientador: Rodinei Augusti.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Minas  
Gerais - Departamento de Química.  
Inclui bibliografia.

1. Química analítica - Teses. 2. Esteroides  
anabólicos - Teses. 3. Resíduos de drogas em veterinária  
- Teses. 4. Carne bovina - Teses. 5. Cromatografia  
líquida - Teses. 6. Espectrometria de massa - Teses. 7.  
Bovino de corte - Teses. I. Faria, Adriana Ferreira,  
Orientadora. II. Augusti, Rodinei, Coorientador. III.  
Título.

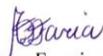
CDU 043

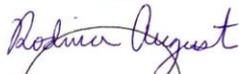


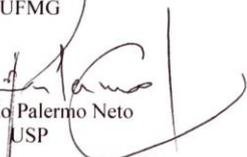
**"Determinação de Resíduos de Anabolizantes em Músculo, Pelo e Soro Bovino  
por LC-MS/MS: Desenvolvimento Analítico e Estudos In Vivo"**

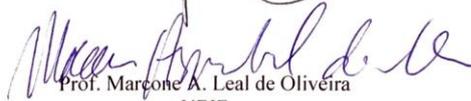
**Diego Gomes Rocha**

Tese aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:

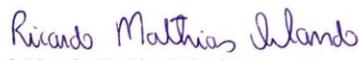
  
Prof. Adriana Ferreira Faria - Orientadora  
UFMG

  
Prof. Rodinei Augusti - Coorientador  
UFMG

  
Prof. João Palermo Neto  
USP

  
Prof. Marcone A. Leal de Oliveira  
UFJF

  
Prof. Clésia Cristina Nascentes  
UFMG

  
Prof. Ricardo Mathias Orlando  
UFMG

Belo Horizonte, 28 de fevereiro de 2020.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, que me deu a vida e tudo o que tenho;

À minha família, que eu tanto amo, e que nunca mediu esforços para que eu alcançasse meus objetivos, muito obrigado à minha esposa Natália, minha mãe Geralda, meu pai Willians, minha irmã Meline, meu sobrinho Nikolas, meu irmão Devans, e meus cunhados Enock e Géssica;

À minha orientadora Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Adriana Ferreira Faria, pela parceria desde o mestrado, além de todo empenho, companheirismo e dedicação durante todas as etapas deste trabalho;

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Rodinei Augusti, pelo suporte neste trabalho;

À Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Débora Cristina Sampaio de Assis da Escola de Veterinária da UFMG, por toda a ajuda neste trabalho, principalmente durante as etapas de experimentação animal juntamente com seus alunos Bárbara, Geovani, Marianna, Paulo, Rommel e Viviane. Agradeço também a Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Silvana de Vasconcelos Cançado da Escola de Veterinária da UFMG, pelo suporte neste trabalho;

Aos colegas do LFDA/MG, Alexandre, Alisson, Ana Cláudia, Andrea, Christiane Romanelli, Cristiana Paiva, Cristiane Glaucia, Felipe, Flávio, Gabriel, Josefa, Leila, Leonardo, Maria Helena, Mariana, Mary Ane, Nilson, Olívia, Otília, Rogério Pinheiro, Rose, Sérgio, Thiago e Wagner Luis; pela, colaboração, companheirismo e exemplo;

À Coordenação, à secretaria e aos professores da pós-graduação;

À Universidade Federal de Minas Gerais e ao Departamento de Química;

Ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento;

## RESUMO

Este trabalho envolveu a otimização e validação de três métodos multirresíduos para análise de substâncias de ação anabolizante em músculo, pelo e soro bovino por LC-MS/MS. As duas últimas matrizes também foram avaliadas por meio de um procedimento de experimentação animal envolvendo a administração de formulações comerciais de anabolizantes em animais bovinos. O desenvolvimento do método para músculo bovino contemplou um total de 39 analitos, pertencentes às classes dos esteroides, estilbenos e laconas do ácido resorcílico. O método foi aplicado neste trabalho para a análise exploratória de 80 amostras de músculo bovino provenientes do Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes Animal do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento do Brasil e de programas específicos de importação de carnes, em que foram reportadas as faixas de concentrações obtidas para os anabolizantes detectados. Um total de 25 esteroides e ésteres de esteroides foi validado para a matriz pelo bovino e 30 para soro bovino. Oito animais foram submetidos a tratamento com injeções intramusculares de formulações comerciais contendo propionato de testosterona e undecilenato de boldenona. Amostras de pelo, soro e urina foram coletadas desses animais, sendo que outros quatro foram mantidos sem tratamento hormonal durante a execução do experimento. A urina, matriz tradicionalmente empregada nos programas de monitoramento de anabolizantes, foi comparada com as demais. Detectaram-se os analitos administrados apenas em amostras de pelo coletadas próximo ao local de aplicação das injeções. Na matriz soro, as formas parentais esterificadas foram detectadas por um período de até 11 dias após o início do tratamento. Os metabólitos desses compostos foram detectados em soro e urina, sendo que os derivados da boldenona apresentaram maiores janelas de detecção em soro, que provou ser uma matriz adequada para inclusão no monitoramento de anabolizantes.

Palavras Chave: resíduos de anabolizantes; animais bovinos; músculo; pelo; soro; LC-MS/MS; fiscalização agropecuária.

## ABSTRACT

This work involved the optimization and validation of three multi-residue methods for the analysis of anabolic substances in muscle, hair and bovine serum by LC-MS/MS. The last two matrices were also evaluated by an animal experimentation procedure involving the administration of commercial anabolic formulations in bovine animals. The development of the bovine muscle method comprised a total of 39 analytes belonging to the resorcylic acid lactone, steroid and stilbene classes. The method was applied in this work in the exploratory analysis of 80 bovine muscle samples from the National Plan of Residues and Contaminants Control of Ministry of Agriculture, Livestock and Supply of Brazil and specific meat import programs, where the concentration ranges obtained for the detected anabolic steroids were reported. A total of 25 steroids and steroid esters were validated for bovine hair and 30 for bovine serum. Eight animals underwent treatment with intramuscular injections of commercial formulations containing testosterone propionate and boldenone undecylenate. Hair, serum and urine samples were collected from these animals, and four others were kept without hormonal treatment during the experiment. This latter matrix, traditionally used in anabolic monitoring programs, was compared with the others. The detection of the studied analytes in hair was observed only in hair samples collected near the injection site. The serum matrix was able to detect esterified parental forms for up to 11 days after initiation of treatment. The metabolites of these compounds were detected in serum and urine, where boldenone metabolites presented larger detection windows in serum, which proved to be a matrix suitable for implementation in monitoring programs regarding to anabolic substances.

Keywords: residues of anabolic substances; bovine animals; muscle; hair; serum; LC-MS/MS; agricultural inspection.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1: Cromatograma de íons extraídos referente ao gradiente otimizado para o extrato de músculo bovino fortificado no LMDR de cada analito e analisado por LC-MS/MS no modo ESI <sup>+</sup> .....	32
Figura 2.2: Cromatograma de íons extraídos referente ao gradiente otimizado para o extrato de músculo bovino fortificada no LMDR de cada analito e analisado por LC-MS/MS no modo ESI <sup>-</sup> .....	33
Figura 2.3: Gráficos de Pareto dos efeitos padronizados resultantes do planejamento fatorial 2 <sup>3</sup> para avaliação da hidrólise enzimática para STL3OHG, STL3OH, PRG e βTE .....	36
Figura 2.4: Fluxograma representativo do procedimento de extração para a matriz músculo bovino empregado durante a validação.....	37
Figura 3.1: Representação da coleta de pelo por tricotomia na região pescoço dos animais.....	68
Figura 3.2: Cromatograma de íons extraídos referente a uma amostra branca de pelo bovino fortificada no LMDR de cada analito e extraída pelo procedimento desenvolvido .....	71
Figura 3.3: Fluxograma representativo do procedimento de extração para pelo bovino empregado durante a validação .....	76
Figura 4.1: Cromatograma de íons extraídos referente ao gradiente otimizado para o extrato de soro bovino fortificado no LMDR de cada analito e analisado por LC-MS/MS no modo ESI <sup>+</sup> .....	101
Figura 4.2: Fluxograma representativo do procedimento de extração para soro bovino empregado durante a validação .....	105
Figura 5.1: Representação gráfica da variação das concentrações de UNB e PPT nos grupos B e T em soro bovino após o tratamento com Equi-Boost e Androgenol. ....	127
Figura 5.2: Cromatogramas de íons extraídos relativos a: a) ausência de detecção dos sinais de βBO, PPT e UNB no animal B1 em D0; b) última detecção de βBO para B1	

em D92; c) última detecção de UNB para B1 em D11; d) última detecção de PPT para T1 em D9.....	129
Figura 5.3: Representação gráfica da variação das concentrações de $\beta$ BO e $\beta$ TE nos grupos B e T em soro bovino após o tratamento com Equi-Boost e Androgenol .....	130
Figura 5.4: Cromatogramas de íons extraídos para $\beta$ TE e $\alpha$ TE obtidos de soro bovino relativos ao animal T1 no intervalo de tempo de D0 a D17 .....	132
Figura 5.5: Valores de razões $\beta$ TE/ $\alpha$ TE calculados para 72 amostras de soro dos grupos B e C .....	133
Figura 5.6: Razões $\beta$ TE/ $\alpha$ TE calculadas para o grupo T de D-5 a D42 .....	134
Figura 5.7: Razões $\beta$ TE/ $\alpha$ TE calculadas para os grupos B e C não submetidos a tratamento com Androgenol .....	135
Figura 5.8: Representação gráfica das concentrações calculadas para $\beta$ TE e razões $\beta$ TE/ $\alpha$ TE para o grupo T em urina bovina .....	138
Figura 5.9: Cromatogramas de íons extraídos obtidos de urina bovina relativos ao animal T1 no intervalo de tempo de D0 a D17 .....	139
Figura 5.10: Representação gráfica das concentrações calculadas em urina bovina para os metabólitos $\alpha$ BO e $\beta$ BO no grupo B .....	142
Figura 5.11: Cromatogramas de íons extraídos obtidos de urina bovina relativos ao grupo B evidenciando o último dia de detecção de $\alpha$ BO para os quatro animais monitorados .....	142

## LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1: Instrumentos e materiais empregados durante as otimizações e validações.	20
Tabela 2.2: Fatores e variações testadas para avaliação da robustez do método de extração de anabolizantes em músculo bovino.....	29
Tabela 2.3: Combinações ensaiadas na avaliação de robustez para análise de anabolizantes em músculo bovino .....	30
Tabela 2.4: Principais condições de operação do espectrômetro de massas API5000 para análise de anabolizantes em músculo bovino .....	31
Tabela 2.5: Condições cromatográficas otimizadas para determinação de anabolizantes em músculo bovino no sistema Agilent 1200SL.....	32
Tabela 2.6: Áreas calculadas para os picos cromatográficos obtidos a partir de planejamento fatorial $2^3$ empregado para avaliação da hidrólise enzimática.....	35
Tabela 2.7: Avaliação da linearidade dos anabolizantes pesquisados nas matrizes músculo bovino .....	38
Tabela 2.8: Avaliação de recuperação e precisão para os analitos estudados na matriz músculo bovino .....	42
Tabela 2.9. Valores calculados de $CC\alpha$ , $CC\beta$ , U; recuperação e CVs nos respectivos LQs para músculo bovino .....	45
Tabela 2.10: Avaliação da seletividade para a matriz músculo bovino.....	51
Tabela 2.11: Resultados de concentrações obtidas acima do $CC\alpha$ para os anabolizantes pesquisados após a análise de 80 amostras de músculo bovino .....	54
Tabela 3.1: Áreas detectadas para amostras contendo naturalmente BET e FPN submetidas a diferentes pré-tratamentos .....	72
Tabela 3.2: Soma ponderada das áreas medidas para avaliação de diferentes estratégias de purificação da matriz pelo bovino .....	74
Tabela 3.3: Avaliação da linearidade da matriz pelo bovino relacionada aos procedimentos de derivatização realizada em bloco de aquecimento e forno de micro-ondas .....	79
Tabela 3.4: Avaliação da recuperação e precisão para os esteroides e ésteres de esteroides estudados na matriz pelo bovino .....	82
Tabela 3.5: Valores estimados de incerteza expandida, $CC\alpha$ e $CC\beta$ para os esteroides e ésteres de esteroides estudados .....	84

Tabela 3.6: Avaliação da seletividade e robustez do método desenvolvido para determinação de esteroides e ésteres de esteroides em pelo bovino .....	87
Tabela 4.1: Comparação da soma ponderada das áreas dos picos cromatográficos obtidas a partir de diferentes abordagens de extração de esteroides em soro bovino fortificado no LMDR de cada analito .....	102
Tabela 4.2: Avaliação de linearidade para os esteroides e ésteres de esteroides estudados em soro bovino .....	106
Tabela 4.3: Avaliação das figuras de mérito estudadas para validação do método de determinação de esteroides em soro bovino .....	108
Tabela 5.1: Informações relativas à idade e peso dos animais utilizados na experimentação animal de anabolizantes em bovinos .....	119
Tabela 5.2: Identificação das datas de coleta de sangue, urina e pelo dos animais bovinos submetidos ao tratamento com injeção intramuscular de anabolizantes .....	121
Tabela 5.3: Concentrações estimadas de UNB e PPT relacionadas com os dias de coleta das amostras de pelo bovino coletadas do pescoço dos animais .....	123
Tabela 5.4: Concentrações calculadas dos esteroides esterificados, PPT e UNB, administrados nos grupos B e T .....	126
Tabela 5.5: Concentrações calculadas dos esteroides não esterificados $\beta$ BO e $\beta$ TE nos grupos B e T em soro bovino .....	130
Tabela 5.6: Concentrações calculadas para $\beta$ TE e razões $\beta$ TE/ $\alpha$ TE para o grupo T em urina bovina .....	138
Tabela 5.7: Concentrações calculadas em urina bovina para os metabólitos $\alpha$ BO e $\beta$ BO no grupo B .....	140

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

a - Intercepto

ACN - Acetonitrila

ACT - Acetona

b - Inclinação da curva de calibração

C18 - Octadecil-sílica

CAS - *Chemical Abstracts Service*

CC $\alpha$  - Limite de decisão

CC $\beta$  - Capacidade de detecção

CE - Comunidade Europeia

CLF - Clorofórmio

Cov - Covariância

CV - Coeficiente de Variação

DLLME - Microextração Líquido-Líquido Dispersiva (*Dispersive Liquid-Liquid Microextraction*)

EC - Energia de Colisão

ESI – Modo de ionização *Electrospray*

EtOAc – Acetato de etila

EUA - Estados Unidos da América

FAO - Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (*Food and Agriculture Organization of the United Nations*)

FDA - *Food and Drug Administration*

GC-C-IRMS - Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas de Razão Isotópica (*Gas chromatography-Combustion Isotope Ratio Mass Spectrometry*)

GC-MS - Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas (*Gas Chromatography-Mass Spectrometry*)

HEX - n-hexano

JECFA - Grupo FAO/WHO de Especialistas Sobre Aditivos e Contaminantes (*The Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives*)

LC-MS - Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massas (*Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*)

LC-MS/MS - Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massas Sequencial (*Liquid Chromatography Coupled to Sequential Mass Spectrometry*)

LD - Limite de Detecção

LFDA – Laboratório Federal de Defesa Agropecuária

LLE – Extração Líquido-Líquido (*Liquid-Liquid Extraction*)

LMDR - Limite Mínimo de Desempenho Requerido

LMR - Limite Máximo de Resíduo

LQ - Limite de Quantificação

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MERCOSUL - Mercado Comum do Sul

MMQO - Método dos Mínimos Quadrados Ordinários

MMQP - Método dos Mínimos Quadrados Ponderados

MOX – Hidrocloro de metoxiamina

MTBE - Éter metil terc-butílico

NaOAc – Acetato de sódio

NH<sub>2</sub> - aminopropil

PCBs - Dioxinas e bifenilas policloradas

PD - Potencial de Declusterização

PNCRC - Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes Animal

PSC - Potenciais de Saída da Célula de Colisão

r - Coeficiente de correlação

R - Recuperação

R<sup>2</sup> - Coeficiente de determinação.

RNA<sub>m</sub> - RNA mensageiro

s - Desvio padrão

s<sup>2</sup> - Variância

$S_a$  - Desvio padrão do intercepto

$SD_i$  - Desvio padrão das diferenças

S.I.F - Sistema de Inspeção Federal

SRM - Monitoramento de Reações Seleccionadas (*Selected Reaction Monitoring*)

$S_{p.interm}$  - Desvio padrão da precisão intermediária

*SPE* - Extração em Fase Sólida (*Solid Phase Extraction*)

TCEP - Cloridrato de tris(2-carboxietil) fosfina (*tris(2-carboxyethyl)phosphine*)

TRIS - tris-hidroximetil aminometano

TLC - cromatografia em Camada Delgada (*Thin Layer Chromatography*)

$t_r$  - t de Student para correlação linear

U - incerteza expandida

$u_{calibração}$  - incerteza relativa às curvas de calibração

$u_{p.interm.}$  - incerteza relativa à precisão intermediária

WHO - Organização Mundial da Saúde (*World Health Organization*)

$\mu_{c0}$  - incerteza no nível de concentração zero

## SUMÁRIO

### **CAPÍTULO 1 - MONITORAMENTO DE RESÍDUOS DE MEDICAMENTOS VETERINÁRIOS**

1.1 Introdução .....	1
1.1.1 Resíduos de Medicamentos Veterinários .....	1
1.1.2 Substâncias de Ação Anabolizante.....	1
1.1.2.1 Estrógenos e Progestágenos .....	3
1.1.2.2 Andrógenos.....	4
1.1.2.3 Origem Endógena x Exógena .....	5
1.1.3 Formulações de Substâncias de Ação Anabolizante e seus Resíduos em Animais Tratados .....	6
1.1.4 Monitoramento de Resíduos de Medicamentos Veterinários .....	8
1.1.4.1 O Uso da Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massas na Análises de Resíduos .....	10
1.1.4.2 Estratégias para Diferenciação da Origem Endógena/Exógena de Substâncias de Ação Anabolizante .....	11
1.2 Proposição .....	12
1.3 Referências Bibliográficas .....	13

### **CAPÍTULO 2 DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE UM MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE 39 ANABOLIZANTES EM MÚSCULO BOVINO**

2.1 Introdução .....	17
2.2 Experimental .....	20
2.2.1 Padrões Analíticos .....	20
2.2.2 Materiais, Reagentes e Insumos .....	20
2.2.3 Preparo das Soluções Padrão .....	21
2.2.4 Estudo das Condições Espectrométricas .....	22
2.2.5 Estudo das Condições Cromatográficas .....	22
2.2.6 Estudo do Preparo de Amostra .....	23
2.2.7 Validação do Método .....	24
2.2.7.1 Faixa de Trabalho e Linearidade .....	25

2.2.7.2	Recuperação e Precisão .....	26
2.2.7.3	Incerteza de Medição .....	26
2.2.7.4	Limite de Decisão e Capacidade de Detecção .....	27
2.2.7.5	Limite de Detecção e Limite de Quantificação .....	28
2.2.7.6	Seletividade .....	28
2.2.7.7	Robustez .....	29
2.2.8	Aplicação do Método em Amostras Reais .....	30
2.3.	Resultados e Discussão .....	31
2.3.1	Estudo das Condições Espectrométricas .....	31
2.3.2	Estudo das Condições Cromatográficas .....	31
2.3.3	Estudo do Preparo de Amostra .....	33
2.3.4	Validação do Método .....	38
2.3.4.1	Linearidade .....	38
2.3.4.2	Recuperação e Precisão .....	40
2.3.4.3	Incerteza de Medição .....	45
2.3.4.4	Limite de Decisão e Capacidade de Detecção .....	49
2.3.4.5	Limite de Detecção e Limite de Quantificação .....	50
2.3.4.6	Seletividade .....	51
2.3.4.7	Robustez .....	53
2.3.5	Aplicação do Método em Amostras Reais .....	53
2.4	Conclusões .....	54
2.5	Referências Bibliográficas .....	55

**CAPÍTULO 3 - DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE UM MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE 25 ESTEROIDES E ÉSTERES DE ESTEROIDES EM PELO BOVINO**

3.1	Introdução .....	60
3.2	Experimental .....	62
3.2.1	Padrões e Soluções Padrão .....	62
3.2.2	Reagentes e Soluções .....	63
3.2.3	Instrumentação e Materiais .....	63
3.2.4	Condições Espectrométricas .....	64

3.2.5 Preparo de Amostra .....	64
3.2.6 Estudos de Extração .....	65
3.2.7 Purificação dos Extratos - <i>Clean-up</i> .....	66
3.2.8 Validação .....	67
3.2.8.1 Linearidade .....	68
3.2.8.2 Recuperação e Precisão .....	68
3.2.8.3 Limite de Decisão, Capacidade de Detecção e Incerteza de Medição .....	69
3.2.8.4 Robustez e Seletividade .....	69
3.3 Resultados e Discussão .....	70
3.3.1 Condições Espectrométricas e Cromatográficas .....	70
3.3.2 Preparo de Amostra .....	71
3.3.3 Estudos de Extração .....	71
3.3.4 Purificação dos Extratos - <i>Clean-up</i> .....	73
3.3.5 Validação .....	77
3.3.5.1 Linearidade e Derivatização .....	77
3.3.5.2 Recuperação e Precisão .....	81
3.3.5.3 Limite de Decisão e Capacidade de Detecção.....	81
3.3.5.4 Incerteza de Medição .....	86
3.3.5.5 Seletividade e Robustez .....	86
3.4 Conclusões .....	88
3.5 Referências Bibliográficas .....	88

## **CAPÍTULO 4 - DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE UM MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE 30 ESTEROIDES E ÉSTERES DE ESTEROIDES EM SORO BOVINO**

4.1 Introdução .....	93
4.2 Experimental .....	96
4.2.1 Padrões Analíticos e Soluções Padrão .....	96
4.2.2 Materiais, Reagentes e Insumos .....	96
4.2.3 Estudo das Condições Espectrométricas e Cromatográficas .....	97

4.2.4 Preparo de Amostra e Extração .....	97
4.2.4.1 Estudos de Extração .....	98
4.2.5 Validação .....	99
4.2.5.1 Faixa de Trabalho e Linearidade .....	99
4.2.5.2 Recuperação e Precisão .....	99
4.2.5.3 Limite de Decisão, Capacidade de Detecção e Incerteza de medição .....	100
4.3 Resultados e Discussão .....	100
4.3.1 Estudo das Condições Espectrométricas e Cromatográficas .....	100
4.3.2 Estudos de Extração .....	101
4.3.3 Validação .....	105
4.3.3.1 Linearidade .....	105
4.3.3.2 Recuperação e Precisão .....	107
4.3.3.3 Limite de Decisão, Capacidade de detecção e Incerteza de Medição .....	110
4.4 Conclusões .....	111
4.5 Referências Bibliográficas .....	111

## **CAPÍTULO 5 - AVALIAÇÃO DA APLICABILIDADE DAS MATRIZES PELO, SORO E URINA POR ESTUDOS IN VIVO ENVOLVENDO A APLICAÇÃO DOS MEDICAMENTOS ANDROGENOL E EQUI-BOOST EM BOVINOS**

5.1 Introdução .....	114
5.1.1 Monitoramento de Resíduos de Boldenona .....	114
5.1.2 Monitoramento de Resíduos de Testosterona .....	116
5.1.3 Experimentação Animal .....	117
5.2 Experimental .....	118
5.2.1 Administração de Formulações Contendo PPT e UNB <i>In Vivo</i> .....	118
5.2.2 Coleta Amostral .....	120
5.2.3 Monitoramento de Resíduos de PPT e UNB em Urina .....	121
5.3 Resultados .....	122
5.3.1 Monitoramento de Resíduos de PPT e UNB na Matriz Pelo .....	122

5.3.2 Monitoramento de Resíduos de PPT e UNB na Matriz Soro .....	126
5.3.2.1 Monitoramento das Concentrações dos Esteroides Administrados .....	126
5.3.2.2 Avaliação da Razão $\beta$ TE/ $\alpha$ TE .....	132
5.3.2.3 Liberação de Resultados Analíticos para Amostras de Soro .....	136
5.3.3 Monitoramento de Resíduos de PPT e UNB na Matriz Urina .....	137
5.4 Conclusões .....	143
5.5 Referências Bibliográficas .....	145

## **CAPÍTULO 6 - CONSIDERAÇÕES FINAIS**

6.1 Considerações Finais .....	148
--------------------------------	-----

## **ANEXOS E APÊNDICES**

ANEXO I Principais formulações comerciais disponíveis para tratamento animal com substâncias de ação anabolizante .....	150
ANEXO II Resumo das metodologias mais relevantes descritas na literatura para análise de substâncias dos grupos A1, A3 e A4 em músculo .....	152
ANEXO III Valores dos limites máximos estabelecidos oficialmente por organismos internacionais na matriz músculo .....	155
APÊNDICE I Descrição dos padrões analíticos utilizados, contendo abreviatura, número CAS, fórmulas molecular e estrutural, massa molar e marca .....	157
APÊNDICE II Transições monitoradas e condições do espectrômetro de massas API5000 para análise de anabolizantes em músculo bovino .....	180
APÊNDICE III Transições monitoradas e condições do espectrômetro de massas API5000 para análise de anabolizantes em pelo bovino .....	185
APÊNDICE IV Transições monitoradas e condições do espectrômetro de massas API5000 para análise de anabolizantes em soro bovino .....	187

## **Capítulo 1**

# **Monitoramento de Resíduos de Medicamentos Veterinários**

## **1.1 INTRODUÇÃO**

### **1.1.1 Resíduos de Medicamentos Veterinários**

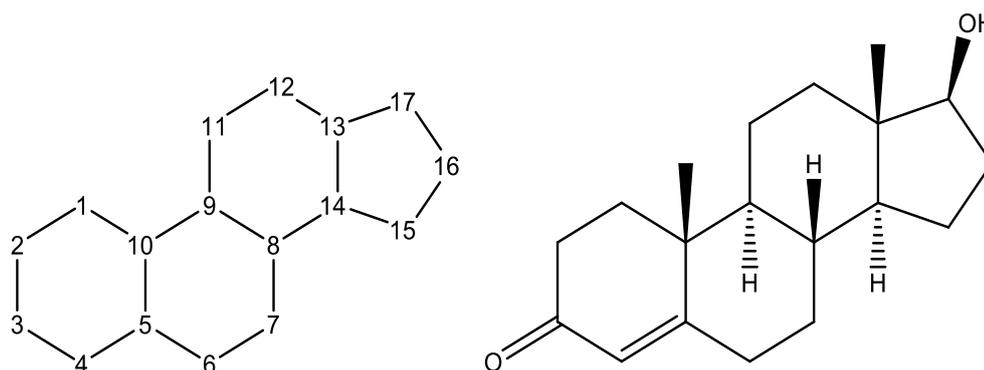
A constante intensificação dos processos de globalização do comércio agropecuário tem levado ao aumento da criação de animais destinados à produção de alimentos, juntamente com o objetivo de se maximizar o rendimento com menores custos. Para essa finalidade, destacam-se práticas como a seleção genética de determinadas linhagens de animais, a seleção das dietas alimentares dos mesmos e das pastagens, o uso de aditivos à ração animal, tais como vitaminas e oligoelementos, e o uso de medicamentos veterinários (KOOLE, 1998, RONQUILLO, 2017). Além disso, os animais também podem ser expostos a outras classes de substâncias, tais como pesticidas e contaminantes ambientais, como os compostos organohalogenados, micotoxinas, dioxinas e bifenilas policloradas (PCBs), que podem ter sua origem no ar, no solo, na água ou na alimentação (IRELAND, 2015).

No caso específico dos medicamentos veterinários, o uso dos mesmos está relacionado a três finalidades principais: terapia, prevenção de doenças e promoção de crescimento. Entretanto, os consumidores podem ser potencialmente expostos aos resíduos dessas substâncias através do consumo de alimentos derivados de animais tratados. Isto inclui carne e produtos à base de carne das principais espécies alimentares (bovinos, ovinos, caprinos, suínos, peixes e aves), bem como leite, ovos e mel. No caso dos medicamentos veterinários licenciados, as condições de dose, período de tratamento e de retenção especificados antes do abate, devem ser respeitadas, de acordo com as recomendações de uso aprovadas, para que os seus resíduos estejam presentes nos alimentos em níveis seguros aos consumidores (IRELAND, 2015).

### **1.1.2 Substâncias de Ação Anabolizante**

As substâncias de ação anabolizante são aquelas que aumentam a retenção de nitrogênio proteico e não proteico (ureia) presentes nos alimentos, diminuindo a fração desses compostos eliminados nas fezes e urina. Dessa forma, o processo de síntese proteica nos músculos esqueléticos é aprimorado, com consequente ganho de massa muscular e peso (HAF, 2006).

Os esteroides são compostos que apresentam como estrutura fundamental o núcleo ciclopentanofenantreno, sendo derivados da  $17\beta$ -testosterona ( $\beta$ TE) (Figura 1.1), que por sua vez é sintetizada naturalmente a partir do colesterol. Esse grupo pode ainda ser subdividido em esteroides naturais, como andrógenos, estrógenos, progestágenos e corticoesteroides, e esteroides sintéticos ou xenobióticos, como etinilestradiol (ETE), trembolona, metiltestosterona (MTT), metenolona (MTN), dentre outros (HAF, 2006, GONZALEZ, 2017).



**Figura 1.1:** Estruturas do anel ciclopentanofenantreno e da  $17\beta$ -testosterona.

De forma geral, o mecanismo de ação de todos os hormônios ocorre por meio da ligação específica dos mesmos a receptores presentes nas células alvo. Esses receptores são proteínas que desencadeiam reações modificadoras do metabolismo celular, por meio de mudanças conformacionais relacionadas a essa ligação. A maioria dos esteroides atravessa as membranas plasmáticas e tem seus receptores localizados no núcleo celular. O complexo ativado hormônio-receptor se une a regiões específicas do DNA para ativar ou inativar determinados genes, afetando seletivamente o processo de transcrição celular e a produção do RNAm (RNA mensageiro) respectivo, que é então traduzido nos ribossomos relacionados à síntese proteica específica da célula em questão (GONZALEZ, 2017).

O metabolismo dos esteroides envolve principalmente as reações de fase I e II. As reações de fase I geralmente convertem o esteroide em compostos mais polares, através de reações catalisadas enzimaticamente (oxidação, redução ou hidroxilação), para inativar o fármaco e facilitar a sua eliminação do corpo. A principal reação desse grupo engloba os esteroides 3-ceto-4-eno, como a testosterona, envolvendo a redução da

ligação dupla C-4,5. As enzimas que catalisam essas reações,  $5\alpha$ -redutase e  $5\beta$ -redutase, estão localizadas principalmente no fígado, sendo a  $5\alpha$ -redutase no retículo endoplasmático e a  $5\beta$ -redutase no citoplasma (KOOLE, 1998; GONZALEZ, 2017).

As reações de fase II, que também são chamadas de reações de conjugação, atuam para acoplar o esteroide ou seu metabólito com o ácido glucurônico ou com um grupo sulfato (glucuronização ou sulfatação). A conjugação ajuda a eliminar o esteroide do organismo, principalmente por via renal ou pelos ácidos biliares. Ambas as reações de conjugação são controladas enzimaticamente, a glucuronidação envolvendo o ácido UDP-glucurônico como um substrato, e a coenzima 3'-fosfoadenosina-5'-fosforosulfato (PAPS) atuando na fosfatação (GONZALEZ, 2017, SCHÄNZER, 1996).

### **1.1.2.1 Estrógenos e Progestágenos**

Os estrógenos e progestágenos regulam o ciclo menstrual em mulheres adultas, onde os primeiros são mais importantes na primeira metade do ciclo e os segundos na segunda fase, sendo responsáveis pelo desenvolvimento das características femininas (KOOLE, 1998). Os estrógenos possuem em sua estrutura um grupo fenólico, ao passo que para os progestágenos esse grupo é substituído por uma cetona. Os estrogênios naturais são  $17\alpha$ -estradiol ( $\alpha$ ES) e  $17\beta$ -estradiol ( $\beta$ ES), estrona, estriol e equilin. A forma do estradiol predominante no organismo humano é a  $\beta$ , sendo cerca de 40 vezes mais ativa que a  $\alpha$  (KOOLE, 1998). Devido ao fato de fazerem parte do processo reprodutivo em animais e seres humanos, os estrogênios são amplamente empregados como contraceptivos (inibidores do processo de ovulação) em terapias de reposição hormonal, tratamentos de cânceres de próstata e de mama, e em tratamentos para calvície masculina (NETO, 1998).

O mecanismo de ação anabolizante dos estrógenos naturais como o  $\beta$ ES, e dos semissintéticos como o dietilestilbestrol (DES) e zeranol (ZER), envolve processos múltiplos ainda não totalmente esclarecidos, como o aumento de proteínas plasmáticas, aumento da secreção do hormônio do crescimento e da insulina, redução na síntese de corticosteroides, estimulação da glândula pituitária para produção de somatotropina (hormônio do crescimento), além da ligação específica a receptores estrógenos nas células alvo (KOOLE, 1998; NETO, 1998).

Os hormônios progestágenos são amplamente usados em programas de sincronização da ovulação em animais desde a década de 1940, quando eram aplicados na forma de injeções (SAVIO, 1998). Atualmente, esses hormônios são administrados sob as formas de implantes subcutâneos de progesterona e por meio de dispositivos liberadores de progesterona intravaginal. A partir da década de 1950, vários progestágenos, ativos por via oral foram sintetizados, como os acetatos de melengestrol (AME) e de medroxiprogesterona (MPR), o 6-metil-17-acetoxi-progesterona e o acetato de clormadinona (ACC). Outros exemplos de progestágenos empregados incluem o acetato de megestrol (MEG), norgestrel, noretisterona e fluorogesterona (MADUREIRA, 2001).

Além de atuarem nos processos reprodutivos animais, os progestágenos apresentam também um efeito anabólico, porém, normalmente bem menos pronunciado que o das outras classes de esteroides. Além de se ligarem a receptores progestágenos específicos, sabe-se que também possuem a habilidade de ligarem-se a receptores androgênicos e estrogênicos, aumentando, por exemplo, a biodisponibilidade de andrógenos e estrógenos usados em combinação com os mesmos (PETTES, 2014).

Deve-se considerar que progestágenos recentemente sintetizados, como o ACC e o MPR, possuem, além do efeito anabólico, ação antiandrogênica e antiestrogênica. Esses dois últimos mecanismos resultam do bloqueio dos receptores androgênicos e estrogênicos, e da redução da atividade da enzima  $5\alpha$ -redutase, envolvida no metabolismo dos esteroides, como, por exemplo, na conversão da  $\beta$ TE na dehidrotestosterona (DHT), um esteroide androgênico mais potente. Dessa forma, pode-se conseguir um aumento de massa muscular na criação animal, combinado a um efeito contraceptivo ou de sincronização de estro, sem os efeitos colaterais indesejáveis relacionados à masculinização animal ou à feminilização de fetos (RAUDRANT, 2003).

### **1.1.2.2 Andrógenos**

Os andrógenos, ou androgênios, exercem os seus efeitos em tecidos reprodutivos, músculos, ossos, folículos capilares, fígado, rins e nos sistemas imunitários e nervosos centrais (MOORADIAN, 1987). Os efeitos androgênicos destes hormônios podem ser considerados como aqueles associados à masculinização, e os

anabólicos como aqueles associados à síntese proteica nos músculos esqueléticos e ossos.

O andrógeno secretado em maior quantidade é a  $\beta$ TE, que no homem é produzida principalmente nas células de Leydig dos testículos. Os ovários e as glândulas suprarrenais, em ambos os sexos, produzem uma pequena quantidade de  $\beta$ TE, mas secretam andrógenos mais fracos, como a desidroepiandrosterona (DHEA) e a androstenodiona, que têm importância fisiológica nas mulheres, ao sofrerem uma conversão em andrógenos mais potentes, como a  $\beta$ TE e a  $5\alpha$ -dihidrotestosterona (DHT) (KICMAN, 2008).

Em termos de tratamento animal, e em humanos, a  $\beta$ TE é considerada um anabolizante fraco, pois quando ingerido por via oral é rapidamente degradado no fígado e nas paredes do intestino, sendo que apenas pequenas quantidades atingem a circulação sistêmica. Adicionalmente, quando a  $\beta$ TE é usada em preparações injetáveis, os níveis eficazes deste fármaco não são sustentados por um longo prazo (WILSON, 1988). A fim de maximizar a eficácia anabolizante, sobrepondo-se a atividade anabólica aos demais efeitos androgênicos, a estrutura química de base da testosterona é geralmente modificada por: 1) esterificação no grupo  $17\beta$ -hidroxila; 2) alquilação na posição  $17\alpha$  ou  $3\beta$ ; 3) modificação nos carbonos 1, 2, 9 ou 11 da estrutura em anel do esteroide (WILSON, 1988, KICMAN, 2008).

A atividade oral pode ser conferida por substituição do hidrogênio na posição  $17\alpha$  por um grupo metila ou etila, para a síntese dos esteroides anabólicos  $17\alpha$ -alquilados (ex.  $17\alpha$ -metiltestosterona (MTT) e metildrostanolona). A substituição do grupo alquila previne a desativação do esteroide pelo metabolismo de fase I, impedindo estericamente a oxidação ou redução da hidroxila na posição  $17\beta$  (KICMAN, 2008).

### **1.1.2.3 Origem Endógena x Exógena**

Com relação à origem endógena ou exógena de esteroides, deve-se notar que os anabolizantes  $17\beta$ -boldenona ( $\beta$ BO),  $17\beta$ -nandrolona ( $\beta$ NAN) e ZER (incluindo seu isômero taleranol -TAL), antes tidos como esteroides exógenos, também podem ser encontrados em animais não tratados com os respectivos medicamentos veterinários. O principal metabólito da  $\beta$ NAN,  $17\alpha$ -nortestosterona ( $\alpha$ NAN), foi detectado na maioria

das amostras de urina tomadas durante a última metade da gravidez em vacas, e em novilhos recém nascidos em um trabalho publicado por DE BRABANDER e colaboradores (1994). Além disso, ambos os isômeros também foram identificados em amostras de bovinos machos e fêmeas não prenhas, além de equinos (KENNEDY, 2009 e HOUGHTON, 2007). No caso de porcos, apenas o isômero  $\beta$ NAN é encontrado, devido à ausência da enzima isomerase correspondente (SCARTH, 2009).

No caso do  $\beta$ BO, esteroide androgênico que difere da  $\beta$ TE apenas pela presença de uma ligação dupla na posição 1, tanto as formas  $\alpha$  quanto  $\beta$  já foram detectadas em diversas espécies de animais controle não tratados, incluindo bovinos e suínos, sendo que no caso destes apenas a forma  $\beta$  é encontrada devido à ausência da enzima isomerase em suínos (DE BRABANDER, 2004). Destaca-se que essa detecção de ambos isômeros da boldenona em urina de bovinos já foi relacionada a uma possível contaminação fecal resultante do processo de coleta amostral, por um processo de conversão de outros esteroides endógenos nesse composto pela microbiota presente no meio. Além desse mecanismo, processos de biotransformação resultantes da ingestão de fitoesteroides presentes em gorduras vegetais já foram relacionados à presença de alguns esteroides em animais não tratados (AFSCA, 2013; VILJANTO, 2019).

Outro caso é o apresentado pelo ZER e seu metabólito TAL, que são compostos a princípio sintéticos, mas que também fazem parte de uma rota metabólica envolvendo a micotoxina zearalenona (ZEA) e seus metabólitos alfa-zearalenol ( $\alpha$ ZE) e beta-zearalenol ( $\beta$ ZE), produzidos, principalmente, em silagens e rações mal armazenadas. De uma forma geral, a detecção dos anabolizantes na ausência de micotoxinas é um forte indicativo da utilização dos mesmos a partir de medicamentos veterinários. Caso as micotoxinas estejam presentes em concentrações consideráveis, deve-se avaliar a conversão das mesmas em ZER/TAL (AFSCA, 2013).

### **1.1.3 Formulações de Substâncias de Ação Anabolizante e seus Resíduos em Animais Tratados**

Para atender principalmente às exigências da União Europeia, o Brasil proibiu pela primeira vez o uso de anabolizantes na pecuária em 1961. Atualmente, através da Instrução Normativa nº 55 de 01 de dezembro de 2011 do Ministério da Agricultura,

Pecuária e Abastecimento (MAPA), a importação, a produção, a comercialização e o uso de substâncias naturais ou artificiais com atividade anabolizante, ou mesmo outras substâncias dotadas dessa atividade, mas desprovidas de caráter hormonal, é proibida. Essa instrução normativa permite o uso de anabolizantes, exclusivamente, para fins terapêuticos, sincronização do estro, transferência de embriões, melhoramento genético e pesquisa experimental em medicina veterinária. No entanto, a utilização dessas substâncias como promotores de crescimento é permitida em países como Estados Unidos da América (EUA), Canadá, Argentina, Austrália, Nova Zelândia e Colômbia. Nesses países, os hormônios  $\beta$ TE,  $\beta$ ES, PRG, ATR, ZER e AME podem ser usados em preparações registradas (DE SOUZA, 2000).

A fim de se potencializar o crescimento animal, as concentrações dos compostos estrogênicos, em um período pré-abate, devem ser semelhantes às de uma fêmea jovem e, de forma correspondente, a concentração dos androgênios deve ser equivalente ao de um macho jovem. Sabe-se hoje que a suplementação androgênica, usualmente com ésteres de testosterona ou acetato de trembolona, é mais útil para fêmeas, e a suplementação de estrogênios, com ésteres de estradiol ou zeranol, para os machos. Normalmente são empregadas combinações de andrógenos com estrógenos, ou andrógenos com progestágenos (KOOLE, 1998).

As preparações comerciais dos esteroides possuem usualmente o grupo  $17\beta$ -hidroxila esterificado com uma porção ácida, para evitar a rápida absorção do veículo oleoso, no caso de soluções injetáveis, normalmente constituídas de um óleo vegetal acrescido de uma pequena quantidade de álcool benzílico. Entretanto, a forma mais comum de administração de anabolizantes em animais em larga escala são os implantes subcutâneos, normalmente aplicados com uma pistola de pressão na orelha animal. Esses implantes representam dispositivos de liberação lenta, contendo quantidades relativamente grandes de hormônios, que são liberadas ao longo de alguns meses (EFSA, 2007; KOOLE, 1998).

O Anexo I desta tese apresenta um levantamento realizado por PARIS e colaboradores (2006), contendo as principais formulações comerciais de anabolizantes para tratamento animal.

O órgão regulamentar *European Food Safety Authority* publicou em 2007 (EFSA, 2007), um documento oficial contendo uma compilação de dados de experimentação animal envolvendo os principais anabolizantes comerciais, contendo as concentrações dos resíduos desses compostos em diversos tecidos animais. Observa-se, por exemplo, um aumento na concentração média, antes e após o tratamento com implantes, de  $\beta$ ES de 0,005 para 0,025  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , e de uma concentração máxima  $\beta$ TE de 0,029 para 0,360  $\mu\text{g kg}^{-1}$  em músculo. Entretanto, esses valores são inferiores aos observados em vacas prenhas, 0,156  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , e touros 0,54  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , respectivamente. O mesmo ocorre para a PRG na comparação com vacas prenhas. Um argumento usado pelos defensores do uso de hormônios anabolizantes na produção animal é o de que até mesmo crianças secretam diariamente quantidades dessas substâncias em concentrações bem maiores do que as dos resíduos encontrados em produtos de origem animal (COMISSÃO EUROPEIA, 1999; KOOLE, 1998).

Por outro lado, o fato de as formulações comerciais serem distribuídas sem receita em países onde são autorizadas para uso em animais de corte aumenta a probabilidade de uso indevido destas, o que pode resultar em níveis de resíduos mais elevados, ou mesmo na ingestão de produtos de origem animal contendo os cortes de carne correspondentes aos sítios de implantação ou de injeção. Nesse caso, deve-se considerar que cerca de 10 a 20% da quantidade aplicada permanece no local de implantação após a remoção do implante, podendo ser encontradas até mesmo quantidades de miligramas dos medicamentos nesses locais (EFSA, 2007; KOOLE, 1998; PARIS, 2006).

#### **1.1.4 Monitoramento de Resíduos de Medicamentos Veterinários**

Tendo-se em vista os potenciais riscos à saúde dos consumidores dos produtos de origem animal, níveis de segurança têm sido estabelecidos para resíduos de medicamentos veterinários. No Brasil, o estabelecimento desses níveis é de responsabilidade do Ministério da Saúde e, no caso de não estabelecidos pelo mesmo, podem-se utilizar valores normatizados no MERCOSUL (Mercado Comum do Sul) (BRASIL, 2004), recomendados pelo Codex Alimentarius (CODEX, 2017), constantes

nas Diretivas da União Europeia (CRLs, 2007), ou os utilizados pela *Food and Drug Administration* (FDA/USA) (CFR/USFD, 2018).

O comitê científico internacional de maior destaque, envolvido nos processos de estabelecimento de limites de resíduos de medicamentos em produtos alimentares, é aquele formado por um conjunto de peritos da *Food and Agriculture Organization of the United Nations* (FAO) em conjunto com a *World Health Organization* (WHO), denominado *The Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives* (JECFA). Normalmente esse comitê se reúne bianualmente desde 1956, para avaliação da segurança dos aditivos alimentares. Os pedidos de parecer científico são canalizados através da Comissão do Codex Alimentarius (CAC), que engloba o Comitê do Codex sobre Aditivos Alimentares e Contaminantes de Alimentos, e o Comitê sobre Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos (JECFA, 2006).

O limite máximo de resíduo (LMR) é a concentração máxima (expressa em  $\text{mg kg}^{-1}$ ,  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ,  $\text{mg L}^{-1}$  ou  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) que é permitida legalmente, ou que se reconheça como admissível, em um alimento (FDA, 2006). No caso das substâncias permitidas, os LMRs são calculados aplicando-se um fator de segurança à ingestão diária aceitável (IDA), que é definida como a dose diária que, durante o todo o período de vida de um consumidor, aparenta não causar um risco apreciável à saúde do mesmo (JECFA/66/SC).

Para os analitos banidos ou proibidos, os laboratórios devem utilizar como referência o limite mínimo de desempenho requerido (LMDR), estabelecido em normativas específicas (BRASIL, 2011). A fim de se assegurar que diferentes laboratórios possam comunicar de forma uniforme a presença dessas substâncias proibidas, dos seus metabólitos ou dos seus marcadores, deve ser estabelecida uma capacidade mínima de detecção e identificação para os métodos de teste. Leva-se em conta, nesses casos, que alguns laboratórios poderão identificar uma gama mais vasta ou concentrações mais baixas de substâncias proibidas do que outros. Devem ser estabelecidos, então, LMDRs para substâncias proibidas nos quais todos os laboratórios participantes de uma determinada rede devem operar. Dessa forma, o LMDR é a concentração de uma substância proibida ou seu metabólito marcador que os laboratórios devem ser capazes de detectar e identificar rotineiramente (WADA, 2014).

O estabelecimento desses valores também leva em conta os fatores do metabolismo, toxicidade, farmacocinética e farmacodinâmica da substância proibida, por isso substâncias tidas como de risco, como agentes anabolizantes, possuem baixos valores de LMDRs, quando estabelecidos (JECFA, 2006; WADA, 2014).

#### **1.1.4.1 O Uso da Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massas na Análises de Resíduos**

As diversas técnicas que empregam a espectrometria de massas ocupam hoje uma posição de destaque como ferramenta analítica, possibilitando uma grande gama de aplicações recentes tais como a elucidação de processos bioquímicos, análises de proteoma, metaboloma, resíduos de medicamentos veterinários, pesticidas, e os diversos ramos da ciência forense (WANG, 2012).

Historicamente, no início da década de 1970, a análise de resíduos de medicamentos veterinários se baseava no monitoramento dos antibióticos sulfonamidas e tireostáticos de forma qualitativa e semi-quantitativa pela técnica de cromatografia em camada delgada (*thin layer chromatography*, TLC) (STOLKER, 2007). A implementação de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (*gas chromatography/mass spectrometry*, GC-MS), na década de 1980, ocorreu em primeiro lugar no campo da análise dos resíduos hormonais e levou a uma revolução, no que se refere à fiscalização contra o uso indevido de compostos proibidos (LE BIZEC, 2009).

Até o final da década de 1990, as tentativas de se analisarem baixos níveis de resíduos de hormônios em matrizes animais foram restritas ao uso de GC-MS. Esta técnica requer uma reação de derivatização desses compostos por meio da reação de sililação, acilação ou oxima/sililação, com o objetivo de se aumentar a estabilidade térmica e a retenção cromatográfica dos analitos. No entanto, especificidades relacionadas a essa reação, tais como a formação de múltiplos produtos derivatizados, a ocorrência de rearranjo químico e a elevação no tempo e custo de análise, estimularam fortemente o desenvolvimento de métodos baseados na cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (*liquid chromatography/mass spectrometry*, LC-MS) (EFSA, 2007). Deve-se levar em conta também a ampla variedade de fases móveis e estacionárias disponíveis para essa última técnica, o que possibilita a realização de

corridas cromatográficas mais rápidas. Além do fato de a maior parte dos resíduos de medicamentos veterinários apresentarem baixa volatilidade e polaridade moderada, o que desfavorece o desempenho da GC-MS (BRASIL, 2011).

#### **1.1.4.2 Estratégias para Diferenciação da Origem Endógena/Exógena de Substâncias de Ação Anabolizante**

A capacidade de uma estratégia analítica detectar o abuso de esteroides é influenciada por diversos fatores, a começar pela coleta amostral e pelo tipo de matriz. A coleta deve ser realizada preferencialmente pouco tempo após a administração de esteroides nos animais, antes de os mesmos serem completamente excretados, para que as concentrações destes estejam acima dos limites de sensibilidade instrumentais. As matrizes normalmente utilizadas nos programas de monitoramento são a urina e fígado. Entretanto, outras matrizes onde os analitos são menos metabolizados, como soro, plasma e pelo, podem ser utilizadas. Deve-se considerar também, se as amostras são coletadas após o abate ou de animais vivos, ou provenientes de um programa de alimentação especial. Além disso, destaca-se que, os programas de monitoramento de produtos importados requerem normalmente a análise direta dos respectivos cortes de carne ou produtos a serem comercializados (EFSA, 2007).

As sensibilidades analíticas para a detecção de esteroides aumentaram significativamente ao longo dos anos, o que resultou em um número cada vez maior de compostos suspeitos como metabólitos exógenos presentes em amostras analisadas em baixas concentrações. Sistemas de LC-MS capazes de fornecer resultados com alta exatidão de massa e resolução tornaram-se comercialmente disponíveis, e começaram a ganhar popularidade para a triagem e pesquisa de vigilância de drogas desportivas e resíduos de medicamentos. Como esses dados adquiridos são análises de varredura completa de porções não fragmentadas  $[M-H]^+$  ou  $[M-H]^-$ , um número grande de analitos pode ser monitorado simultaneamente em tempo real, ou retrospectivamente (VANHAECKE, 2011; SCARTH, 2012).

Embora ainda não haja uma única técnica que seja capaz de detectar o uso de todos os esteroides endógenos em todas as espécies de animais e matrizes, houve um progresso significativo nessa área, e já estão disponíveis algumas estratégias, a maioria

em fase exploratória. Dentre essas, destacam-se: o uso de metabólitos marcadores, de limites de corte (*threshold*), o monitoramento de ésteres de esteroides intactos em pelo ou soro animal, a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas de razão isotópica (*Gas chromatography combustion isotope ratio mass spectrometry*, GC-C-IRMS), e o desenvolvimento das estratégias ômicas de perfis de biomarcadores, como no caso da metabolômica, proteômica e transcriptômica (SCARTH, 2012).

## 1.2 PROPOSIÇÃO

Nos próximos capítulos serão apresentadas estratégias que visam a fortalecer o monitoramento de resíduos de anabolizantes no âmbito do Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes (PNCRC) Animal (BRASIL, 2019). Tendo em vista a proibição de uso desses compostos no Brasil, o monitoramento desses resíduos deve assegurar a produção e o consumo de produtos livres de anabolizantes, inibindo o uso dos mesmos para fins de promoção de crescimento de animais.

Com relação ao consumo de produtos cárneos, será apresentado um estudo e validação de um método de ensaio para a determinação de anabolizantes na matriz músculo bovino, que ainda não era monitorada por esse programa no início do desenvolvimento deste trabalho. Destaca-se que essa matriz é consumida diretamente pela população, dessa forma, uma metodologia analítica confirmatória, que contemple todas as formulações comerciais de anabolizantes, é necessária para um monitoramento eficaz dessa classe de resíduos.

Nota-se também o desafio de se detectar o uso intencional de anabolizantes endógenos na criação animal, uma vez que mesmo a quantificação de níveis elevados desses compostos em matrizes como urina, fígado ou músculo, pode ser relacionada a uma produção anormal dos mesmos pelo próprio metabolismo. Como alternativa analítica para esse problema, ésteres de esteroides foram estudados nas matrizes pelo e soro bovino, uma vez que a detecção dessas formas comprova a administração exógena. Por se tratarem de matrizes ainda pouco exploradas no monitoramento de resíduos, um procedimento de experimentação animal foi realizado, para que as mesmas sejam

comparadas com a matriz urina, tradicionalmente elencada para o monitoramento de anabolizantes pelo PNCRC.

### 1.3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AFSCA - Agence fédérale pour la sécurité de la chaîne alimentaire. **Presence of substances with an endogenous origin known or suspected to a certain level through the metabolism and/or feed in different matrices of animal species producing food, 2013.** Disponível em: “[http://www.afsca.be/comitescientifique/avis/2013/\\_documents/](http://www.afsca.be/comitescientifique/avis/2013/_documents/)

ADVIESAVIS072013\_Annex2\_substanceswithanendogenousoriginknownorsuspected.pdf”, acesso em 02/09/2019.

BRASIL, Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Manual de Garantia da Qualidade Analítica: Resíduos e Contaminantes em Alimentos.** Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Secretaria de Defesa Agropecuária, Brasília, 2011.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento - MAPA. **Relatório Técnico.** Portaria do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, N° 808, de 06 de novembro de 2003. Brasília, 05 de maio de 2004. Disponível em “[http://www.agricultura.gov.br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-pecuarios/arquivos-de-insumos-pecuarios/RelatorioTecnicoFinal05\\_05\\_04.doc](http://www.agricultura.gov.br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-pecuarios/arquivos-de-insumos-pecuarios/RelatorioTecnicoFinal05_05_04.doc)”, acesso em 01/11/2019.

CFR/USFD - Code of Federal Regulations US Food & Drug. **Tolerances for Residues of New Animal Drugs in Food.** Disponível em: “<https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?CFRPart=556>”, acesso em 01/10/2019.

CODEX, Codex Alimentarius International Food Standard. **Maximum residue limits (MRLS) and risk management recommendations (RMRS) for residues of veterinary drugs in foods.** CAC/MRL 2-2017, Roma, 2017.

COMISSÃO EUROPEIA. **Opinion of the Scientific Committee on Veterinary Measures relating to Public Health on “Assessment of potential risks to human health from hormone residues in bovine meat and meat products.** European Commission, 30 de abril de 1999. Disponível em: “[https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/safety/docs/cs\\_meat\\_hormone-out50\\_en.pdf](https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/safety/docs/cs_meat_hormone-out50_en.pdf)”, acesso em 30/10/2019.

CRLs - Community Reference Laboratories Residues. **CRLs view on state of the art analytical methods for national residue control plans, 2007.** Disponível em:

“<http://www.rivm.nl/bibliotheek/digitaaldepot/crlguidance2007.pdf>”, acesso em 01/10/2019.

DE BRABANDER, H. F., *et al.* Presence and metabolism of the anabolic steroid boldenone in various animal species: a review. **Food Addit Contam.**, Bélgica, v.21 n.6, p.515–525, 2004.

De BRABANDER, H. F., *et al.* Endogenic nortestosterone in cattle? **Analyst**, Bélgica, v.199, n.12, p. 2581 – 2585, 1994.

DE SOUZA, M. V., *et al.* **Anabolizantes: uma discussão sem preconceitos**. Editora UFLA, Lavras, 2000. Disponível em: “<http://www.editora.ufla.br/index.php/component/phocadownload/category/56-boletins-de-extensao?download=1082:boletins-extensao>”, acesso em 02/10/2019.

DIRETIVA 96/23/CE. **Relativa às medidas de controlo a aplicar a certas substâncias e aos seus resíduos nos animais vivos e respectivos produtos**. Jornal Oficial da União Europeia, nº L 125 de 23/05/1996, Luxemburgo, p. 10 – 32.

EFSA - European Food Safety Authority. Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in the Food Chain on a Request from the European Commission Related to Hormone Residues in Bovine Meat and Meat Products - Question N° EFSA-Q-2005-048. **The EFSA Journal**, Bruxelas, v. 510, p.1-62, 2007.

GONZALEZ, F. H. D., DA SILVA, S. C. **Introdução à bioquímica clínica veterinária**, 3ª edição, Editora da UFRGS, Porto Alegre 2017.

HAF, G. Anabolic Androgenic Steroids. **NSCA’s Performance Training Journal - Steroids: Special Report**. National Strength and Conditioning Association, EUA, p. 7-14, 2006.

HOUGHTON, E., TEALE, P., DUMASIA, M. C. Studies related to the origin of C18 neutral steroids isolated from extracts of urine from the male horse: the identification of urinary 19-oic acids and their decarboxylation to produce estr-4-ene-17-ol-3-one (19-nortestosterone) and ester-4-ene-3,17-dione (19-norandroste-4-ene-3,17-dione) during sample processing. **Anal. Chim. Acta**, Reino Unido, v.586, n. 1-2, p.196–207. 2007.

IRELAND, Food Safety Authority. Chemical Residues and Contaminants in Foods of Animal Origin. **Toxicology Factsheet Series**, Irlanda, n.2, 2015. Disponível em: “<https://www.fsai.ie/residuesofanimalremediesinfood.html>”, acesso em 29/10/2019.

JECFA - Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. **Fact Sheet – What is JECFA?** FAO/WHO Joint Secretariat to JECFA, 2006. Disponível em: “<http://www.fao.org/3/a-at863e.pdf>”, acesso em 26/01/2018.

JECFA/66/SC - Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. **Sixty-sixth meeting (Residues of veterinary drugs), Summary and Conclusions**, 2006b. Disponível em “[www.fao.org/3/a-at875e.pdf](http://www.fao.org/3/a-at875e.pdf)”, acesso em 26/10/2019.

KENNEDY, D. G., *et al.* Occurrence of  $\alpha$ - and  $\beta$ -nortestosterone residues in the urine of injured male cattle. **Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess.**, Reino Unido, v.26 n.5, p.683–691, 2009.

KICMAN, A. T. Pharmacology of anabolic steroids. **Br. J. Pharmacol**, Inglaterra, v.15, n.3, p.502–521, 2008.

KOOLE, A. **Multi-residue analysis of growth promoters in food-producing animals**. University Medical Center Groningen, Países Baixos, 1998. Disponível em: “<https://www.rug.nl/research/portal/files/3200311/c1.pdf>”, acesso em 12/09/2019.

LE BIZEC, B., PINEL, G., ANTIGNAC, J. P. Options for veterinary drug analysis using mass spectrometry. **J. Chromatogr. A**, França, v. 121, p. 8016–8034, 2009.

MADUREIRA, E. H. **Controle farmacológico do ciclo estral com emprego de progesterona e progestágenos**. Reprodução em 16/03/01 por Equipe BeefPoint. Disponível em: “<http://www.beefpoint.com.br/control-farmacologico-do-ciclo-estral-com-emprego-de-progesterona-e-progestagenos-5041/>”, acesso em 21/11/2019.

MOORADIAN, A. D., MORLEY, J. E., KORENMAN, S. G. Biological actions of androgens. **Endocr. Rev.**, EUA, v.8, n.1, p. 1-28, 1987.

NETO, J. P. Anabolizantes e pecuária de corte. **Revista de Educação Continuada do CRMV-SP**. São Paulo, fascículo 1, v.1, p.10–15, 1998.

PARIS, A, *et al.* Hormones et promoteurs de croissance en productions animales: de la physiologie à l'évaluation du risque. **INRA Prod. Anim.**, França, v.19, n.3, p.151-240, 2006.

PETTES, C. L., WANAMAKER, B. P. **Applied Pharmacology for Veterinary Technicians**, 5ª edição, Elsevier, EUA, 2014.

RAUDRANT D., RABE, T. Progestogens with antiandrogenic properties. **Drugs**, França, v. 63, n.5, p. 463–92, 2003.

RONQUILLO, M. G., HERNANDEZ, J. C. A. Antibiotic and synthetic growth promoters in animal diets: Review of impact and analytical methods. **Food Control**, México, v.72, p.255-267, 2017.

SAVIO, J. D., KEENAN, L., BOLAND, M. P., ROCHE, J. F. Pattern of growth of dominant follicles during the oestrous cycle of heifers. **J Reprod. Fertil.**, Irlanda, v.83, n.2, p. 663-671, 1998.

SCARTH, J. P., *et al.* A review of analytical strategies for the detection of ‘endogenous’ steroid abuse in food production. **Drug Test Anal.**, Reino Unido, v.4, n.1, p.40-49, 2012.

SCHÄNZER W. Metabolism of anabolic androgenic steroids. **Clin Chem.**, Alemanha, v.42, n.7, p.1001-1020, 1996.

SCHARTH, J., *et al.* Presence and metabolism of endogenous androgenic–anabolic steroid hormones in meat producing animals: a review. **Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess.**, Reino Unido, v.26 n.5, p.640–671, 2009.

STOLKER, A. A. M., ZUIDEMA, T., NIELSEN, M. W. F. Residue analysis of veterinary drugs and growth-promoting agents. **TrAC-Trend. Anal.Chem**, EUA, v. 26, n.2, p. 967-974, 2007.

VANHAECKE, L., *et al.* European analytical criteria: Past, present, and future. **J. AOAC Int**, Países Baixos, v.94, n.2, p.360-372, 2011.

VILJANTO, M., KICMAN, A. T., WALKER, C. J., WOLFF, K., MUIR, T., HINCKS, P., BIDDLE, S., SCARTH, J. Bioformation of boldenone and related precursors/metabolites in equine faeces and urine, with relevance to doping control. **Drug Test. Anal.**, Reino Unido, 2019. <https://doi.org/10.1002/dta.2706>

WADA - *World Anti-Doping Agency*. **WADA Technical Document – TD2014MRPL: Minimum Required Performance Levels for Detection and Identification of Non-threshold Substances**, Canadá, 2014. Disponível em “<https://www.wada-ama.org/sites/default/files/resources/files/WADA-TD2014MRPL-v1-Minimum-Required-Performance-Levels-EN.pdf>”, acesso em 25/10/2019.

WANG, J., MACNEIL, J. D., KAY, J. F. Chemical Analysis of Antibiotic Residues in Food. **Wiley**, 1ª edição, EUA, 2012.

WILSON, J. D. Androgen abuse by athletes. **Endocr Rev.**, EUA, v.9, n.2, p.181-99, 1988.

## **Capítulo 2**

### **Desenvolvimento e Validação de um Método para Determinação de 39 Anabolizantes em Músculo Bovino**

## 2.1 INTRODUÇÃO

O monitoramento de compostos de ação anabolizante em animais é tradicionalmente realizado em amostras de urina ou fígado, devido principalmente à facilidade de coleta, no caso da primeira, e bioacumulação de resíduos, para a segunda (SCARTH, 2012). Entretanto, o músculo é uma matriz diretamente consumida por grande parte da população, e também se constitui na única matriz disponível para análise no caso de produtos importados.

No âmbito do monitoramento veterinário de compostos anabolizantes no Brasil, o PNCRC do MAPA (BRASIL, 2019) prioriza o monitoramento de anabolizantes nas matrizes urina e fígado. No ano de 2019, o monitoramento na matriz músculo foi realizado apenas para a espécie de pescado para os analitos  $\alpha$ ZE,  $\beta$ ZE, DES, DIE, HEX, MTT, ZER e TAL. Amostras de músculo bovino importadas também podem ser esporadicamente analisadas em programas de monitoramento específicos do MAPA, empregando o método de ensaio a ser descrito neste capítulo.

O Anexo II apresenta os valores dos limites máximos estabelecidos oficialmente por organismos internacionais para a matriz músculo de diferentes espécies (AUSTRALIA, 2018; CANADÁ, 2017; CFR/USFD; CODEX, 2017; CRLs, 2007; JAPÃO, 2018).

O processo de extração de analitos presentes em baixas concentrações em produtos de origem animal é um passo fundamental na análise, consumindo a maior parte do seu tempo e sendo mais suscetível à ocorrência de erros experimentais. Um dos grandes desafios durante o desenvolvimento de um método analítico envolve a otimização de um processo de extração que possibilite a determinação com recuperação e precisão aceitáveis, para o maior número possível de analitos pertencentes a diferentes classes.

O preparo de amostra dos trabalhos descritos na literatura para análise de anabolizantes em músculo (Anexo II) envolve etapas tais como: hidrólise enzimática; extração sólido-líquido seguida de purificação com cartuchos de extração em fase sólida (*solid phase extraction* - SPE) e/ou extração líquido-líquido (*liquid-liquid extraction* - LLE); sendo que o método QuEChERS (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*) também foi empregado para extração e purificação dos extratos. Destaca-se que a

realização da etapa de hidrólise enzimática não foi consenso. Essa reação tem como objetivo a desconjugação dos analitos de suas formas glucuronídicas e/ou sulfatadas para as formas livres dos mesmos, podendo ser realizada por meios biológicos (enzimáticos) ou químicos, sendo que estes últimos não são recomendados por causarem a degradação dos analitos. As enzimas utilizadas para tal finalidade podem ser obtidas a partir de fígado de mamíferos, da bactéria *Escherichia coli* e de moluscos, como do gênero *Helix pomatia* ou *Patella vullgata*. As fontes mamíferas e bacterianas contêm apenas atividade da  $\beta$ -glucuronidase, permitindo a clivagem da porção de glucuronídeo do anabolizante. Já as fontes derivadas de *Helix pomatia* contêm tanto a atividade de  $\beta$ -glucuronidase quanto a de sulfatase, a última responsável pela hidrólise das formas sulfatadas do metabolismo de fase II, sendo, portanto, as formulações enzimáticas mais utilizadas. No entanto, não há nenhum método universal para a desconjugação de esteróides disponível na literatura (GOMES, 2009).

Métodos de ensaio com ausência da etapa de hidrólise enzimática, como os desenvolvidos por WOZNIAK (2013) e VANHAECK (2011), também são reportados na literatura. Entretanto, devem-se considerar os estudos robustos apresentados em encontros oficiais do JECFA para comitês específicos da FAO, que promoveram experimentação animal com anabolizantes radiomarcados e comerciais. Os resultados indicaram que uma parcela significativa dos esteroides  $\beta$ ES,  $\beta$ TE, 17 $\beta$ -trembolona ( $\beta$ TB), 17 $\alpha$ -trembolona ( $\alpha$ TB) e ZER encontravam-se covalentemente conjugados em suas formas glucuronídicas e sulfatadas (FAO, 1987; FAO, 1999). Dessa forma, a não realização da etapa de desconjugação, durante o preparo de amostra, pode levar a uma subestimação das concentrações desses analitos.

No caso dos métodos que utilizaram a hidrólise, a enzima  $\beta$ -glucuronidase/arilsulfatase foi normalmente empregada em meio aquoso tamponado. Em seguida, um solvente orgânico para partição dos analitos, como acetato de etila (EtOAc) e éter dietílico, foi adicionado. Os coeficientes de partição octanol-água da maioria dos esteroides correspondem a valores de logP entre 3 e 5 (SHOSHITARI, 2008), ou seja, apresentam maiores afinidades com solventes orgânicos do que com a água. No caso dos procedimentos que não empregam a hidrólise enzimática, os solventes mais utilizados, para extração dos analitos da matriz músculo, são metanol e acetonitrila (ACN), que, além de promoverem a extração dos analitos, participam do

processo de precipitação das proteínas presentes no meio (BLASCO, 2007; VANHAECKE, 2011).

Antes da injeção no sistema cromatográfico, o extrato contendo os analitos é normalmente submetido a uma etapa de purificação e concentração por meio de SPE. Nesse caso, emprega-se normalmente cartuchos de extração octadecil-sílica (C18) acoplados a cartuchos aminopropil (NH<sub>2</sub>) (KINSELLA, 2009). O primeiro cartucho visa à retenção de compostos interferentes apolares ou pouco polares, por um mecanismo de cromatografia de fase reversa, devido à presença de grupos pouco polares octadecil sílica, produzidos por modificação química de grupos silanóis ligados à superfície da sílica. Cartuchos de sílica (SiOH) também podem ser usados para essa finalidade (MARCHAND, 2000), mas os analitos devem estar dissolvidos em solventes apolares como n-hexano (HEX) e EtOAc antes de serem aplicados no cartucho, devido a um mecanismo de separação por cromatografia de fase normal. Já o cartucho NH<sub>2</sub> promove a retenção de ânions devido a presença de um grupo alifático aminopropil ligado à superfície da sílica (KINSELLA, 2009), funcionando também com um mecanismo de filtração adicional.

A extração via QuEChERS foi proposta por WOZNIACK e colaboradores (2013) para análise qualitativa de 9 anabolizantes, estilbenos e lactonas do ácido resorcílico em músculo. Esses compostos foram analisados por LC-MS com analisador do tipo orbitrap operando no modo de ionização *electrospray* negativo, conhecido por possuir menor influência de interferentes provenientes da matriz que o modo de ionização positivo, normalmente empregado para análise de esteroides. LÓPEZ-GARCÍA e colaboradores (2018) desenvolveram e validaram um método QuEChERS para a análise quantitativa de 14 corticoesteróides e esteróides nas matrizes de músculo bovino, suíno e de ave. Entretanto, apenas a classe dos anabolizantes esteroides foi validada neste trabalho, sem a inclusão de nenhum analito da classe dos estilbenos ou lactonas do ácido resorcílico.

O trabalho a ser apresentado neste capítulo objetivou desenvolver e validar um método multirresíduos para análise confirmatória de 39 compostos de ação anabolizante, pertencentes às classes dos esteroides, etilbenos e lactonas do ácido resorcílico, em músculo de bovino. As etapas de hidrólise enzimática e extração foram estudadas e o método foi validado de acordo com os critérios estabelecidos no Manual

de Garantia Analítica: Resíduos e Contaminantes em Alimentos do MAPA (BRASIL, 2011).

## 2.2. EXPERIMENTAL

### 2.2.1 Padrões Analíticos

As informações referentes aos padrões analíticos utilizados neste trabalho, como abreviaturas, fórmulas estruturais e fabricantes, estão descritas no Apêndice I.

### 2.2.2 Materiais, Reagentes e Insumos

Todos os reagentes empregados durante este trabalho foram de grau analítico: o ácido acético glacial foi adquirido da Tedia Brasil (Rio de Janeiro, Brasil), o ácido fórmico da Impex (Diadema, Brasil) e o acetato de sódio anidro da Vetec (Rio de Janeiro, Brasil). A enzima  $\beta$ -glucuronidase derivada de *Helix pomatia*, tipo HP-2, atividade  $\geq 100000$  unidades/mL, e o solvente etilenoglicol de grau analítico foram adquiridos da Sigma Aldrich (St. Louis, EUA). Metanol de grau analítico para espectrometria de massas foi empregado no preparo da fase móvel (JT. Baker e Tedia, EUA). Os demais solventes empregados de grau HPLC foram EtOAc, acetona (ACT), ACN e metanol (JT. Baker, EUA). A Tabela 2.1 apresenta os instrumentos e materiais empregados.

**Tabela 2.1:** Instrumentos e materiais empregados durante as otimizações e validações (continua)

Instrumentos/Materiais	Marca/Descrição
Sistema LC-MS/MS	API 5000 da Applied Biosystems acoplado ao sistema HPLC Agilent 1200
Centrífuga	Thermo, CR4i
Balança analítica	Bioprecisa, PA 2104N Shimadzu AUW220D
Sistema <i>Manifold</i>	Agilent, Vac Elut 20
Banho de água	Yamato, BT-25

**Tabela 2.1:** Instrumentos e materiais empregados durante as otimizações e validações (conclusão)

Instrumentos/Materiais	Marca/Descrição
Incubadora	Tecnal, TE-420-EI
Aparelho de ultrassonificação	Unique, Ultrasonic Cleaner
Sistema da purificação de água	Gehaka, Master Sigma 100
Coluna cromatográfica	Agilent, Zorbax Eclipse XDB-C18, 50 mm x 3,0 mm d.i., x 1,8 $\mu\text{m}$
	Agilent, Poroshell C18, 50 mm x 3,0 mm d.i. x 1,9 $\mu\text{m}$
Cartucho de extração <i>SPE</i>	Sorblin, C18, 600 mg, 6 mL
	J.T.Baker, C18, 600 mg, 6 mL
	Agilent, Bond Elut NH <sub>2</sub> , 500 mg, 3 mL

### 2.2.3 Preparo das Soluções Padrão

Soluções estoque de cada analito e dos padrões deuterados foram preparadas na concentração aproximada de 200,0  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , dissolvendo-se as massas pesadas dos padrões em metanol.

Soluções padrão intermediárias foram preparadas por diluição das soluções estoque individuais em metanol, de forma a se agruparem os analitos que possuem LMDRs iguais. Os analitos DES, HEX, DIE, ETE, MTT,  $\alpha\text{TB}$ ,  $\beta\text{TB}$ , ATR, STL, STL4OH, STL16OH, AME, ZER, TAL, MPR, ACM, MTD, 17OMBO, MTN, PRG,  $\alpha\text{BO}$ ,  $\beta\text{BO}$ ,  $\alpha\text{NAN}$ ,  $\beta\text{NAN}$ ,  $\beta\text{ES}$ ,  $\alpha\text{TE}$ ,  $\beta\text{TE}$  foram preparados na concentração de 3,0  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Já os analitos MEG, AMG, ACC, NOT, ETN, ZEA,  $\alpha\text{ZE}$ ,  $\beta\text{ZE}$  foram preparados na concentração de 6,0  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , e CLD e DRO na concentração de 12,0  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

Uma solução padrão de trabalho, usada na fortificação das amostras brancas, foi preparada em metanol por diluição das três soluções intermediárias descritas anteriormente, por um fator de diluição de 100 vezes, perfazendo as respectivas concentrações: 0,03; 0,06 e 0,12  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

Para os padrões deuterados, empregou-se a concentração de  $3,0 \mu\text{g mL}^{-1}$  para a solução intermediária de AME-d3,  $\beta\text{BO-d3}$ , TES-d2, NOR-d3, DES-d8, HEX-d4, MTT-d3 e  $\beta\text{ESd4}$ , e de  $6,0 \mu\text{g mL}^{-1}$  para MEG-d3. A solução padrão de trabalho deuterada foi preparada em metanol por diluição das duas soluções intermediárias descritas anteriormente, empregando-se também um fator de diluição de 100 vezes, resultando numa concentração final de  $0,03$  e  $0,06 \mu\text{g mL}^{-1}$ , respectivamente. Todas as soluções padrão foram armazenadas em temperatura inferior a  $-15^\circ\text{C}$ .

#### **2.2.4 Estudo das Condições Espectrométricas**

Para a definição dos íons precursores de cada analito, dos seus respectivos íons produto, bem como dos parâmetros: potencial de declusterização (PD), energia de colisão (EC) e potencial de saída da célula de colisão (PSC), uma solução individual contendo  $100 \text{ ng mL}^{-1}$  de cada analito em metanol/água (50:50 v/v) foi injetada diretamente no espectrômetro de massas, utilizando-se seringa de infusão em um fluxo de  $10 \mu\text{L min}^{-1}$ . Após a seleção dos íons característicos, os parâmetros espectrométricos citados foram selecionados com base na obtenção das maiores respostas instrumentais. Os parâmetros relacionados à fonte de ionização: gás de nebulização, *curtain gas*, potencial de entrada na célula de colisão, voltagem do capilar e temperatura, foram otimizados por *Flow Injection Analysis* (FIA). Uma solução contendo todos os analitos na concentração de  $2 \text{ ng mL}^{-1}$  foi injetada no cromatógrafo, utilizando como fase móvel água ultrapura e metanol na proporção 50:50 (v/v) sob uma vazão de  $300 \mu\text{L min}^{-1}$ . A otimização de cada parâmetro baseou-se na combinação dos valores que levaram a maiores intensidades de sinal analítico das transições monitoradas.

Para cada analito monitorado foram selecionadas pelo menos uma transição de quantificação e uma de confirmação. Foram obtidos os cromatogramas de íons extraídos para cada transição monitorada, e as intensidades relativas entre as mesmas foram calculadas, através da razão da área da transição de confirmação pela área da transição de quantificação correspondente.

#### **2.2.5 Estudo das Condições Cromatográficas**

A separação cromatográfica dos analitos foi otimizada avaliando a composição das fases móveis e das estacionárias empregadas. No primeiro caso, utilizaram-se como

fases orgânicas misturas, em diferentes proporções, dos solventes metanol e ACN, e uma fase aquosa para eluição em modo gradiente. Diferentes colunas cromatográficas C18 de 50 mm de comprimento foram testadas, variando-se o diâmetro, tamanho de partícula e empacotamento das fases estacionárias.

### **2.2.6 Estudo do Preparo de Amostra**

O procedimento de extração foi estudado a partir da fortificação de diferentes amostras brancas de músculo bovino provenientes do PNCRC, com solução a padrão de trabalho dos anabolizantes (BRASIL, 2017). De acordo com os procedimentos do programa, essas amostras são coletadas de frigoríficos, que são inspecionados pelo Sistema Federal de Inspeção (S.I.F.), e encaminhadas ao Laboratório Federal de Defesa Agropecuária de Minas Gerais (LFDA/MG). Por músculo bovino entendem-se os cortes cárneos coletados de regiões aleatórias das carcaças animais, geralmente da parte dianteira para fins de inspeção. Supôs-se, então, que os animais relacionados às amostras coletadas não foram submetidos a tratamento com os anabolizantes pesquisados, o que foi posteriormente confirmado por meio do procedimento de extração otimizado. Como diferentes amostras foram utilizadas, fatores como raça, idade, sexo e regime alimentar foram contemplados no desenvolvimento analítico.

Para avaliar a ação da enzima  $\beta$ -glucuronidase aril/sulfatase, utilizou-se uma amostra naturalmente contaminada com PRG e  $\beta$ TE, obtida do PNCRC do ano de 2017, à qual foram adicionados os compostos dietilestilbestrol-monoglucuronídeo (DESG), 3-hidróxi-estanozolol monoglucuronídeo (STL3OHG) e 17 $\beta$ -estradiol monoglucuronídeo ( $\beta$ ESG) na concentração correspondente a 1,0  $\mu\text{g kg}^{-1}$ . A influência dos fatores: volume de enzima, tempo e temperatura de incubação na hidrólise enzimática foi avaliada através de um planejamento fatorial 2<sup>3</sup>. O volume da enzima foi estudado nos níveis: (-) 50  $\mu\text{L}$  e (+) 100  $\mu\text{L}$ ; tempo de incubação, nos níveis: (-) 1,5 h e (+) 16 h; e temperatura de incubação, nos níveis: (-) 37,5 °C e (+) 55 °C. Dois experimentos adicionais (9 e 10) foram realizados, a fim de se verificar a possível desconjugação dos analitos promovida pelas condições reacionais, sem a adição da enzima. As condições desses ensaios estão descritas na Tabela 2.6.

Para se assegurar a homogeneidade da matriz em todos os experimentos, a amostra em questão foi picada e triturada em ultraturrax. Para a fortificação das

amostras brancas,  $3,000 \pm 0,100$  g de músculo bovino foram pesados em tubos de centrífuga de polipropileno de 50 mL. Em seguida, 100,0  $\mu$ L da mistura de padrões glucuronídeos ( $0,03 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) foram adicionados e os tubos foram mantidos em câmara escura por cerca de 1h. As amostras fortificadas foram submetidas à extração com 10,0 mL de metanol, com agitação em vórtex por 30 s, e posterior adição de igual volume de tampão acetato de sódio  $0,2 \text{ mol L}^{-1}$  (pH = 5,2), e 15 min de homogeneização em agitador horizontal. Após centrifugação a 2700 g por 10 min, os sobrenadantes obtidos foram transferidos para outro tubo de 50 mL, e o metanol foi evaporado em banho de água a 50°C, sob fluxo de ar sintético. À fase contendo o tampão não evaporado foi realizada a adição da enzima  $\beta$ -glucuronidase/aril sulfatase derivada de *Helix pomatia*, com posterior incubação nas temperaturas e tempos avaliados no planejamento fatorial 2<sup>3</sup>. Após a centrifugação em condições iguais a anterior, o sobrenadante foi transferido para um cartucho SPE C18, previamente condicionado com 5 mL metanol e 5 mL água, e efetuou-se a lavagem do mesmo com 5 mL de água e 5 mL de metanol/água (55:45 v/v). No caso da otimização da hidrólise, efetuou-se a lavagem com apenas 5 mL de água em todos os testes, a fim de se evitar a perda das formas glucuronídicas. Em seguida, acoplou-se um cartucho NH<sub>2</sub>, previamente condicionado com 5 mL de metanol e 5 mL de ACT, e efetuou-se a eluição dos analitos com 5 mL de ACT, em tubo de vidro contendo 50  $\mu$ L de metanol/etilenoglicol (90:10 v/v). O eluato foi evaporado até a secura em banho de água a 45 °C, sob fluxo de ar sintético, e reconstituído com 225  $\mu$ L de solução de metanol/água (55:45 v/v). O extrato obtido foi analisado por LC-MS/MS, sendo criada inicialmente uma sequência de injeções no modo de ionização ESI<sup>+</sup>, e uma sequência posterior no modo ESI<sup>-</sup>, ou vice-versa.

### 2.2.7 Validação do Método

A validação do método de ensaio seguiu o protocolo estabelecido pelo Manual de Garantia da Qualidade Analítica – Resíduos e Contaminantes em Alimentos, do MAPA (BRASIL, 2011), avaliando-se as figuras de mérito: linearidade, precisão, recuperação, incerteza de medição (U), limite de decisão (CC $\alpha$ ), capacidade de detecção (CC $\beta$ ), limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), seletividade e robustez.

### 2.2.7.1 Faixa de Trabalho e Linearidade

Assumiu-se a ocorrência de efeito de matriz para o método desenvolvido, dessa forma, empregaram-se curvas de calibração matrizadas com a adição dos padrões analíticos antes do procedimento de extração. A faixa de trabalho foi de 0,5 a 2,0 vezes o LMDR de cada analito (0,50; 0,75; 1,00; 1,25; 1,50 e 2,00 LMDR). Os valores dos LMDRs de cada analito estão descritos na Tabela 2.9. Como respostas instrumentais, empregou-se a razão entre a área do pico cromatográfico do analito e a área do padrão interno deuterado, exceto para os analitos STL, STL4OH e STL16OH, devido à falta de um padrão interno adequado, evidenciada durante as etapas de otimização. Cada ponto da curva foi preparado em triplicata genuína e extraído segundo procedimento descrito no item 2.2.6.

Aplicou-se inicialmente um teste F para verificação da homogeneidade das variâncias, entre os níveis de concentração. Para os casos em que as variâncias dos resíduos entre os níveis de calibração não foram estatisticamente iguais ( $F_{\text{calculado}} > F_{(5,5)} = 5,05$ ), aplicou-se o método dos mínimos quadrados ponderados (MMQP), usando como ponderador o inverso da variância. Quando o valor de F calculado foi menor que o valor crítico, o método dos mínimos quadrados ordinários (MMQO) foi empregado na regressão (BRASIL, 2011).

Para a avaliação da linearidade, calcularam-se os coeficientes de correlação linear das curvas ajustadas pelos MMQO ou MMQP. A partir desses valores, calcularam-se os valores de t de correlação linear ( $t_r$ ) para cada analito (Equação 2.1). Quando o valor de  $t_r$  foi maior ou igual ao valor de t crítico bilateral, a 95% de confiança (2,78), a faixa de concentrações avaliada foi considerada linear (BRASIL, 2011). Todos os cálculos foram realizados em planilha validada no Microsoft Excel®.

$$t_r = |r_w| \sqrt{\frac{N_x - 2}{1 - R^2}} \quad (2.1)$$

Onde

$r_w$  é o coeficiente de correlação linear pelo método dos mínimos quadrados ponderados ( $w = 1$  para MMQO);

$N_x$  é o número de níveis de concentração;

$R^2$  é o coeficiente de determinação.

### 2.2.7.2 Recuperação e Precisão

As amostras de músculo bovino foram fortificadas em três níveis de concentração, 1,0; 1,5 e 2,0 vezes o LMDR de cada analito, em sextuplicata por nível. Os analitos foram extraídos conforme procedimento descrito no item 2.2.6. Em conjunto com essas replicatas, foram preparadas curvas de calibração conforme descrito no item 2.2.7.1, sem replicata de preparo, com injeção em triplicata. Esse procedimento foi efetuado em dois dias diferentes por um mesmo analista, correspondendo à condição de repetibilidade para o primeiro desses dias. Para se avaliar a precisão intermediária, um outro analista executou a análise num terceiro dia.

Utilizaram-se os critérios de aceitação do Codex Alimentarius (CODEX, 2014), que consideram como satisfatórias recuperações entre 50 e 120% para concentrações menores ou iguais a 1  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , entre 60 e 120% para concentrações entre 1 e 10  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , e entre 70 e 120% entre 10 e 100  $\mu\text{g kg}^{-1}$ . Para esses mesmos intervalos de concentração, os coeficientes de variação (CVs) devem ser inferiores a 35, 30 e 20%, respectivamente.

### 2.2.7.3 Incerteza de Medição

A estimativa de incerteza de medição foi realizada por meio da metodologia *Top-Down* (YOU DEN, 1975). Foram consideradas duas fontes principais: a incerteza relativa às curvas de calibração elaboradas em 2.2.7.2, por meio da combinação das 3 curvas preparadas, e a relacionada aos ensaios de precisão intermediária.

A incerteza relativa às curvas analíticas foi determinada por meio dos parâmetros obtidos da regressão para cada analito (Equação 2.2).

$$u_{\text{calibração}} = \sqrt{\frac{s^2(y^*) + s^2(a) + (x^*)^2 s^2(b) + 2x^* \text{cov}(a, b)}{b^2}} \quad (2.2)$$

Onde:

$x^*$  é a concentração do analito no nível de referência (ex. LMDR);

$s^2(y^*)$  é a variância da resposta instrumental no nível de concentração avaliado;

$s^2(a)$  é a variância do intercepto da curva de calibração;

$s^2(b)$  é a variância da inclinação da curva de calibração;

$\text{cov}(a,b)$  é a covariância entre o intercepto e a inclinação da curva de calibração;

$b$  é a inclinação da curva de calibração.

Os valores de incerteza relativos à precisão intermediária, nos três níveis de concentração avaliados (1,0; 1,5; 2,0 x LMDR), foram calculados a partir do desvio padrão das concentrações, calculadas por interpolação das respostas instrumentais na curva de calibração, de acordo com a Equação 2.3.

$$u_{p.interm.} = (x^*) \cdot \left( \frac{S_{conc.}}{\bar{x}} \right) \quad (2.3)$$

Onde:

$u_{p.interm.}$  é a incerteza da precisão intermediária;

$x^*$  é a concentração do analito no nível de referência (ex.: LMDR);

$S_{conc.}$  é o desvio padrão obtido nos ensaios precisão intermediária ou repetibilidade no nível de concentração estudado;

$\bar{x}$  é a concentração média obtida para as replicatas verdadeiras no nível de concentração avaliado.

A incerteza combinada ( $u_{combinada}$ ) foi calculada através da combinação das incertezas da calibração e da precisão intermediária (Equação 2.4), para os três níveis de concentração estudados (1,0; 1,5; 2,0 x LMDR).

$$u_{combinada} = \sqrt{(u_{calibração}^2 + u_{p.interm.}^2)} \quad (2.4)$$

A incerteza final foi reportada como incerteza expandida (U), calculada de acordo com a Equação 2.5, ao nível de confiança de 95%, para um fator de abrangência (k) igual a 2.

$$U = k \cdot u_{combinada} \quad (2.5)$$

#### 2.2.7.4 Limite de Decisão e Capacidade de Detecção

O  $CC\alpha$  e a  $CC\beta$  foram estimados como descrito no item II.7.6 do Manual de Garantia da Qualidade Analítica (BRASIL, 2011), utilizando a abordagem de cálculo para substâncias proibidas. O procedimento consistiu na fortificação de 20 amostras brancas no LQ da faixa de trabalho (0,5 LMDR), injetadas em conjunto com curva de calibração. Os desvios padrão das concentrações estimadas para essas 20 amostras fortificadas ( $S_{20LQ}$ ) foram utilizados para o cálculo de  $CC\alpha$  e  $CC\beta$  (Equações 2.6 e 2.7):

$$CC\alpha = 2,33 \times S_{20LQ} \quad (2.6)$$

$$CC\beta = CC\alpha + 1,64 S_{20LQ} = 3,97 \times S_{20LQ} \quad (2.7)$$

### **2.2.7.5 Limite de Detecção e Limite de Quantificação**

Para o estabelecimento de um LD para os analitos estudados, 20 amostras brancas foram analisadas pelo método desenvolvido, medindo-se as áreas cromatográficas referentes ao ruído obtido no tempo de retenção característico de cada analito. Os valores obtidos foram multiplicados por 3 e interpolados nas respectivas curvas analíticas. O LD de cada analito correspondeu ao valor médio das concentrações calculadas para as 20 amostras.

O LQ para músculo bovino foi estimado como 0,5 LMDR para cada analito, e avaliado por meio da análise de um total de 20 amostras brancas fortificadas neste nível de concentração para todos os analitos pesquisados, em condições de precisão intermediária (cada um de dois analistas analisou 10 amostras). As concentrações dos analitos foram calculadas por interpolação em curva analítica preparada e injetada no mesmo dia de análise. Em seguida, estimaram-se os valores de recuperação e CV, que foram avaliados de acordo com os critérios do Codex Alimentarius (CODEX, 2014).

### **2.2.7.6 Seletividade**

De acordo com o item VI.1.2 do Manual de Garantia da Qualidade Analítica (BRASIL, 2011), amostras brancas foram analisadas durante todo o processo de otimização e validação, evienciando-se a ausência de sinal analítico nos tempos de retenção característicos dos analitos estudados. Em adição a essa observação, a seletividade do método desenvolvido foi estudada a partir de um protocolo interno do LFDA-MG, que envolve a adição intencional de uma classe de compostos interferentes durante o procedimento de extração. Seis amostras brancas de músculo bovino foram fortificadas com 300,0 µL de solução padrão contendo as avermectinas: doramectina, abamectina, ivermectina, moxidectina e eprinomectina, na concentração de 1 µg mL<sup>-1</sup>, correspondente ao LMR desses analitos para essa amostra (100 µg kg<sup>-1</sup>). Uma inspeção visual nos cromatogramas de íons extraídos dessas amostras fortificadas foi realizada, a fim de se avaliar uma possível presença de interferentes nos tempos de retenção característicos de cada analito.

Adicionalmente a essa verificação, 20 amostras de músculo bovino foram fortificadas com 100,0 µL da solução de trabalho dos padrões anabolizantes nos LMDRs de cada analito, e 10 dessas amostras também foram fortificadas com 300,0 µL

da solução de trabalho de avermectinas. As concentrações dos anabolizantes foram calculadas nas amostras com e sem adição de avermectinas, e foram comparadas utilizando o teste F (Snedecor) de homogeneidade de variâncias e o teste t (Student) para comparação de médias.

#### 2.2.7.7 Robustez

De acordo com o item VI.1.7 do Manual de Garantia da Qualidade Analítica (BRASIL, 2011), a avaliação da robustez envolve um estudo de diferentes condições experimentais a que o método deve ser submetido. Os fatores experimentais selecionados para serem avaliados, de acordo com o procedimento adotado neste trabalho, foram: tempo da centrifugação final, que ocorre após a hidrólise enzimática; a marca do cartucho SPE de fase reversa C18; e a temperatura de evaporação final, que ocorre após a eluição dos analitos dos cartuchos SPE. O procedimento foi executado seguindo a abordagem de Youden (BRASIL, 2011; YODEN, 1975). O experimento foi conduzido por meio da fortificação de amostras de músculo bovino com as soluções padrão de trabalho e deuterada (item 2.2.3) no LMDR de cada analito, totalizando 8 amostras, de acordo com as variações propostas na Tabelas 2.2 e 2.3.

**Tabela 2.2:** Fatores e variações testadas para avaliação da robustez do método de extração de anabolizantes em músculo bovino

<b>Fator</b>	<b>Método Original</b>		<b>Variação testada</b>	
Tempo de centrifugação	20 min	(A)	15 min	(a)
Cartucho SPE C18	Sorblin	(B)	J.T Baker	(b)
Temperatura de evaporação	45°C	(C)	50°C	(c)

**Tabela 2.3:** Combinações ensaiadas na avaliação de robustez para análise de anabolizantes em músculo bovino

Fator	Combinação ensaiada							
	1	2	3	4	5	6	7	8
A ou a	20 min (A)	20 min (A)	20 min (A)	15 min (a)	15 min (a)	15 min (a)	20 min (a)	15 min (a)
B ou b	Sorblin (B)	Sorblin (B)	J.T Baker (b)	J.T Baker (b)	Sorblin (B)	J.T Baker (b)	J.T Baker (b)	Sorblin (B)
C ou c	45°C (C)	50°C (c)	45°C (C)	50°C (c)	45°C (C)	45°C (C)	50°C (c)	50°C (c)
<b>Resultado</b>	<b>S</b>	<b>t</b>	<b>u</b>	<b>v</b>	<b>w</b>	<b>x</b>	<b>y</b>	<b>z</b>

Os ensaios foram realizados de forma aleatória, em duplicata de injeção, sendo que os fatores com letra maiúscula correspondem ao procedimento otimizado, e os representados por letra minúscula correspondem às modificações propostas. A concentração de cada analito, referente a cada ensaio realizado, foi calculada por meio de uma curva de calibração injetada no mesmo dia de análise. Em seguida, calculou-se o desvio padrão das diferenças (SD<sub>i</sub>) dessas concentrações, de acordo com metodologia proposta no Manual de Garantia da Qualidade Analítica, que foi então comparado com o desvio padrão no nível do LMDR, em condições de precisão intermediária para cada analito. O método é considerado robusto se apresentar valores de SD<sub>i</sub> menores que S<sub>p.intern.</sub> (BRASIL, 2011).

### 2.2.8 Aplicação do Método em Amostras Reais

Após a validação do método, e a devida implementação do mesmo no sistema de garantia da qualidade laboratorial, um total de 60 amostras de músculo bovino provenientes no PNCRC do ano de 2017 foram analisadas, juntamente com 20 amostras de músculo bovino importado dos EUA em 2017 e 2018. Um levantamento dos analitos encontrados nessas amostras, em concentração acima do CC<sub>α</sub>, foi realizado.

## 2.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 2.3.1 Estudo das Condições Espectrométricas

Os analitos estudados foram detectados e quantificados empregando-se o modo de monitoramento de reações selecionadas (*selected reaction monitoring*, SRM) por ionização em fonte *electrospray*, nos modos positivo e negativo (ESI<sup>+</sup>, ESI<sup>-</sup>). Os parâmetros instrumentais otimizados para o espectrômetro de massas API 5000 da Applied Biosystems estão descritos na Tabela 2.4. Os íons selecionados no primeiro quadrupolo (Q1), seus respectivos íons produtos (Q3), a intensidade relativa entre as transições monitoradas, bem como os potenciais de declusterização (PD), as energias de colisão (EC) e os potenciais de saída da célula de colisão (PSC) das transições selecionadas estão apresentados no Apêndice II.

**Tabela 2.4:** Principais condições de operação do espectrômetro de massas API5000 para análise de anabolizantes em músculo bovino

Parâmetro	Condição (ESI <sup>+</sup> )	Condição (ESI <sup>-</sup> )
Collision Gas (psi)	6	6
Gás de nebulização (psi)	50	50
<i>Curtain Gas</i> (psi)	10	10
Voltagem do capilar (V)	5500	-4500
Temperatura (°C)	650	650

### 2.3.2 Estudo das Condições Cromatográficas

As condições cromatográficas foram estudadas visando a obtenção de um tempo razoável de corrida cromatográfica, tendo-se em vista o elevado número de analitos, e uma separação cromatográfica dos compostos, em especial dos diversos isômeros epímeros. Percebeu-se que a melhor resolução dos mesmos foi obtida com o uso da fase orgânica formada apenas por metanol em vazões menores que 0,30 mL min<sup>-1</sup>.

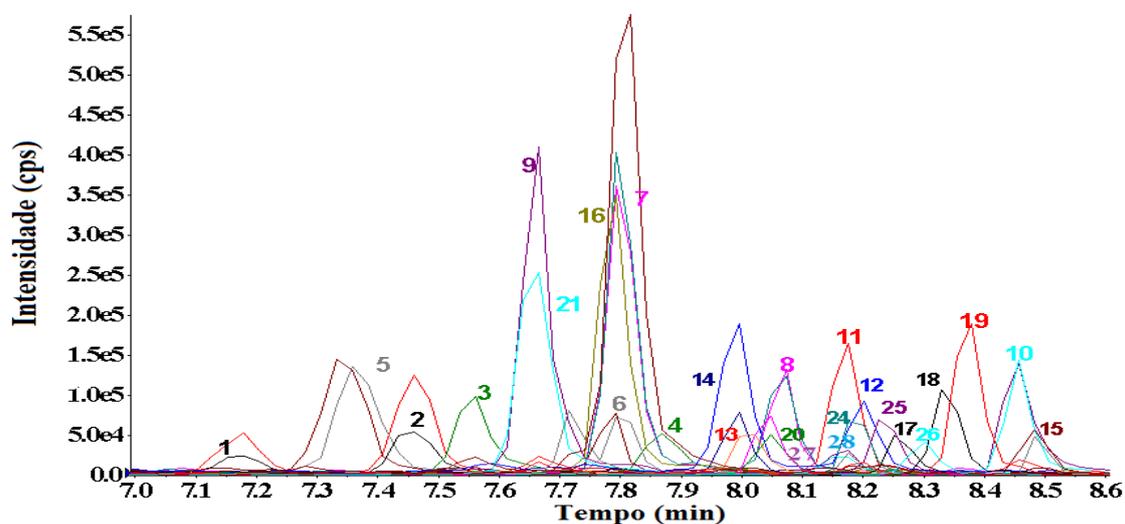
Com relação à adição de modificadores nas fases móveis, observou-se que a adição de ácidos orgânicos, como fórmico e acético a 0,1% v/v, levou à supressão da ionização dos analitos detectados no modo de ionização ESI<sup>-</sup>, em especial αES, βES e DES. Da mesma forma, a adição de acetato e formiato de amônio, com a finalidade de se melhorar a ionização no modo negativo, diminuiu a intensidade dos analitos detectados no modo ESI<sup>+</sup>, em especial CLD, DRO e MEG. Por finalidades práticas, optou-se pelo uso das mesmas composições de fases móveis, aquosa e orgânica, para

ambos os modos de ionização, e não foram adicionados modificadores nessas fases. A Tabela 2.5 apresenta as condições cromatográficas otimizadas.

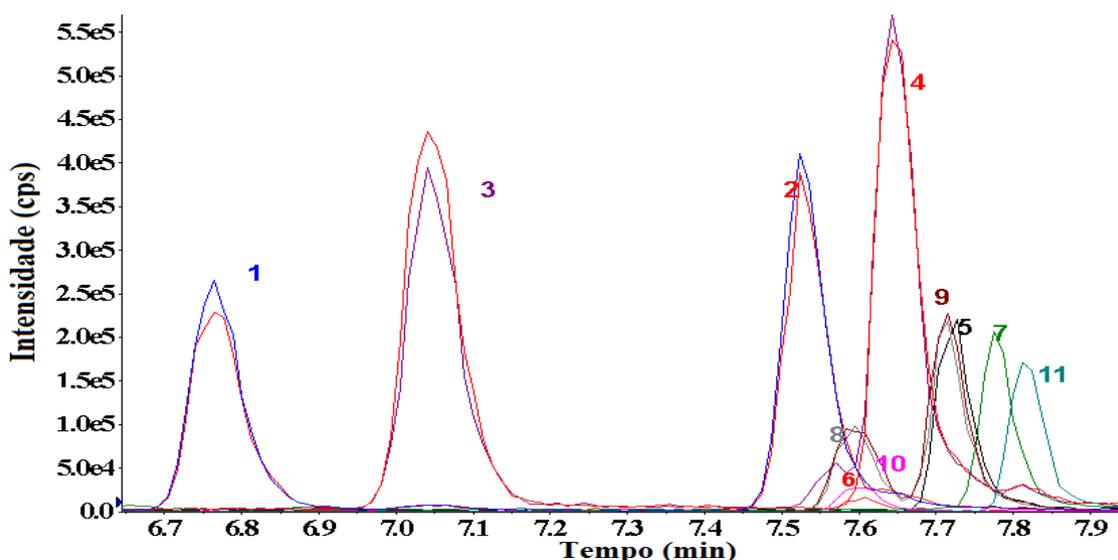
**Tabela 2.5:** Condições cromatográficas otimizadas para determinação de anabolizantes em músculo bovino no sistema Agilent 1200SL

Parâmetro	Condição
Coluna	Zorbax Eclipse XDB-C18, 50 mm x 3,0 mm d.i., x 1,8 µm
Temperatura da coluna e do injetor	40°C ± 2 °C e 15 °C
Volume de injeção	10 µL
Fase móvel	FMA: água ultrapura FMB: metanol
Gradiente da fase móvel	De 0 a 0,5 min B = 20%; de 0,5 a 2,0 min B aumenta linearmente até 70%; de 2,0 a 5,0 min B = 70%; de 5,0 a 5,1 min B aumenta linearmente até 100 %. De 5,1 a 10,0 min B = 100%; de 10,0 a 10,1 min B decai linearmente até 20%, permanecendo nesta condição até 14 min
Vazão da fase móvel	0,30 mL min <sup>-1</sup>
Tempo de corrida	14 min

As Figuras 2.1 e 2.2 apresentam os cromatogramas de íons extraídos obtidos nos modos ESI<sup>+</sup> e ESI<sup>-</sup>.



**Figura 2.1:** Cromatograma de íons extraídos referente ao gradiente otimizado para o extrato de músculo bovino fortificado no LMDR de cada analito e analisado por LC-MS/MS no modo ESI<sup>+</sup>. 1: βTB; 2: αTB; 3: bNAN; 4: αNAN; 5: βBO; 6: αBO; 7: βTE; 8: αTE; 9: MTD; 10: 17-O-MBO; 11: NOP; 12: NOT; 13: MTN; 14: MTT; 15: DRO; 16: ETN; 17: ATR; 18: PRG; 19: STL; 20: MEG; 21: STL4OH; 22: STL16OH; 23: CLD; 24: AMG; 25: ACM; 26: AME; 27: ACC; 28: MPR.



**Figura 2.2:** Cromatograma de íons extraídos referente ao gradiente otimizado para o extrato de músculo bovino fortificado no LMDR de cada analito e analisado por LC-MS/MS no modo ESI. 1: TAL; 2: ZER; 3: βZE; 4: αZE; 5: DIE, 6: DES, 7: HEX, 8: βES; 9: αES; 10: ETE; 11: ZEA.

### 2.3.3 Estudo do Preparo de Amostra

O processo de desenvolvimento das condições de extração envolveu inicialmente a escolha do solvente de extração. De acordo com a revisão bibliográfica apresentada no Anexo II deste trabalho, evidenciou-se que as metodologias multirresíduos que envolvem a análise de uma grande quantidade de analitos empregam normalmente metanol ou ACN como fase extratora. Partiu-se da metodologia desenvolvida por MARCHAND e colaboradores (2000), utilizando metanol como solvente de extração, que foi evaporado antes da adição do tampão acetato de sódio para a realização da hidrólise enzimática. Dessa forma, a extração dos analitos da matriz foi realizada inicialmente em solvente orgânico ao invés de meio aquoso, levando-se em conta a baixa polaridade dos analitos em estudo. Após a evaporação do solvente orgânico presente na mistura metanol-tampão acetato de sódio, restou a fase aquosa tamponada, na qual foi realizada a hidrólise enzimática. A etapa de purificação dos extratos foi baseada no método desenvolvido por SCHMIDT e colaboradores (2008), empregando-se cartuchos SPE C18 e NH<sub>2</sub>. Seguiu-se então o procedimento de extração descrito no item 2.2.6, com posterior injeção no sistema LC-MS/MS em modo SRM para avaliação das transições monitoradas.

O estudo das condições da hidrólise enzimática foi realizado por meio de um planejamento fatorial  $2^3$ , avaliando-se as variáveis que provavelmente são mais significativas no processo: volume de enzima, tempo e temperatura de incubação (FERCHAUD, 2000; KINSELLA, 2009). A enzima derivada de *Helix pomatia* foi empregada, pois sua hidrólise engloba tanto as formas glucuronídicas quanto as sulfatadas dos anabolizantes. As áreas dos picos cromatográficos obtidos após os procedimentos de extração, bem como as condições dos ensaios realizados, são apresentadas na Tabela 2.6.

Os dados apresentados mostram que em todas as condições testadas, empregando-se a enzima, houve conversão completa dos analitos 17 $\beta$ -estradiol monoglucuronídeo ( $\beta$ EG) e dietilestilbestrol-monoglucuronídeo (DESG). Os experimentos controles 9 e 10, sem a adição de enzima, levaram a valores de áreas detectáveis para as formas glucuronídicas, mostrando que o método testado foi capaz de recuperar esses analitos. Deve-se considerar também que os analitos  $\beta$ ES e DES não foram detectados na ausência de enzima, o que indica que as condições reacionais não levaram à desconjugação de  $\beta$ EG e DESG.

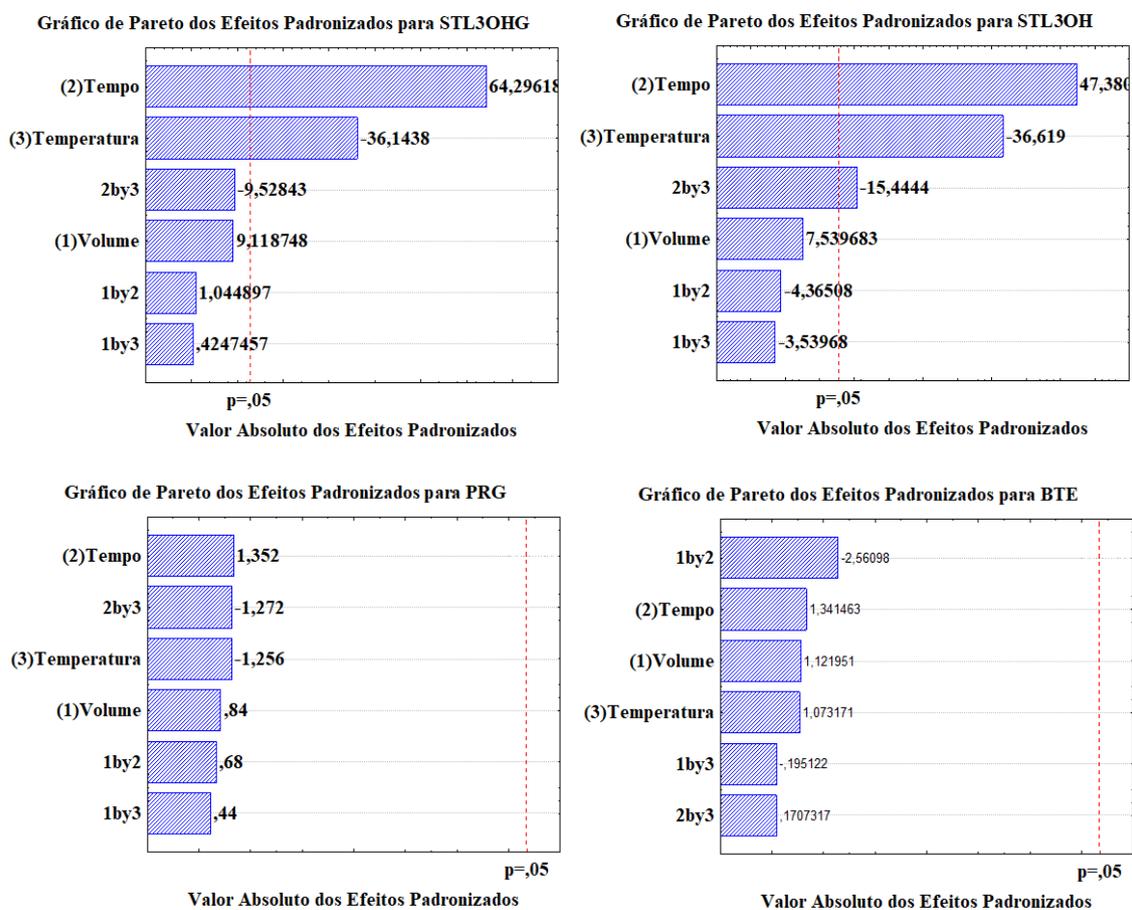
Os analitos PRG e  $\beta$ TE estavam naturalmente presentes na amostra analisada e foram detectados em todos os experimentos realizados. Entretanto, os sinais destes analitos foram bastante inferiores nos ensaios 9 e 10, ou seja, sem a adição de enzima. Portanto, uma parcela significativa desses analitos deve estar presente nas formas glucuronídicas nas amostras contendo esses compostos com produção endógena, e o emprego da hidrólise enzimática deve ser adotado no procedimento de preparo da amostra. Os gráficos de pareto mostram que nenhum dos fatores avaliados foi significativo, ao nível de 95% de confiança, para ambos os analitos.

**Tabela 2.6:** Áreas calculadas para os picos cromatográficos obtidos a partir de planejamento fatorial  $2^3$  empregado para avaliação da hidrólise enzimática

Ensaio	V ( $\mu\text{L}$ )	t (h)	T ( $^{\circ}\text{C}$ )	Áreas calculadas por analito (cps)							
				STL3OH ( $\times 10^5$ )	STL3OHG ( $\times 10^4$ )	PRG ( $\times 10^4$ )	$\beta\text{EG}$ ( $\times 10^6$ )	$\beta\text{ES}$ ( $\times 10^3$ )	DESG ( $\times 10^4$ )	DES ( $\times 10^3$ )	$\beta\text{TE}$ ( $\times 10^4$ )
1	+1	+1	+1	13,60	6,87	5,10	ND	7,77	ND	3,75	3,28
2	-1	+1	+1	13,40	7,70	3,25	ND	7,25	ND	3,14	3,82
3	+1	-1	+1	4,60	17,90	5,40	ND	7,38	ND	5,39	3,70
4	-1	-1	+1	2,28	24,80	4,65	ND	8,15	ND	5,53	2,78
5	+1	+1	-1	30,8	4,52	4,78	ND	7,39	ND	6,96	3,27
6	-1	+1	-1	29,0	4,91	3,73	ND	5,29	ND	6,42	3,32
7	+1	-1	-1	12,7	10,30	4,34	ND	7,41	ND	6,63	3,35
8	-1	-1	-1	7,52	11,60	3,89	ND	6,49	ND	5,59	2,76
9	0	+1	+1	ND	42,60	0,96	2,87	ND	6,49	ND	0,64
10	0	-1	-1	ND	33,60	0,86	2,64	ND	3,89	ND	0,96

V: Volume de enzima: (-1) 50 e (+1) 100  $\mu\text{L}$ ; t: tempo de incubação: (-1) 1,5 e (+1) 16 h; T: temperatura de incubação: (-1) 37,5 e (+1) 55  $^{\circ}\text{C}$ ; cps: contagens por segundo; ND: Não detectado

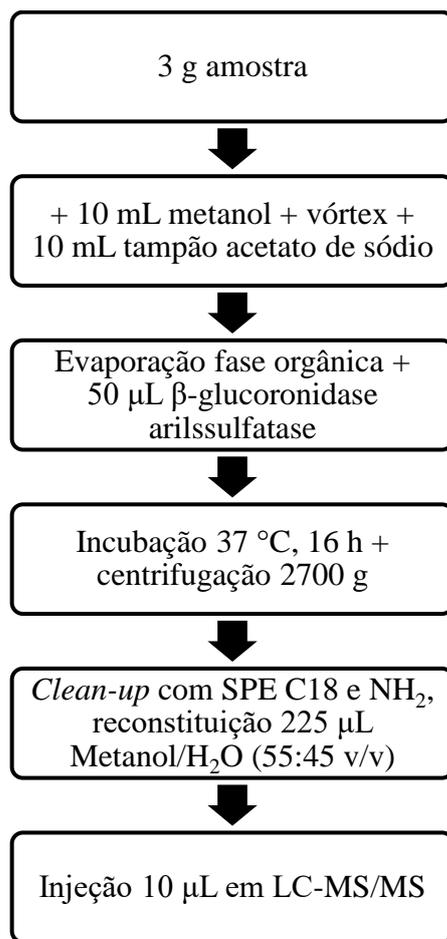
A significância das variáveis, ao nível de 95% de confiança, foi avaliada por meio dos gráficos de Pareto (Figura 2.3):



**Figura 2.3:** Gráficos de Pareto dos efeitos padronizados resultantes do planejamento fatorial  $2^3$  para avaliação da hidrólise enzimática para STL3OHG, STL3OH, PRG e  $\beta$ TE

Observou-se que os fatores avaliados não foram significativos ao nível de confiança adotado para os analitos  $\beta$ TE e PRG, o que indica que a hidrólise enzimática das formas conjugadas desses analitos foi completa em todas as condições testadas com o emprego da enzima. A detecção do analito 3-hidróxi-estanozolol monoglucuronídeo (STL3OHG), em todos os experimentos realizados, indica que sua hidrólise completa não foi possível em nenhuma das condições testadas. O produto de hidrólise desconjugado, 3-hidróxi-estanozolol (STL3OH), foi detectado apenas nos ensaios em que se realizou a hidrólise enzimática. Para a avaliação da significância dos fatores testados para esse analito na forma glucuronídica, trabalhou-se com o inverso das áreas calculadas, uma vez que as mesmas são inversamente proporcionais à eficiência da reação de hidrólise. Os gráficos de Pareto (Figura 2.3) mostram que as variáveis: tempo, com efeito positivo, e temperatura, com efeito negativo, foram significativas ao

nível de confiança de 95%, tanto para STL3OHG e STL3OH. Para esse último, a interação entre o tempo e a temperatura também foi significativa, apresentando um efeito negativo. Dessa forma, conclui-se que a melhor condição de hidrólise corresponde ao emprego de um maior tempo de reação, 16 h, em uma menor temperatura, 37,5 °C. Como a variável volume de enzima não foi significativa, o emprego do menor volume de 50 µL foi selecionado, de forma a se reduzir o custo da análise. A Figura 2.4 apresenta o procedimento final do preparo de amostra.



**Figura 2.4:** Fluxograma representativo do procedimento de extração para a matriz músculo bovino empregado durante a validação

Nota-se que essas condições utilizadas para a realização da hidrólise enzimática estão em consonância com os procedimentos descritos na literatura (FERCHAUD, 2000; KINSELLA, 2009) e com estudos apresentados pela fabricante (AURAND, 2016). Dessa forma, uma abordagem de otimização por avaliação de superfícies de resposta, como Box-Behnken ou Planejamento Composto Central, não foi realizada.

A condição otimizada contemplou todos os anabolizantes não esterificados presentes nas principais formulações comerciais empregadas em bovinos, bem como seus respectivos metabólitos (AME, ATR,  $\beta$ ES,  $\beta$ TE, PRG, ZER – Anexo I). Além disso, o número de anabolizantes analisados foi superior aos métodos apresentados no Anexo II, para a análise dessas substâncias em músculo bovino.

### 2.3.4 Validação do Método

#### 2.3.4.1 Linearidade

Para avaliação da linearidade, inicialmente aplicou-se o teste F de Fisher-Snedecor, para verificar a homocedasticidade das variâncias das respostas instrumentais ao longo da faixa de trabalho. Considerando-se o valor crítico de  $F_{(5,5)}$  igual a 5,05, apenas a curva referente ao analito  $\beta$ NAN apresentou comportamento homocedástico, com um valor calculado de F igual a 4,86. Dessa forma, para as curvas de calibração dos demais analitos empregou-se o MMQP para a regressão, utilizando como ponderador o inverso da variância de cada nível de calibração. Após o cálculo da inclinação (b), desvio da inclinação (sb), intercepto (a), desvio do intercepto (sa), coeficiente de correlação (r) e de determinação ( $R^2$ ), a avaliação da linearidade foi feita por meio do cálculo de  $t_r$  (Equação 2.1). Para todas as curvas de calibração avaliadas os valores de  $t_r$  calculados foram maiores que o valor crítico,  $t_{r \text{ crítico}}(4; 0,05) = 2,78$ , o que evidenciou a adequação do ajuste linear dos modelos de regressão, ao nível de confiança de 95%. Os valores dos  $R^2$  variaram entre 0,720 para ZEA e 0,988 para  $\alpha$ TB. A Tabela 2.7 apresenta os parâmetros para avaliação de linearidade calculados para as curvas de calibração construídas.

**Tabela 2.7:** Avaliação da linearidade dos anabolizantes pesquisados nas matrizes músculo bovino (continua)

Analito	$a \pm (sa)$	$b \pm (sb)$	$F_{\text{calc}}$	$R^2$	$t_r$
$\alpha$ BO	$-0,022 \pm (0,009)$	$0,310 \pm (0,008)$	7,18	0,976	7,81
$\beta$ BO	$0,045 \pm (0,016)$	$0,680 \pm (0,018)$	13,69	0,975	7,38
$\alpha$ ES	$0,077 \pm (0,054)$	$1,523 \pm (0,046)$	13,37	0,978	7,74

**Tabela 2.7:** Avaliação da linearidade dos anabolizantes pesquisados nas matrizes músculo bovino (continuação)

$\beta$ ES	0,024 $\pm$ (0,011)	0,806 $\pm$ (0,011)	56,27	0,986	7,64
STL4OH	-80134 $\pm$ (18446)	348657 $\pm$ (19575)	8,49	0,892	7,65
STL16OH	-623019 $\pm$ (10671)	2584889 $\pm$ (69129)	14,46	0,972	7,71
17OMBO	-0,048 $\pm$ (0,041)	0,899 $\pm$ (0,037)	39,25	0,952	8,48
MTT	0,014 $\pm$ (0,014)	0,392 $\pm$ (0,016)	13,30	0,966	7,99
$\alpha$ NAN	0,468 $\pm$ (0,036)	0,548 $\pm$ (0,028)	10,27	0,943	7,90
$\beta$ NAN	0,350 $\pm$ (0,067)	0,868 $\pm$ (0,053)	4,86	0,937	7,55
$\alpha$ TE	4,299 $\pm$ (0,425)	4,428 $\pm$ (0,249)	14,13	0,939	8,08
$\beta$ TE	7,068 $\pm$ (0,681)	10,417 $\pm$ (0,605)	32,40	0,928	7,82
$\alpha$ TB	-0,019 $\pm$ (0,005)	0,278 $\pm$ (0,004)	68,39	0,988	7,47
$\beta$ TB	-0,029 $\pm$ (0,007)	0,146 $\pm$ (0,007)	1000	0,938	7,18
ACC	0,020 $\pm$ (0,003)	0,030 $\pm$ (0,001)	28,12	0,916	8,20
ACM	-0,001 $\pm$ (0,004)	0,166 $\pm$ (0,005)	48,16	0,925	8,25
AMG	0,065 $\pm$ (0,004)	0,081 $\pm$ (0,001)	1226,7	0,968	8,28
AME	0,184 $\pm$ (0,362)	4,835 $\pm$ (0,250)	7,39	0,941	8,30
ATR	0,013 $\pm$ (0,013)	0,188 $\pm$ (0,013)	14,84	0,931	8,27
CLD	-0,070 $\pm$ (0,018)	0,093 $\pm$ (0,003)	55,71	0,966	8,02
DES	-0,026 $\pm$ (0,006)	0,416 $\pm$ (0,008)	264,76	0,935	7,60
DIE	0,633 $\pm$ (0,240)	5,039 $\pm$ (0,238)	12,51	0,955	7,74
DRO	0,004 $\pm$ (0,016)	0,038 $\pm$ (0,003)	8,15	0,917	8,50
STL	-2566 $\pm$ (31725)	709573 $\pm$ (35540)	532,83	0,941	8,38
ETE	0,003 $\pm$ (0,004)	0,228 $\pm$ (0,004)	127,96	0,985	7,60
ETN	-0,159 $\pm$ (0,033)	0,819 $\pm$ (0,013)	409,0	0,980	7,80
HEX	0,012 $\pm$ (0,003)	0,155 $\pm$ (0,003)	77,25	0,982	7,76
MPR	-0,007 $\pm$ (0,037)	0,603 $\pm$ (0,040)	12,31	0,934	8,16
MEG	0,135 $\pm$ (0,131)	1,824 $\pm$ (0,085)	79,41	0,923	8,15
MTD	0,287 $\pm$ (0,065)	1,218 $\pm$ (0,083)	162,08	0,916	7,65

**Tabela 2.7:** Avaliação da linearidade dos anabolizantes pesquisados nas matrizes músculo bovino (conclusão)

<b>Analito</b>	<b>a ± (sa)</b>	<b>b ± (sb)</b>	<b>F<sub>calc</sub></b>	<b>R<sup>2</sup></b>	<b>t<sub>r</sub></b>
MTN	0,024± (0,033)	1,332± (0,034)	192,33	0,974	8,00
NOP	0,083± (0,036)	0,637± (0,039)	23,35	0,947	8,17
NOT	0,029± (0,018)	0,215 ± (0,011)	86,70	0,945	8,21
PRG	0,105± (0,003)	0,169± (0,005)	228,81	0,936	8,35
TAL	-0,763 ± (0,072)	3,152 ± (0,071)	7,12	0,927	6,77
ZEA	0,419 ± (0,139)	0,397 ± (0,048)	8,54	0,729	7,80
ZER	-0,436 ± (0,064)	4,349 ± (0,056)	58,19	0,984	7,52
αZE	-0,417 ± (0,150)	2,292 ± (0,070)	14,60	0,915	7,65
βZE	-0,635± (0,097)	2,743± (0,047)	94,12	0,824	7,05

a: intercepto da curva analítica; sa: desvio padrão do intercepto; b: inclinação da curva analítica; sb: desvio padrão da inclinação; t<sub>r</sub>: t de correlação linear.

#### 2.3.4.2 Recuperação e Precisão

Os valores de recuperação média e CV referentes aos ensaios em condições de repetibilidade e de precisão intermediária, nos três dias de validação e nos três níveis de concentração avaliados, são apresentados na Tabela 2.8.

Em condições de repetibilidade para o nível de 1,0 LMDR, as recuperações médias variaram entre 86,9% para DRO e 114,1% para αBO, sendo que a micotoxina ZEA apresentou o valor de 122,8%, acima do valor máximo de referência adotado de 120%, apresentado no item 2.2.7.2. Os CVs para este nível de concentração compreenderam a faixa entre 3,5% para HEX e 30,5% para PRG. Para o nível de 1,5 LMDR, as recuperações variaram entre 82,8% para βTE e 111,9% para βTE, e os CVs entre 4,9% para HEX e 29,6% para ACC, sendo que para a micotoxina αZE o valor de CV foi de 40,8%, acima do limite máximo estabelecido de 30%. No nível de concentração de 2,0 LMDR, os valores médios das recuperações compreenderam a faixa entre 60,3% para αZE e 118,6% para αNAN, e os valores de CV entre 3,6% par HEX e 24,2% para DRO. Para a micotixina αZE o valor de CV foi de 46,1%.

Em condições de precisão intermediária as recuperações médias variaram no nível de concentração de 1,0 LMDR entre 92,1% para DRO e 111,6% para PRG, sendo

que para a micotoxina ZEA a recuperação foi de 125,8%, acima do valor limite de 120%. Para esse mesmo nível de concentração, os valores de CV variaram entre 3,8% para HEX e 27% para PRG. Para 1,5 LMDR, os valores de recuperação variaram entre 90,3% para  $\alpha$ TB e 108,1% para STL, e os CVs entre 4,7% para HEX e 27,8% para ACC e STL. Em 2,0 LMDR, as recuperações se situaram entre 84,8% para ACC e 115,9% para  $\alpha$ NAN, e os CV entre 3,3% para HEX e 27,0% para STL.

Deve-se considerar que os analitos  $\alpha$ ZE,  $\beta$ ZE e ZEA não são hormônios anabolizantes, sendo classificados como micotoxinas do tipo lactonas do ácido resorcílico. Os mesmos são normalmente monitorados em conjunto com os anabolizantes ZER e TAL, uma vez que já foi reportado na literatura a formação desses dois últimos anabolizantes a partir das micotoxinas, e vice-versa (AFSCA, 2013). Dessa forma, a presença de micotoxinas em amostras contendo ZER e TAL deve ser investigada, a fim de se avaliar a origem desses analitos. Um monitoramento qualitativo de  $\alpha$ ZE,  $\beta$ ZE e ZEA pode então ser indicado, de tal forma que os parâmetros de recuperação e precisão acima dos limites estabelecidos não comprometem a confirmação e quantificação dos anabolizantes estudados neste trabalho.

De forma complementar a esses ensaios, uma amostra de músculo bovino proveniente de um procedimento de experimentação animal envolvendo a administração de DES em animais vivos foi analisada. A amostra BCR<sup>®</sup>411 é um material de referência certificado (MRC) produzido pela *European Commission*, com concentração certificada maior que 0,5  $\mu\text{g kg}^{-1}$ . Após aplicação do procedimento desenvolvido, obteve-se um valor de concentração igual a 0,59  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , correspondente a uma recuperação de 118,0%, demonstrando a adequação em termos de veracidade do método desenvolvido para esse analito.

**Tabela 2.8:** Avaliação de recuperação e precisão para os analitos estudados na matriz músculo bovino (continua)

Analito	Repetibilidade						Precisão Intermediária					
	1,0 LMDR		1,5 LMDR		2,0 LMDR		1,0 LMDR		1,5 LMDR		2,0 LMDR	
	R (%)	CV (%)	R (%)	CV (%)	R (%)	CV (%)	R (%)	CV (%)	R (%)	CV (%)	R (%)	CV (%)
$\alpha$ BO	114,1	14,1	109,3	11,9	112,2	13,0	109,4	14,0	103,2	13,6	104,1	16,9
$\beta$ BO	96,4	7,8	100,4	6,9	102,8	6,0	97,4	6,9	98,6	7,2	99,5	8,2
$\alpha$ ES	101,6	8,9	100,3	8,5	99,4	6,2	103,4	8,0	100,9	7,0	100,9	6,0
$\beta$ ES	102,8	7,4	103,2	6,6	98,1	7,7	104,3	6,5	102,9	5,6	99,7	6,9
STL4OH	98,3	9,5	94,9	14,6	104,6	13,8	97,8	8,0	96,6	15,3	98,9	15,2
STL16OH	93,6	11,2	88,3	10,4	90,1	9,7	97,7	10,9	91,6	14,6	89,3	10,4
17OMBO	100,7	11,3	101,9	8,9	96,9	8,5	105,2	11,0	102,0	9,6	101,8	9,9
MTT	103,4	8,4	103,0	7,2	91,5	7,5	101,1	8,5	98,8	10,5	92,0	7,6
$\alpha$ NAN	91,6	7,8	96,2	12,9	118,6	19,7	97,4	10,8	99,9	12,4	115,9	17,2
$\beta$ NAN	102,0	9,8	98,8	13,0	107,0	9,0	101,3	9,9	99,0	10,9	104,7	8,9
$\alpha$ TE	108,6	7,2	110,3	7,0	106,4	9,2	104,0	9,5	106,3	8,6	100,9	11,8
$\beta$ TE	110,4	14,1	111,9	18,3	105,9	10,8	105,5	15,4	103,6	20,0	100,9	13,8
$\alpha$ TB	92,0	11,8	89,4	14,1	93,1	16,2	94,8	11,3	90,3	11,8	91,8	14,7
$\beta$ TB	99,9	11,2	97,1	15,8	102,5	12,8	101,7	10,5	94,2	14,6	97,8	14,5

**Tabela 2.8:** Avaliação de recuperação e precisão para os analitos estudados na matriz músculo bovino (continuação)

Analito	Repetibilidade						Precisão Intermediária					
	1,0 LMDR		1,5 LMDR		2,0 LMDR		1,0 LMDR		1,5 LMDR		2,0 LMDR	
	R (%)	CV (%)	R (%)	CV (%)	R (%)	CV (%)	R (%)	CV (%)	R (%)	CV (%)	R (%)	CV (%)
ACC	103,7	19,9	107,6	29,6	77,4	19,0	104,1	16,1	103,0	27,8	84,8	20,3
ACM	99,5	15,7	91,1	26,7	82,2	9,7	98,3	13,3	91,4	22,2	85,3	10,2
AMG	104,8	9,0	104,3	16,8	96,4	7,1	103,3	8,2	101,5	16,2	100,5	8,1
AME	105,1	8,5	100,8	9,7	93,7	8,7	100,2	11,3	99,9	11,2	92,9	8,4
ATR	87,1	12,1	90,8	21,2	81,3	14,1	89,4	12,3	92,2	17,0	86,9	14,3
CLD	91,5	8,3	86,3	13,3	82,1	7,5	96,3	10,6	91,8	14,6	91,8	16,7
DES	97,9	12,2	98,5	15,2	85,7	5,6	98,4	13,2	98,6	12,6	91,2	11,0
DIE	99,7	11,1	101,3	16,8	104,0	11,8	100,3	10,6	92,4	21,5	95,3	18,5
DRO	86,9	17,0	94,9	21,9	84,0	24,2	92,1	15,6	96,9	19,0	92,7	22,7
STL	96,4	15,2	102,3	17,0	104,2	24,1	109,4	22,4	108,1	27,8	106,3	27,0
ETE	99,8	7,5	99,1	7,6	89,2	16,0	102,8	7,4	100,5	7,7	94,0	14,4
ETN	101,8	8,3	99,7	13,8	90,2	10,8	100,5	7,7	97,4	12,1	91,2	9,9
HEX	101,0	3,5	102,7	4,9	100,1	3,6	102,5	3,8	101,7	4,7	99,7	3,3
MPR	90,9	8,6	84,1	15,2	93,9	9,4	96,6	11,0	90,7	16,3	98,9	10,6

**Tabela 2.8:** Avaliação de recuperação e precisão para os analitos estudados na matriz músculo bovino (conclusão)

Analito	Repetibilidade						Precisão Intermediária					
	1,0 LMDR		1,5 LMDR		2,0 LMDR		1,0 LMDR		1,5 LMDR		2,0 LMDR	
	R (%)	CV (%)	R (%)	CV (%)	R (%)	CV (%)	R (%)	CV (%)	R (%)	CV (%)	R (%)	CV (%)
MEG	96,9	7,8	97,2	11,3	93,4	9,7	95,4	11,9	94,5	13,1	92,7	9,8
MTD	98,4	8,6	100,2	6,8	96,2	7,6	98,7	7,1	97,9	7,7	94,8	9,2
MTN	96,8	10,6	94,8	9,3	92,2	5,2	95,2	9,9	96,1	8,1	94,3	7,79
NOP	96,4	10,5	91,6	17,1	93,7	5,4	100,3	10,3	95,8	15,4	99,0	8,9
NOT	98,3	10,5	100,4	17,4	99,9	10,5	96,6	10,9	99,3	15,5	97,5	10,7
PRG	102,6	30,5	98,9	27,7	87,1	6,4	111,6	27,0	99,2	27,7	102,3	24,71

LMDR: Limite Mínimo de Desempenho Requerido; R (%): porcentagem de recuperação; CV (%): coeficiente de variação.

### 2.3.4.3 Incerteza de Medição

Os valores de U estimados usando a metodologia *Top-Down* são apresentados na Tabela 2.9, como porcentagem em relação ao nível de concentração avaliado.

**Tabela 2.9:** Valores calculados de  $CC\alpha$ ,  $CC\beta$ , U; recuperação e CVs nos respectivos LQs para músculo bovino (continua)

Analito	LMDR	$CC\alpha$ ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	$CC\beta$ ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	U (%)			LQ ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	$R_{LQ}$ (%)	$CV_{LQ}$ (%)
				1,0 LMDR	1,5 LMDR	2,0 LMDR			
$\alpha$ BO	1,00	0,27	0,46	33,8	29,9	34,1	0,50	100,5	25,1
$\beta$ BO	1,00	0,16	0,26	20,5	17,5	16,9	0,50	95,8	18,5
$\alpha$ ES	1,00	0,20	0,34	38,4	26,9	15,1	0,50	97,9	17,6
$\beta$ ES	1,00	0,17	0,29	17,7	13,5	14,2	0,50	109,1	16,0
STL4OH	1,00	0,14	0,23	33,8	36,3	31,3	0,50	65,7	14,2
STL16OH	1,00	0,12	0,21	43,9	38,4	21,5	0,50	74,2	12,5
17OMBO	1,00	0,32	0,54	28,8	23,1	20,2	0,50	104,3	26,2
MTT	1,00	0,19	0,33	17,8	21,3	15,4	0,50	92,2	17,3
$\alpha$ NAN	1,00	0,25	0,43	27,1	27,5	34,8	0,50	83,9	25,3
$\beta$ NAN	1,00	0,28	0,47	27,8	25,4	18,5	0,50	87,4	24,8

**Tabela 2.9:** Valores calculados de  $CC\alpha$ ,  $CC\beta$ , U; recuperação e CVs nos respectivos LQs para músculo bovino (continuação)

Analito	LMDR	$CC\alpha$ ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	$CC\beta$ ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	U (%)			LQ ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	$R_{LQ}$ (%)	$CV_{LQ}$ (%)
				1,0 LMDR	1,5 LMDR	2,0 LMDR			
$\alpha$ TE	1,00	0,18	0,31	23,2	19,5	23,9	0,50	96,7	22,0
$\beta$ TE	1,00	0,18	0,31	33,4	41,1	28,0	0,50	96,0	12,9
$\alpha$ TB	1,00	0,25	0,43	25,2	24,9	29,8	0,50	84,4	31,7
$\beta$ TB	1,00	0,23	0,39	25,5	30,7	29,3	0,50	73,6	24,7
ACC	2,00	0,57	0,96	47,3	61,2	41,2	1,00	108,0	31,9
ACM	1,00	0,33	0,56	34,5	47,1	21,2	0,50	104,8	34,1
AMG	2,00	0,42	0,71	26,9	35,5	17,2	1,00	99,6	22,6
AME	1,00	0,18	0,30	28,5	25,5	17,6	0,50	100,8	16,8
ATR	1,00	0,39	0,67	51,0	47,1	39,6	0,50	114,1	33,5
CLD	6,00	1,23	2,10	25,0	30,4	33,6	3,00	101,7	17,0
DES	1,00	0,17	0,29	29,8	26,8	22,2	0,50	96,7	14,1
DIE	1,00	0,13	0,23	30,8	45,3	37,4	0,50	89,6	17,6
DRO	6,00	2,56	4,36	42,3	44,7	45,8	3,00	92,3	18,3

**Tabela 2.9:** Valores calculados de  $CC\alpha$ ,  $CC\beta$ , U; recuperação e CVs nos respectivos LQs para músculo bovino (continuação)

Analito	LMDR	$CC\alpha$ ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	$CC\beta$ ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	U (%)			LQ ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	$R_{LQ}$ (%)	$CV_{LQ}$ (%)
				1,0 LMDR	1,5 LMDR	2,0 LMDR			
STL	1,00	0,23	0,40	53,1	59,1	54,4	0,50	52,0	15,9
ETE	1,00	0,23	0,39	27,2	21,9	29,1	0,50	114,3	19,0
ETN	2,00	0,42	0,71	19,1	25,4	20,0	1,00	106,5	35,3
HEX	1,00	0,10	0,17	8,5	9,7	6,7	0,50	100,4	9,0
MPR	1,00	0,25	0,42	28,0	34,6	22,0	0,50	91,2	27,0
MEG	2,00	0,33	0,57	27,6	27,8	20,1	1,00	78,3	17,7
MTD	1,00	0,29	0,49	15,1	15,7	18,5	0,50	99,9	28,7
MTN	1,00	0,10	0,17	21,1	16,9	15,5	0,50	92,3	11,2
NOP	1,00	0,20	0,34	22,5	31,4	18,2	0,50	98,2	14,3
NOT	2,00	0,31	0,52	40,0	38,7	22,8	1,00	61,2	22,8
PRG	1,00	0,46	0,79	59,7	58,3	49,8	0,50	68,9	16,5
TAL	1,00	0,18	0,30	38,2	31,6	31,7	0,50	108,8	23,0
ZEA	2,00	0,80	1,36	64,7	75,8	39,9	1,00	123,7	50,5

**Tabela 2.9:** Valores calculados de  $CC\alpha$ ,  $CC\beta$ , U; recuperação e CVs nos respectivos LQs para músculo bovino (conclusão)

Analito	LMDR	$CC\alpha$ ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	$CC\beta$ ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	U (%)			LQ ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	$R_{LQ}$ (%)	$CV_{LQ}$ (%)
				1,0 LMDR	1,5 LMDR	2,0 LMDR			
ZER	1,00	0,25	0,43	35,2	37,5	39,1	0,500	74,8	33,1
$\alpha$ ZE	2,00	0,91	1,54	53,7	73,2	74,0	1,00	125,2	49,1
$\beta$ ZE	2,00	0,90	1,54	50,9	50,0	39,0	1,00	136,3	84,3

LMDR: Limite Mínimo de Desempenho Requerido;  $CC\alpha$ : Limite de decisão,  $CC\beta$ : Capacidade de detecção; U: Incerteza de medição expandida;  $R_{LQ}$  = Recuperação no LQ de cada analito,  $CV_{LQ}$  = Coeficiente de variação no LQ de cada analito.

De acordo com o item II.8.3 do guia de validação adotado (BRASIL, 2011), os valores de U não devem exceder o limite máximo de incerteza estabelecido por legislação ou norma específica. A DECISÃO 2002/657/CE, referência base para a elaboração desse guia, não contempla o cálculo de U como figura de mérito para validação. Entretanto, o guia de validação brasileiro expressa uma recomendação de tolerância aceitável. Nos casos em que U é calculada incluindo a precisão de reprodutibilidade (ou desvio padrão de precisão intermediária ou incerteza de ensaios interlaboratoriais colaborativos), seu valor não deve exceder a 40% do valor de concentração correspondente, para concentrações de 1 a 10  $\mu\text{g kg}^{-1}$ . A análise dos dados de incerteza apresentados mostrou que os analitos, ACC, DRO, STL, STL16OH, PRG, e as micotoxinas ZEA,  $\alpha\text{ZE}$  e  $\beta\text{ZE}$  apresentaram valores de incerteza acima dessa recomendação. De acordo com a equação 2.4, nota-se que os valores de incerteza são calculados como combinações das incertezas relacionadas às curvas de calibração e ao desvio padrão obtido em condições de precisão intermediária. Para esses compostos citados, observaram-se que esses parâmetros, apesar de dentro das faixas recomendadas, exibiram desempenhos individuais inferiores que, quando combinados, levaram a valores mais altos de U. De acordo com as fórmulas estruturais apresentadas no Apêndice I, observa-se também que esses anabolizantes apresentam grupos funcionais e especificidades estruturais não relacionadas aos respectivos padrões internos, quando do seu emprego. Dessa forma, flutuações não compensadas nas respostas instrumentais desses compostos podem explicar esse desempenho, principalmente no que se refere à estabilidade das moléculas protonadas envolvidas no mecanismo de ionização *electrospray* (CHIARADIA, 2008).

Em consonância com os parâmetros de recuperação e precisão obtidos para as micotoxinas, recomenda-se um monitoramento qualitativo para as mesmas. Para os outros cinco analitos, tendo em vista os resultados satisfatórios para as demais figuras de mérito avaliadas, propõe-se um monitoramento quantitativo.

#### **2.3.4.4 Limite de Decisão e Capacidade de Detecção**

De acordo com a DECISÃO 2002/657EC, o  $CC\alpha$  é o limite acima do qual se pode concluir que uma amostra contém o analito, com uma probabilidade de erro de  $\alpha$  igual a 1% para substâncias proibidas (probabilidade de resultados falso-positivos). O

CC $\beta$  é a concentração mais baixa de um composto em que o mesmo pode ser identificado e quantificado em uma amostra, com uma probabilidade de erro de  $\beta$  igual a 5% (probabilidade de resultados falso-negativos).

Os valores de CC $\alpha$  e CC $\beta$  para cada analito (Tabela 2.9) foram calculados através da abordagem de substâncias proibidas pela fortificação de 20 amostras no LQ de cada analito. Nessas condições, o desvio padrão calculado em condições de precisão intermediária é contabilizado, o que evita a obtenção de valores subestimados desses parâmetros, como os calculados pela metodologia da curva analítica (ISO 11843). Deve-se levar em conta que os valores calculados para CC $\alpha$  e CC $\beta$  devem ser menores que os LMDRs, de forma que seja possível a obtenção prática desses níveis de concentração. Observou-se que essas condições foram satisfeitas para os analitos pesquisados, com valores de CC $\alpha$  variando de 0,10 (HEX e MTN) a 2,56  $\mu\text{g kg}^{-1}$  (DRO), e CC $\beta$  entre 0,17 (HEX e MTN) e 4,36  $\mu\text{g kg}^{-1}$  (DRO).

#### **2.3.4.5 Limite de Detecção e Limite de Quantificação**

Os LDs do método foram estimados como a média das concentrações correspondentes a 3 vezes o valor da intensidade do ruído calculado para as 20 amostras brancas analisadas (Tabela 2.9). Para os analitos  $\alpha$ TE,  $\beta$ TE,  $\alpha$ ES,  $\beta$ ES e PRG, os valores de LD não foram estimados, uma vez que já estão presentes naturalmente nas amostras brancas utilizadas.

Os LQs para músculo bovino foram avaliados por meio da análise de um total de 20 amostras brancas fortificadas em 0,50 LMDR, para todos os analitos pesquisados, em duas ocasiões, e por 2 analitos diferentes. A Tabela 2.9 apresenta os valores obtidos para recuperação e CV, que foram avaliados de acordo com critérios apresentados no item 2.2.7.2. Esses parâmetros calculados foram considerados adequados para todos os analitos estudados na matriz músculo bovino, com exceção das micotoxinas  $\alpha$ ZE,  $\beta$ ZE e ZEA. Os valores de recuperação obtidos para esses 3 analitos foram superiores ao limite máximo de 120%, e o valor de CV para  $\beta$ ZE foi 84,4%, superior ao limite máximo de 35%. Levando-se em conta a finalidade de um monitoramento qualitativo proposto para  $\alpha$ ZE,  $\beta$ ZE e ZEA, como discutido no item 2.3.4.2, considerou-se que os analitos monitorados apresentaram desempenho satisfatório para LQ.

### 2.3.4.6 Seletividade

A seletividade do método foi avaliada frente à adição dos interferentes da classe avermectinas. Levou-se em conta que esses compostos antiparasitários são amplamente utilizados na criação dessa espécie de animais, havendo então a possibilidade de estarem presentes em conjunto com anabolizantes. Para a avaliação das respostas instrumentais com e sem a adição de interferentes, conforme descrito no item 2.2.7.6, aplicou-se inicialmente o teste F de Fisher-Snedecor. Para os casos em que as variâncias entre os dois conjuntos de dados foram estatisticamente iguais, a 95% de confiança ( $F_{\text{calculado}} < F_{(9;9;0,05)} = 3,18$ ), aplicou-se o teste t não-pareado com variância agrupada. Para as amostras cujos valores calculados de F foram maiores que o valor crítico 3,18, empregou-se o teste t não-pareado com variância não agrupada. Os valores de F e t calculados, bem como os valores críticos, estão apresentados na Tabela 2.10. Para todos os analitos, os valores calculados de t foram menores que os respectivos valores críticos de t, indicando que a contaminação intencional com os analitos da classe avermectinas não influenciou de forma significativa, ao nível de 95% de confiança, as recuperações dos anabolizantes pesquisados.

**Tabela 2.10:** Avaliação da seletividade e robustez para a matriz músculo bovino (continua)

Analito	Seletividade			Robustez	
	F <sub>calculado</sub>	t <sub>crítico</sub>	t <sub>calculado</sub>	S <sub>di</sub>	S <sub>p.interm</sub>
αBO	1,18		1,62	0,053	0,392
βBO	1,12		1,90	0,019	0,259
αES	1,04	2,10	0,43	0,179	0,294
βES	1,18		0,98	0,100	0,261
STL4OH	2,39		1,69	0,039	0,334
STL16OH	1,47		1,94	0,053	0,306
17OMBO	5,37		1,78	0,241	0,339
MTT	6,70	2,18	1,78	0,049	0,293
αNAN	1,23	2,10	1,83	0,049	0,324
βNAN	2,41		0,64	0,059	0,477
αTE	29,98	2,23	1,81	0,153	0,314

**Tabela 2.10:** Avaliação da seletividade e robustez para a matriz músculo bovino (continuação)

Analito	Seletividade			Robustez	
	F <sub>calculado</sub>	t <sub>crítico</sub>	t <sub>calculado</sub>	S <sub>di</sub>	S <sub>p.interm</sub>
βTE	1,58	2,10	1,33	0,104	0,403
αTB	4,17	2,16	1,77	0,264	0,327
βTB	1,63		1,97	0,101	0,327
ACC	1,28		1,05	0,475	0,579
ACM	2,36		1,32	0,167	0,361
AMG	1,86		1,08	0,267	0,389
AME	1,12		1,98	0,074	0,336
ATR	1,08		0,38	0,315	0,332
CLD	1,22		1,56	0,109	0,784
DIE	1,68		0,10	0,066	0,326
DRO	1,37		0,15	0,821	0,929
STL	1,58	2,10	2,00	0,153	0,495
ETE	1,38		0,17	0,130	0,275
ETN	1,83		1,81	0,256	0,394
HEX	1,44		0,41	0,026	0,198
MPR	1,89		1,48	0,131	0,325
MEG	1,12		0,16	0,046	0,477
MTD	1,41		0,32	0,073	0,264
MTN	2,17		0,03	0,089	0,307
NOP	1,24		1,81	0,242	0,322
NOT	5,07	2,18	1,78	0,264	0,459
PRG	1,29		1,85	0,338	0,549
TAL	1,17	2,10	0,07	0,298	0,394
ZEA	1,16		0,06	0,542	0,825
ZER	1,00		0,30	0,157	0,360

**Tabela 2.10:** Avaliação da seletividade e robustez para a matriz músculo bovino (conclusão)

Analito	Seletividade			Robustez	
	F <sub>calculado</sub>	t <sub>crítico</sub>	t <sub>calculado</sub>	S <sub>di</sub>	S <sub>p.interm</sub>
$\alpha$ ZE	1,06	2,10	0,15	0,458	0,665
$\beta$ ZE	1,01		0,13	0,503	0,648

F<sub>calculado</sub>: valor calculado pelo teste F; t<sub>crítico</sub>: valor crítico para o teste t de Student; t<sub>calculado</sub>: valor calculado para o teste t; S<sub>di</sub>: desvio padrão das diferenças; S<sub>p.interm</sub>: desvio padrão calculado nas condições de precisão intermediária.

### 2.3.4.7 Robustez

A análise dos dados obtidos, a partir da abordagem de Youden (Tabela 2.10), mostra que todos os analitos apresentaram valores de SDi menores que os respectivos S<sub>p.interm</sub> no nível do LMDR, evidenciando que o método foi robusto para todos os analitos, frente às modificações propostas. Dessa forma, as pequenas variações testadas, que porventura possam ocorrer durante a execução do método, não devem interferir de forma significativa nas respostas instrumentais dos analitos.

### 2.3.5 Aplicação do Método em Amostras Reais

Após a análise de um total de 80 amostras de músculo bovino, oriundas do PNCRC e de importação dos EUA, verificou-se a presença de resíduos de anabolizantes em concentrações superiores aos seus respectivos valores de CC $\alpha$  em 58 amostras (Tabela 2.11). Entretanto, todos os analitos quantificados são típicos de origem endógena,  $\beta$ ES,  $\alpha$ TE,  $\beta$ TE e PRG. Destaca-se que foram estimadas concentrações de até 24,6  $\mu\text{g kg}^{-1}$  para PRG (calculadas por extrapolação em curva de até 2,0 LMDR). Entretanto, a natureza endógena desses compostos inviabilizou a tomada de decisão, no sentido da investigação dos produtores pelo uso de tais analitos como promotores de crescimento, uma vez que mesmo concentrações elevadas de anabolizantes podem ser naturalmente produzidas pelos animais investigados (AFSCA, 2013). Dessa forma, métodos de confirmação complementares tornam-se necessários para a diferenciação do caráter endógeno/exógeno desses compostos.

**Tabela 2.11:** Resultados de concentrações obtidas acima do CC $\alpha$  para os anabolizantes pesquisados após a análise de 80 amostras de músculo bovino

<b>Analito</b>	<b>CC<math>\alpha</math> (<math>\mu\text{g kg}^{-1}</math>)</b>	<b>Número de amostras positivas</b>	<b>Faixa de concentrações (<math>\mu\text{g kg}^{-1}</math>)</b>	<b>Concentração média (<math>\mu\text{g kg}^{-1}</math>)</b>
$\beta$ ES	0,14	2	0,24 – 0,32	0,28
$\alpha$ TE	0,31	2	0,32 – 0,35	0,33
$\beta$ TE	0,31	11	0,31 – 1,05	0,39
PRG	0,38	38	0,38 – 24,6	2,31

## 2.4 CONCLUSÕES

Este método visou o fortalecimento da fiscalização agropecuária no Brasil quanto ao uso de compostos de ação anabolizante, por meio da inserção da matriz músculo bovino e do aumento do número de analitos monitorados. O emprego dessa matriz é de grande relevância no âmbito da defesa agropecuária, tendo-se em vista o consumo direto de carne por grande parte da população. Além disso, deve-se considerar a possibilidade de importação de cortes de carne oriundos de países, em que o uso de anabolizantes é permitido na criação animal, resultantes de acordos bilaterais de comércio.

O método otimizado e validado, neste capítulo, contemplou todos os analitos usados em formulações comerciais de anabolizantes, em um total de 39 compostos das classes esteroides, estilbenos e lactonas do ácido resorcílico, número bem superior à maioria dos trabalhos publicados na literatura para essa matriz. As condições de hidrólise enzimática foram estudadas via planejamento fatorial 2<sup>3</sup>, uma vez que não há recomendações oficiais de condições experimentais para essa reação. Assim, comprovou-se a necessidade de uso dessa reação para liberação dos analitos presentes nas formas conjugadas glucuronídicas para as respectivas formas livres.

Os resultados obtidos durante as validações apontaram para um monitoramento qualitativo para as micotoxinas  $\alpha$ ZE,  $\beta$ -ZE e ZEA, uma vez que seus parâmetros de desempenho quanto à recuperação, precisão e incerteza de medição apresentaram valores fora das faixas de conformidade estabelecidas. Entretanto, como o

monitoramento desses compostos é apenas indicativo da origem dos anabolizantes ZER e TAL, uma abordagem qualitativa já é suficiente para essa finalidade. Para os demais analitos pesquisados, todas as figuras de mérito apresentaram desempenhos satisfatórios.

O método desenvolvido já está inserido no sistema de gestão da qualidade do LFDA/MG, tendo sido executado para a análise de carnes importadas dos EUA. Realizou-se um procedimento de expansão desta validação para as matrizes músculo suíno, músculo de pescado e fígado de aves. O método encontra-se atualmente acreditado na ISO 17025 para todas essas matrizes, e é aplicado na análise de rotina dessas duas últimas. Um total de 80 amostras de músculo bovino foi analisado, sendo que os analitos  $\beta$ ES,  $\alpha$ TE,  $\beta$ TE e PRG foram encontrados em concentrações acima do CC $\alpha$  de cada analito, sendo os dois últimos em concentrações acima do LMDR respectivo. Tendo em vista a possível natureza endógena desses compostos, faz-se necessário o desenvolvimento de métodos que possibilitem a diferenciação com um uso exógeno, a fim de que uma ação de fiscalização mais ampla tenha amparo para ser iniciada. Dessa forma, nos próximos capítulos desta tese serão apresentados o desenvolvimento e validação de métodos de ensaio para determinação de ésteres de esteroides em pelo e soro de animais bovinos. De forma que a simples detecção desses compostos, em concentrações acima dos respectivos valores de CC $\alpha$ , já pode caracterizar o uso indevido de substâncias de ação anabolizante.

## 2.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas - *ABNT NBR ISO/IEC 17025: 2017. Requisitos gerais para a competência de laboratórios de ensaio e calibração*. Rio de Janeiro, 2017, 43 p.

AFSCA - Agence fédérale pour la sécurité de la chaîne alimentaire. **Presence of substances with an endogenous origin known or suspected to a certain level through the metabolism and/or feed in different matrices of animal species producing food, 2013.** Disponível em: “[http://www.afsca.be/comitescientifique/avis/2013/\\_documents/](http://www.afsca.be/comitescientifique/avis/2013/_documents/)

ADVIESAVIS072013\_Annex2\_substanceswithanendogenousoriginknownorsuspected.pdf”, acesso em 02/09/2019.

ANTIGNAC, J. P., LE BIZEC, B., MONTEAU, F., ANDRE, F. Validation of analytical methods based on mass spectrometric detection according to the “2002/657/EC” European decision: guideline and application. **Anal. Chim. Acta**, França, v.483, p.325–334, 2003.

AURAND, C., BROWN, K. Using UHPLC/MS (TOF) for Detection of Drugs and Metabolites in Urine following Optimized Enzymatic Hydrolysis Conditions. Disponível em:

“<https://www.sigmaaldrich.com/technicaldocuments/articles/analytical/bioanalytical/uhplc-analysis-drugs-glucuronidase.html>”, acesso em 25/01/2020.

AUSTRALIA - Australian Government Federal Register of Legislation. **Agricultural and Veterinary Chemicals Code Instrument No. 4 (MRL Standard) 2012**. Disponível em: “<https://www.legislation.gov.au/Details/F2017C00056>”, acesso em 01/02/2018.

BLASCO, C.; POUCKE, V. P.; PETEGHEM, C. V. Analysis of meat samples for anabolic steroids residues by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. **J. Chromatogr. A**, Espanha, v.1154, n. 1-2, p.230- 239, 2007.

BRASIL, Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Manual de Garantia da Qualidade Analítica: Resíduos e Contaminantes em Alimentos**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Secretaria de Defesa Agropecuária, Brasília, 2011.

BRASIL, Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº05, de 23 de abril de 2019 - Plano de amostragem e limites de referência para o Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes em Produtos de Origem Animal - PNCRC de 2017**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Diário Oficial da União, 25/09/2019.

CANADÁ. **List of Maximum Residue Limits (MRLs) for Veterinary Drugs in Foods**, de 02 de Agosto de 2017. Disponível em: “<https://www.canada.ca/en/health-canada/services/drugs-health-products/veterinary-drugs/maximum-residue-limits-mrls/list-maximum-residue-limits-mrls-veterinary-drugs-foods.html>”, acesso em 02/01/2018.

CFR/USFD - Code of Federal Regulations US Food & Drug. **Tolerances for Residues of New Animal Drugs in Food**. Disponível em: “<https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?CFRPart=556>”, acesso em 01/02/2018.

CODEX - *Codex Alimentarius International Food Standard* - CAC/GL 40-1993. **Guidelines on Good Laboratory Practice in Residue Analysis, Codex Alimentarius Commission**, Joint FAO/WHO Food Standards Program, Roma, 2003.

CODEX - *Codex Alimentarius International Food Standard. Guidelines on Analytical Terminology* - CAC/GL 72-2009, v. 1, Roma, 2009.

CODEX - *Codex Alimentarius International Food Standard. Guidelines for the Design and Implementation of National Regulatory Food Safety Assurance Programmes Associated with the Use of Veterinary Drugs in Food Producing Animals* - CAC/GL 71-2009, v. 3, Roma, 2014.

CODEX, *Codex Alimentarius International Food Standard. Maximum residue limits (MRLS) and risk management recommendations (RMRS) for residues of veterinary drugs in foods*. CAC/MRL 2-2017, Roma, 2017.

CHIARADIA, M. C., COLLINS, C. H., JARDIM, I. C. S. F. O estado da arte da cromatografia associada à espectrometria de massas acoplada à espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimentos. **Quim. Nova**, São Paulo, v. 31, n. 3, p. 623-636, 2008.

CRLs - *Community Reference Laboratories Residues. CRLs view on state of the art analytical methods for national residue control plans, 2007*. Disponível em: “<http://www.rivm.nl/bibliotheek/digitaaldepot/crlguidance2007.pdf>”, acesso em 01/02/2018.

DECISÃO 2002/657/CE. Concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results. **Official Journal of the European Communities**, Bruxelas, L.221, p. 08–36, 2002 (Decision N° 2002/657/EC de 12 de Agosto de 2002).

DI DONNA, L. Determination of ketosteroid hormones in meat by liquid chromatography tandem mass spectrometry and derivatization chemistry. **Anal. Bioanal. Chem.** Itália, v. 407, p. 5835–5842, 2015.

FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations. Residues of some veterinary drugs in foods and animals. **FAO Food and Nutrition Papers 41**, 1987. Disponível em: “<http://www.fao.org/food/food-safety-quality/scientificadvice/jecfa/jecfa-vetdrugs/details/en/c/49/>”, acesso em 02/09/2019.

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. Residues of some veterinary drugs in foods and animals. **FAO Food and Nutrition Papers 41/12**. Monographs prepared by the fifty-second meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives: Roma, 2 - 11 Fevereiro, 1999. Disponível em: “<http://www.fao.org/docrep/014/X4259E/X4259E.pdf>”, acesso em 02/09/2019.

FERCHAUD, V., COURCOUX, P., LE BIZEC, B., MONTEAU, F., ANDRÉ, F. Enzymatic hydrolysis of conjugated steroid metabolites: search for optimum conditions using response surface methodology. **Analyst**, França, v.125, p.2255–2259, 2000.

GOMES, R., MEREDITH, W., SNAPEB, C. E., SEPHTON, M. A. Analysis of conjugated steroid androgens: Deconjugation, derivatisation and associated issues. **J Pharm. Biomed. Anal.**, Reino Unido, v.49, n.5, p. 1133-1140, 2009.

ISO - International Organization for Standardization. ISO 11843-2:2000. **Capability of detection-- Part 2: Methodology in the linear calibration case**. Genebra, 2000, 24p.

JAPÃO - The Japan Food Chemical Research Foundation. **Maximum Residue Limits (MRLs) List of Agricultural Chemicals in Foods**. Disponível em “[http://ffcr.sakura.ne.jp/pesticide\\_db/html/front/](http://ffcr.sakura.ne.jp/pesticide_db/html/front/)”, acesso em 01/02/2018.

KINSELLA, B., O’MAHONY, J., MALONE, E., MOLONEY, M., CANTWELL, H., FUREY, A., DANAHER, M. Current trends in sample preparation for growth promoter and veterinary drug residue analysis. **J. Chromatogr. A.**, Irlanda, v.1216, n.46, p.7977-8015, 2009.

KOOLE, A. **Multi-residue analysis of growth promoters in food-producing animals**. University Medical Center Groningen, Países Baixos, 1998. Disponível em: “<https://www.rug.nl/research/portal/files/3200311/c1.pdf>”, acesso em 22/01/2018.

LÓPEZ-GARCIA, M., ROMERO-GONZÁLEZ, R., GARRIDO, A. F. Determination of steroid hormones and their metabolite in several types of meat samples by ultra high performance liquid chromatography-Orbitrap high resolution mass spectrometry. **J. Chromatogr. A**, Espanha, v.1540, p.21-30, 2018.

MALONE, E. M., ELLIOTT, C. T., KENNEDY, D. G., REGAN, L. Development of a Rapid Method for the Analysis of Synthetic Growth Promoters in Bovine Muscle Using Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry. **Anal. Chim. Acta**, Reino Unido, v.637, n.1-2, p.112-120, 2009.

MARCHAND, P., LE BIZEC, B., MONTEAU, F., ANDRÉ, F. Ultra trace detection of a wide range of anabolic steroids in meat by gas chromatography coupled to mass spectrometry. **J. Chromatogr. A**, França, v.867, p. 219–233, 2000.

NETO, J. P., JUNIOR, A. M. P. **Relatório Técnico Referente ao Grupo de Trabalho constituído pela Portaria do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, no 40, de 08 de janeiro de 2006**. Disponível em “<http://www.agricultura.gov.br/assuntos>

[/insumos-agropecuarios/insumos-pecuarios/arquivos-deinsumospecuarios/RelatorioTecnicoGTII31\\_07\\_06.doc](http://www.agricultura.gov.br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-pecuarios/arquivos-deinsumospecuarios/RelatorioTecnicoGTII31_07_06.doc)”, acesso em 26/01/2018.

PEDERSEN, M., ANDERSEN, J. H. Confirmatory analysis of steroids in muscle using liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess**, Dinamarca, v.28, n.4, p.428-437, 2011.

SCARTH, J. P., *et al.* A review of analytical strategies for the detection of ‘endogenous’ steroid abuse in food production. **Drug Test Anal.**, Reino Unido, v.4, n.1, p.40-49, 2012.

SCHEUTWINKEL, M. **Validation on the basis of Commission Decision 2002/657/EC**. International Federation for Consulting GmbH, 2008. Disponível em: “<http://www.inmetro.gov.br/credenciamento/palestrasMercosul.asp>”, acesso em 30/01/2018.

SCHMIDT, K., STACHEL, C., GOWIK, P. Development and in-house validation of an LC-MS/MS method for the determination of stilbenes and resorcylic acid lactones in bovine urine. **Anal Bioanal Chem.**, Alemanha, v.391, p. 1199–1210, 2008.

SDA - Secretaria de Defesa Agropecuária. **Instrução Normativa SDA Nº 55, de 01 de dezembro de 2011**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Brasília, 2011.

SHOSHTARI, S. Z., WEN, J., ALANY, R. Octanol water partition coefficient determination for model steroids using an HPLC method. **Lett. Drug Des. Discov.**, Nova Zelândia, v.5, n.6, p.394-400, 2008.

VANHAECKE, L., *et al.* European analytical criteria: Past, present, and future. **J. AOAC Int**, Países Baixos, v.94, n.2, p.360-372, 2011.

VENTURA, R., *et al.* Detection of the administration of 17 $\beta$ -nortestosterone in boars by gas chromatography/mass spectrometry. **Rapid Commun. Mass Spectrom**, Espanha, v.22, n.12, p.1863-1870, 2008.

YOUNDEN, W. J., STEINER, E. H. **Statistical manual of the AOAC of Official Analytical Chemists**, AOAC-I, EUA, 1975.

WOZNIAK, B., ZUCHOWSKA, I. M., ZMUDZKI, J. Determination of stilbenes and resorcylic acid lactones in bovine, porcine and poultry muscle tissue by liquid chromatography–negative ion electrospray mass spectrometry and QuEChERS for sample preparation. **J. Chromatogr. B**, Polônia, v.940, p.15– 23, 2013.

ZHAO, C., YUE, Z., WU, H., LAI, F. Simultaneous determination of fourteen steroid hormone residues in beef samples by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Anal. Methods**, China, v.6, n.19, p.8030-8038, 2014.

## **Capítulo 3**

### **Desenvolvimento e Validação de um Método para Determinação de 25 Esteroides e Ésteres de Esteroides em Pelo Bovino**

### 3.1 INTRODUÇÃO

O monitoramento de medicamentos veterinários, em especial dos compostos de ação anabolizante, é tradicionalmente realizado em urina e fígado. No entanto, essas matrizes apresentam como desvantagens uma curta janela de detecção analítica, uma extensa biotransformação para a primeira e restrições quanto à amostragem *in vivo* para o fígado [ROCCA, 2017]. Uma alternativa promissora para fins de controle é a análise de pelo. Esta alternativa foi utilizada pioneiramente por BAUMGARTNER e colaboradores [1979], quando propuseram o monitoramento do abuso crônico de opiáceos em usuários de heroína através da análise de cabelo. No campo veterinário, o uso de pelo para o monitoramento de promotores de crescimento começou com a detecção de clenbuterol em pelo bovino em 2003 [JOHANSSON, 2003], seguido de esteroides e ésteres de esteroides em 2005 e 2006 [RAMBAUD, 2005; NIELEN, 2006].

O pelo é um apêndice corpóreo, caracterizado como um filamento proteico, formado principalmente por queratina, que cresce a partir de uma raiz localizada em uma cavidade da derme denominada folículo. Em sua superfície, o cabelo possui uma cobertura espessa que consiste em uma ou mais camadas de estruturas planas sobrepostas, denominadas cutículas, que funcionam para proteger e ancorar a haste capilar ao folículo [KINTZ, 2015]. As camadas de cutícula circundam o córtex, que contém quase toda a massa de fibras e proteínas fibrosas, consistindo de células em forma de fuso alinhadas longitudinalmente. Quimicamente, o pelo é uma rede polimérica reticulada, parcialmente cristalina, que contém diferentes grupos funcionais químicos com potencial para se ligarem a pequenas moléculas. É composto por aproximadamente 65-95% de proteínas, 15-35% de água, 1-9% de lipídios e 0,25-0,95% de minerais (UNODC, 2014).

As principais vantagens no monitoramento do pelo são a janela de detecção prolongada por até meses, a facilidade de coleta de amostras em animais vivos ou abatidos e a possibilidade de se rastrear de forma temporal o abuso de drogas, por meio de uma análise retrospectiva. Destaca-se também a possibilidade de detecção de medicamentos administrados não biotransformados, como os ésteres de esteroides intactos [KINTZ, 2018]. Esse último caso é particularmente útil quando são detectados esteroides como  $\beta$ BO,  $\beta$ TE,  $\beta$ ES e  $\beta$ NAN, uma vez que a possibilidade de produção endógena desses compostos impede uma conclusão final relacionada ao uso

medicamentoso. No entanto, quando o éster do esteroide é detectado, pode-se concluir que houve administração exógena, uma vez que as formas esterificadas são indubitavelmente sintéticas. No que se refere às formulações comerciais de anabolizantes, o uso de versões esterificadas de esteroides ajuda a prolongar seu efeito e ampliar a janela de detecção analítica, quando comparado aos esteroides não esterificados administrados por via oral [SCARTH, 2012]. O comprimento da cadeia lateral do éster determina a solubilidade em água do esteroide esterificado e, portanto, afeta sua biodisponibilidade. Ésteres de cadeias carbônicas curtas, como acetato (C2) e propionato (C3), são rapidamente transferidos da massa muscular para a corrente sanguínea, levando a concentrações circulantes relativamente altas e a uma rápida excreção. No caso dos ésteres de cadeias mais longas, como decanoato (C10) e undecilenato (C11), os esteroides são liberados lentamente em concentrações mais baixas, por um período de tempo mais longo (GRAY, 2018).

O mecanismo exato que leva à incorporação de fármacos no pelo não é completamente compreendido. No entanto, pressupõe-se uma combinação de diferentes processos, começando durante a sua formação por difusão sanguínea no folículo, além da incorporação a partir da secreção de glândulas apócrinas, do suor ou mesmo do sebo. Outros fatores devem ser cuidadosamente avaliados no que tange a essa matriz, como a cor do pelo analisado, uma vez que pigmentos como a melanina podem interferir nesse mecanismo (*melanine-binding*). Além desse, a região em que a amostra foi coletada deve ser especificada, bem o procedimento usado para a coleta (corte com tesoura, uso de lâmina de tricotomia ou tosa) [KINTZ, 2015; 2018].

A primeira etapa recomendada para a análise de pelo é a descontaminação da amostra por meio de lavagem com uma fase predominantemente aquosa, contendo um solvente orgânico. Dessa forma, qualquer contaminante externo, que possa levar a um resultado falso positivo, deve ser eliminado, sem causar perdas dos analitos de interesse [MANTINIEKS, 2018]. A etapa subsequente é a homogeneização, com o objetivo de se aumentar a área superficial exposta aos agentes de extração. Usualmente, o pelo é fracionado com tesoura em comprimentos de 1 a 3 mm, ou efetua-se a moagem com auxílio de um moinho de bolas ou criogênico [AQAI, 2009]. A extração da amostra deve ser capaz de liberar os analitos alvo de uma matriz composta predominantemente por proteínas (65-95%), e com baixo teor de gordura (1-9%). Diferentes agentes de

extração foram descritos na literatura para esse fim, destacando-se o uso de metanol devido à sua eficácia tanto em relação aos compostos hidrofílicos quanto aos lipofílicos [GAO, 2016; UNODC, 2014]. A extração utilizando soluções aquosas ácidas ou soluções tamponadas também foi relatada, geralmente realizada sob digestão com aquecimento [GRAY, 2018; FABRESSE, 2017; KWOK, 2017]; a digestão básica também tem sido empregada [DESHMUKH, 2012; LEPORATI, 2014]. Os procedimentos de limpeza para purificação dos extratos, antes da análise instrumental, também são relatados, empregando-se especialmente LLE [GRAY, 2018; SHAH, 2014] ou SPE [DEVI, 2018; KOWK, 2017]. A maioria dos métodos utilizam baixos valores de massas para as amostras em análise, de até 300 mg, devido à baixa densidade dessa matriz, o que corresponde a baixas concentrações disponíveis para detecção dos analitos relacionados. Nesse sentido, a derivatização química tem sido empregada com sucesso para aumentar as respostas instrumentais, especialmente no caso de compostos fracamente ionizáveis como ésteres de esteroides [ATHANASIADOU, 2013; HIGASHI, 2016].

Este capítulo apresenta o estudo das condições de extração e detecção de esteroides e ésteres de esteroides em pelo bovino, bem como a validação de um método quantitativo para a determinação desses analitos. Tal procedimento apresenta-se como uma alternativa à análise de urina e fígado para o monitoramento de anabolizantes, em especial os de origem endógena.

## **3.2 EXPERIMENTAL**

### **3.2.1 Padrões e Soluções Padrão**

As informações referentes aos padrões analíticos utilizados neste trabalho, como abreviaturas, fórmulas estruturais e fabricantes, estão descritas no Apêndice I.

Soluções estoque individuais dos analitos estudados e padrões internos foram preparadas em uma concentração aproximada de 200  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , dissolvendo a massa de cada composto em metanol. As soluções de trabalho foram preparadas misturando-se as soluções estoque individuais, e diluindo-as em metanol da seguinte forma: 0,005  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de ATR, BZT, FPT, IST e PPT; 0,0075  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de ATE, CPB, DET e FPN; 0,0010  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de ACC, ACM, AME, AMG, BET, BNA, UNB e NOT; 0,020  $\mu\text{g mL}^{-1}$

mL<sup>-1</sup> de BAD, ETN e MTT; 0,030 µg mL<sup>-1</sup> de DRO e MTD; 0,040 µg mL<sup>-1</sup> de MTN; 0,060 µg mL<sup>-1</sup> de ETE; e 0,10 µg mL<sup>-1</sup> de DET.

Para os padrões deuterados foi utilizada uma concentração de 0,006 µg mL<sup>-1</sup> para a solução de trabalho de FPT-d3 e PPT-d3. Para βBO-d3, βESd3, AME-d3, DET-d3 e BZT-d3 empregou-se uma concentração de 0,009 µg mL<sup>-1</sup>, e para CPT-d3 uma concentração final de 0,012 µg mL<sup>-1</sup>.

### 3.2.2 Reagentes e Soluções

Empregaram-se reagentes de grau analítico durante todos os procedimentos de desenvolvimento analítico e validação. O ácido fórmico foi adquirido da Panreac (Barcelona, Espanha). Ácido acético glacial, ácido clorídrico, hidrocloreto de metoxiamina (MOX), acetato de sódio (NaOAc), hidróxido de sódio (NaOH), cloridrato de tris (2-carboxietil) fosfina (TCEP) e tris-hidroximetil aminometano (*Trizma base* - TRIS) foram obtidos da Sigma Aldrich (St. Louis, EUA). Os solventes de grau HPLC: ACT, ACN, clorofórmio (CLF), EtOAc, éter metil terc-butílico (MTBE) e metanol foram adquiridos da J.T Baker (Center Valley, EUA). HEX foi adquirido da Loba Chemie (Mumbai, Índia). Água ultrapura foi gerada por Gehaka, Master Sigma 100 (Gehaka, São Paulo, Brasil).

A solução tampão de NaOAc (0,2 mol L<sup>-1</sup>) foi preparada dissolvendo 16,4 g de acetato de sódio anidro em 1000 mL de água ultrapura, ajustando-se o pH em 5,2 por meio da adição de ácido acético glacial. A solução TRIS para ajuste de pH foi preparada na concentração de 2,0 mol L<sup>-1</sup> a partir da dissolução de 242 g do sal em 900 mL de água, com posterior ajuste do pH com NaOH ou HCl, completando-se o volume para 1000 mL ao final do ajuste. A solução derivatizante MOX foi preparada na concentração de 4,8 mg mL<sup>-1</sup> do reagente em metanol/água (4:1 v/v).

### 3.2.3 Instrumentação e Materiais

Utilizou-se o mesmo sistema LC-MS/MS que o apresentado na Tabela 2.1 do Capítulo 2. A separação cromatográfica foi realizada na coluna Acquity UPLC BEH C18 (100 x 2,1 mm, 1,7 µm) equipada com pré-coluna Acquity UPLC BEH VanGuard C18 (5,0 x 2,1 mm, 1,7 µm) (Waters Corporation, Milford, EUA). A vazão utilizada foi de 0,300 mL min<sup>-1</sup> e a temperatura da coluna foi mantida em 55 °C. Utilizou-se um gradiente de eluição com solvente A (água ultrapura acidificada com 0,1% v/v de ácido

fórmico) e solvente B (ACN acidificada com 0,1% v/v de ácido fórmico) da seguinte forma: de 0 a 0,5 min a porcentagem de B foi mantida em 65% e aumentada linearmente para 100% até 7 min; de 7 a 12 min esse percentual foi mantido constante e de 12,0 a 12,1 diminuiu linearmente para 65%. De 12,1 a 18,0 min, o percentual de B foi mantido constante em 65%. O volume de injeção foi de 25  $\mu$ L.

### **3.2.4 Condições Espectrométricas**

A obtenção dos parâmetros empregados na detecção dos analitos envolveu o preparo de uma solução individual contendo cerca de 10 ng mL<sup>-1</sup> de cada analito em metanol, que foi evaporada por aquecimento a 45 °C em fluxo de ar, e reconstituída com 1 mL da solução derivatizante MOX em tubos de vidro com tampa de rosca. Após aquecimento em bloco a 80 °C por 1h, foram adicionados 1 mL de água ultrapura e 1 mL de HEX aos tubos, que foram agitados em vórtex e a camada orgânica foi transferida para outro tubo de vidro de 10 mL e evaporada a 45 °C sob fluxo de ar. O extrato final foi reconstituído em 1 mL de ACN/água (65:35 v/v) acidificado com 0,1% v/v de ácido fórmico, transferido para uma seringa de infusão e injetado em vazão de 10  $\mu$ L min<sup>-1</sup> no espectrômetro de massas, conforme descrito no item 2.2.4 do Capítulo 2. As condições espectrométricas otimizadas foram: temperatura do bloco da fonte em 650 °C com voltagem do capilar igual a 5 kV, gás nitrogênio utilizado como agente de dessolvatação e gás nebulizador com vazões de 50 psi, e argônio usado como gás de colisão com vazão de 6 psi. A detecção foi operada no modo SRM.

### **3.2.5 Preparo de Amostra**

As amostras de pelo foram lavadas inicialmente usando uma mistura de água/metanol (80:20 v/v) e secas durante a noite em incubação a 50 °C. Posteriormente, realizou-se a moagem dos fios, usando um moinho ultracentrífugo Retsch ZM-200 (Newtown, EUA). Duzentos e cinquenta (250) mg de pelo moído foram pesados em tubo plástico com tampa de rosca de 50 mL, ao qual foram adicionados 300  $\mu$ L da solução de trabalho deuterada. Um volume de 7 mL de metanol foi adicionado a cada amostra, que foi agitada em vórtex por 30 s, sonicada em banho de ultrassom por 15 min e incubada a 50 °C por 1 h. Posteriormente, 3 mL de água ultrapura foram adicionados, seguido de homogeneização em um agitador horizontal por 5 min. As amostras foram centrifugadas a 2700 g por 30 min a 4 °C, os sobrenadantes foram então

transferidos para tubos de 15 mL e evaporados em um concentrador de amostras a 45 °C, sob fluxo de ar, até o volume final inferior a 3 mL. Aos tubos de 15 mL contendo as fases aquosas restantes foram adicionados 1 mL de HEX, seguido de agitação em vórtex por 20 s e centrifugação a 2700 g por 15 min a 4 °C. Esse procedimento foi repetido mais uma vez e as camadas de HEX sobrenadantes foram combinadas em outro tubo de vidro de 15 mL, e evaporadas até a secura a 45 °C sob fluxo de ar. Cento e vinte (120) µL da solução derivatizante MOX foram adicionados a cada tubo, que foram agitados em vórtex por 30 s. Os tubos foram tampados com tampas de rosca e aquecidos em forno micro-ondas doméstico - Philco PMS25N2 (Pensilvânia, EUA) - a 70% de potência por 18 s. Após um intervalo de 1 min, os tubos foram novamente aquecidos por mais 18 s. Aos extratos derivatizados foram adicionados 1 mL de água ultrapura e 1 mL de HEX, com posterior agitação em vórtex por 20 s e transferência da camada orgânica para um tubo de vidro de 10 mL. A partição foi repetida usando mais 1 mL de HEX, e as camadas orgânicas combinadas foram evaporadas a 45 °C sob fluxo de ar. O extrato final foi reconstituído com 120 µL de ACN/água (65:35 v/v), acidificado com 0,1% v/v de ácido fórmico. Os extratos finais (25 µL) foram injetados no sistema LC-MS/MS no modo de ionização ESI<sup>+</sup>.

### 3.2.6 Estudos de Extração

Duas amostras de pelo bovino foram utilizadas para avaliação da eficiência de extração de diferentes procedimentos avaliados. As amostras foram provenientes de um procedimento de experimentação animal realizado no Rikilt (Wageningen, Países Baixos), em que ésteres de anabolizantes foram implantados em animais bovinos (*Research study for steroid esters in bovine hair – Rikilt/2017*). Uma amostra de pelo bovino continha BET com um valor de concentração consensual de 14 µg kg<sup>-1</sup>, e uma segunda amostra continha FPN com um valor de concentração consensual de 1,9 µg kg<sup>-1</sup>. As amostras foram pesadas em diferentes tubos e submetidas aos seguintes testes de pré-tratamento: 1) 0,1 mol L<sup>-1</sup> de HCl (DESHMUKH, 2010); 2) 0,1 mol L<sup>-1</sup> de tampão NaOAc (pH = 5,2) (FABRESSE, 2017); 3) 0,1 mol L<sup>-1</sup> de NaOH (LEPORATI, 2014; SHAH, 2014); 4) 0,1 mol L<sup>-1</sup> de TCEP (NIELEN, 2011); e 5) 0,1 mol L<sup>-1</sup> da solução TRIS (pH = 9,5) (BREIDI, 2012). Devido à indisponibilidade de material não foram preparadas replicatas genuínas para os testes citados.

Após a lavagem das amostras e adição da solução de trabalho deuterada, adicionaram-se 7 mL dos reagentes de pré-tratamento citados com posterior sonicação durante 15 min, e incubação posterior durante 1 h a 50 °C. Um experimento adicional também foi realizado, no qual 7 mL de metanol foram adicionados às amostras, em vez das soluções aquosas citadas; sendo que após sonicação e incubação em condições iguais, 3 mL de água ultrapura foram adicionados aos tubos e o metanol foi evaporado sob fluxo de ar a 50 °C. Em seguida, a extração da amostra prosseguiu como descrito em 3.2.5 e as áreas dos picos cromatográficos de cada analito foram comparadas.

### **3.2.7 Purificação dos Extratos - *Clean-up***

Após selecionar a melhor condição de extração dentre os testes realizados, diferentes métodos de limpeza para remoção de compostos interferentes advindos da matriz também foram avaliados: SPE, LLE e microextração líquido-líquido dispersiva (*Dispersive Liquid-Liquid Microextraction - DLLME*).

O primeiro procedimento consistiu em uma abordagem de SPE desenvolvida no LFDA-MG, para participação no estudo colaborativo promovido pelo Rikilt, citado no item 3.2.6. Foi empregado um cartucho HLB (*Hydrophilic-Lipophilic Balance*) - Sigma Aldrich (St. Louis, EUA) - previamente condicionado com 5 mL de metanol e 5 mL de água. Os extratos aquosos remanescentes após a evaporação do metanol, conforme descrito em 3.2.5, foram adicionados aos cartuchos, que foram posteriormente lavados com 5 mL de água e 5 mL de metanol/água (55: 45 v/v). Os analitos foram eluídos consecutivamente com 2 mL de ACN, seguidos por 2 mL de EtOAc e 1,5 mL de ACT em tubos de vidro, e os extratos foram evaporados até a secura a 45 °C sob fluxo de ar. Uma reação de derivatização com MOX foi realizada e o procedimento foi conduzido como descrito em 3.2.5.

Para a avaliação de LLE, 1 mL de misturas dos solventes HEX, EtOAc e MTBE (Tabela 3.2) foi adicionado aos extratos aquosos restantes após a evaporação do metanol, como descrito no item 3.2.5. Tomou-se por base o procedimento descrito por GRAY e colaboradores em 2018, que emprega uma mistura de EtOAc/MTBE (1:1 v/v) durante a etapa de LLE; o procedimento descrito por LEPORATI e parceiros em 2014, que emprega MTBE durante essa etapa; o procedimento apresentado por KWOK *et al.* e

DEVI (2018), que utilizam a mistura HEX/EtOAc (7:3 v/v); e o procedimento desenvolvido por SHAH *et al.* (2014) que utiliza HEX na etapa de LLE.

Os solventes orgânicos foram agitados em vórtex durante 30 s, juntamente com a fase aquosa e centrifugados a 2700 g durante 10 min a 4 °C. Esse procedimento foi repetido e as fases do sobrenadante contendo os analitos foram transferidas para tubos de vidro, sendo evaporadas até a secura a 45 °C sob fluxo de ar, com posterior derivatização com o reagente MOX.

A avaliação por DLLME envolveu o uso de misturas de solventes dispersores (metanol, ACT e ACN) e extratores (CLF e HEX), baseados nas recomendações dessas misturas apresentadas por MOUSAVI *et al.* (2018) e REZAEI *et al.* (2010) (Tabela 3.2). Os volumes dos solventes extratores foram fixados em 200 µL, e em 250 µL para os solventes dispersores. Após a evaporação do metanol, como descrito em 3.2.5, ambos os solventes foram misturados e introduzidos no extrato aquoso contendo os analitos como um jato pulsado, com o auxílio de uma micropipeta. O sistema foi agitado em vórtex por 30 s e centrifugado a 2700 g por 10 min a 4 °C. As fases extratoras compostas por HEX foram removidas da camada superior do sistema, usando-se uma micropipeta, e transferidas para um tubo de vidro. As fases formadas por CLF foram transferidas da parte inferior dos tubos de extração, devido à sua maior densidade. A evaporação das fases extratoras foi efetuada a 45 °C sob fluxo de ar, realizando-se, em seguida, a derivatização com o reagente MOX.

### **3.2.8 Validação**

A validação foi realizada em conformidade com o Manual de Garantia da Qualidade Analítica – Resíduos e Contaminantes em Alimentos, do MAPA (BRASIL, 2011). As figuras de mérito avaliadas foram: linearidade, recuperação, precisão (repetibilidade e precisão intermediária), CC $\alpha$ , CC $\beta$ , incerteza, robustez e seletividade. Os LMDRs foram indicados para os compostos estudados, levando em consideração seu uso proibido como promotores de crescimento.

Uma novilha de dois anos de idade, dois bezerros de seis meses e dois touros de dois anos de idade foram criados em condições de controle sem tratamento hormonal, para fornecimento de amostras brancas durante a validação. Amostras de pelo de comprimento e cores variadas foram coletadas da região do pescoço e da garupa dos

animais, usando-se uma lâmina de tricotomia. As regiões retangulares resultantes da coleta na região do pescoço dos animais estão representadas na Figura 3.1. Em seguida as mesmas foram lavadas e trituradas conforme descrito em 3.2.5, e posteriormente misturadas para formar um material branco representativo.



**Figura 3.1:** Representação da coleta de pelo por tricotomia na região pescoço dos animais

### **3.2.8.1 Linearidade**

Assumiu-se a ocorrência de efeito de matriz para o método desenvolvido, empregando-se assim curvas de calibração matrizadas com a adição dos padrões analíticos antes do procedimento de extração. A faixa de trabalho compreendeu os níveis: 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 3,0 e 4,0 x LMDR de cada analito, correspondendo aos seguintes volumes da solução de trabalho: 50,0; 100,0; 150,0; 200,0; 300,0 e 400,0  $\mu\text{L}$ . Para os compostos BAD, DRO, ENT, MTD e NOT, a faixa de trabalho foi de: 1,0; 1,5; 2,0; 3,0; 4,0 e 5,0 x LMDR. A resposta instrumental utilizada foi a razão entre a área dos picos cromatográficos e a área dos padrões internos deuterados correspondentes. Cada ponto da curva foi preparado em triplicata genuína e extraído de acordo com o procedimento descrito em 3.2.5. Os valores discrepantes - *outliers*- dos dados obtidos foram detectados pelo teste de Grubbs, e excluídos, ao nível de confiança de 99%.

### **3.2.8.2 Recuperação e Precisão**

Amostras brancas foram fortificadas com a solução de trabalho em três níveis de concentração, correspondentes a 1,0, 2,0 e 3,0 x LMDR de cada analito, com seis repetições em cada nível de concentração (18 amostras no total). Também foi preparada

uma curva de calibração no mesmo dia para estimar as respectivas concentrações. Esse procedimento foi realizado em dois dias diferentes por um analista e num terceiro dia por outro, caracterizando as condições de precisão intermediária.

### **3.2.8.3 Limite de Decisão, Capacidade de Detecção e Incerteza de Medição**

Os valores de  $CC\alpha$  e  $CC\beta$  foram calculados por meio da fortificação de 20 amostras no respectivo LQ de cada analito, conforme descrito no item 2.2.7.4 do Capítulo 2. A incerteza de medição foi estimada usando a metodologia *Top-Down* (YOUNDEN, 1975), considerando a incerteza relativa às curvas de calibração elaboradas durante a validação, combinada com a incerteza relacionada aos ensaios de precisão intermediária, de acordo com procedimento descrito no item 2.2.7.3 do Capítulo 2.

### **3.2.8.4 Robustez e Seletividade**

O procedimento para avaliação da robustez envolveu a fortificação de 8 amostras no LMDR de cada analito, calculando-se as respectivas concentrações e o desvio padrão das diferenças pela abordagem de Youden (BRASIL, 2011; YOUNDEN, 1975), descrita no item 2.2.7.7 do Capítulo 2. Os fatores experimentais avaliados nesse estudo, seguindo a apresentação das Tabelas 2.2 e 2.3 do Capítulo 2, foram o tempo de centrifugação após a extração com metanol (A = 30 min, a = 20 min), temperatura de evaporação do metanol (B = 45 °C, b = 50 °C) e temperatura de centrifugação após a LLE com HEX (C = 4 °C, c = 20 °C).

Conforme descrito no item 2.2.7.6 deste trabalho, seguiram-se as recomendações expressas no item VI.1.2 do Manual de Garantia da Qualidade Analítica (BRASIL, 2011) para avaliação da seletividade. Por essa abordagem, amostras brancas foram analisadas durante todo o processo de otimização e validação, evidenciando-se a ausência de sinal analítico nos tempos de retenção característicos dos analitos estudados. Além dessa observação, adicionaram-se 25,0  $\mu\text{L}$  de uma solução metanólica de avermectinas a amostras de pelo bovino. Utilizou-se uma concentração de 10,0  $\mu\text{g mL}^{-1}$  desses compostos, correspondendo à concentração em pelo de 10,0  $\mu\text{g kg}^{-1}$  de abamectina, doramectina, eprinomectina, ivermectina e moxidectina, obtidos da LG Standards (Augsburgo, Alemanha). Três amostras foram fortificadas em cada um dos 3 níveis de concentração apresentados no item 3.2.8.2 (1,0; 2,0 e 3,0 LMDR), totalizando 9 amostras contaminadas com avermectinas. As recuperações das mesmas foram

comparadas com as de 9 amostras fortificadas apenas com os anabolizantes, igualmente distribuídas entre os 3 níveis de concentração estudados, utilizando o teste F (Snedecor) de homogeneidade de variâncias e o teste t de Student para comparação das médias.

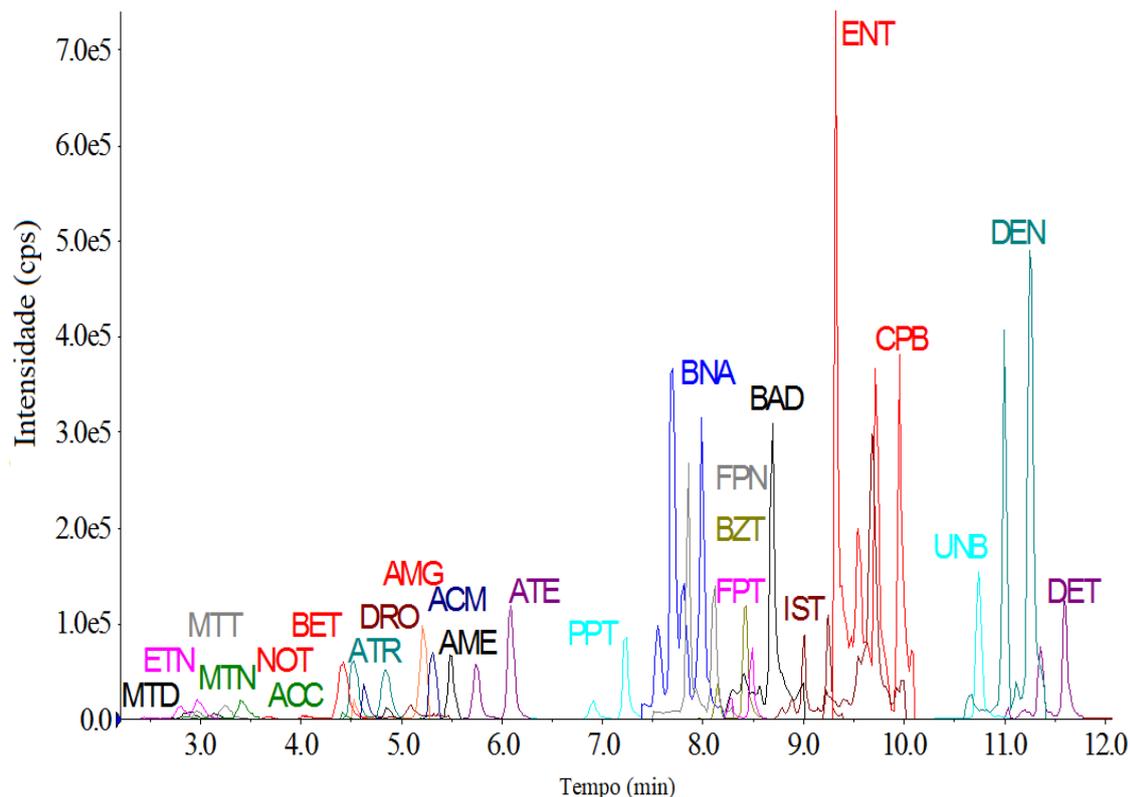
### **3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

#### **3.3.1 Condições Espectrométricas e Cromatográficas**

Os analitos foram detectados empregando o modo SRM, sendo que as transições selecionadas, as razões de íons calculadas para as mesmas e os parâmetros PD, EC e PSC são apresentados no Apêndice III.

A reação de derivatização realizada levou à formação de dois produtos diastereoisômeros, que foram cromatograficamente separados para ACC, AME, ATE, AME-d3, ATR, AMG, ACM, BNA, BZT, BZT-d3, CIP-d3, DEN, DET, DET-d3, ENT, FPN, FPT, FPT-d3, MTD, MTT, MTT-d3, NOT, IST, PPT e PPT-d3. Para fins de praticidade, o pico relacionado ao maior tempo de retenção foi selecionado para ser integrado para todos os analitos. Porém, para ATR e NOT essa integração envolveu ambos os picos cromatográficos uma vez que os parâmetros de linearidade e precisão apresentaram melhor desempenho quando do uso dos dois sinais analíticos concomitantemente. Em virtude da presença de picos duplicados referentes a esses isômeros, uma melhor separação cromatográfica para os mesmos foi obtida com o uso de uma coluna cromatográfica de maior comprimento (100 mm) e menores tamanho de partícula (1,7  $\mu\text{m}$ ) e diâmetro (2,1 mm), do que na coluna utilizada no Capítulo 2 (50 x 3,0 mm, 1,8  $\mu\text{m}$ ). Nesse caso, a eficiência de uma coluna cromatográfica é comumente medida pelo número de pratos teóricos da mesma, que por sua vez é inversamente proporcional à altura equivalente a um prato (H), que possui uma relação inversa com o comprimento da coluna cromatográfica (LANÇAS, 2011). De acordo com a equação de Van Deemter (MALDANER, 2009), há ainda uma relação direta entre H e o diâmetro interno e o tamanho de partícula de uma coluna cromatográfica.

O cromatograma de íons extraídos para uma amostra branca fortificada no LMDR de cada analito, nas condições otimizadas descritas nos itens 3.2.3 e 3.2.4, é apresentado na Figura 3.1.



**Figura 3.2:** Cromatograma de íons extraídos referente a uma amostra branca de pelo bovino fortificada no LMDR de cada analito e extraída pelo procedimento desenvolvido

### 3.3.2 Preparo de Amostra

As amostras de pelo, após a coleta, podem conter suor, poeira, lama e outros contaminantes externos, que devem ser removidos por meio de uma lavagem prévia a extração da amostra, sem causar perda dos analitos de interesse. AQAI e colaboradores (2009) propuseram a lavagem das amostras com água/metanol (80:20 v/v), e esse foi o procedimento adotado no presente trabalho. O pelo foi imerso na solução de lavagem ou lavado sob fluxo dessa solução, dependendo da quantidade de matriz.

### 3.3.3 Estudos de Extração

Após a lavagem do pelo, outra prática comumente descrita na literatura é um procedimento para ruptura da matriz e liberação dos analitos presentes nas partes internas de sua estrutura. Diferentes metodologias foram avaliadas a partir de amostras de pelo contendo BET e FPN: digestão com TCEP (GROOT, 2012; NIELEN, 2011), NaOH [LEPORATI, 2014], HCl (PIZZATO, 2007) e com os tampões NaOAc [KINTZ, 2018; CHOI, 2018] e TRIS (KINTZ, 2015). O solvente metanol, em vez das soluções aquosas citadas, foi avaliado como um agente de extração e ruptura da matriz, devido à

sua capacidade de precipitação de proteínas, penetração na mesma e baixo ponto de ebulição para fins de evaporação (UNODC, 2014; GAO, 2016). A Tabela 3.1 apresenta as áreas dos picos cromatográficos dos analitos observados após cada pré-tratamento avaliado.

**Tabela 3.1:** Áreas detectadas para amostras contendo naturalmente BET e FPN submetidas a diferentes pré-tratamentos

Ensaio	Área (cps)	
	BET	FPN
Metanol	1,0 x 10 <sup>6</sup>	4,3 x 10 <sup>5</sup>
HCl 0,1 mol L <sup>-1</sup>	4,1 x 10 <sup>5</sup>	1,3 x 10 <sup>5</sup>
NaOAc 0,1 mol L <sup>-1</sup>	2,0 x 10 <sup>5</sup>	2,3 x 10 <sup>5</sup>
NaOH 0,1 mol L <sup>-1</sup>	ND	ND
TCEP 0,1 mol L <sup>-1</sup>	3,3 x 10 <sup>5</sup>	2,3 x 10 <sup>5</sup>
TRIS 0,1 mol L <sup>-1</sup>	5,1 x 10 <sup>5</sup>	3,5 x 10 <sup>5</sup>

ND: Analito não detectado

Pôde-se notar que o uso da digestão básica com NaOH levou a uma perda completa do sinal dos analitos BET e FPN, o que pode ter ocorrido devido a uma conversão dos ésteres em sais ou outros produtos não detectados, o que já foi evidenciado por GAO *et al.* em 2016. As condições básicas relativas ao uso da solução TRIS 2,0 mol L<sup>-1</sup>, em pH igual a 9,5, não levaram a uma perda completa do sinal desses compostos. Quanto às condições ácidas, a digestão usando tampão NaOAc, em pH igual a 5,2, levou a maiores áreas detectadas para FPN em comparação com HCl, e o efeito oposto foi observado para o composto BET. O reagente TCEP não exibiu vantagem em relação aos demais reagentes aquosos testados, para os dois analitos estudados. Observou-se, porém, que o uso de metanol como solvente de extração resultou nas maiores áreas para os dois analitos e, portanto, esse solvente foi selecionado. Esse resultado está em consonância com a literatura recente, que aponta o uso frequente de metanol durante os procedimentos de extração na matriz pelo (GAO, 2016).

### 3.3.4 Purificação dos Extratos - *Clean-up*

O método SPE usando cartucho HLB foi testado e comparado com outros métodos que poderiam ser facilmente implementados em uma rotina analítica, evitando-se os elevados custos de aquisição desses cartuchos de extração: LLE e DLLME [MOUSAVI, 2018]. Na abordagem de LLE, após a realização da extração conforme descrito em 3.2.5, diferentes solventes e misturas de solventes foram adicionados ao extrato aquoso remanescente da evaporação do metanol, com base em diferentes protocolos descritos na literatura (GRAY, 2018; LEPORATI, 2014; KWOK, 2017 e SHAH, 2014).

A outra abordagem estudada foi a DLLE, que é considerada uma LLE miniaturizada com base na partição dos analitos, utilizando uma mistura de solventes dispersor e extrator [MOUSAVI, 2018; REZAEI, 2010]. Em todos os testes, os volumes de solvente extrator foram fixados em 200  $\mu\text{L}$  e o solvente do dispersor em 250  $\mu\text{L}$ . Menores volumes desses solventes não levaram a uma separação de fases bem definida. Os testes H e L (Tabela 3.2) foram realizados sem o uso do solvente dispersor, para avaliar sua significância.

Como um grande número de analitos foi avaliado simultaneamente, a soma ponderada das áreas dos picos cromatográficos foi calculada em cada ensaio. Para cada analito, essa resposta ponderada correspondeu à divisão da área obtida em cada experimento pela área média calculada para esse composto. Uma soma ponderada para cada ensaio foi então calculada, sendo que maiores valores da mesma correspondem a maiores eficiências de partição e purificação dos extratos. Os analitos DRO, ENT, ETN, MTD, MTN, MTT e NOT não foram avaliados neste estudo, pois foram adicionados ao desenvolvimento do método em um estágio posterior. Todos os ensaios citados foram realizados em duplicatas genuínas, e a Tabela 3.2 apresenta os valores de áreas obtidos, com os seus respectivos desvios padrão entre parênteses, e as somas ponderadas calculadas para os diferentes experimentos.

**Tabela 3.2:** Soma ponderada das áreas medidas para avaliação de diferentes estratégias de purificação da matriz pelo bovino (continua)

Clean-up	Áreas (x 10 <sup>4</sup> cps)																		Soma
	ACC	ACM	AME	AMG	ATE	ATR	BAD	BET	BNA	BZT	CPB	DEN	DET	FPN	FPT	IST	PPT	UNB	
SPE A) HLB	3,2 (0,4)	4,5 (0,7)	4,3 (0,8)	10,9 (1,3)	3,2 (0,4)	3,9 (0,4)	19,2 (3,9)	1,0 (0,2)	7,7 (1,3)	1,5 (0,2)	4,8 (0,9)	10,2 (2,4)	3,2 (0,6)	6,4 (1,5)	2,1 (0,1)	3,4 (0,7)	2,7 (0,7)	4,3 (0,7)	21,1
B) HEX	3,4 (0,2)	2,4 (0,4)	5,3 (0,6)	11,9 (1,6)	4,5 (0,3)	5,3 (0,7)	20,7 (0,5)	2,2 (0,5)	15,7 (3,1)	2,8 (0,8)	9,4 (2,2)	13,3 (3,7)	6,1 (0,5)	8,3 (1,0)	2,3 (0,2)	4,1 (0,7)	2,9 (0,1)	4,0 (0,9)	26,6
C) HEX/EtOAc (7:3 v/v)	4,1 (0,5)	1,9 (0,6)	4,9 (0,6)	14,1 (0,9)	3,2 (0,5)	5,9 (0,8)	19,2 (1,8)	1,7 (0,4)	13,3 (2,8)	2,9 (0,2)	10,5 (1,5)	14,0 (2,2)	6,4 (0,9)	8,4 (1,3)	2,4 (0,5)	3,9 (0,2)	2,3 (0,4)	4,3 (0,6)	26,1
D) MTBE	2,9 (0,3)	1,4 (0,3)	5,1 (0,8)	9,7 (1,4)	3,5 (0,7)	5,1 (1,0)	19,5 (3,8)	1,5 (0,4)	12,5 (2,0)	2,6 (0,5)	9,2 (1,0)	10,3 (2,1)	3,3 (1,5)	7,3 (1,0)	2,0 (0,7)	3,7 (0,5)	2,3 (0,3)	3,0 (0,4)	21,6
E) HEX/MTBE (7:3 v/v)	3,0 (0,6)	1,6 (0,1)	4,2 (0,7)	9,2 (1,3)	4,0 (0,3)	5,7 (0,9)	16,4 (2,4)	1,9 (0,5)	9,6 (1,2)	2,0 (0,5)	6,2 (2,1)	9,4 (1,7)	3,2 (0,8)	4,6 (1,4)	1,5 (0,1)	2,5 (0,6)	2,1 (0,9)	2,7 (0,3)	19,0
F) EtOAc	2,9 (0,7)	1,8 (0,5)	4,5 (0,5)	9,4 (2,5)	3,5 (0,7)	5,9 (0,6)	13,8 (1,2)	1,5 (0,4)	9,8 (2,0)	1,9 (0,4)	4,3 (1,2)	7,6 (1,1)	2,8 (0,3)	5,5 (0,8)	1,6 (0,6)	2,8 (0,3)	2,1 (0,6)	2,6 (0,2)	18,1
G) MTBE/EtOAc (1:1 v/v)	3,7 (0,5)	1,8 (0,2)	5,0 (0,6)	12,3 (1,8)	3,3 (0,7)	5,0 (0,9)	21,4 (2,6)	1,6 (0,7)	13,7 (1,8)	3,1 (0,6)	10,2 (1,7)	13,1 (2,0)	5,4 (0,7)	7,9 (1,1)	2,5 (0,4)	4,4 (0,8)	2,5 (0,5)	4,0 (0,4)	25,4

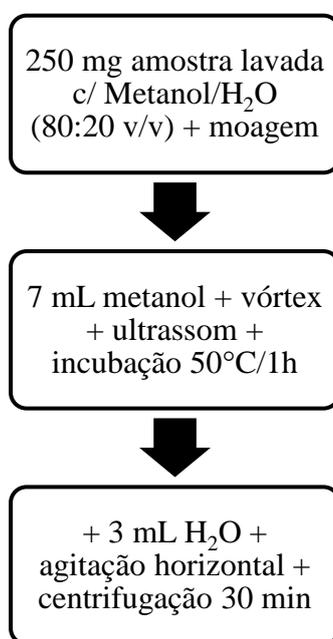
**Tabela 3.2:** Soma ponderada das áreas medidas para avaliação de diferentes estratégias de purificação da matriz pelo bovino (conclusão)

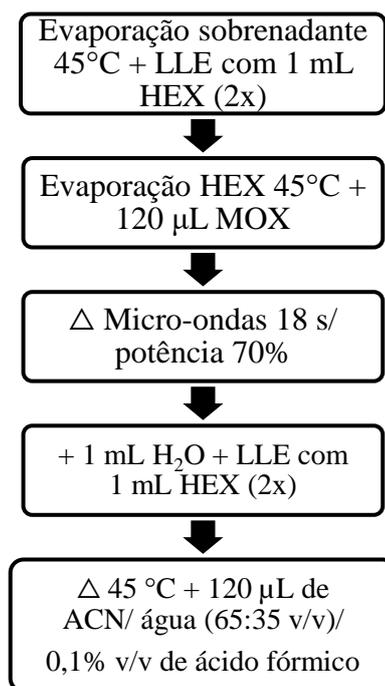
Clean-up	Área (x 10 <sup>4</sup> cps)																		Soma
	ACC	ACM	AME	AMG	ATE	ATR	BAD	BET	BNA	BZT	CPB	DE N	DET	FPN	FPT	IST	PPT	UNB	
H) HEX	3,9 (0,7)	2,5 (0,5)	5,9 (1,1)	10,5 (1,9)	5,3 (1,0)	5,7 (0,7)	18,2 (3,0)	2,6 (0,8)	10,7 (1,8)	2,7 (0,7)	6,8 (1,8)	3,5 (0,7)	0,9 (0,1)	7,7 (1,0)	1,2 (0,2)	2,4 (0,5)	1,3 (0,2)	2,2 (0,4)	19,7
I) HEX/ACN	4,6 (0,8)	2,6 (0,5)	8,0 (1,3)	17,0 (2,8)	3,6 (0,9)	4,0 (1,1)	7,4 (1,9)	2,0 (0,6)	5,6 (0,9)	1,2 (0,2)	3,2 (0,4)	1,3 (0,2)	0,3 (0,2)	3,3 (0,3)	1,4 (0,3)	1,7 (0,2)	1,7 (0,2)	0,6 (0,1)	15,1
J) HEX/ACT	3,0 (0,7)	1,8 (0,4)	5,1 (0,9)	10,6 (2,0)	2,9 (1,0)	3,4 (0,6)	7,0 (0,9)	1,4 (0,3)	5,6 (0,7)	1,1 (0,2)	2,7 (0,4)	2,3 (0,5)	0,6 (0,1)	3,0 (0,4)	1,1 (0,2)	1,5 (0,3)	1,2 (0,2)	0,9 (0,3)	11,9
DLLME K) HEX/ Metanol	0,9 (0,2)	0,6 (0,2)	1,3 (0,2)	2,7 (0,3)	2,3 (0,4)	1,9 (0,3)	11,6 (2,1)	1,1 (0,2)	6,8 (0,8)	1,2 (0,2)	2,9 (0,4)	4,5 (0,9)	1,4 (0,2)	3,7 (0,6)	0,6 (0,2)	1,1 (0,1)	1,0 (0,2)	2,2 (0,2)	9,7
	L) CLF	2,6 (0,4)	1,3 (0,2)	3,4 (0,4)	7,0 (0,6)	3,7 (0,7)	4,7 (0,8)	8,5 (1,1)	1,3 (0,2)	8,0 (1,0)	1,2 (0,3)	2,9 (0,5)	6,0 (1,0)	1,4 (0,2)	3,0 (0,5)	0,7 (0,2)	1,4 (0,4)	1,0 (0,1)	1,9 (0,2)
M) CLF/ACN	2,0 (0,7)	1,3 (0,2)	3,3 (0,5)	6,4 (0,4)	3,2 (0,6)	4,3 (0,7)	10,8 (2,1)	1,2 (0,3)	8,0 (1,1)	1,1 (0,3)	3,4 (0,5)	5,0 (0,4)	1,3 (0,3)	4,3 (0,7)	1,2 (0,2)	1,8 (0,3)	1,2 (0,2)	1,7 (0,1)	12,8
N) CLF/ACT	1,8 (0,3)	1,2 (0,2)	2,8 (0,4)	5,7 (0,5)	2,7 (0,5)	3,5 (0,5)	7,9 (1,0)	1,0 (0,2)	6,6 (0,3)	1,0 (0,2)	2,7 (0,2)	3,9 (0,5)	1,2 (0,3)	3,2 (0,4)	0,8 (0,2)	1,5 (0,2)	0,8 (0,1)	1,4 (0,2)	10,4
O) CLF/Metanol	5,7 (0,3)	3,4 (0,2)	8,7 (0,9)	20,0 (3,2)	4,4 (0,7)	4,8 (0,8)	12,8 (0,8)	2,2 (0,5)	6,5 (0,9)	1,9 (0,2)	4,8 (0,8)	2,4 (0,3)	0,8 (0,1)	5,6 (0,7)	2,3 (0,6)	2,0 (0,6)	2,4 (0,5)	1,3 (0,1)	20,1

ACN: acetonitrila; ACT: acetona; CLF: clorofórmio; EtOAc: acetato de etila; MTBE: éter metil terc-butílico; HEX: n-hexano; cps: contagens por segundo.

Observou-se que a abordagem SPE, mais dispendiosa e de custo mais elevado que as demais, forneceu uma maior área apenas para ACM. Com relação aos ensaios de DLLME, o uso do solvente dispersor metanol favoreceu a migração dos analitos da fase aquosa para a fase orgânica formada por CLF. Nesse caso, os demais experimentos empregando DLLME sem o uso de metanol apresentaram desempenhos consideravelmente inferiores.

Quanto aos testes envolvendo LLE, as maiores somas ponderadas foram obtidas para os ensaios B, C e G, sendo que o B foi selecionado dentre os demais devido ao maior valor de soma obtido e por sua maior praticidade não requerendo o preparo de misturas de solventes. Destaca-se a menor polaridade do n-hexano ( $\log P = 4,0$ ) em comparação com os demais solventes ( $\log P_{\text{CLF}} = 1,97$ ;  $\log P_{\text{EtOAc}} = 0,73$ ;  $\log P_{\text{MTBE}} = 0,94$ ) (SANGSTER, 1989), o que se relaciona com a baixa polaridade dos ésteres de esteroides e esteroides estudados. Nota-se que para o ensaio H, que utilizou 200  $\mu\text{L}$  de HEX, valores de áreas menores que os obtidos na condição B foram observadas, especialmente para DEN e DET, o que mostra a influência negativa relacionada ao uso de baixos volumes de solventes durante a etapa de partição. A Figura 3.3 apresenta o procedimento de extração e purificação otimizado.





**Figura 3.3:** Fluxograma representativo do procedimento de extração para pelo bovino empregado durante a validação

### 3.3.5 Validação

#### 3.3.5.1 Linearidade e Derivatização

Os ésteres esteroides são conhecidos por sua baixa eficiência de ionização, de tal modo que a derivatização química é uma estratégia promissora para melhorar as respostas instrumentais desses analitos [HIGASHI, 2016]. Os protocolos de derivatização usando MOX para converter os grupos cetona dos esteroides em derivados de oxima já provaram ser eficazes, e são realizados normalmente em 40, 60 ou 80 min de tempo de reação, com aquecimento em temperaturas variando de 80 a 90 °C (DEVI, 2018; GRAY, 2018 e REGAL, 2010). A fim de reduzir o tempo gasto nessa reação, uma derivatização assistida por micro-ondas foi estudada. Após a evaporação do HEX proveniente da etapa de *clean-up*, a solução derivatizante foi adicionada aos tubos de vidro, hermeticamente fechados com tampa de plástico. Diferentes tempos de reação e valores de potência de micro-ondas foram avaliados, de forma a se evitar uma projeção da solução de derivatização por superaquecimento e evaporação excessiva da mesma. A condição final consistiu no aquecimento em 2 ciclos por 18 s, empregando-se 70% da potência de micro-ondas. A eficiência deste procedimento foi comparada com a reação tradicional de derivatização, que envolveu o

uso de um bloco de aquecimento por 60 min a 80 °C. Os analitos DRO, ENT, ETN, MTD, MTN, MTT e NOT foram avaliados nesta etapa apenas pela abordagem de micro-ondas, uma vez que foram incorporados no desenvolvimento do método após este estudo.

Para a comparação de ambos os procedimentos de derivatização, curvas de calibração matrizadas foram preparadas em triplicatas genuínas, e as suas inclinações (b) e interceptos (a) foram comparados através do teste t de Student bilateral, ao nível de confiança de 95% (valores críticos de  $F_{(0,05; 16;16)} = 2,33$  e  $t_{(0,05; 34)} = 2,03$ ) (BRASIL, 2011; PEARSON, 1962).

A Tabela 3.3 apresenta os parâmetros de linearidade e a comparação estatística das duas abordagens de derivatização. A avaliação desses dados mostra que a maioria dos analitos exibiu um comportamento de derivatização equivalente, tanto para a abordagem por micro-ondas quanto para o bloco de aquecimento. Os analitos ACC, ACM, AME, ATR e DET apresentaram modelos de linearidade estatisticamente diferentes. No entanto, com exceção de DET, as inclinações referentes à derivatização assistida por micro-ondas foram maiores que a avaliação por bloco de aquecimento. Dessa forma, a abordagem mais rápida levou a curvas de calibração com maiores sensibilidades analíticas, e foi selecionada para uso nas etapas posteriores da validação.

Na avaliação da linearidade das curvas de calibração, os valores de  $t_r$  foram superiores ao valor crítico,  $t_{r(0,05; 4)} = 2,78$ , o que evidenciou a adequação dos ajustes lineares dos modelos de regressão, ao nível de confiança de 95%.

**Tabela 3.3:** Avaliação da linearidade da matriz pelo bovino relacionada aos procedimentos de derivatização realizada em bloco de aquecimento e forno de micro-ondas  
(continua)

Analito	Derivatização em bloco				Derivatização em micro-ondas				Comparação estatística das derivatizações				
	a	b	R <sup>2</sup>	t <sub>r</sub>	a	b	R <sup>2</sup>	t <sub>r</sub>	F	F <sub>crítico</sub>	t <sub>a</sub>	t <sub>b</sub>	t <sub>crítico</sub>
ACC	0,177	0,098	0,958	9,56	-0,082	0,107	0,981	14,56	1,71		4,28	1,82	2,04
ACM	0,041	0,076	0,971	11,52	-0,031	0,105	0,972	11,83	1,03		0,93	4,66	2,04
AME	0,279	0,157	0,939	7,83	-0,116	0,169	0,982	14,82	2,89		3,11	1,22	2,06
AMG	0,579	0,312	0,958	9,55	0,079	0,341	0,982	14,72	1,70		2,03	1,43	2,04
ATE	-0,003	0,325	0,988	17,94	-0,107	0,328	0,985	16,36	1,30		1,41	0,47	2,04
ATR	0,227	0,201	0,968	11,03	-0,153	0,299	0,965	10,52	3,62		4,97	7,80	2,04
BAD	0,133	0,164	0,972	11,85	0,193	0,180	0,985	16,31	1,14		0,30	1,86	2,04
BET	-0,047	0,145	0,978	13,30	-0,020	0,142	0,989	18,95	2,37		0,50	0,72	2,05
BNA	0,922	0,272	0,979	13,53	0,773	0,357	0,957	9,47	5,74		0,27	1,87	2,08
BZT	-0,012	0,145	0,987	17,41	0,006	0,139	0,987	17,54	2,00	2,33	0,79	1,41	2,04
CPB	0,517	0,124	0,93	7,26	0,450	0,121	0,975	12,39	5,19		0,80	0,23	2,08
DEN	0,544	0,053	0,981	14,19	0,774	0,047	0,986	16,57	1,65		0,64	2,33	2,04
DET	-0,090	0,176	0,982	14,65	0,332	0,126	0,982	14,72	8,99		2,86	3,12	2,09
DRO	-	-	-	-	0,010	0,035	0,985	16,22	-		-	-	-
ETN	-	-	-	-	-0,197	0,508	0,986	16,75	-		-	-	-
FPN	0,172	0,260	0,981	14,36	0,224	0,276	0,984	15,89	4,48		0,30	0,83	2,07
FPT	-0,062	0,214	0,974	12,28	0,262	0,155	0,984	15,77	8,98		1,80	2,00	2,09
IST	-0,109	0,218	0,934	7,54	0,975	0,028	0,975	12,53	37,49		1,98	2,10	2,12
MTD	-	-	-	-	0,158	0,094	0,97	11,37	-		-	-	-
MTN	-	-	-	-	0,508	0,283	0,948	8,53	-		-	-	-

**Tabela 3.3:** Avaliação da linearidade da matriz pelo bovino relacionada aos procedimentos de derivatização realizada em bloco de aquecimento e forno de micro-ondas  
(conclusão)

Analito	Derivatização em bloco				Derivatização em micro-ondas				Comparação estatística das derivatizações				
	a	b	R <sup>2</sup>	t <sub>r</sub>	a	b	R <sup>2</sup>	t <sub>r</sub>	F	F <sub>crítico</sub>	t <sub>a</sub>	t <sub>b</sub>	t <sub>crítico</sub>
MTT	-	-	-	-	0,025	0,033	0,984	15,90	-		-	-	-
NOT	-	-	-	-	-0,016	0,029	0,978	13,40	-		-	-	-
PPT	-0,023	0,254	0,990	19,50	0,048	0,243	0,987	17,48	6,12		1,74	1,69	2,08
UNB	0,039	0,026			0,407	0,001			217,55		1,86	1,55	2,12

a: intercepto; b: inclinação; R<sup>2</sup>: coeficiente de determinação; t<sub>r</sub>: valor calculado de t de Student de correlação; F: valor calculado para o teste F; F<sub>crítico</sub>: valor crítico de F; t<sub>a</sub>: valor de t calculado para comparação dos interceptos; t<sub>b</sub>: valor de t calculado para comparação das inclinações; t<sub>crítico</sub>: valor crítico de t.

### 3.3.5.2 Recuperação e Precisão

Considerando que os analitos estudados são de uso proibido como promotores de crescimento em animais, os respectivos LMDRs foram estabelecidos para cada analito como o segundo nível de concentração das respectivas curvas de calibração. Os critérios de aceitação do Codex Alimentarius (CODEX, 2014) foram utilizados, e estes consideram como satisfatórias recuperações entre 50 e 120% para concentrações menores ou iguais a  $1 \mu\text{g kg}^{-1}$ , entre 60 e 120% para concentrações entre 1 e  $10 \mu\text{g kg}^{-1}$ , e entre 70 e 120% entre 10 e  $100 \mu\text{g kg}^{-1}$ . Para esses mesmos intervalos de concentração os CVs devem ser inferiores a 35, 30 e 20% respectivamente.

As recuperações obtidas, apresentadas na Tabela 3.4, mostraram-se aceitáveis para todos os compostos investigados. Os valores calculados nos respectivos LMDRs, em condições de repetibilidade, variaram de 87,6% (MTD) a 118,1% (FPN), e em condições de precisão intermediária entre 87,6% (ENT) e 115,0% (FPN).

Para avaliação da precisão, os CVs obtidos foram adequados no nível do LMDR, variando de 3,4% (DET) a 22,6% (BNA) em condições de repetibilidade, e 3,9% (BET) a 24,1% (MTD) para precisão intermediária. Para os analitos BAD, ETN, MTD e MTN, valores de CV superiores aos estabelecidos foram obtidos nos níveis 1,5 e 2,0 LMDR. Propõe-se então um monitoramento qualitativo nesses níveis de maiores concentrações, o que não inviabiliza a aplicação da matriz pelo para esses compostos, tendo em vista o uso proibido dos mesmos em animais, evidenciado em quaisquer níveis de concentração. A Tabela 3.4 apresenta os resultados de recuperação e precisão obtidos nos níveis 1,0; 2,0 e 3,0 LMDR, bem como nos respectivos LQs de cada analito.

### 3.3.5.3 Limite de Decisão e Capacidade de Detecção

Um desvio padrão, em unidades de concentração, foi calculado para 20 amostras fortificadas, em condições de precisão intermediária no LQ de cada analito, e esse valor foi utilizado para o cálculo de  $CC\alpha$  e  $CC\beta$ . Os valores obtidos de  $CC\alpha$ , apresentados na Tabela 3.5, variaram de 0,39 a  $12,32 \mu\text{g kg}^{-1}$ , e os de  $CC\beta$  de 0,66 a  $20,99 \mu\text{g kg}^{-1}$ , sendo que os valores de  $CC\alpha$  foram inferiores aos seus respectivos LMDRs, de acordo com a recomendação da CRLs - *Community Reference Laboratories Residues* (CRLs, 2007).

**Tabela 3.4:** Avaliação da recuperação e precisão para os esteroides e ésteres de esteroides estudados na matriz pelo bovino (continua)

Analito	Repetibilidade						Precisão Intermediária						LQ (0,5 LMDR)	
	1,0 LMDR		1,5 LMDR		2,0 LMDR		1,0 LMDR		1,5 LMDR		2,0 LMDR			
	R	CV	R	CV	R	CV	R	CV	R	CV	R	CV	R	CV
ACC	109,2	10,0	109,0	10,7	98,9	12,0	103,8	11,5	106,1	10,3	99,8	11,1	111,1	4,9
ACM	98,9	13,8	103,7	6,6	101,6	5,3	98,2	11,4	102,4	9,4	103,2	5,7	102,8	4,4
AME	96,6	4,1	98,3	3,6	100,5	3,3	98,5	5,1	98,0	3,6	99,4	3,5	86,5	4,4
AMG	103,4	4,1	99,5	5,5	94,4	4,6	102,4	4,5	100,2	5,4	95,6	5,8	100,8	9,8
ATE	111,7	21,5	113,7	23,6	106,5	13,4	104,0	21,7	116,1	20,2	114,6	17,4	118,7	11,3
ATR	108,9	17,2	103,9	10,1	86,5	13,0	99,4	21,8	108,7	11,5	94,8	20,1	119,0	11,4
BAD	111,3	7,2	114,8	17,8	113,6	20,8	112,6	12,2	104,4	21,8	105,0	22,3	111,3	7,2
BET	102,3	4,3	101,6	4,7	102,5	5,1	102,1	3,9	100,7	4,9	100,3	5,6	102,6	7,2
BNA	87,4	22,6	93,2	24,8	87,9	23,1	94,6	20,9	95,6	20,6	91,6	19,0	92,5	16,9
BZT	104,7	11,6	109,1	8,9	107,0	8,1	104,2	9,6	108,4	7,7	108,5	7,7	99,4	16,4
CPB	87,4	17,9	90,9	9,2	87,5	13,0	95,6	19,2	97,3	12,3	90,5	11,9	76,1	22,2
DEN	107,7	6,6	108,6	8,3	105,3	13,7	104,1	8,6	108,2	7,6	107,3	11,8	109,2	8,2
DET	105,1	3,4	104,9	5,0	101,6	5,7	103,8	5,9	104,5	5,2	103,1	6,9	105,9	3,7
DRO	114,6	19,3	108,1	20,3	111,0	20,3	107,5	19,4	103,3	18,6	107,6	17,6	114,6	19,3

**Tabela 3.4:** Avaliação da recuperação e precisão para os esteroides e ésteres de esteroides estudados na matriz pelo bovino (conclusão)

Analito	Repetibilidade						Precisão Intermediária							
	1,0 LMDR		1,5 LMDR		2,0 LMDR		1,0 LMDR		1,5 LMDR		2,0 LMDR		LQ (0,5 LMDR)	
	R	CV	R	CV	R	CV	R	CV	R	CV	R	CV	R	CV
ENT	95,5	18,7	103,9	16,0	93,8	9,3	87,6	22,5	106,3	14,2	105,5	18,5	95,5	18,7
ETN	104,3	18,6	96,6	12,5	103,7	20,3	99,2	19,8	102,6	22,2	113,5	21,2	71,8	14,8
FPN	118,1	15,2	116,9	21,9	111,1	20,2	115,0	16,8	112,0	20,3	107,2	18,9	116,8	4,1
FPT	108,1	9,1	104,1	10,8	106,7	11,7	105,8	8,2	102,9	9,8	104,6	11,3	97,9	8,4
IST	96,8	21,0	106,3	15,3	93,0	19,8	92,2	22,9	117,2	20,5	104,4	22,0	103,5	15,5
MTD	86,7	20,5	99,0	23,2	97,6	22,4	93,1	24,1	101,4	20,9	107,2	22,4	86,7	20,5
MTN	102,7	12,4	97,8	19,6	107,4	22,3	98,3	18,0	96,4	19,2	107,5	20,3	81,1	10,3
MTT	108,6	4,7	100,2	9,2	93,9	9,9	102,2	11,3	103,8	9,0	96,1	9,5	83,5	1,9
NOT	102,0	21,9	118,0	21,4	115,0	19,2	101,1	18,0	111,6	22,3	111,1	17,1	102,0	21,9
PPT	98,5	8,5	100,6	6,5	101,1	3,5	103,1	10,7	101,9	6,2	101,5	6,1	89,7	8,1
UNB	92,5	14,5	102,1	10,7	99,8	15,9	101,2	17,1	109,3	14,8	104,9	15,1	100,2	16,4

R: Porcentagem de recuperação (%); CV: Coeficiente de variação (%); LMDR: Limite Mínimo de Desempenho Requerido; LQ: Limite de Quantificação

**Tabela 3.5:** Valores estimados de incerteza expandida,  $CC\alpha$  e  $CC\beta$  para os esteroides e ésteres de esteroides estudados (continua)

Analito	PI	LMDR ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	U (%)			$CC\alpha$ ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	$CC\beta$ ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )
			1,0 LMDR	1,5 LMDR	2,0 LMDR		
ACC		4,00	28,5	29,8	33,4	1,23	2,09
ACM	MEA-d3	4,00	29,5	28,0	17,1	1,16	1,97
AME		4,00	11,3	10,0	10,5	0,51	0,86
AMG		4,00	11,8	15,3	17,4	0,43	0,74
ATE	PPT-d3	3,00	50,7	56,7	52,7	1,73	2,96
ATR	PPT-d3	2,00	47,5	33,3	60,5	0,98	1,66
BAD	BZT-d3	8,00	46,9	63,7	67,9	3,63	6,18
BET	BES-d3	4,00	12,8	14,7	16,8	0,39	0,66
BNA	BZT-d3	4,00	25,5	46,5	39,0	1,01	1,72
BZT	BZT-d3	2,00	23,5	22,3	23,3	0,47	0,81
CPB	CPT-d3	3,00	46,3	38,0	36,0	1,58	2,69
DEN	DET-d3	40,00	1,7	1,7	2,7	10,29	17,53
DET		3,00	19,3	17,1	21,0	0,46	0,79
DRO	MEL-d3	12,00	67,3	61,6	53,4	7,50	12,79

**Tabela 3.5:** Valores estimados de incerteza expandida,  $CC\alpha$  e  $CC\beta$  para os esteroides e ésteres de esteroides estudados (conclusão)

Analito	PI	LMDR ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	U (%)			$CC\alpha$ ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	$CC\beta$ ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )
			1,0 LMDR	1,5 LMDR	2,0 LMDR		
ENT	PPT-d3	24,00	63,7	49,9	56,5	12,32	20,99
ETN	$\beta$ BO-d3	8,00	49,6	62,8	63,9	3,70	6,30
FPN	FPT-d3	3,00	40,3	56,0	56,8	1,44	2,46
FPT		2,00	23,5	28,3	34,3	0,52	0,88
IST	PPT-d3	2,00	71,5	66,3	67,0	0,99	1,69
MTD	$\beta$ BO-d3	12,00	78,3	70,0	68,3	6,49	11,05
MTN	$\beta$ BO-d3	16,00	49,5	56,6	61,3	8,12	13,84
MTT	MTT-d3	8,00	24,1	24,8	28,6	2,15	3,66
NOT	MTT-d3	4,00	42,5	61,3	51,5	2,43	4,13
PPT	PPT-d3	2,00	29,0	21,0	18,8	0,50	0,85
UNB	DET-d3	4,00	42,8	42,8	45,5	1,68	2,86

PI: Padrão interno; LMDR: Limite Mínimo de Desempenho Requerido; U: incerteza de medição expandida;  $CC\alpha$ : limite de decisão;  $CC\beta$ : capacidade de detecção.

### 3.3.5.4 Incerteza de Medição

Embora a incerteza de medição não esteja indicada na DECISÃO 2002/657/CE, a norma ISO/IEC 17025 (ABNT, 2017), usada pelos laboratórios de calibrações e ensaios, apresenta esse parâmetro como um requisito de validação. De acordo com o exposto no item 2.3.4.3 do Capítulo 2, a obtenção de valores de U inferiores a 40% para concentrações menores que  $10 \mu\text{g kg}^{-1}$  e de 45% para concentrações abaixo de  $1 \mu\text{g kg}^{-1}$  é desejável (BRASIL, 2011). A avaliação dos dados apresentados na Tabela 3.5 mostra que para os analitos ATE, ATR, BAD, CPB, DRO, ENT, ETN, IST, MTD e MTN, porcentagens superiores foram obtidas no nível do LMDR. Considerando que as demais figuras de mérito apresentaram desempenho satisfatório para esses compostos, e que as tolerâncias citadas são apresentadas como recomendações, pode-se propor um monitoramento quantitativo para esses analitos, levando-se em conta que os valores de incerteza obtidos serão reportados durante a liberação dos resultados.

### 3.3.5.5 Seletividade e Robustez

A seletividade do método para pelo bovino foi avaliada por meio da adição dos interferentes da classe avermectinas, de forma similar à avaliação realizada para músculo bovino no item 2.2.7.6 do Capítulo 2. Para a comparação das respostas instrumentais com e sem a adição desses interferentes, aplicou-se o teste F de Fisher-Snedecor, sendo que para os casos em que as variâncias entre os dois conjuntos de dados foram estatisticamente iguais a 95% de confiança ( $F_{\text{calculado}} < F_{\text{crítico}}(8; 8; 0,05) = 3,44$ ), aplicou-se o teste t não-pareado com variância agrupada. Nos casos em que os valores calculados de F foram superiores ao valor crítico empregou-se o teste t não-pareado com variância não agrupada. Os valores de F e t calculados estão apresentados na Tabela 3.6. Todos os analitos apresentaram valores calculados de t inferiores ao valor crítico  $t_{\text{crítico}}(0,05, 16) = 2,12$ , dessa forma a contaminação intencional das amostras com as avermectinas selecionadas não influenciou de forma significativa, ao nível de 95% de confiança, nas recuperações dos esteroides pesquisados.

Para o estudo da robustez, empregou-se a abordagem fatorial fracionária de Youden, conforme descrito no item 3.2.8.4. A avaliação dos resultados constantes na Tabela 3.6 mostra que todos os analitos apresentaram valores de SDi menores que os

respectivos  $S_{p,interm}$  no nível do LMDR, portanto, o método foi robusto para todos os analitos frente às modificações avaliadas.

**Tabela 3.6:** Avaliação da seletividade e robustez do método desenvolvido para determinação de esteroides e ésteres de esteroides em pelo bovino

Analito	Seletividade		Robustez	
	$F_{calculado}$	$t_{calculado}$	Sdi	$S_{p,interm}$
ACC	1,62	0,37	0,44	0,48
ACM	1,36	0,92	0,15	0,45
AME	1,74	0,23	0,17	0,20
AMG	1,75	1,06	0,17	0,18
ATE	1,19	0,05	0,64	0,68
ATR	1,17	0,81	0,15	0,43
BAD	1,42	0,14	0,83	1,10
BET	2,13	0,64	0,13	0,16
BNA	1,42	0,55	0,68	0,79
BZT	1,94	1,03	0,12	0,20
CPB	2,39	0,28	0,35	0,55
DEN	1,47	0,31	0,25	0,26
DET	1,55	1,00	0,12	0,19
DRO	1,97	1,80	1,70	2,51
ENT	1,67	0,32	4,72	3,23
ETN	1,16	0,36	1,28	1,57
FPN	1,40	0,93	0,53	0,58
FPT	1,26	0,11	0,12	0,17
IST	1,20	0,89	0,31	0,42
MTD	1,07	0,65	0,29	2,69
MTN	1,56	0,84	2,57	2,83
MTT	1,85	0,58	0,59	0,93
NOT	2,02	0,15	0,70	0,73
PPT	1,77	0,66	0,21	0,22
UNB	2,11	0,97	0,51	0,69

Sdi: desvio padrão das diferenças;  $S_{p,interm}$ : desvio padrão calculado em condições de precisão intermediária durante a validação.

### 3.4 CONCLUSÕES

O método otimizado e validado permitiu a identificação e quantificação de 25 esteroides e ésteres de esteroides em pelo bovino, em baixos níveis de concentração. A extração desse tipo de amostra não é um consenso entre os laboratórios da área de análise de resíduos, dessa forma amostras contendo BET e FPN, coletadas após administração de formulações sintéticas, foram empregadas durante a otimização da extração. O efeito de diferentes soluções digestoras na liberação dos analitos da matriz foi avaliado, sendo que o uso de metanol como solvente de extração mostrou-se adequado e mais eficaz do que as outras abordagens estudadas. O uso da LLE empregando HEX foi escolhido como estratégia de limpeza (*clean-up*), provando ser mais eficaz do que as abordagens empregando SPE e DLLME. A derivatização química com MOX, assistida por micro-ondas doméstico, foi empregada pela primeira vez com o objetivo de se melhorar a sensibilidade da detecção dos analitos.

A matriz pelo é apresentada na literatura como uma ferramenta promissora na detecção do abuso de drogas veterinárias, já sendo oficialmente utilizada em programas de monitoramento em países como França e Holanda. A aplicabilidade dessa matriz será estudada por meio de um procedimento de experimentação animal no Capítulo 5, a fim de se avaliar fatores como janela de detecção e distribuição dos medicamentos administrados em animais selecionados.

### 3.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas - ABNT NBR ISO/IEC 17025: 2017. **Requisitos gerais para a competência de laboratórios de ensaio e calibração**. Rio de Janeiro, 2017, 43 p.

AQAI, P., STOLKER, A. A., LASAROMS, J. J. Effect of sample pre-treatment on the determination of steroid esters in hair of bovine calves. **J. Chromatogr. A**, Países Baixos, v.1216, n.46, p.8233-8239, 2009.

ATHANASIADOU, I., ANGELIS, Y.S., LYRIS, E., GEORGAKOPOULOS, C. Chemical derivatization to enhance ionization of anabolic steroids in LC-MS for doping-control analysis. **TrAC Trends Anal. Chem.**, Grécia, v.42, p.137-156, 2013.

BAUMGARTNER, A. M., JONES, P. F., BAUMGARTNER, W. A., BLACK, C. T. Radioimmunoassay of hair for determining opiate-abuse histories. **J. Nucl. Med.**, EUA, v.20, n.7, p.748-752, 1979.

BREIDI, S. E., BARKER, J., PETROCZI, A., NAUGHTON, D. P. Enzymatic Digestion and Selective Quantification of Underivatized Delta-9-Tetrahydrocannabinol and Cocaine in Human Hair Using Gas Chromatography-Mass Spectrometry. **J. Anal. Methods Chem.**, v.2012, p.1-8, 2012.

CHOI, T. L. S., KWOK, K. Y., KWOK, W. H., TSOI, Y. Y. K., WONG, J. K. Y., WAN, T. S. M. Detection of seventy-two anabolic and androgenic steroids and/or their esters in horse hair using ultra-high performance liquid chromatography-high resolution mass spectrometry in multiplexed targeted MS2 mode and gas chromatography-tandem mass spectrometry. **J Chromatogr A**, China, v.1566, p.51-63, 2018.

CODEX - *Codex Alimentarius International Food Standard. Guidelines for the Design and Implementation of National Regulatory Food Safety Assurance Programmes Associated with the Use of Veterinary Drugs in Food Producing Animals - CAC/GL 71-2009*, v. 3, Roma, 2014.

CRLs - Community Reference Laboratories Residues. **CRLs view on state of the art analytical methods for national residue control plans, 2007**. Disponível em: “<http://www.rivm.nl/bibliotheek/digitaaldepot/crlguidance2007.pdf>”, acesso em 01/02/2018.

DECISÃO 2002/657/CE. Concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results. **Official Journal of the European Communities**, Bruxelas, L.221, p. 08–36, 2002 (Decisão N° 2002/657/EC de 12 de Agosto de 2002).

DESHMUKH, N. I. K., ZACHAR, G., PETRÓCZI, A., SZÉKELY, A.D., BARKER, J., NAUGHTON, D. P. Determination of stanozolol and 3'-hydroxystanozolol in rat hair, urine and serum using liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Chem Cent J.**, Reino Unido, v.6, p.162-174, 2012.

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

DEVI, J. L., ZAHRA, P., VINE, J. H., WHITTEM, T. Determination of testosterone esters in the hair of male greyhound dogs using liquid chromatography-high resolution mass spectrometry. **Drug Test Anal.**, Austrália, v.10, n.3, p.460-473, 2018.

FABRESSE, N., GRASSIN-DELYLE, S., ETTING, I., ALVAREZ, J. C. Detection and quantification of 12 anabolic steroids and analogs in human whole blood and 20 in hair using LC-HRMS/MS: application to real cases. **Int J Legal Med.**, França, v.131, n.4, p.989-999, 2017.

GAO, W., KIRSCHBAUM, C., GRASS, J., STALDER, T. LC-MS based analysis of endogenous steroid hormones in human hair. **J Steroid Biochem Mol Biol.**, Alemanha, v.162, p.92-99, 2016.

GRAY, B., VILJANTO, M., MENZIES, E., VANHAECKE, L. Detection of prohibited substances in equine hair by ultra-high performance liquid chromatography–triple quadrupole mass spectrometry – application to doping control samples. **Drug Test Anal.**, Bélgica, v.10, n.7, p.1050–1060, 2018.

GROOT, M. J., LASAROMS, J. J., VAN BENNEKOM, E. O., MEIJER, T., VINYETA, E., VAN DER KLIS, J. D., NIELEN, M. W. Illegal treatment of barrows with nandrolone ester: effect on growth, histology and residue levels in urine and hair. **Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess.**, Países Baixos, v.29, n.5, p.727-735, 2012.

HIGASHI, T., OGAWA, S. Chemical derivatization for enhancing sensitivity during LC/ESI-MS/MS quantification of steroids in biological samples: a review. **J. Steroid Biochem. Mol. Biol.**, Japão, v.162, p.57-69, 2016.

JOHANSSON, M. A., HELLENÄS, K. Immunobiosensor analysis of clenbuterol in bovine hair. **Food Agr Immunol.**, Suécia, v.15, n.3-4, p.197-205, 2003.

KINTZ, P. **Hair analysis in forensic toxicology**. 1ª ed. França: WIREs Forensic Sci., 2018.

KINTZ, P., SALOMONE, A., VINCENTI, M. **Hair Analysis in Clinical and Forensic Toxicology**: 1ª ed. Oxford: Elsevier, 2015.

KWOK, K. Y., CHOI, T. L. S., KWOK, W. H., WONG, J. K. Y., WAN, T. S. M. Detection of anabolic and androgenic steroids and/or their esters in horse hair using ultra-high performance liquid chromatography–high resolution mass spectrometry. **J. Chromatogr. A**, China, v.1493, p.76-86, 2017.

LANÇAS, F.M. Aumentando a eficiência das colunas de HPLC por meio da diminuição do diâmetro das partículas da fase estacionária: até onde? **Scientia Chromatographica**, São Carlos, v.3, n.1, p.17-23, 2011.

LEPORATI, M., BERGOGLIO, M., CAPRA, P., BOZZETTA, E., ABETE, M. C., VINCENIA, M. Development, validation and application to real samples of a multiresidue LC-MS/MS method for determination of  $\beta$ 2-agonists and anabolic steroids in bovine hair. **J. Mass Spectrom.**, Itália, v.49, n.9, p.936-946, 2014.

MALDANER, L., JARDIM, I. C. S. F. O estado da arte da cromatografia líquida de ultra eficiência. **Quim. Nova**, Campinas, vol. 32, n.1, p.214-222, 2009.

MANTINIEKS, D., GEROSTAMOULOS, D., WRIGHT, P., DRUMMER, O. The effectiveness of decontamination procedures used in forensic hair analysis. **Forensic Sci Med Pathol.**, Austrália, v.14, n.3, p.349-357, 2018.

MOUSAVI, L., TAMIJI, Z., KHOSHAYAND, M. R. Applications and opportunities of experimental design for the dispersive liquid–liquid microextraction method - A review. **Talanta**, Irã, v.190, p.335-356, 2018.

NIELEN, M. W., NIJROLDER, A.W., HOOIJERINK, H., STOLKER, A.A. Feasibility of desorption electrospray ionization mass spectrometry for rapid screening of anabolic steroid esters in hair. **Anal. Chim. Acta**, Países Baixos, v.700, n.1-2, p.63–69, 2011.

NIELEN, M. W., LASAROMS, J. J., MULDER, P. P., VAN HENDE, J., VAN RHIJN, J. H., GROOT, M. J. Multi residue screening of intact testosterone esters and boldenone undecylenate in bovine hair using liquid chromatography electrospray tandem mass spectrometry. **J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.**, Países Baixos, v.830, n.1, p.126-134, 2006.

PEARSON, E. S., HARTLEY, H. O. **Biometrika tables for statisticians**: 2<sup>a</sup> ed. Cambridge: Cambridge University Press, 1962.

PIZZATO, E. C., FILONZI, M., DA ROSA, H. S., DE BAIRROS, A. V. Pretreatment of different biological matrices for exogenous testosterone analysis: a review. **Toxicol. Mech. Methods**, Brasil, v.27, n.9, p.641-656, 2007.

RAMBAUD, L., BICHON, E., CESBRON, N., ANDRÉ, F., LE BIZEC, B. Study of 17 $\beta$ -estradiol-3-benzoate, 17 $\alpha$  methyltestosterone and medroxyprogesterone acetate fixation in bovine hair. **Anal. Chim. Acta**, França v.532, p.165-176, 2005.

REGAL, P., NEBOT, C., VÁZQUEZ, B. I., CEPEDA, A., GENTE, C. A. Determination of the hormonal growth promoter 17 $\alpha$ -methyltestosterone in food-producing animals: Bovine hair analysis by HPLC–MS/MS. **Meat Sci.**, Espanha, v.84, n.1, p.196-201, 2010.

REZAEI, M., YAMINI, Y., FARAJI, M. Evolution of dispersive liquid–liquid microextraction method. **J. Chromatogr A**, Irã, v.1217, n.16, p.2342-2357, 2010.

ROCCA, L. M., GENTILI, A., PÉREZ-FERNÁNDEZ, V., TOMAI, P. Veterinary drugs residues: a review of the latest analytical research on sample preparation and LCMS based methods. **Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess.**, Itália, v.34, n.5, p.766-784, 2017.

SCARTH, J. P., KAY, J., TEALE, P., AKRE, C., LE BIZEC, B., DE BRABANDER, H. F., VANHAECKE, L., VAN GINKEL, L., POINTS, J. A review of analytical strategies for the detection of ‘endogenous’ steroid abuse in food production. **Drug Test Anal.**, Reino Unido, v.4, n.1, p.40-49, 2012.

SHAH, I., PETROCZI, A., UVACSEK, M., RÁNKY, M., NAUGHTON, D. P. Hair-based rapid analyses for multiple drugs in forensics and doping: application of dynamic multiple reaction monitoring with LC-MS/MS. **Chem Cent J.**, Reino Unido, v.8, p.73-83, 2014.

UNODC - United Nations Office on Drugs and Crime. Guidelines for Testing Drugs under International Control in Hair, Sweat and Oral Fluid. **Manual for Use by National Drug Testing Laboratories**, Nova Iorque, 2014. Disponível em: “[https://www.unodc.org/documents/scientific/ST\\_NAR\\_30\\_Rev.3\\_Hair\\_Sweat\\_and\\_Oral\\_Fluid.pdf](https://www.unodc.org/documents/scientific/ST_NAR_30_Rev.3_Hair_Sweat_and_Oral_Fluid.pdf)”, acesso em 18/09/2018.

## **Capítulo 4**

### **Desenvolvimento e Validação de um Método para Determinação de 30 Esteroides e Ésteres de Esteroides em Soro Bovino**

## 4.1 INTRODUÇÃO

O soro é utilizado como matriz preferencial para o monitoramento de hormônios em análises clínicas de humanos, tendo em vista o fato de refletir as concentrações circulantes dos compostos monitorados no organismo avaliado num dado momento. Além disso, coletas programadas em um dado intervalo de tempo permitem traçar um perfil de variação dessas concentrações, que pode ser utilizado para avaliar a resposta de algum tratamento medicamentoso (FRENCH, 2016).

No caso das análises *anti-doping*, a matriz mais comumente avaliada para os compostos hormonais é a urina, entretanto, o monitoramento de amostras de soro vem ganhando relevância. A partir de 2019 a Agência Mundial *Anti-Doping* (*World Anti-Doping Agency - WADA*) implementou a obrigatoriedade da inclusão da matriz soro no módulo hematológico do passaporte biológico do atleta (WADA, 2016). Em março de 2019, duas atletas ucranianas foram punidas com suspensão de 4 e 8 anos pelo Tribunal de Arbitragem do Esporte (*Court of Arbitration for Sport - CAS*), com base na detecção de níveis não fisiológicos de testosterona em suas amostras de soro sanguíneo, após análise nos laboratórios credenciados pela WADA (WADA, 2019). Destaca-se que esta foi a primeira decisão de *doping* aplicada com base em valores esteroidais em soro, concomitante com um resultado negativo para as amostras de urina correspondentes.

Uma das principais vantagens da matriz soro se relaciona à identificação de um perfil metabólico com menor interferência de processos fisiológicos de excreção, como é o caso da urina. Dessa maneira, formas parentais não degradadas de drogas administradas podem ser detectadas, em especial os ésteres de anabolizantes, que são indetectáveis na urina, mas representam uma prova inequívoca de administração exógena (FORSDAHL, 2015). Além disso, metabólitos marcadores específicos presentes no soro podem ser identificados e usados de forma complementar à urina, ampliando a janela de detecção das drogas em questão. Deve-se notar que baixos valores de concentrações sanguíneas de esteroides endógenos em bovinos são encontrados nessa matriz, dessa forma, métodos analíticos com alta sensibilidade são requeridos (WOZNIACK, 2016).

Em termos de preparo de amostra, uma etapa de precipitação de proteínas é comumente utilizada na maioria dos métodos descritos na literatura, a fim de se quebrar

a ligação dos analitos de interesse com proteínas séricas (FRENCH, 2016). Nesse procedimento adiciona-se, por exemplo, um solvente orgânico ao soro, como metanol ou ACN, causando a coagulação e precipitação das proteínas, facilmente removidas por meio de centrifugação. Como procedimentos de purificação (*clean-up*), destacam-se o emprego de duas técnicas: LLE e SPE (WOZNIACK, 2017). A primeira delas destaca-se pela simplicidade e custo, ao utilizar solventes orgânicos comumente empregados em laboratórios de ensaios, e de baixos pontos de ebulição, o que facilita uma etapa posterior de evaporação. A SPE destaca-se pela sua seletividade, uma vez que quando adequadamente otimizada, permite a eliminação de compostos interferentes em etapas de lavagem da fase estacionária do cartucho de extração, com posterior eluição dos compostos de interesse com solventes apropriados. Entretanto, os elevados custos desses cartuchos, combinados ao fato de serem gastos volumes consideráveis de solventes nas etapas de condicionamento, lavagem e eluição, fazem com que métodos mais simples como LLE tenham ganhado relevância frente aos que empregam SPE (FRENCH, 2016).

Alguns protocolos inicialmente desenvolvidos para a extração de lipídeos em matrizes biológicas, atualmente, têm sido empregados para a extração de hormônios esteroidais em soro, considerando a natureza pouco polar dos mesmos (REIS, 2013). O método desenvolvido por Folch e colaboradores (FOLCH, 1957) baseia-se na formação de um sistema bifásico, empregando-se uma mistura extratora de CLF/metanol (2:1 v/v), seguida de lavagem do sistema com água. No método original, a amostra era diluída 20 vezes com a fase extratora, sendo que essa proporção foi progressivamente diminuída à medida que as sensibilidades instrumentais aumentaram (FRENCH, 2016). BLIGH e Dyer (1959) desenvolveram um protocolo baseado na mesma combinação de solventes, no qual uma mistura de metanol/CLF (2:1 v/v) foi adicionada à matriz para a formação do sistema miscível e, posteriormente, um volume de CLF e de água foi adicionado à mistura para a separação de duas fases.

As metodologias mais recentes descritas na literatura normalmente empregam SPE e LLE para extração e purificação das amostras. Dentre as que empregaram SPE, em 2017, REJTHAROVÁ e colaboradores propuseram um método para determinação de 5 ésteres de testosterona e nandrolona em soro bovino e porcino, utilizando como solvente extrator ACN acidificada com 1% v/v de ácido fórmico, e purificação com

cartucho SPE HLB. Em 2018, os mesmos autores (REJTHAROVÁ, 2018) apresentaram outro procedimento para a determinação de 11 ésteres de esteroides em soro bovino e porcino, por meio de uma extração inicial com fase dispersiva Supel™ QuE Z-Sep (Sigma Aldrich, St Louis, EUA) e posterior purificação em coluna de alumina. Em 2013, KAABIA e colaboradores validaram um método para determinação de 20 ésteres de anabolizantes em soro e plasma equino, no qual a amostra foi submetida a banho ultrassônico, SPE utilizando cartucho C18 e eluição com ACT/EtOAc (1:1 v/v), e posterior derivatização com cloreto de dansila por 40 min a 60 °C.

Com relação às metodologias empregando LLE, em 2016, GENANGELI e colaboradores desenvolveram um método para determinação de 17 esteroides em plasma equino através da extração com ACN, seguida de centrifugação, evaporação e dissolução com metanol. Em 2017, WOŹNIAK e colaboradores desenvolveram um método para determinação de testosterona, utilizando a mistura de éter de petróleo/MTBE (70:30 v/v) para a extração. Em 2019, LIU e colaboradores apresentaram um método para análise de 10 hormônios utilizando MTBE para LLE e posterior derivatização com solução de hidroxilamina a 40 °C por 20 min. Em 2015, FORSDAHL e parceiros também desenvolveram um método empregando 1 mL de soro, com precipitação de proteínas realizada após adição de 1 mL de metanol e 1 mL de NaOH 0,1 mol L<sup>-1</sup>, e LLE com 5 mL de ciclo-hexano, seguido de derivatização com hidroxilamina dissolvida em piridina, com incubação a 60 °C por 10 min. Em 2018, DE KOCK e colaboradores desenvolveram um método para determinação de 19 esteroides através da extração com MTBE e derivatização com MOX por 45 min a 60 °C. Em 2016, LUO e colaboradores apresentaram um método para determinação de 16 anabolizantes empregando hidrólise enzimática com β-glucuronidase a 37 °C por 60 min, e purificação em placa multicanal de 96 posições (*96 well plate format*).

No presente capítulo, o desenvolvimento e a validação de um método para a determinação de 30 esteroides e ésteres de esteroides em soro bovino serão apresentados.

## 4.2 EXPERIMENTAL

### 4.2.1 Padrões Analíticos e Soluções Padrão

Os padrões analíticos utilizados na otimização para a matriz soro foram os mesmos validados para a matriz pelo bovino, com a adição de:  $\beta$ BO,  $\beta$ TB,  $\beta$ TE, CNA e CPT. As informações referentes aos padrões analíticos utilizados neste trabalho, como abreviaturas, fórmulas estruturais e fabricantes, estão descritas no Apêndice I.

Soluções estoque individuais dos analitos e padrões deuterados foram preparadas em uma concentração média de  $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ , dissolvendo a massa de cada composto em metanol. As soluções de trabalho foram preparadas misturando as soluções estoque individuais e diluindo-as para as seguintes concentrações finais:  $0,0010 \mu\text{g mL}^{-1}$  de FPT;  $0,0015 \mu\text{g mL}^{-1}$  de DET ;  $0,0020 \mu\text{g mL}^{-1}$  de ATR, MTT, BZT, FPN, IST e PPT;  $0,0025 \mu\text{g mL}^{-1}$  de  $\beta$ TE;  $0,0030 \mu\text{g mL}^{-1}$  de ATE, BNA e CPB;  $0,0040 \mu\text{g mL}^{-1}$  de ACC, ACM, AMG, AME, ATE,  $\beta$ TB e UNB ;  $0,006 \mu\text{g mL}^{-1}$  de CNA e DRO;  $0,0080 \mu\text{g mL}^{-1}$  de BAD, ETN e NOT ;  $0,012 \mu\text{g mL}^{-1}$  de CPT e ENT ;  $0,015 \mu\text{g mL}^{-1}$  de BET ;  $0,016 \mu\text{g mL}^{-1}$  de CLD e MTN ;  $0,020 \mu\text{g mL}^{-1}$  de DEN ;  $0,030 \mu\text{g mL}^{-1}$  de MTD; e  $0,070 \mu\text{g mL}^{-1}$  de  $\beta$ BO.

As concentrações das soluções de trabalho para os padrões deuterados foram:  $0,024 \mu\text{g mL}^{-1}$  de BES-d4, FPT-d3 e PPT-d3;  $0,036 \mu\text{g mL}^{-1}$  de BZT-d3, DET-d3, MTT-d3 e BES-d3; em  $0,048 \mu\text{g mL}^{-1}$  de CPT-d3;  $0,49 \mu\text{g mL}^{-1}$  de TES-d2;  $0,072 \mu\text{g mL}^{-1}$  de AME-d3; e  $0,26 \mu\text{g mL}^{-1}$  de BBO-d3.

### 4.2.2 Materiais, Reagentes e Insumos

Empregaram-se os mesmos reagentes de grau analítico descritos no item 3.2.2 do Capítulo 3, com exceção de ácido acético glacial, hidróxido de sódio, NaOAc, TCEP e TRIS, que foram utilizados apenas nesse último capítulo. Os materiais e insumos utilizados foram listados no item 2.2.2 do Capítulo 2.

As análises por LC-MS/MS foram realizadas no mesmo sistema e sob as mesmas condições que as descritas no item 3.2.3 do Capítulo 3, com exceção da coluna cromatográfica, em que a aQ Synchronis (100 x 2,1 mm, 1,7  $\mu\text{m}$ ) (Thermo Scientific, Waltham, EUA) equipada com pré-coluna Acquity UPLC BEH VanGuard C18 (5,0 x 2,1 mm, 1,7  $\mu\text{m}$ ) (Waters Corporation, Milford, EUA) foi utilizada para soro bovino.

### **4.2.3 Estudo das Condições Espectrométricas e Cromatográficas**

O mesmo procedimento descrito no item 3.2.4 do Capítulo 3, para a otimização das condições espectrométricas, foi realizado para inclusão dos compostos derivatizados:  $\beta$ BO,  $\beta$ TB,  $\beta$ TE, CNA e CPT.

### **4.2.4 Preparo de Amostra e Extração**

Amostras brancas de soro bovino foram coletadas de uma novilha de dois anos de idade, dois bezerros de seis meses e dois touros de dois anos de idade criados em condições de controle, sem tratamento hormonal. Essas amostras foram misturadas a fim de se obter um material representativo contemplando as variações de gênero, idade e demais especificidades individuais. Tubos de plástico Vacuette<sup>®</sup> (Greiner Bio-one, Americana, Brasil) de 16 x 100 mm com capacidade de 9 mL contendo ativador de coágulo foram utilizados para as coletas realizadas nas veias jugulares dos animais, em que a região de coleta foi previamente lavada com álcool etílico comercial. Após um período de aproximadamente 1h, em que os tubos permaneceram em repouso na posição vertical, efetuou-se centrifugação dos mesmos a 730 g por 6 min a 4 °C, combinando-se as camadas de soro superiores em tubo de plástico de 50 mL. Essa mistura de soros bovinos coletados dos animais citados foi utilizada como amostra branca durante o procedimento de otimização e validação do método, sendo acondicionada em freezer com temperatura inferior a -15 °C.

O procedimento de extração otimizado consistiu na adição de 50,0  $\mu$ L da solução de trabalho deuterada e 0,5 mL de metanol em 1000  $\mu$ L de soro bovino, contidos em tubo plástico com tampa de rosca de 15 mL, e posterior agitação em vórtex, em velocidade baixa por cerca de 5 s. Em seguida, adicionou-se 1 mL de água ultrapura e 1 mL de HEX, com posterior inversão manual dos tubos fechados por 20 vezes. A mistura foi então homogeneizada em vórtex em velocidade baixa por cerca de 10 s e centrifugada a 2700 g por 20 min a 4 °C. Esse procedimento foi repetido mais uma vez e as camadas de HEX sobrenadantes foram combinadas em outro tubo de vidro de 15 mL, com posterior evaporação a 45 °C sob fluxo de ar. O procedimento de derivatização em micro-ondas com MOX foi realizado e resíduo purificado foi reconstituído com 120  $\mu$ L de solução de ACN/água (65:35 v/v) acidificada com 0,1% v/v de ácido fórmico, como descrito no item 3.2.5 do Capítulo 3.

#### 4.2.4.1 Estudos de Extração

Diferentes abordagens de extração foram avaliadas até se obterem as condições descritas em 4.2.4. Em todas elas, 1 mL de soro bovino foi fortificado com 75 µL da solução de trabalho, o que corresponde ao LMDR proposto para cada analito, sendo todos os testes realizados em duplicatas genuínas. Nos procedimentos listados a seguir, as etapas de extração descritas no item 4.2.4 foram seguidas e as modificações abaixo foram avaliadas:

- A) Bligh & Dyer: Realizou-se a primeira LLE com 2 mL de solução metanol/CLF (2:1 v/v), seguido da adição de 670 µL de CLF e 670 µL de água ultrapura; e uma segunda LLE com 1 mL de CLF. As fases orgânicas, fases inferiores, foram recolhidas dos tubos com o auxílio de uma pipeta de *Pasteur* e transferidas para outro tubo de vidro para evaporação posterior e derivatização. Deve-se observar que para os procedimentos A e B não se adicionaram 0,5 mL de metanol e 1 mL de água ao soro antes das etapas de LLE (BLIGH, 1959);
- B) Folch: realizou-se a primeira LLE com 2 mL da mistura CLF/metanol (2:1 v/v), seguido da adição de 750 µL de água ultrapura; e uma segunda LLE com 2 mL de CLF, recolhendo-se as fases como descrito no procedimento A (FOLCH, 1957);
- C) Realizou-se o procedimento descrito em 4.2.4, sem a adição de 0,5 mL de metanol após a adição das soluções de trabalho;
- D) Procedimento descrito em 4.2.4;
- E) Realizaram-se duas LLE consecutivas empregando 1 mL de mistura de EtOAc/MTBE (50:50 v/v) (YOU, 2011);
- F) Realizaram-se duas LLE consecutivas empregando 1 mL de mistura de HEX/EtOAc (7:3 v/v) (GRAY, 2011);
- G) Após a adição de 0,5 mL de metanol e 1 mL de água ultrapura ao soro com posterior centrifugação, transferiu-se o sobrenadante para cartucho de extração HLB, previamente condicionado com 5 mL de metanol e 5 mL de água. Realizou-se a lavagem dos cartuchos com 5 mL de água e 5 mL de metanol/água (55:45 v/v), e os analitos foram eluídos com 2 mL de ACN, seguidos por 2 mL de EtOAc e 1,5 mL de ACT, em um tubo de vidro. Os eluatos foram subsequentemente evaporados até a secura a 45 ° C sob fluxo de ar, seguindo-se a derivatização (Procedimento desenvolvido previamente no LFDA-MG).

Para cada procedimento avaliado, as áreas dos picos cromatográficos de cada analito foram divididas pela média das áreas do mesmo composto, a fim de se uniformizar a magnitude numérica das áreas dos diferentes analitos. As áreas ponderadas de todos os analitos, em cada condição avaliada, foram então somadas, obtendo-se assim uma soma de áreas ponderadas por experimento.

#### **4.2.5 Validação**

Como previsto no Manual de Garantia da Qualidade Analítica – Resíduos e Contaminantes em Alimentos (BRASIL, 2011), o procedimento de expansão de validação para a matriz soro bovino foi realizado, considerando o método originalmente validado para a matriz pelo bovino apresentado no Capítulo 3. As figuras de mérito estudadas foram: linearidade, recuperação, precisão, U,  $CC\alpha$ ,  $CC\beta$  e LQ.

##### **4.2.5.1 Faixa de Trabalho e Linearidade**

Curvas de calibração matrizadas, preparadas por meio da adição dos padrões analíticos antes do procedimento de extração, foram empregadas durante todo o processo de validação. A faixa de trabalho englobou os níveis: 1/3 (LQ); 2/3; 1,0; 4/3; 5/3 e 2,0 x LMDR de cada analito, correspondendo aos volumes da solução de trabalho (item 4.2.1): 25; 50; 75; 100; 125 e 150  $\mu\text{L}$ . Cada ponto da curva foi preparado em triplicata genuína e extraído de acordo com o procedimento descrito em 4.2.4. Os valores discrepantes -*outliers*- dos dados obtidos foram detectados pelo teste de Grubbs, e excluídos, ao nível de confiança de 99%. A avaliação da linearidade foi executada de acordo com o item 2.2.7.1 do Capítulo 2, em que calcularam-se os valores de t de correlação linear ( $t_r$ ) para cada analito a partir das curvas ajustadas pelos MMQO ou MMQP.

##### **4.2.5.2 Recuperação e Precisão**

Para as condições de repetibilidade, 10 amostras brancas foram fortificadas com a solução de trabalho no LMDR de cada analito, e uma curva de calibração foi preparada para se calcular as respectivas concentrações. Esse procedimento foi realizado para outras 10 amostras por um outro analista no mesmo dia de análise, totalizando 20 amostras para o estudo em condições de precisão intermediária. O LQ de cada analito foi avaliado em condições de repetibilidade, por meio da fortificação de 6 amostras no primeiro nível de concentração descrito no item 4.2.5.1. Os LDs dos

analitos foram avaliados por meio da fortificação em triplicata genuína de amostras brancas em concentrações decrescentes, correspondendo a LQ/2, LQ/4 e LQ/10. Os analitos foram considerados como detectados quando todas as transições de massas monitoradas apresentaram relação entre sinal analítico e ruído superior a 3. Para o analito  $\beta$ TE essa avaliação não foi realizada, devido à indisponibilidade de matriz branca, por se tratar de um composto de origem endógena.

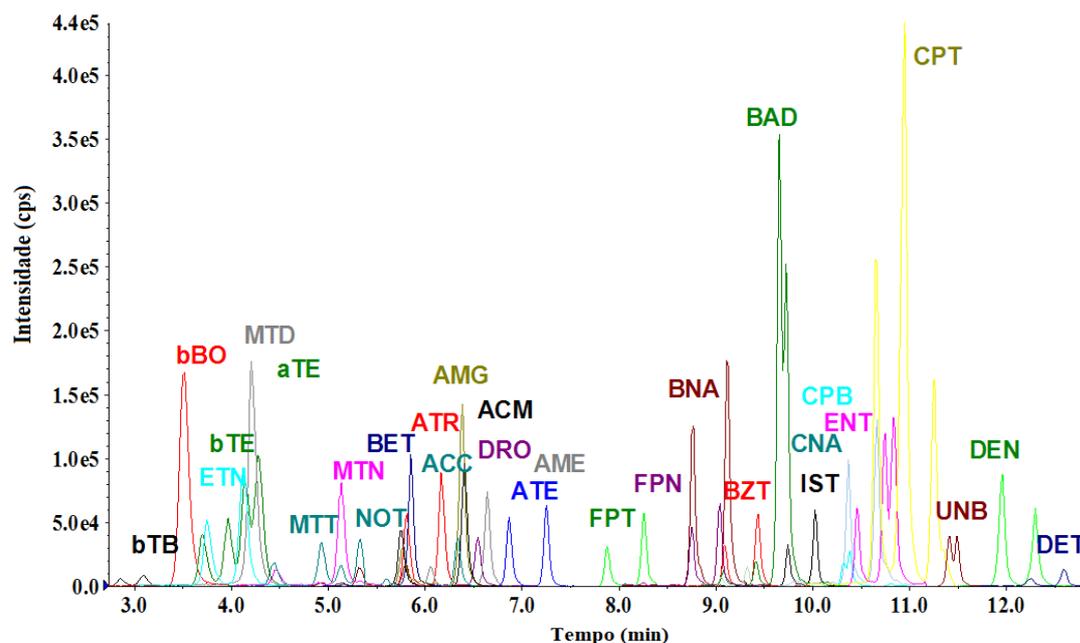
#### **4.2.5.3 Limite de Decisão, Capacidade de Detecção e Incerteza de medição**

Os valores de  $CC\alpha$  e  $CC\beta$  foram calculados por meio da fortificação de 20 amostras no respectivo LMDR de cada analito, conforme descrito no item 2.2.7.4 do Capítulo 2. A incerteza de medição foi estimada usando a metodologia *Top-Down* (YODEN, 1975), considerando a incerteza relativa à curva de calibração, combinada com a incerteza relacionada ao ensaio de precisão intermediária das 20 amostras analisadas, de acordo com procedimento descrito no item 2.2.7.3 do Capítulo 2.

### **4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

#### **4.3.1 Estudo das Condições Espectrométricas e Cromatográficas**

Os resultados referentes aos parâmetros de operação do espectrômetro de massas, bem como as razões de íons para as transições de massas estudadas para a matriz soro bovino estão apresentados no Apêndice IV. Após o emprego do gradiente descrito no item 3.2.3, obteve-se o cromatograma de íons extraídos apresentado na Figura 4.1:



**Figura 4.1:** Cromatograma de íons extraídos referente ao gradiente otimizado para o extrato de soro bovino fortificado no LMDR de cada analito e analisado por LC-MS/MS no modo ESI<sup>+</sup>

Da mesma forma que para os cromatogramas obtidos para pelo bovino (item 3.3.1), 2 picos cromatográficos, referentes aos isômeros formados após a reação de derivatização, foram observados para  $\alpha$ TE, ACC, AME, ATE, AME-d3, ATR, AMG, ACM, BNA,  $\beta$ TB,  $\beta$ TE, BZT, BZT-d3, CIP-d3, CNA, CPT, DEN, DET, DET-d3, ENT, FPN, FPT, FPT-d3, MTD, MTT, MTT-d3, NOT, IST, PPT, PPT-d3 e UNB. O pico relacionado ao maior tempo de retenção foi selecionado para ser integrado para esses os analitos, com exceção de ATR, ENT e UNB, cuja integração contemplou ambos os picos, uma vez que essa condição levou a melhores desempenhos referentes a linearidade e precisão. Para  $\alpha$ TE e  $\beta$ TE integraram-se os picos de menor tempo de retenção, uma vez que os picos de maiores tempos desses dois isômeros não apresentaram boa resolução cromatográfica.

#### 4.3.2 Estudos de Extração

Diferentes procedimentos, que poderiam ser facilmente implementados numa rotina analítica de um laboratório de determinação de resíduos de medicamentos, foram avaliados e comparados com um método inicialmente desenvolvido no LFDA-MG, baseado em SPE utilizando cartucho HLB. A Tabela 4.1 apresenta os valores das áreas

calculadas para cada analito, os respectivos desvios padrão para as duplicatas reais analisadas, e a soma ponderada calculada para cada método avaliado:

**Tabela 4.1:** Comparação da soma ponderada das áreas dos picos cromatográficos obtidas a partir de diferentes abordagens de extração de esteroides em soro bovino fortificado no LMDR de cada analito

(continua)

Analito	Procedimentos avaliados						
	A) BLIGH DYER	B) FOLCH	C) HEX	D) Metanol + HEX	E) EtOAc/ MTBE	F) HEX/ EtOAc	G) SPE HLB
	Áreas ( $\times 10^6$ cps)						
ACC	0,8 ( $\pm 0,1$ )	0,9 ( $\pm 0,1$ )	1,8 ( $\pm 0,4$ )	1,4 ( $\pm 0,1$ )	0,9 ( $\pm 0,2$ )	1,1 ( $\pm 0,4$ )	1,2 ( $\pm 0,1$ )
ACM	2,0 ( $\pm 0,3$ )	2,2 ( $\pm 0,1$ )	2,6 ( $\pm 0,1$ )	2,2 ( $\pm 0,2$ )	2,67 ( $\pm 0,6$ )	2,6 ( $\pm 0,6$ )	1,9 ( $\pm 0,1$ )
AME	1,7 ( $\pm 0,1$ )	1,9 ( $\pm 0,1$ )	2,7 ( $\pm 0,1$ )	2,4 ( $\pm 0,1$ )	1,9 ( $\pm 0,6$ )	2,0 ( $\pm 0,6$ )	1,9 ( $\pm 0,1$ )
ATE	1,1 ( $\pm 0,1$ )	1,2 ( $\pm 0,1$ )	2,5 ( $\pm 0,1$ )	2,3 ( $\pm 0,4$ )	1,1 ( $\pm 0,2$ )	1,9 ( $\pm 0,6$ )	1,6 ( $\pm 0,1$ )
ATR	1,6 ( $\pm 0,3$ )	1,0 ( $\pm 0,1$ )	3,1 ( $\pm 0,1$ )	3,1 ( $\pm 0,1$ )	1,6 ( $\pm 0,2$ )	2,5 ( $\pm 0,7$ )	1,8 ( $\pm 0,4$ )
BAD	6,2 ( $\pm 0,4$ )	7,1 ( $\pm 0,5$ )	24,4 ( $\pm 2,9$ )	24,6 ( $\pm 3,8$ )	6,9 ( $\pm 0,7$ )	10,5 ( $\pm 1,8$ )	24,1 ( $\pm 0,8$ )
BBO	1,7 ( $\pm 0,3$ )	1,1 ( $\pm 0,1$ )	3,5 ( $\pm 0,1$ )	0,3 ( $\pm 0,1$ )	1,9 ( $\pm 0,1$ )	1,2 ( $\pm 0,3$ )	0,7 ( $\pm 0,1$ )
BET	0,18 ( $\pm 0,1$ )	0,22 ( $\pm 0,1$ )	0,8 ( $\pm 0,1$ )	0,6 ( $\pm 0,1$ )	0,2 ( $\pm 0,1$ )	0,2 ( $\pm 0,1$ )	0,4 ( $\pm 0,1$ )
BNA	3,6 ( $\pm 0,5$ )	4,4 ( $\pm 0,4$ )	10,9 ( $\pm 0,4$ )	14,0 ( $\pm 4,4$ )	4,3 ( $\pm 1,1$ )	6,2 ( $\pm 1,9$ )	7,3 ( $\pm 0,1$ )
BTB	1,1 ( $\pm 0,1$ )	1,2 ( $\pm 0,1$ )	0,2 ( $\pm 0,1$ )	0,2 ( $\pm 0,1$ )	2,5 ( $\pm 0,08$ )	0,8 ( $\pm 0,2$ )	0,3 ( $\pm 0,1$ )
BTE	2,8 ( $\pm 0,6$ )	1,8 ( $\pm 0,2$ )	1,6 ( $\pm 0,6$ )	1,4 ( $\pm 0,1$ )	4,8 ( $\pm 0,1$ )	3,5 ( $\pm 0,6$ )	2,6 ( $\pm 0,2$ )
BZT	0,7 ( $\pm 0,1$ )	0,8 ( $\pm 0,1$ )	2,3 ( $\pm 0,1$ )	2,6 ( $\pm 0,7$ )	1,0 ( $\pm 0,1$ )	1,3 ( $\pm 0,2$ )	2,6 ( $\pm 0,1$ )
CNA	8,2 ( $\pm 0,3$ )	9,3 ( $\pm 0,4$ )	27,1 ( $\pm 1,8$ )	28,4 ( $\pm 4,2$ )	7,3 ( $\pm 0,3$ )	11,2 ( $\pm 3,3$ )	7,2 ( $\pm 0,6$ )
CPB	1,2 ( $\pm 0,1$ )	1,4 ( $\pm 0,1$ )	5,6 ( $\pm 0,3$ )	5,6 ( $\pm 0,4$ )	0,9 ( $\pm 0,3$ )	1,8 ( $\pm 0,6$ )	4,5 ( $\pm 0,9$ )

**Tabela 4.1:** Comparação da soma ponderada das áreas dos picos cromatográficos obtidas a partir de diferentes abordagens de extração de esteroides em soro bovino fortificado no LMDR de cada analito  
(conclusão)

Analito	Procedimentos avaliados						
	A) BLIGH DYER	B) FOLCH	C) HEX	D) Metanol + HEX	E) EtOAc/ MTBE	F) HEX/ EtOAc	G) SPE HLB
	Áreas (x10 <sup>6</sup> cps)						
CPT	1,0 (± 0,2)	0,8 (± 0,1)	4,6 (± 0,3)	4,8 (± 0,4)	2,2 (± 0,7)	2,7 (± 0,5)	2,1 (± 0,4)
DEN	5,1 (± 0,1)	5,4 (± 0,2)	9,2 (± 0,6)	11,5 (± 2,3)	2,6 (± 0,6)	4,2 (± 0,9)	10,5 (± 2,5)
DET	0,7 (± 0,1)	0,7 (± 0,2)	0,9 (± 0,1)	1,4 (± 0,4)	0,2 (± 0,1)	0,5 (± 0,2)	1,2 (± 0,1)
DRO	0,5 (± 0,1)	0,6 (± 0,1)	1,0 (± 0,1)	0,7 (± 0,1)	0,6 (± 0,1)	0,7 (± 0,3)	0,7 (± 0,1)
ENT	1,9 (± 0,3)	2,2 (± 0,1)	8,6 (± 0,1)	10,8 (± 1,9)	2,2 (± 0,1)	3,0 (± 0,4)	7,5 (± 0,2)
ETN	2,7 (± 0,6)	3,1 (± 0,2)	1,5 (± 0,5)	1,8 (± 0,1)	4,0 (± 0,4)	2,9 (± 0,6)	2,2 (± 0,3)
FPN	2,1 (± 0,3)	2,3 (± 0,1)	4,8 (± 0,3)	7,4 (± 1,4)	2,8 (± 0,5)	3,5 (± 1,0)	4,8 (± 0,1)
FPT	0,2 (± 0,3)	0,2 (± 0,1)	0,7 (± 0,2)	0,9 (± 0,2)	0,3 (± 0,1)	0,4 (± 0,1)	0,6 (± 0,1)
IST	1,4 (± 0,2)	1,6 (± 0,1)	1,9 (± 0,2)	1,8 (± 0,1)	1,8 (± 0,5)	1,8 (± 0,4)	1,3 (± 0,1)
MTD	4,3 (± 0,9)	5,2 (± 0,4)	1,5 (± 0,4)	1,8 (± 0,5)	6,1 (± 0,4)	3,4 (± 0,5)	3,2 (± 0,3)
MTN	2,5 (± 0,3)	3,0 (± 0,3)	2,5 (± 0,8)	2,0 (± 0,1)	2,5 (± 0,1)	2,6 (± 0,6)	2,9 (± 0,1)
MTT	2,1 (± 0,4)	1,5 (± 0,3)	1,9 (± 0,5)	2,0 (± 0,2)	2,6 (± 0,2)	2,5 (± 0,5)	2,3 (± 0,2)
NOT	0,2 (± 0,1)	0,2 (± 0,1)	0,1 (± 0,1)	0,1 (± 0,1)	0,3 (± 0,1)	0,2 (± 0,1)	0,1 (± 0,1)
PPT	1,3 (± 0,2)	1,6 (± 0,2)	3,0 (± 0,2)	3,8 (± 1,4)	1,8 (± 0,3)	2,2 (± 0,3)	2,7 (± 0,2)
UNB	1,2 (± 0,1)	1,3 (± 0,1)	3,9 (± 0,8)	4,1 (± 0,9)	0,6 (± 0,1)	1,3 (± 0,6)	5,2 (± 0,8)
Soma ponderada	21,9	23,0	39,4	39,0	27,8	27,0	31,8

HEX: n-hexano; EtOAc: acetato de etila.; MTBE: éter metil terc-butílico; SPE: extração em fase sólida.

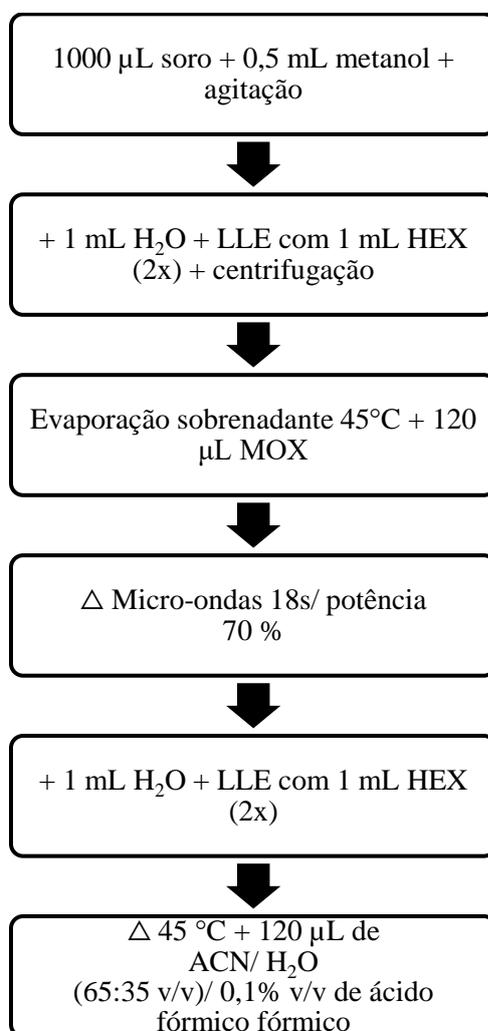
Durante a execução dos experimentos A e B, observou-se que a adição de misturas de CLF e metanol levou à coagulação das proteínas do soro, que ficaram dispersas na fase superior dos tubos, tendo em vista a maior densidade do CLF. Observou-se também a formação de uma fase gelificada intermediária entre o CLF e a fase coagulada superior, o que tornou o processo de transferência da fase orgânica mais dispendioso e demorado em comparação com os demais ensaios. Nota-se, a partir da Tabela 4.1, que as condições dos experimentos A e B levaram a desempenhos similares em termos de soma ponderada, não correspondendo aos maiores valores de áreas corrigidas para nenhum dos analitos estudados.

Para os procedimentos C e D, os maiores valores de somas ponderadas dentre as abordagens avaliadas foram obtidos. Entretanto, na condição C observou-se que a ausência de metanol levou à formação de intensa gelificação nas amostras, mesmo efetuando-se agitação dos tubos por inversão manual e com baixa velocidade de agitação em vórtex. Portanto, a adição de metanol ao meio melhora a limpeza dos extratos, sem interferir na eficiência de partição durante as LLEs com HEX, o que acarretou na seleção da condição D para a condução da validação. Destaca-se que a maior eficiência de extração desse solvente deve-se a sua menor polaridade dentre os avaliados ( $\log P = 4,00$ ), o que, como apresentado em 3.3.4, corresponde com a baixa polaridade dos ésteres de esteroides e esteroides em estudo.

Para a abordagem E, observaram-se as maiores áreas corrigidas para os analitos não esterificados, mais polares,  $\beta$ TB,  $\beta$ TE, ETN, MTD, MTT, NOT e ACM, o que pode ser explicado pelos menores valores de coeficientes de partição octanol-água ( $\log P$ ) para EtOAc (0,73) e MTBE (0,94), em comparação com HEX (4,00) (SANGSTER, 1989). Entretanto, durante a realização dos experimentos observou-se que, após a partição, a fase orgânica superior apresentou turvação elevada e coloração amarela intensa, o que evidenciou que a mistura de solventes empregada em E levou à extração de uma maior quantidade de impurezas em comparação com C e D. Para a condição F, um desempenho semelhante à E foi observado, porém a turbidez e a coloração amarela foram menos intensas que em E.

Comparando-se os resultados obtidos a partir do procedimento D, baseados em LLE, com os resultados do ensaio G, fundamentado em SPE, notou-se que o último forneceu maiores áreas apenas para BZT e UNB, porém não muito superiores às

observadas para esses analitos na condição D. Dessa forma, o emprego da LLE com HEX não somente levou a uma análise mais rápida e de menor custo em comparação com a SPE empregando cartucho HLB, como também, apresentou melhor desempenho no que se refere à eficiência de extração. A Figura 4.2 representa o procedimento de extração otimizado:



**Figura 4.2:** Fluxograma representativo do procedimento de extração para soro bovino empregado durante a validação

### 4.3.3 Validação

#### 4.3.3.1 Linearidade

Para avaliação da linearidade, os valores de t de Student para correlação linear ( $t_r$ ) (Tabela 4.2) foram estimados para cada analito, e estes foram superiores ao valor

crítico, igual a 2,78. Portanto, a linearidade foi considerada adequada, dentro das faixas de trabalho otimizadas.

**Tabela 4.2:** Avaliação de linearidade para os esteroides e ésteres de esteroides estudados em soro bovino (continua)

<b>Analito</b>	<b>PI</b>	<b>b</b>	<b>s(b)</b>	<b>a</b>	<b>s(a)</b>	<b>R<sup>2</sup></b>	<b>t<sub>r</sub></b>
ACC	AME-d3	0,778	0,011	-0,012	0,002	0,994	26,81
ACM	AME-d3	1,852	0,02	0,047	0,003	0,986	16,85
AME	AME-d3	1,430	0,01	-0,001	0,002	0,999	73,23
AMG	AME-d3	2,969	0,045	-0,032	0,01	0,997	38,32
ATE	PPT-d3	0,505	0,006	0,001	0,001	0,997	38,48
ATR	PPT-d3	1,176	0,023	-0,007	0,002	0,994	25,88
BAD	BZT-d3	1,385	0,007	-0,051	0,004	0,984	15,45
βBO	βBO-d3	0,092	0,001	0,033	0,002	0,999	75,08
BET	BET-d3	0,633	0,006	-0,017	0,005	0,995	27,69
BNA	BZT-d3	1,016	0,011	-0,003	0,001	0,994	26,62
βTB	βBO-d3	0,048	0,002	0,002	0,001	0,973	12,05
βTE	βTE-d2	13,297	0,419	3,289	0,108	0,977	13,07
BZT	BZT-d3	0,579	0,011	0,003	0,001	0,992	22,11
CNA	CPT-d3	0,188	0,005	0,016	0,001	0,982	14,72
CPB	CPT-d3	0,209	0,004	0,004	0,001	0,984	15,58
CPT	CPT-d3	0,339	0,005	-0,003	0,004	0,995	29,39
DEN	DET-d3	0,165	0,002	-0,012	0,002	0,955	9,24
DET	DET-d3	0,318	0,008	0,007	0,001	0,989	19,40
DRO	AME-d3	0,139	0,003	0,003	0,001	0,983	15,13
ENT	PPT-d3	0,116	0,002	0,008	0,001	0,992	22,19
ETN	βBO-d3	0,346	0,004	-0,004	0,002	0,990	20,42
FPN	FPT-d3	0,663	0,013	0,008	0,002	0,989	18,68
FPT	FPT-d3	0,354	0,012	0,001	0,001	0,983	15,32
IST	TEP-d3	1,070	0,055	0,005	0,003	0,914	6,53
MTD	βBO-d3	0,133	0,002	0,042	0,003	0,986	16,68
MTN	βBO-d3	0,126	0,003	-0,011	0,003	0,983	15,30
MTT	MTT-d3	0,418	0,003	0,002	0,001	0,998	42,33

**Tabela 4.2:** Avaliação de linearidade para os esteroides e ésteres de esteroides estudados em soro bovino (conclusão)

<b>Analito</b>	<b>PI</b>	<b>b</b>	<b>s(b)</b>	<b>a</b>	<b>s(a)</b>	<b>R<sup>2</sup></b>	<b>t<sub>r</sub></b>
NOT	MTT-d3	0,065	0,001	0,001	0,001	0,985	16,00
PPT	PPT-d3	0,478	0,015	0,009	0,003	0,977	13,15
UNB	DET-d3	0,730	0,014	-0,014	0,004	0,988	18,49

a: intercepto; b: inclinação; R<sup>2</sup>: coeficiente de determinação; s(a): desvio padrão do intercepto; s(b): desvio padrão da inclinação; PI: padrão interno; t<sub>r</sub>: valor de t de Student para correlação.

#### 4.3.3.2 Recuperação e Precisão

Os critérios de aceitação apresentados pelas diretrizes do Codex Alimentarius foram adotados (CODEX, 2003). Para níveis de concentração iguais ou abaixo de 1 µg kg<sup>-1</sup>, valores de recuperação entre 50 e 120% são considerados satisfatórios, e para a faixa de 1 a 10 µg kg<sup>-1</sup> valores entre 60 e 120%. Os CVs aceitáveis correspondem a 35 e 30% para as duas faixas de concentração respectivas.

A recuperação do método (Tabela 4.3), no nível do LQ de cada analito, em condições de repetibilidade, variou entre 73,0 (CPB) e 117,6% (UNB). No nível do LMDR, em condições de repetibilidade, esses valores variaram entre 93,7 (ACM) e 119,3% (βTB), e em condições de precisão intermediária entre 92,6 (DEN) e 118,1% (PPT). Considerando as faixas de limites citadas, pode-se afirmar que o método desenvolvido apresentou recuperação adequada para os analitos monitorados.

**Tabela 4.3:** Avaliação das figuras de mérito estudadas para validação do método de determinação de esteroides em soro bovino (continua)

Analito	LD	LQ	LMDR	R (%)	CV (%)	R <sup>a</sup> (%)	R <sup>b</sup> (%)	CV <sup>a</sup>	CV <sup>b</sup>	CC $\alpha$	CC $\beta$	U
	( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	LQ	LQ			(%)	(%)	( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	(%)
ACC	0,050	0,100	0,300	108,4	3,5	100,7	99,8	3,6	4,7	0,032	0,055	10,7
ACM	0,010	0,100	0,300	104,0	6,5	93,7	94,1	8,5	6,9	0,045	0,100	13,7
AME	0,010	0,100	0,300	100,8	3,4	98,1	98,1	3,3	2,8	0,019	0,033	6,0
AMG	0,010	0,100	0,300	104,9	3,1	98,8	99,1	5,7	4,1	0,029	0,049	9,3
ATE	0,019	0,075	0,225	102,6	12,8	98,1	103,9	14,7	15,4	0,084	0,143	31,1
ATR	0,005	0,050	0,150	100,6	7,1	100,6	101,5	12,2	11,7	0,042	0,071	24,0
BAD	0,050	0,200	0,600	87,3	15,3	101,1	105,6	7,0	9,1	0,134	0,20	18,5
$\beta$ BO	0,440	1,750	5,250	94,3	4,3	98,6	97,8	2,1	2,7	0,317	0,541	6,3
BET	0,094	0,375	1,125	110,1	6,3	101,1	99,1	6,3	6,2	0,16	0,273	12,6
BNA	0,0075	0,075	0,225	104,8	9,3	101,5	100	7,5	6,6	0,035	0,059	13,8
$\beta$ TB	0,050	0,100	0,300	94,3	4,3	119,3	116,6	10,3	10,1	0,082	0,140	25,3
$\beta$ TE	-	0,063	0,188	109,0	15,6	107,2	101,0	13,7	13,2	0,058	0,100	46,3
BZT	0,012	0,050	0,150	97,8	2,3	101,8	98,6	3,6	5,0	0,017	0,029	11,3
CNA	0,038	0,150	0,450	84,6	12,5	101,4	93,9	9,9	12,3	0,121	0,206	25,8
CPB	0,019	0,075	0,225	73,0	5,9	103,4	95,7	5,1	10,0	0,05	0,085	20,4
CPT	0,150	0,300	0,900	75,6	13,2	102,6	102,0	6,6	6,2	0,132	0,300	39,3
DEN	0,120	0,500	1,500	86,5	18,3	94,9	92,6	8,2	9,8	0,319	0,543	19,9
DET	0,0095	0,038	0,113	110,6	9,6	108,6	109,0	7,1	8,6	0,024	0,042	20,4
DRO	0,037	0,150	0,450	78,8	18,2	99,3	97,6	14,7	13,1	0,134	0,229	26,9
ENT	0,150	0,300	0,900	87,3	5,7	106,2	104,2	11,4	14,3	0,313	0,534	29,7

**Tabela 4.3:** Avaliação das figuras de mérito estudadas para validação do método de determinação de esteroides em soro bovino (conclusão)

Analito	LD	LQ	LMDR	R (%)	CV (%)	R <sup>a</sup> (%)	R <sup>b</sup> (%)	CV <sup>a</sup>	CV <sup>b</sup>	CC $\alpha$	CC $\beta$	U
	( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	LQ	LQ			(%)	(%)	( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	(%)
ETN	0,050	0,200	0,600	100,2	8,8	102,1	102,4	9,8	10,4	0,149	0,255	21,3
FPN	0,012	0,050	0,150	95,1	21,4	100,1	101,7	11,4	9,6	0,034	0,058	20,0
FPT	0,0062	0,025	0,075	116,5	13,6	104,4	109,0	6,8	9,3	0,018	0,030	20,0
IST	0,025	0,050	0,150	98,9	16,8	97,5	103,3	19,6	19,6	0,071	0,121	40,7
MTD	0,190	0,750	2,250	88,2	13,0	109,4	108,4	16,8	15,7	0,895	1,525	31,8
MTN	0,100	0,400	1,200	105,8	11,9	98,5	101,0	11,8	11,2	0,318	0,541	23,7
MTT	0,012	0,050	0,150	95,1	2,1	100,9	100,5	2,1	3,7	0,013	0,022	8,0
NOT	0,037	0,150	0,450	91,2	19,0	111,0	112,0	16,1	16,0	0,188	0,150	32,2
PPT	0,012	0,050	0,150	100,6	16,2	112,0	118,1	9,4	8,8	0,036	0,062	28,7
UNB	0,025	0,100	0,300	117,6	7,4	106,7	106,2	10,7	8,4	0,063	0,100	18,7

LD: limite de detecção verificado experimentalmente; LQ: limite de quantificação; LMDR: limite mínimo de desempenho requerido; R: Recuperação; CV: Coeficiente de variação; a: procedimento realizado em condições de repetibilidade no nível do LMDR; b: procedimento realizado em condições de precisão intermediária no nível do LMDR; CC $\alpha$ : limite de decisão; CC $\beta$ : capacidade de detecção; U: incerteza de medição.

Para o estudo da precisão do método, os valores dos CVs obtidos no nível do LQ, em condições de repetibilidade, variaram entre 2,1 (MTT) e 21,4% (FPN) (Tabela 4.3). No LMDR de cada analito, os CVs ficaram compreendidos entre 2,1 (MTT) e 19,6% (IST), em condições de repetibilidade; e entre 2,7 ( $\beta$ BO) e 19,6% (IST), em condições de precisão intermediária (Tabela 4.3). Nota-se, então, que a precisão do método, nos níveis de concentração avaliados, mostrou-se adequada para todos os analitos pesquisados de acordo com as faixas aceitáveis citadas.

#### **4.3.3.3 Limite de Decisão, Capacidade de detecção e Incerteza de Medição**

Os valores obtidos para  $CC\alpha$  variaram entre 0,013 (MTT) e 0,895  $\mu\text{g L}^{-1}$  (MTD), e os valores de  $CC\beta$  entre 0,022 (MTT) e 1,525  $\mu\text{g L}^{-1}$  (MTD). Considerando que os valores desses dois parâmetros devem ser menores que os respectivos LMDRs, de acordo com recomendação da Comunidade Europeia (CRLs, 2007), pode-se afirmar que a aplicação dos valores calculados de  $CC\alpha$  e/ou  $CC\beta$  na tomada de decisão quanto à presença de drogas proibidas na matriz soro bovino é adequada.

Conforme descrito no item 4.2.5.2, efetuou-se verificação experimental do LD dos analitos por meio de diluições sucessivas da solução de trabalho, sendo que, de acordo com os dados apresentados na Tabela 4.3, a maior parte dos analitos apresentou LD correspondente à razão LQ/4. Observou-se também que, com exceção de ACC e  $\beta$ BO, todos os analitos apresentaram valores de  $CC\alpha$  superiores aos respectivos LDs.

Os valores estimados de incerteza de medição calculados pela metodologia *Top-Down* variaram entre 6,0 (AME) e 46,3% ( $\beta$ TE). Considerando as recomendações descritas no item II.8.3 do guia de validação adotado neste trabalho (BRASIL, 2011), para faixas de concentração abaixo de 1  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , os valores de incerteza devem ser menores que 46,7%, o que foi alcançado para todos os analitos estudados.

#### 4.4 CONCLUSÕES

Neste capítulo foi realizado um estudo para a otimização da extração de 30 esteroides e ésteres de esteroides na matriz soro bovino, bem como a validação do método desenvolvido. Essa matriz foi avaliada com o objetivo de inseri-la no monitoramento de resíduos de anabolizantes no âmbito do PNCRC do MAPA. Um total de sete abordagens de extração foi avaliado, envolvendo LLE e SPE. Ao final desse estudo, obteve-se um método simples e de baixo custo, com desempenho adequado para a análise confirmatória dos analitos monitorados, baseado em LLE com HEX e derivatização química com MOX em forno de micro-ondas doméstico.

A identificação de ésteres de esteroides é uma prova inequívoca da administração exógena de formulações de esteroides na criação animal, o que não seria possível apenas com o monitoramento de compostos como  $\beta$ BO,  $\beta$ ES,  $\beta$ NAN e  $\beta$ TE, devido à origem endógena destes. Outros esteroides não esterificados também foram inseridos no método desenvolvido, uma vez que suas origens sintéticas também condicionam a detecção dos mesmos com um uso medicamentoso.

O emprego do método validado em soro bovino visa, portanto, ao fortalecimento do monitoramento de substâncias de ação anabolizante no Brasil. O emprego do mesmo poderá ser solicitado nos casos de investigação de amostras de urina ou músculo bovino suspeitas como positivas para anabolizantes, por meio da solicitação de coletas adicionais no produtor em questão.

#### 4.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BLIGH, E. G., DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Can. J. Biochem. Physiol.**, Canadá, v.37, p.911-917, 1959.

BRASIL, Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Manual de Garantia da Qualidade Analítica: Resíduos e Contaminantes em Alimentos**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Secretaria de Defesa Agropecuária, Brasília, 2011.

CODEX - Codex Alimentarius International *Food Standard* - CAC/GL 40-1993. **Guidelines on Good Laboratory Practice in Residue Analysis, Codex Alimentarius Commission**, Joint FAO/WHO Food Standards Program, Roma, 2003.

CRLs - Community Reference Laboratories Residues. **CRLs view on state of the art analytical methods for national residue control plans, 2007**. Disponível em: “<http://www.rivm.nl/bibliotheek/digitaaldepot/crlguidance2007.pdf>”, acesso em 01/02/2019.

DE KOCK, N., ACHARYA, S.R., UBHAYASEKERA, S. J. K. A., BERGQUIST, J. A. Novel Targeted Analysis of Peripheral Steroids by UltraPerformance Supercritical Fluid Chromatography Hyphenated to Tandem Mass Spectrometry. **Sci. Rep.**, Suécia, v.8, p.16993-17002, 2018.

FOLCH, J., LEES, M., STANLEY, G. H. S. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. **J. Biol. Chem.**, EUA, v.226, p.497-509, 1957.

FORSDAHL, G., *et al.* Detection of testosterone esters in blood. **Drug Test. Analysis**, Áustria, v.7, p.983-989, 2015.

FRENCH, D. Advances in bioanalytical techniques to measure steroid hormones in serum. **Bioanalysis**, EUA, v.8, n.11, p.1203-1219, 2016.

GENANGELI, M., *et al.* Development and application of a UHPLC-MS/MS method for the simultaneous determination of 17 steroidal hormones in equine serum. **J. Mass Spectrom.**, Itália, v.52, p.22-29, 2017.

GRAY, B. P., TEALE, P., PEARCE, C. M. Analysis of methyloxime derivatives of intact esters of testosterone and boldenone in equine plasma using ultra high performance liquid chromatography tandemmass spectrometry. **Drug Test. Analysis.**, Reino Unido, 2011, v.3, p.206-213, 2011.

KAABIA, *et al.* Ultra high performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry based identification of steroid esters in serum and plasma: An efficient strategy to detect natural steroids abuse in breeding and racing animals. **J. Chromatogr. A**, França, v.1284, p.126-140, 2013.

LIU, Q., CHIL, Q., FAN, RT., TIAN, HD., WANG, X. Quantitative-Profiling Method of Serum Steroid Hormones by Hydroxylamine-Derivatization HPLC-MS. **Nat. Prod. Bioproduct.**, China, v.9, p.201-208, 2019.

LUO, G., LI, Y., BAO, J. J. Development and application of a high-throughput sample cleanup process based on 96-well plate for simultaneous determination of 16 steroids in biological matrices using liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry. **Anal Bioanal Chem**, China, v.408, p.1137-1149, 2016.

REIS, A., RUDNITSKAYA, A., BLACKBURN, G. J., FAUZI, N. M., PITT, A. R., SPICKETT, C. M. A comparison of five lipid extraction solvent systems for lipidomic studies of human LDL. **J. Lipid Res.**, Reino Unido, v.54, p. 1812-1824, 2013.

REJTHAROVÁ, M., REJTHAR, L., ČAČKOVÁ, K. Determination of testosterone esters and estradiol esters in bovine and porcine blood serum. **Food Addit Contam**

**Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess.**, República Tcheca, v.34, n. 4, p.477-481, 2017.

REJTHAROVÁ, M., REJTHAR, L., ČAČKOVÁ, K. Determination of testosterone esters and nortestosterone esters in animal blood serum by LC-MS/MS. **Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess.**, República Tcheca, v. 35, n. 2, p.233-240, 2018.

SANGSTER, J. Octanol-Water Partition Coefficients of Simple Organic Compounds. **J. Phys. Chem. Ref. Data**, Canadá, v.18, n.3, p.1111-1229, 1989.

WADA – World Anti-Doping Agency. **WADA welcomes significant decision by Court of Arbitration for Sport, 2019**. Disponível em ”<https://www.wada-ama.org/en/media/news/2019-04/wada-welcomes-significant-decision-by-court-of-arbitration-for-sport>”. Acesso em 21/09/2019.

WADA – World Anti-Doping Agency. **International Standard for Laboratories**. World Anti-Doping Agency. Montreal, Quebec, Canada, 2016

WOŹNIAK, B., WITEK, S., MATRASZEK-ZUCHOWSKA, I., KŁOPOT, A., POSYNIAK, A. Levels of the natural hormones 17 $\beta$ -oestradiol and testosterone in serum of cattle: results from population studies in Poland. **J. Vet. Res.**, Polônia, v.60, p.461-466, 2016.

WOŹNIAK, B., MATRASZEK-ZUCHOWSKA, I., WITEK, S., POSYNIAK, A. Development of LC-MS/MS confirmatory method for the determination of testosterone in bovine serum. **J. Vet. Res.**, Polônia, v.61, p.81-89, 2017.

YOU, Y., *et al.* Simultaneous separation and determination of 16 testosterone and nandrolone esters in equine plasma using ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry for doping control. **J. Chromatogr. A.**, EUA, v.1218, p.3982-3993, 2011.

## **Capítulo 5**

**Avaliação da Aplicabilidade das Matrizes Pelo, Soro e Urina  
por Estudos *In Vivo* Envolvendo a Aplicação dos  
Medicamentos Androgenol e Equi-Boost em Bovinos**

## 5.1 INTRODUÇÃO

### 5.1.1 Monitoramento de Resíduos de Boldenona

A 17 $\beta$ -boldenona ( $\beta$ BO) é um hormônio androgênico com alta probabilidade de uso em humanos e em animais, nesses últimos para fins de promoção de crescimento e para o tratamento de animais debilitados (AFSCA, 2013). Apesar de possuir indicação apenas para uso veterinário em animais equinos debilitados, sua disponibilidade comercial para tal finalidade é uma facilitadora de seu uso ilegal. No caso de sua aplicação veterinária, o monitoramento do uso dessa droga deve levar em conta os registros na literatura da ocorrência de  $\beta$ BO de forma endógena em alguns animais. A suposição atualmente aceita é a de que compostos como fitoesteróis e mesmo outros esteroides sofram reações de oxidação ou redução em matrizes biológicas, sendo convertidos em compostos correlatos com a mesma estrutura base dos esteroides (Figura 1.1, Capítulo 1). Dessa forma, compostos como  $\beta$ BO (1-dehidrotosterona) poderiam ser formados a partir de precursores naturais e endógenos por esse tipo de reação, especialmente quando da presença de microrganismos da flora intestinal de ruminantes, supostamente envolvidos nessa conversão (VILJANTO, 2019). Resultados positivos de  $\beta$ BO em amostras de urina coletadas de animais devem, portanto, ser cuidadosamente avaliados quanto à presença de fezes, que são consideradas um meio propício para tal reação. Além disso, a própria microbiota presente em amostras de urina, ou mesmo a presente em rações para alimentação animal, pode estar envolvida nesse processo, principalmente quando relacionadas a condições de armazenamento e transporte inapropriadas (POMPA, 2006; VILJANTO, 2019). Com relação à espécie suína, o composto  $\beta$ BO já foi encontrado nos testículos desses animais, indicando uma produção endógena não relacionada a esse mecanismo de conversão citado (POELMANS, 2005).

Em 2009 DESTREZ e parceiros indicaram o metabólito sulfato de 17 $\beta$ -boldenona como um marcador para a administração de formulações comerciais de boldenona em animais bovinos. Esse composto foi detectado em urina até um período de 36 h após administração oral de boldenona, e 30 dias após a administração intramuscular de formulação contendo UNB ( $CC\alpha = 0,2 \text{ ng ml}^{-1}$ ). No ano de 2012, GÓMEZ e colaboradores confirmaram a indicação tanto desse metabólito quanto do sulfato de epiboldenona para a identificação de *doping* em urina de humanos coletadas

até um período de 56 h após administração de 20 mg de  $\beta$ BO. Nesse último trabalho, os autores sugerem que a ausência desses metabólitos pode ser usada para classificar a origem endógena de derivados de  $\beta$ BO, ao passo que uma análise adicional por GC-C-IRMS seria ainda necessária para classificação da administração exógena. Entretanto, no ano de 2015, CHIESA e parceiros desenvolveram um estudo analisando-se a urina de 55 animais não tratados em diferentes condições de estresse durante o transporte e nos abatedouros, constatando a presença das duas formas sulfatadas nesses animais. Deve-se notar que o método de extração envolve o uso de colunas de imunoafinidade, que proporcionaram grande sensibilidade, com valores de  $CC\alpha$  iguais a  $0,07 \text{ ng mL}^{-1}$ . Os autores indicam então que esse ganho de sensibilidade analítica, em comparação com os métodos previamente descritos, pode ter evidenciado a origem endógena desses metabólitos.

Com relação aos trabalhos descritos envolvendo administração de  $\beta$ BO em animais, em 2018, KAABIA e colaboradores desenvolveram um método LC-MS/MS para a identificação de metabólitos resultantes da administração de injeção intramuscular de UNB na dosagem de  $2 \text{ mg kg}^{-1}$  em 2 bezerros, dos quais amostras de urina foram coletadas por um período de até 45 dias após a aplicação. Durante 35 dias foi possível a detecção de  $17\beta$ -boldenona glucuronídeo, juntamente com o composto de identidade hipotética atribuída a  $17\alpha$ -boldenona glucuronídeo.

Em 2007, SOMA e colaboradores realizaram a injeção de UNB a partir do medicamento Equipoise<sup>®</sup> na dosagem de  $1,1 \text{ mg kg}^{-1}$  em 7 cavalos inteiros de  $7,1 \pm 1,9$  anos de idade e  $517,4 \pm 50,8 \text{ kg}$ . Amostras de sangue foram coletadas até 64 dias após a aplicação do medicamento e analisadas por LC-MS/MS, com LD igual a  $25 \text{ pg mL}^{-1}$ . Os autores calcularam um tempo de meia-vida para  $\beta$ BO de 123 h, sendo que esse analito foi quantificável por até 30 dias após a administração em amostras de sangue de todos os 7 cavalos, com concentração de  $58,5 \pm 16,5 \text{ pg mL}^{-1}$ . Nos dias 43, 50 e 64, a  $\beta$ BO foi quantificada, respectivamente, em 3, 2 e 1, dos 7 animais, com concentrações em plasma de  $46,2 \pm 10,7$ ,  $42,6 \pm 3,7$  e  $27,0 \text{ pg mL}^{-1}$ .

Também em 2007, FERRETTI e colaboradores avaliaram amostras de urina coletadas a partir de tratamento oral com 3 doses diárias de 30 mg de UNB em bezerros de 30 e 90 dias de idade. Os metabólitos  $\beta$ BO,  $\alpha$ BO e androsta-1,4-dieno-3,17-diona (boldiona, ADD) foram monitorados por LC-MS/MS, sendo que  $\alpha$ BO e ADD foram

detectados a partir de 24 h após a primeira administração. Após 1h da administração da segunda dose, a concentração de  $\alpha$ BO atingiu o nível de 46,1 ng mL<sup>-1</sup> e  $\beta$ BO começou a ser detectado a 1,5 ng mL<sup>-1</sup>. Após 24 h da última dose,  $\beta$ BO não foi mais detectado, ao passo que  $\alpha$ BO permaneceu detectável por 25 dias, após esse período.

### 5.1.2 Monitoramento de Resíduos de Testosterona

De forma semelhante a  $\beta$ BO, formulações comerciais contendo ésteres de testosterona estão disponíveis no mercado para o tratamento de animais debilitados, apesar da proibição do uso para fins de promoção do crescimento (BRASIL, 2011). No caso específico do PPT, sabe-se que o pequeno tamanho da cadeia de éster da sua estrutura leva a uma rápida conversão para a forma não esterificada  $\beta$ TE, o que pode se tornar um desafio no monitoramento do uso desse analito, no que se refere à detecção da forma esterificada do mesmo. A origem endógena da  $\beta$ TE e do seu principal metabólito  $\alpha$ TE, em bovinos, é indiscutível. Entretanto, as concentrações desses analitos variam de acordo com o gênero, a espécie, a idade, as características genéticas individuais e o regime de alimentação do animal. Portanto, o estabelecimento de um limite de corte global para distinção entre a origem natural e a medicamentosa não parece possível.

Em 2011, GRAY e colaboradores analisaram amostras de plasma coletadas de uma potranca, após administração intramuscular de 500 mg de uma combinação de ésteres de testosterona do medicamento comercial Durateston<sup>®</sup> (1 mL contém 30 mg PPT, 60 mg FPT, 60 mg IST e 100 mg DET). Até o período de 200 h após a injeção, detectou-se a presença de PPT, que atingiu a concentração máxima de 1000 pg mL<sup>-1</sup> após 6 h da aplicação. O éster DET foi detectado durante toda a duração do experimento, 41 dias, atingindo uma concentração máxima de 100 pg mL<sup>-1</sup>. Em 2014, SNOJ e colaboradores analisaram amostras de urina coletadas de 120 animais bovinos machos e 174 fêmeas, não tratados com anabolizantes, por LC-MS/MS. A presença de  $\alpha$ TE foi observada em todos os animais machos, ao passo que a detecção de  $\beta$ TE foi intensificada com o aumento da idade dos animais relacionados. Os autores observaram que a razão  $\beta$ TE/ $\alpha$ TE aumenta com a idade dos animais, de  $0,13 \pm 0,09$  para animais de 1 a 7 meses até  $0,42 \pm 0,10$  de 25 a 38 meses. No caso das amostras de urina coletadas de fêmeas, a  $\beta$ TE não foi detectada em nenhuma, ao passo que  $\alpha$ TE,  $\beta$ ES e PRG foram detectados em concentrações variáveis. Em 2016, VILJANTO e colaboradores aplicaram um método por LC-MS/MS para a análise de 200 amostras de urina,

coletadas no Reino Unido em períodos pós-competição de 200 cavalos castrados, a fim de se avaliar a razão  $\beta\text{TE}/\alpha\text{TE}$  em uma população randômica, não submetida a controle de uso medicamentoso. Para 15 das 200 amostras analisadas, a concentração de  $\beta\text{TE}$  excedeu o valor de  $15 \text{ ng mL}^{-1}$ , apesar do perfil metabólico dessas amostras não indicarem o uso intencional de anabolizantes. Obtiveram-se razões  $\beta\text{TE}/\alpha\text{TE}$  menores que o limite proposto de 5 para essas 15 amostras, o que os autores atribuem à uma produção endógena aumentada de  $\beta\text{TE}$  para esses animais. Também foram analisadas amostras de urina, coletadas após a administração de 5 doses semanais consecutivas de 50 mg de injeção intramuscular contendo PPT em dois cavalos castrados de 7 e 10 anos de idade, e em todas as amostras coletadas a razão  $\beta\text{TE}/\alpha\text{TE}$  excedeu o valor de 5. Em 2013, KAABIA e colaboradores administraram injeções intramusculares contendo PPT em 3 bezerras, e analisaram amostras de soro e plasma por LC-MS/MS. O monitoramento das concentrações levou à observação de picos de concentração entre  $160$  e  $400 \text{ pg mL}^{-1}$  para os três animais no período de 5 h após a aplicação, sendo que o analito PPT foi detectado até um período de 2 dias.

### 5.1.3 Experimentação Animal

A maioria dos trabalhos descritos na literatura envolvendo procedimentos de experimentação animal foram realizados em países do hemisfério norte, utilizando raças específicas de animais e em condições zootécnicas não condizentes com a realidade brasileira. Destaca-se também que no passado compostos como  $\beta\text{BO}$  e  $\beta\text{NAN}$  eram tidos como endógenos, e a razão  $\beta\text{TE}/\alpha\text{TE}$  já foi empregada nos casos de análises *anti-doping* em humanos e animais sem o conhecimento das especificidades relacionadas a essas abordagens. No entanto, a elucidação de parte do metabolismo envolvido para essas abordagens apenas foi obtida por meio de procedimentos de experimentação *in vivo*, com grupos variados de animais. (AFSCA, 2013).

Assim, na presente tese, um estudo *in vivo* foi realizado em animais bovinos submetidos a alimentação por pastagem natural ou feno e submetidos às variações temporais de um clima tropical. As formulações comerciais empregadas nesse estudo foram: Equi-Boost (Syntec do Brasil, Santana de Parnaíba, Brasil), cujo princípio ativo é o undecilenato de boldenona (UNB) na concentração de  $50 \text{ mg mL}^{-1}$ , e Androgenol (Ceva Hertape Saúde Animal S/A, Juatuba, Brasil), comercializado na forma de ampolas de 10 mL contendo  $10 \text{ mg mL}^{-1}$  de propionato de testosterona (PPT). O Equi-

Boost é indicado para uso veterinário em animais equinos debilitados, sendo proibido para animais participantes de competições oficiais ou destinados para consumo humano. De acordo com a bula do medicamento, resíduos de UNB podem ser detectados até 40 dias após a última aplicação, sendo que 1 ou 2 doses do medicamento são normalmente recomendadas para tratamento exclusivamente indicado por médico veterinário. Além disso, é informado que doses elevadas do medicamento podem provocar efeitos androgênicos ou de masculinização transitórios.

O Androgenol, de acordo com a sua bula, auxilia na melhora da libido de machos reprodutores com possível elevação das taxas de prenhez nas fêmeas servidas pelos mesmos. Além disso, é indicado nos casos em que há evidência clínica de deficiência do hormônio sexual masculino (frieza sexual e atraso do desenvolvimento genital). Recomenda-se o uso de injeções múltiplas do medicamento intercaladas por um período de 3 dias.

Essas formulações foram selecionadas para este trabalho devido ao fato de as mesmas serem disponibilizadas pela grande maioria das casas de produtos veterinários pesquisadas. Além do fato, dos metabólitos relacionados possuírem origem endógena, permitindo-se assim a avaliação de estratégias para diferenciação entre a origem endógena ou exógena desses compostos.

Após a administração desses dois medicamentos em animais bovinos machos de peso, idade e raças variadas, o monitoramento dos resíduos dos mesmos foi realizado utilizando os métodos validados para pelo e soro bovino. Dessa forma, este capítulo tem como objetivo o estudo da eficácia desses métodos no monitoramento de resíduos de PPT e UNB, bem como de seus respectivos metabólitos. A aplicabilidade dessas matrizes será comparada com a matriz urina, monitorada concomitantemente por meio de um método oficial do LFDA-MG acreditado pela ISO 17025 (ABNT, 2017).

## **5.2 EXPERIMENTAL**

### **5.2.1 Administração de Formulações Contendo PPT e UNB *In Vivo***

O processo de experimentação animal envolveu 12 animais bovinos machos, castrados, de raça mestiça e idades variadas (Tabela 5.1). Com relação ao delineamento experimental (SAMPAIO, 2011), os animais foram separados em 3 grupos distintos, o

primeiro deles, composto por 4 animais e denominado grupo B, que foi submetido ao tratamento com o medicamento Equi-Boost. O segundo grupo, denominado grupo T, foi composto também por 4 animais submetidos ao tratamento com o medicamento Androgenol. Um terceiro grupo formado por 4 animais foi mantido sem tratamento medicamentoso, durante todo o processo de monitoramento dos demais animais, sendo denominado grupo C (controle). As idades dos animais foram estimadas por cronologia dentária e estão apresentadas na Tabela 5.1, juntamente com a identificação e peso dos mesmos.

**Tabela 5.1:** Informações relativas à idade e peso dos animais utilizados na experimentação animal de anabolizantes em bovinos

<b>Grupo</b>	<b>Identificação animal</b>	<b>Idade (meses)</b>	<b>Peso (kg)</b>
B	B1	32	530
	B2	12	227
	B3	32	391
	B4	32	455
T	T1	12	178
	T2	12	211
	T3	32	437
	T4	24	371
C	C1	12	208
	C2	12	331
	C3	36	421
	C4	18	182

Todo o procedimento de experimentação animal foi realizado após aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFMG, de acordo com o protocolo n° 111/2019, vigente a partir de 10/06/2019.

Durante todo o experimento os animais estiveram alocados nas dependências do LFDA-MG em Pedro Leopoldo, sendo que cada grupo foi mantido separado dos demais em piquetes (áreas demarcadas), situados a pelo menos 300 metros de distância uns dos

outros. Antes da aplicação dos medicamentos, os animais foram aclimatados em cada piquete por um período de 7 dias. O regime de alimentação envolveu o consumo de pastagem natural, feno e água *ad libitum*, sendo que durante o experimento nenhum outro medicamento foi aplicado nos animais.

A aplicação de ambas as formulações comerciais se deu por meio de injeção intramuscular profunda na região do pescoço dos animais. Os tratamentos seguiram as recomendações das bulas dos fabricantes, aplicando-se uma dose única na manhã do dia 08/07/2019 de 1,1 mg kg<sup>-1</sup> de Equi-Boost nos 4 animais pertencentes ao grupo B. No mesmo dia (D0) aplicou-se uma dose de 0,2 mg kg<sup>-1</sup> de Androgenol, também de acordo com recomendação do fabricante, repetindo-se a aplicação da dose desse medicamento, no grupo T, na manhã do dia 11/07/2019 (dia 3 – D3).

### **5.2.2 Coleta Amostral**

A coleta de sangue envolveu o uso de tubos para coleta a vácuo Vacuette® (Greiner Bio-One, Americana, Brasil) de 13 x 100 mm com 9 mL de capacidade, contendo ativador de coágulo e agulha de 25 x 0,8 mm. As coletas foram realizadas de forma intercalada nas veias jugulares esquerda, direita ou coccígeas médias dos animais. A região de coleta foi previamente lavada com álcool etílico comercial. O procedimento de preparação das amostras de sangue para obtenção de soro foi o mesmo que o descrito no item 4.2.4 do Capítulo 4.

As datas e os intervalos entre as coletas variaram de acordo com o grupo de animais em estudo. No dia da aplicação dos medicamentos, 2 coletas de sangue e urina foram realizadas, uma antes da aplicação (D0) e outra 6 h depois (D0 + 6h). O mesmo foi feito no dia 11/07, para o grupo T, na segunda dose de Androgenol.

A coleta das amostras de pelo foi realizada com auxílio de lâmina de tricotomia, em áreas retangulares de raspagem e em duas regiões distintas: região do pescoço, do mesmo lado do da aplicação da injeção, e região da garupa do animal (região traseira superior do animal), também do mesmo lado da aplicação. As amostras foram armazenadas em tubos plásticos de 50 mL de capacidade em temperatura ambiente e ao abrigo de luz.

A Tabela 5.2 apresenta as datas das coletas de acordo com as matrizes e os grupos de animais monitorados. Todas as amostras foram coletadas e analisadas sem o

uso de replicatas genuínas, em virtude do elevado número das mesmas relacionado a todos os procedimentos em conjunto.

**Tabela 5.2:** Identificação das datas de coleta de sangue, urina e pelo dos animais bovinos submetidos ao tratamento com injeção intramuscular de anabolizantes

<b>Matriz</b>	<b>Grupo</b>	<b>Dias de coleta</b>
Sangue e urina	B	D-5 (03/07/2019), D-4, D0, D0+ 6h, D1 (D0 + 24 h), D1 + 6h, D2 (D1 + 24 h), D3, D4, D5, D7, D9, D11, D14, D17, D21, D24, D42, D49, D56, D67, D78, D92, D108, D120
	T	D-5 (03/07/2019), D-4, D0, D0+ 6h, D1 (D0 + 24 h), D1 + 6h, D2 (D1 + 24 h), D3, D3 + 6h, D4, D5, D7, D9, D11, D14, D17, D21, D24, D28, D31 e D42
	C	D-5, D-4, D1, D9, D11, D14, D17
Pelo	B e T	D-5, D-4, D4, D7, D14, D20, D28, D42, D56 e D78
	C	D-5, D14 e D78

### 5.2.3 Monitoramento de Resíduos de PPT e UNB em Urina

Durante as coletas de soro dos animais em estudo, amostras de urina também foram coletadas (Tabela 5.1). O método empregado para a quantificação desses analitos em urina foi validado para  $\beta$ BO, com  $CC\alpha = 0,31 \mu\text{g L}^{-1}$ ,  $CC\beta = 0,53 \mu\text{g L}^{-1}$ ,  $LMDR = 1,0 \mu\text{g L}^{-1}$  e  $U = 0,48 \mu\text{g L}^{-1}$ , nesse nível. Os analitos  $\alpha$ BO,  $\beta$ TE,  $\alpha$ TE, PPT e UNB também foram avaliados pelo método para fins de comparação neste trabalho. Amostras brancas de urina foram coletadas dos animais do grupo C para serem usadas nas curvas analíticas e demais controles analíticos. As faixas de trabalho empregadas corresponderam às concentrações de 0,50; 0,75; 1,00; 1,25; 1,50 e 2,00  $\mu\text{g L}^{-1}$  para  $\beta$ BO; 0,70; 1,05; 1,40; 1,75; 2,10 e 2,80  $\mu\text{g L}^{-1}$  para  $\alpha$ TE e  $\beta$ TE; 3,5; 5,25; 7,00; 8,75; 10,5 e 14,00  $\mu\text{g L}^{-1}$  para  $\alpha$ BO, PPT e UNB. Amostras brancas foram fortificadas no primeiro e no terceiro níveis das faixas de trabalho com todos os analitos citados, e

analisadas em conjunto com as amostras dos animais dos grupos B, C e T, a fim de se avaliar a recuperação do método em cada batelada.

As amostras de urina foram coletadas por micção espontânea dos animais, e posteriormente centrifugadas por 30 min a 2700 g, com transferência de sobrenadante para tubo plástico de 50 mL. As amostras foram acondicionadas em freezer em temperatura inferior a -15 °C e analisadas por um método de ensaio de rotina acreditado pela ISO 17025 do setor de Resíduos e Contaminantes em Alimentos (RCA) do LFDA-MG. Resumidamente, a 5,0 mL de urina são adicionados 2 mL de tampão NaOAc (2 mol L<sup>-1</sup>, pH = 5,2) e 25 µL da enzima β-glucuronidase obtida de *Helix pomatia* com incubação a 37 °C por 16 h. Em seguida, 4 mL da solução TRIS (2 mol L<sup>-1</sup>, pH = 9,5) foi adicionado, e duas LLE consecutivas com éter dietílico foram realizadas. Após evaporação, o resíduo foi reconstituído com 4,5 mL de solução de água/metanol (2:1 v/v), e o *clean-up* foi realizado por SPE, com cartuchos HLB e NH<sub>2</sub> acoplados. Após eluição com ACT e evaporação, 10 µL do resíduo reconstituído foi injetado no sistema LC-MS/MS. Foi utilizada uma fase móvel formada por água ultrapura e outra por metanol (fase móvel B) com eluição por gradiente: de 0 a 2,5 min B = 60%; de 0,5 a 2,0 min B aumenta linearmente para 80%; de 2,0 a 2,01 min B aumenta linearmente para 100%, permanecendo nessa porcentagem até 2,5 min, de 2,5 a 4,0 min B decai linearmente para 60%; permanecendo nessa porcentagem até 6,0 min. Os fabricantes dos reagentes e insumos são os mesmos conforme descrito no item 2.2.2 do Capítulo 2, sendo os reagentes TRIS e éter dietílico, e o cartucho HLB (Supelco, 200 mg, 6 mL) adquiridos da Sigma Aldrich (St. Louis, EUA).

## **5.3 RESULTADOS**

### **5.3.1 Monitoramento de Resíduos de PPT e UNB na Matriz Pelo**

O método otimizado e validado para análise de pelo bovino, descrito no capítulo 3, foi empregado para a determinação das concentrações de PPT e UNB nas amostras coletadas durante a experimentação animal (Tabela 5.3).

**Tabela 5.3:** Concentrações estimadas de UNB e PPT relacionadas com os dias de coleta das amostras de pelo bovino coletadas do pescoço dos animais

<b>Grupo</b>	<b>Identificação animal</b>	<b>Dia da confirmação dos analitos</b>	<b>Concentração (<math>\mu\text{g kg}^{-1}</math>)<sup>3</sup></b>
B	B1	D4 <sup>1</sup>	452,75
		D7 <sup>1</sup>	151,48
		D28	2,97
		D78 <sup>2</sup>	1,19
	B2	D4 <sup>1</sup>	122,91
		D7 <sup>1</sup>	257,56
	B3	D4 <sup>1</sup>	476,80
		D7 <sup>1</sup>	485,28
		D28	14,43
		D42	6,25
	B4	D4 <sup>1</sup>	503,50
		D7 <sup>1</sup>	458,47
		D20 <sup>1</sup>	285,85
		D28	2,04
		D42	5,81
	T1	D4	5,87
		D14 <sup>1</sup>	106,24
		D28 <sup>1</sup>	26,89
	T2	D4 <sup>1</sup>	42,63
		D28	4,13
D42		3,50	
T3	D4 <sup>1</sup>	356,63	
	D28	4,21	
	D42	2,96	
T4	D28	3,88	
	D42	4,40	

<sup>1</sup>: Concentração calculada fora da faixa de trabalho;

<sup>2</sup>: Concentração obtida abaixo do CC $\alpha$ ;

<sup>3</sup>: Para o grupo B foram reportadas concentrações de UNB, e de PPT para o grupo T.

Para todo o conjunto de amostras coletadas não foi detectado nenhum dos analitos pesquisados na região da garupa. Conforme descrito no item 3.1 do Capítulo 3, o mecanismo de incorporação dos medicamentos na matriz pelo não é totalmente conhecido, sendo descrito normalmente como uma combinação de fatores como: difusão sanguínea, incorporação pelo suor, sebo e secreção de glândulas apócrinas [KINTZ, 2018]. Dessa forma, não foi detectado um mecanismo envolvendo a migração dos analitos para áreas diferentes do local de aplicação dos medicamentos como, por exemplo, o que envolveria a difusão sanguínea com posterior incorporação dos analitos na matriz.

Considerando-se as datas nas quais os analitos foram detectados e quantificados, nota-se um comportamento aleatório quanto à presença dos mesmos nas amostras analisadas, sendo que nos dias D20, D56 e D58 não houve qualquer detecção, em nenhum dos animais. Para o animal B1 no dia D78, uma concentração de  $1,2 \mu\text{g kg}^{-1}$  foi estimada, valor abaixo do  $CC\alpha$  validado para UNB ( $1,68 \mu\text{g kg}^{-1}$ ). Entretanto, como a razão entre o sinal analítico e o ruído foi superior a 3, optou-se por reportar esse resultado como detecção.

Para o grupo B houve detecção de UNB nos quatro animais monitorados apenas nos dias D4 e D7, correspondendo às concentrações mais altas reportadas. Para o grupo T, observou-se a presença de PPT em todos os animais apenas no dia D28. Para os dois grupos de animais tratados, 64 amostras foram coletadas na região do pescoço de D4 a D78 (32 por grupo) e analisadas, sendo que em 26 delas os analitos monitorados foram detectados (40,6% do total para os grupos B e T). Considerando os analitos individuais, 34,4%, ou seja, 11 amostras foram positivas para PPT no grupo T, e 46,9%, isto é, 15 amostras foram positivas para UNB no grupo B. Destaca-se que esses valores foram calculados para amostras coletadas no pescoço, mesma região em que os medicamentos foram aplicados. Para as 64 amostras coletadas na garupa não houve identificação dos analitos em nenhuma delas.

Observou-se também que, a partir do dia D28 começou a ocorrer crescimento de pelo na região do pescoço, previamente raspada pela tricotomia das coletas anteriores. Então, efetuou-se a raspagem dessas áreas de novo crescimento em todos os animais nesse dia, e observaram-se concentrações estimadas e calculadas acima do  $CC\alpha$  para os 4 animais do grupo T, e concentrações calculadas dentro da faixa de trabalho para 3 dos

4 animais do grupo B. Apenas no animal B2, desse último grupo, não foi detectado o analito UNB no dia D28. Tendo em vista que as análises de soro realizadas concomitantemente indicaram que no dia D28 já não havia a presença detectável dos analitos PPT e UNB na circulação sanguínea dos animais, os mesmos devem ter sido fixados durante o crescimento do pelo nessa região, exceto para B2.

Concentrações elevadas dos analitos monitorados foram calculadas nos 2 primeiros dias de coleta (D4 e D7), para a grande maioria dos animais. Considerando a faixa de trabalho de PPT (1,0 a 8,0  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) e de UNB (2,0 a 16,0  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ), os valores apresentados representam uma estimativa de concentração real, não calculada por diluição das amostras, uma vez que a detecção de substâncias proibidas já é suficiente para o início de medidas investigativas para uma amostra em análise. De toda forma, observou-se que essas concentrações diminuíram consideravelmente ao longo do período de monitoramento. Portanto, supõem-se que houve um acúmulo dos medicamentos administrados na região de aplicação durante os primeiros dias de coleta. Considerando-se que a coleta por tricotomia envolve também a raspagem da camada de sebo presente na epiderme dos animais, pode-se supor que parte do medicamento administrado pela injeção intramuscular permaneceu retida no sebo ou na camada superior da epiderme, sendo posteriormente absorvido pelo metabolismo animal, ou removido por mecanismos não esclarecidos.

Deve-se destacar que as especificidades relacionadas a altas taxas de resultados falso negativos na matriz pelo, bem como à dependência da distância da coleta amostral em relação à região de aplicação medicamentosa evidenciados neste trabalho, também já foram reportadas na literatura. Em 2009 DUFFY *et al.* desenvolveram um trabalho em que BET e DEN foram administrados por meio de injeções intramusculares em 2 grupos de animais bovinos distintos. De acordo com os autores, os resultados do primeiro estudo indicam que os animais tratados nem sempre podem ser identificados a partir da análise de amostras de pelo, e que resultados positivos ocorrem esporadicamente e somente para alguns dos animais tratados. Para o segundo grupo destacou-se que as concentrações diminuem consideravelmente com a distância a partir do ponto de aplicação das injeções intramusculares. Além disso, como observado no trabalho desenvolvido nesta tese, constatou-se que as concentrações de BET e DEN decaíram consideravelmente com o tempo, e que concentrações elevadas foram obtidas

nos primeiros dias após a administração. Em 2005 RAMBAUD e colaboradores avaliaram criticamente a fixação de ACM, BET e MTT em pelo bovino, observando uma dependência entre a natureza química dos medicamentos e o seu perfil de distribuição. Esse estudo envolveu a coleta de amostras de pelo da cabeça, pescoço, abdômen, garupa e calda dos animais, após a aplicação de injeções intramusculares na região da escápula dos mesmos. Foi demonstrado que o ACM não foi encontrado em nenhuma das amostras coletadas desses locais. Para o BET, as amostras coletadas da cabeça e pescoço foram relatadas como os materiais mais adequados para a detecção. No entanto, para MTT, as amostras coletadas do pescoço abdômen forneceram melhores resultados, sendo que amostras coletadas de coloração escura (contendo melanina) apresentaram maiores concentrações desse analito. Dessa forma, os resultados obtidos nesta tese contribuem com a literatura dessa área ao incluir novos analitos para o estudo da distribuição de ésteres de anabolizantes em pelo de animais bovinos.

### 5.3.2 Monitoramento de Resíduos de PPT e UNB na Matriz Soro

#### 5.3.2.1 Monitoramento das Concentrações dos Esteroides Administrados

Após a aplicação das injeções intramusculares contendo PPT e UNB, as concentrações desses compostos e de seus principais metabólitos,  $\beta$ TE e  $\beta$ BO, foram monitoradas no soro bovino, usando o método otimizado e validado descrito no Capítulo 4. A Tabela 5.4 apresenta as concentrações calculadas para as formas esterificadas:

**Tabela 5.4:** Concentrações calculadas dos esteroides esterificados, PPT e UNB, administrados nos grupos B e T  
(continua)

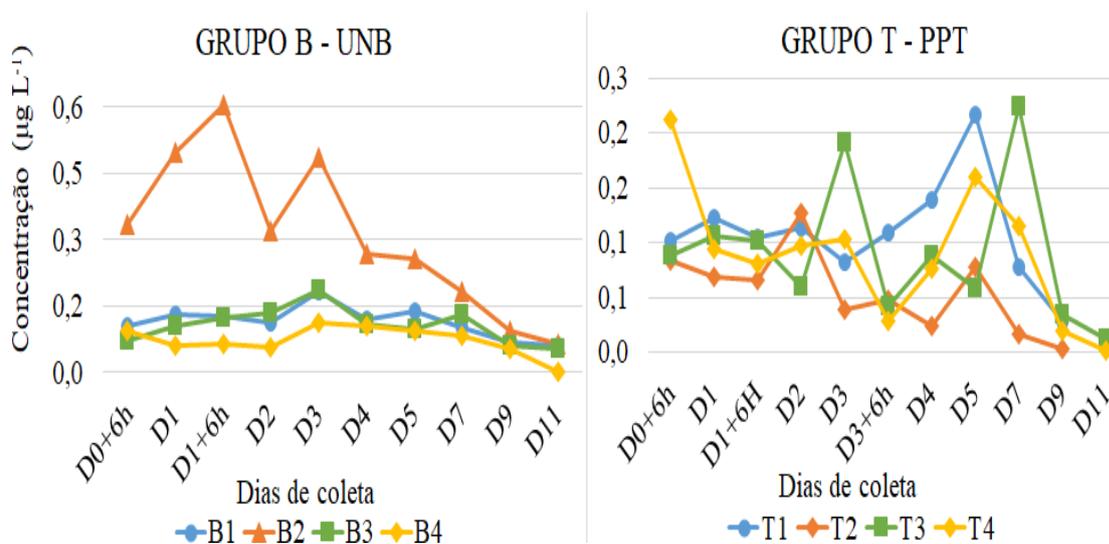
Dia de coleta	Concentração ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )							
	GRUPO B UNB				GRUPO T PPT			
	B1	B2	B3	B4	T1	T2	T3	T4
<b>D0+6h</b>	0,104	0,334	0,070	0,094	0,102	0,084	0,089	0,211
<b>D1</b>	0,129	0,496	0,104	0,059	0,123	0,069	0,107	0,094
<b>D1+6H</b>	0,127	0,603	0,122	0,065	0,105	0,066	0,102	0,081
<b>D2</b>	0,111	0,320	0,133	0,055	0,113	0,127	0,061	0,098

**Tabela 5.4:** Concentrações calculadas dos esteroides esterificados, PPT e UNB, administrados nos grupos B e T (conclusão)

Dia de coleta	Concentração ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )							
	GRUPO B UNB				GRUPO T PPT			
	B1	B2	B3	B4	T1	T2	T3	T4
D3	0,182	0,485	0,185	0,110	0,082	0,039	0,191	0,103
D3+6h	-	-	-	-	0,109	0,048	0,042	0,029
D4	0,117	0,266	0,109	0,102	0,139	0,024	0,088	0,077
D5	0,139	0,254	0,098	0,094	0,217	0,077	0,059	0,161
D7	0,100	0,180	0,131	0,083	0,078	0,017	0,224	0,116
D9	0,065	0,091	0,058	0,052	0,028	0,004	0,035	0,020
D11	0,060	0,063	0,051	ND	ND	ND	0,013	0,001

ND: analito não detectado

A Figura 5.1 apresenta graficamente as concentrações calculadas de UNB e PPT.



**Figura 5.1:** Representação gráfica da variação das concentrações de UNB e PPT nos grupos B e T em soro bovino após o tratamento com Equi-Boost e Androgenol

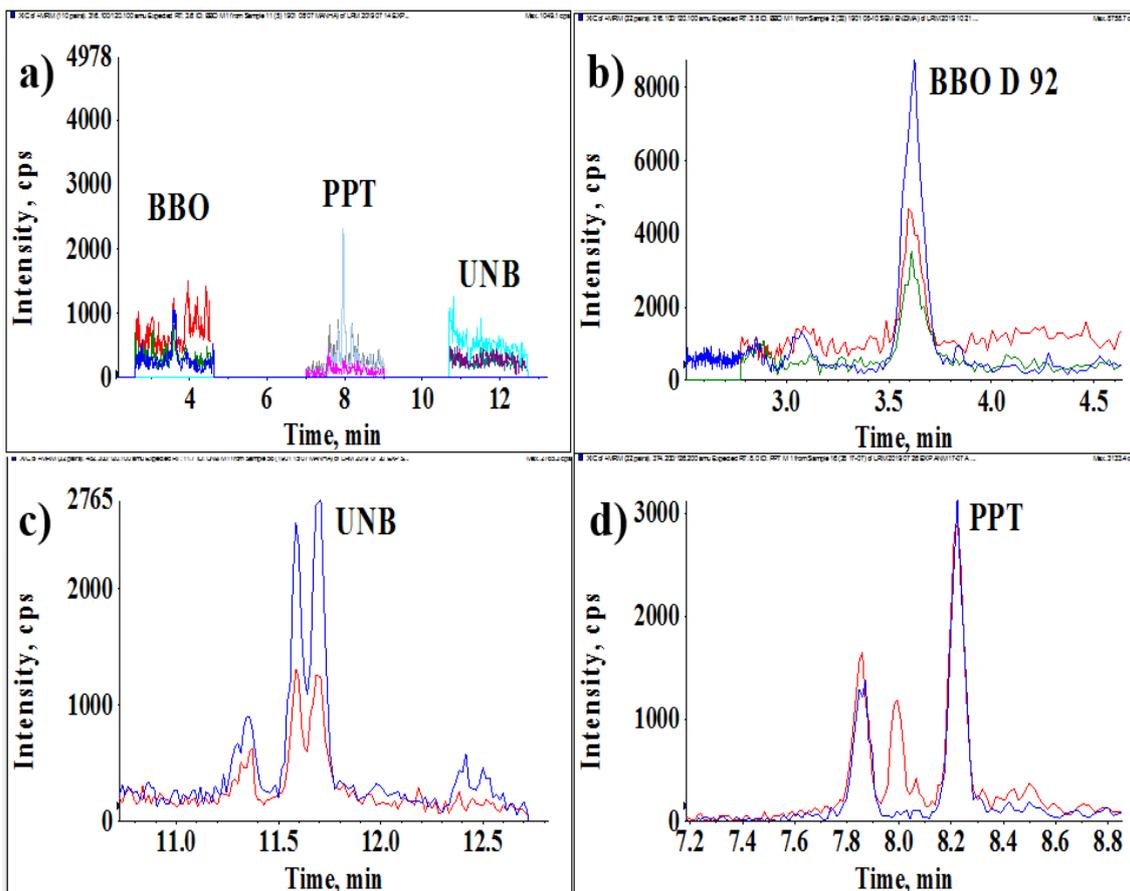
De acordo com a variação das concentrações obtidas, notou-se que até 9 dias após o início dos tratamentos as formas esterificadas foram identificadas em todas as amostras analisadas, e para 3 animais do grupo B e 2 do grupo T até D11.

Para o animal B2 foram obtidas concentrações superiores de UNB em relação aos demais do grupo B, entretanto, mesmo com maiores concentrações, o período de

detecção da forma esterificada foi o mesmo que para os demais animais. Esta observação indica que o tempo necessário para a desesterificação das formas parentais não foi diretamente relacionado com as concentrações dos medicamentos circulantes nos animais.

Como mostrado na Figura 5.1, as concentrações do analito PPT apresentaram maior oscilação do que UNB, após a administração das injeções para a maioria dos animais. Deve-se levar em conta que, para o grupo T duas doses de  $0,2 \text{ mg kg}^{-1}$  de PPT foram aplicadas em um intervalo de 3 dias, de acordo com orientação do fabricante. Nota-se também que, apesar da dose administrada do éster do grupo B ( $1,1 \text{ mg kg}^{-1}$ ) ser superior à do grupo T, e de que as concentrações observadas de UNB para esse grupo terem sido superiores, ambos os ésteres foram detectados em intervalos de tempo similares. Dessa forma, observou-se que 2 doses consecutivas de menores concentrações de um éster de cadeia curta (PPT) corresponderam a uma mesma janela de detecção que a de 1 dose em alta concentração de um éster de cadeia longa. De acordo com a bula do medicamento Androgenol, um total de 5 doses podem ser administradas nos animais tratados, dessa forma janelas de detecção mais longas poderiam ser obtidas, caso um maior número de doses fossem administradas. Para o caso de animais submetidos a outros tipos de administração de medicamentos, como os implantes auriculares descritos no Anexo I, espera-se que os períodos de detecção das formas esterificadas sejam maiores, porém em menor concentração, devido ao processo de liberação dos fármacos ocorrer de forma gradual.

A Figura 5.2 apresenta o cromatograma de íons extraídos para o animal B1 referentes ao dia D0 (antes da aplicação do Equi-Boost), e também os cromatogramas relativos ao último dia de detecção de  $\beta$ BO e UNB para o animal B1, e ao último dia de PPT para o animal T1.



**Figura 5.2:** Cromatogramas de íons extraídos relativos a: a) ausência de detecção dos sinais de  $\beta$ BO, PPT e UNB no animal B1 em D0; b) última detecção de  $\beta$ BO para B1 em D92; c) última detecção de UNB para B1 em D11; d) última detecção de PPT para T1 em D9

Pode-se observar a ausência de sinal analítico correspondente a  $\beta$ BO, PPT e UNB antes da aplicação de Equi-Boost no dia D0 no animal B1. Para o último dia de detecção de  $\beta$ BO e UNB para esse animal, e o último dia em que PPT foi detectado no animal T1, observaram-se que os valores de concentração calculados foram ligeiramente abaixo dos respectivos valores de CC $\alpha$  validados ( $0,32 \mu\text{g L}^{-1}$  para  $\beta$ BO;  $0,036 \mu\text{g L}^{-1}$  para PPT e  $0,063 \mu\text{g L}^{-1}$  para UNB). Entretanto, as razões entre os sinais analíticos e os ruídos característicos superiores foram superiores a 3, em todos os casos. Cromatogramas semelhantes foram obtidos para os outros animais estudados, com as variações das janelas de detecção apresentadas na Tabela 5.4.

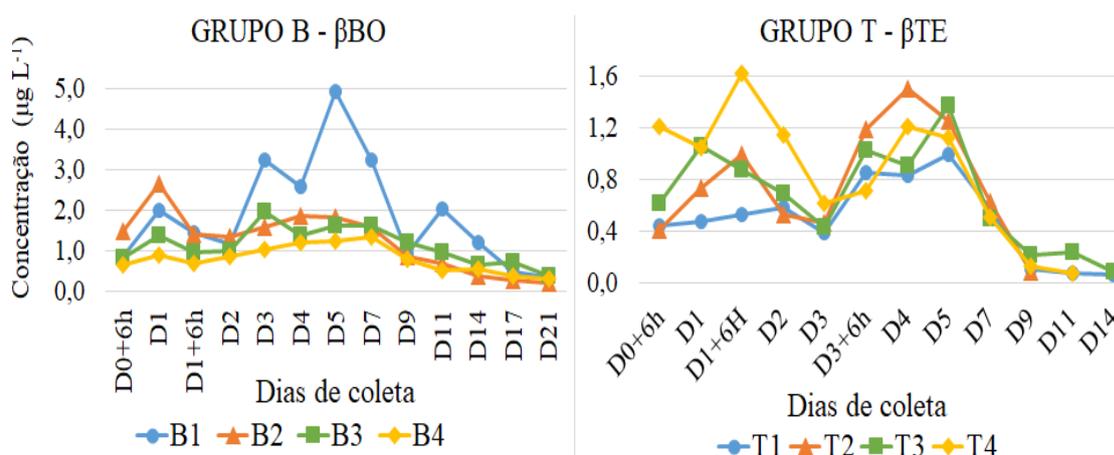
A Tabela 5.5 apresenta as concentrações monitoradas para as formas não esterificadas  $\beta$ BO e  $\beta$ TE, para os grupos B e T. Esses dois analitos foram validados em conjunto com as formas esterificadas no Capítulo 4 e representam os principais metabólitos marcadores, em soro bovino, para os fármacos administrados.

**Tabela 5.5:** Concentrações calculadas dos esteroides não esterificados  $\beta$ BO e  $\beta$ TE nos grupos B e T em soro bovino

Dia de coleta	Concentração ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )							
	GRUPO B $\beta$ BO				GRUPO T $\beta$ TE			
	B1	B2	B3	B4	T1	T2	T3	T4
<b>D0+6h</b>	0,851	1,470	0,807	0,642	0,447	0,413	0,612	1,212
<b>D1</b>	1,992	2,638	1,382	0,883	0,478	0,734	1,056	1,051
<b>D1+6H</b>	1,435	1,410	0,951	0,683	0,527	0,993	0,874	1,628
<b>D2</b>	1,171	1,351	0,997	0,872	0,581	0,528	0,690	1,145
<b>D3</b>	3,236	1,598	1,946	1,033	0,384	0,462	0,434	0,615
<b>D3+6h</b>	-	-	-	-	0,854	1,190	1,026	0,712
<b>D4</b>	2,581	1,874	1,372	1,198	0,831	1,504	0,914	1,213
<b>D5</b>	4,915	1,823	1,628	1,239	0,996	1,258	1,377	1,130
<b>D7</b>	3,236	1,588	1,618	1,342	0,575	0,630	0,497	0,508
<b>D9</b>	0,927	0,872	1,213	0,789	0,110	0,089	0,213	0,133
<b>D11</b>	2,026	0,686	0,960	0,508	0,069	D <sup>2</sup>	0,238	0,072
<b>D14</b>	1,213	0,390	0,636	0,535	0,060	D <sup>2</sup>	0,087	D <sup>2</sup>
<b>D17</b>	0,478	D <sup>1</sup>	0,722	0,370	D <sup>2</sup>	D <sup>2</sup>	D <sup>2</sup>	D <sup>2</sup>
<b>D21</b>	0,343	D <sup>1</sup>	0,386	0,324	D <sup>2</sup>	D <sup>2</sup>	D <sup>2</sup>	D <sup>2</sup>
<b>D24 - D42</b>	D <sup>1</sup>	D <sup>1</sup>	D <sup>1</sup>	D <sup>1</sup>	D <sup>2</sup>	D <sup>2</sup>	D <sup>2</sup>	D <sup>2</sup>
<b>D49 - D56</b>	D <sup>1</sup>	D <sup>1</sup>	D <sup>1</sup>	D <sup>1</sup>	NC	NC	NC	NC
<b>D56 - D92</b>	D <sup>1</sup>	ND	ND	D <sup>1</sup>	NC	NC	NC	NC

D<sup>1</sup>: detecção do analito com concentrações estimadas abaixo do CC $\alpha$  para  $\beta$ BO (0,32  $\mu\text{g L}^{-1}$ ); ND: analito não detectado; D<sup>2</sup>: detecção de  $\beta$ TE relacionada a níveis endógenos pré-existentes; NC: ausência de coleta amostral no período considerado.

A Figura 5.3 representa graficamente as concentrações calculadas, acima dos respectivos valores de CC $\alpha$ , para  $\beta$ BO e  $\beta$ TE:



**Figura 5.3:** Representação gráfica da variação das concentrações de  $\beta$ BO e  $\beta$ TE nos grupos B e T em soro bovino após o tratamento com Equi-Boost e Androgenol

A avaliação das concentrações de  $\beta$ BO calculadas para o grupo B mostra que os animais B2, B3 e B4 apresentaram comportamento de decaimento das concentrações semelhante, diferentemente de B1, cujas concentrações sofreram maior oscilação. Já no caso da forma parental UNB (Figura 5.1), maiores valores de concentrações e maiores oscilações das mesmas foram observados para o animal B2. Concentrações calculadas abaixo do  $CC\alpha$  de  $0,32 \mu\text{g L}^{-1}$  para  $\beta$ BO foram obtidas a partir de D17 para B2, e D24 para os demais animais, de tal forma que para B1 e B4 houve detecção desse analito até D92 (Figura 5.2). Para B2 e B3 essa detecção ocorreu até D56. Observou-se também que a relação entre o sinal e o ruído de todas as transições monitoradas foi superior a 3.

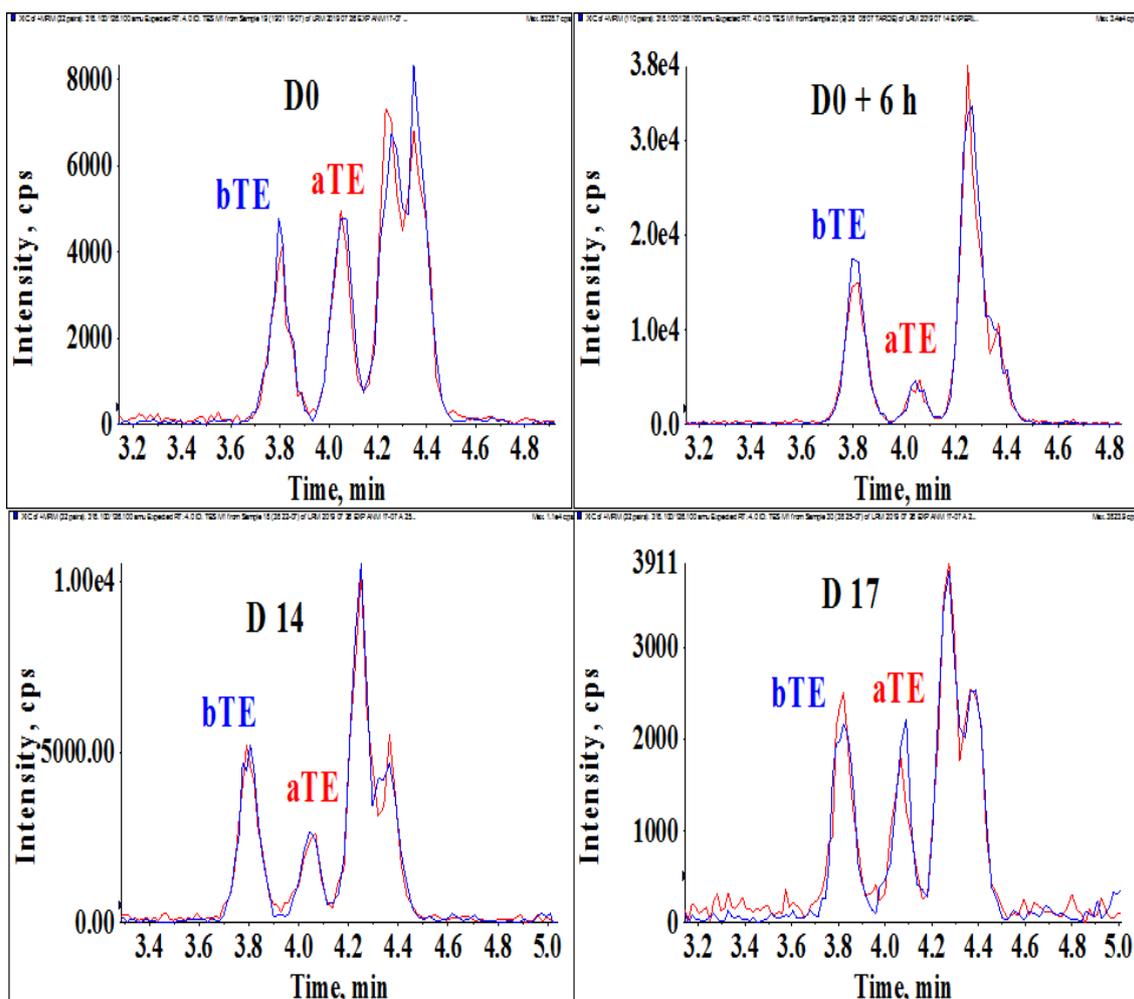
Deve-se levar em conta que o UNB é um éster de anabolizante de cadeia longa, conhecido por permanecer na corrente sanguínea dos animais por um maior período que os ésteres de cadeia curta. Entretanto, o metabólito não esterificado  $\beta$ BO foi a espécie química responsável pela longa janela de detecção para a administração do Equi-Boost. De acordo com a bula do medicamento a detecção de resíduos do mesmo pode ocorrer por um período de até 40 dias após a aplicação em equinos. Esse período foi ultrapassado para a detecção de  $\beta$ BO, no presente trabalho, no qual a administração foi realizada na espécie bovina.

Para o monitoramento de  $\beta$ TE, deve-se considerar o caráter endógeno desse analito, que foi detectado em todas as amostras analisadas, mesmo nos animais não tratados com Androgenol, porém em concentrações inferiores ao  $CC\alpha$  ( $0,058 \mu\text{g L}^{-1}$ ) do método validado. Esses baixos valores provavelmente estão relacionados ao fato de que todos os 12 animais utilizados neste trabalho eram castrados.

Diferentemente de  $\beta$ BO, cuja detecção se estendeu até D56 e D92, valores de  $\beta$ TE acima do  $CC\alpha$  e dos níveis endógenos foram observados até D9 para todos os animais, até D11 para T1, T3 e T4, e até D14 para T1 e T3. Após D14 observaram-se detecções para  $\beta$ TE, porém em níveis correspondentes a valores endógenos do período anterior ao da administração do Androgenol. Também foi verificado um intervalo de 3 dias entre a aplicação do medicamento e uma queda de concentração correspondente a valores anteriores à administração, o que corresponde à indicação constante na bula do medicamento de aplicação de uma nova dose após esse intervalo de tempo. Destaca-se que as janelas de detecção observadas, tanto para as formas esterificadas quanto para os

respectivos metabólitos, foram superiores àquelas da maioria dos trabalhos descritos nos itens 5.1.1 e 5.1.2 (GRAY, 2011; KAABIA, 2013, 2018; SOMA, 2007).

A Figura 5.4 mostra a variação observada nas concentrações de  $\beta$ TE e  $\alpha$ TE para o animal T1 a partir de D0, antes da aplicação de Androgenol, até D17, último dia em que se observaram concentrações acima do CC $\alpha$ . Durante o período de 6 h após a coleta até D14, observou-se que a razão  $\beta$ TE/ $\alpha$ TE sofreu um aumento em relação a D0, retornando a uma equivalência de intensidades no dia D17.



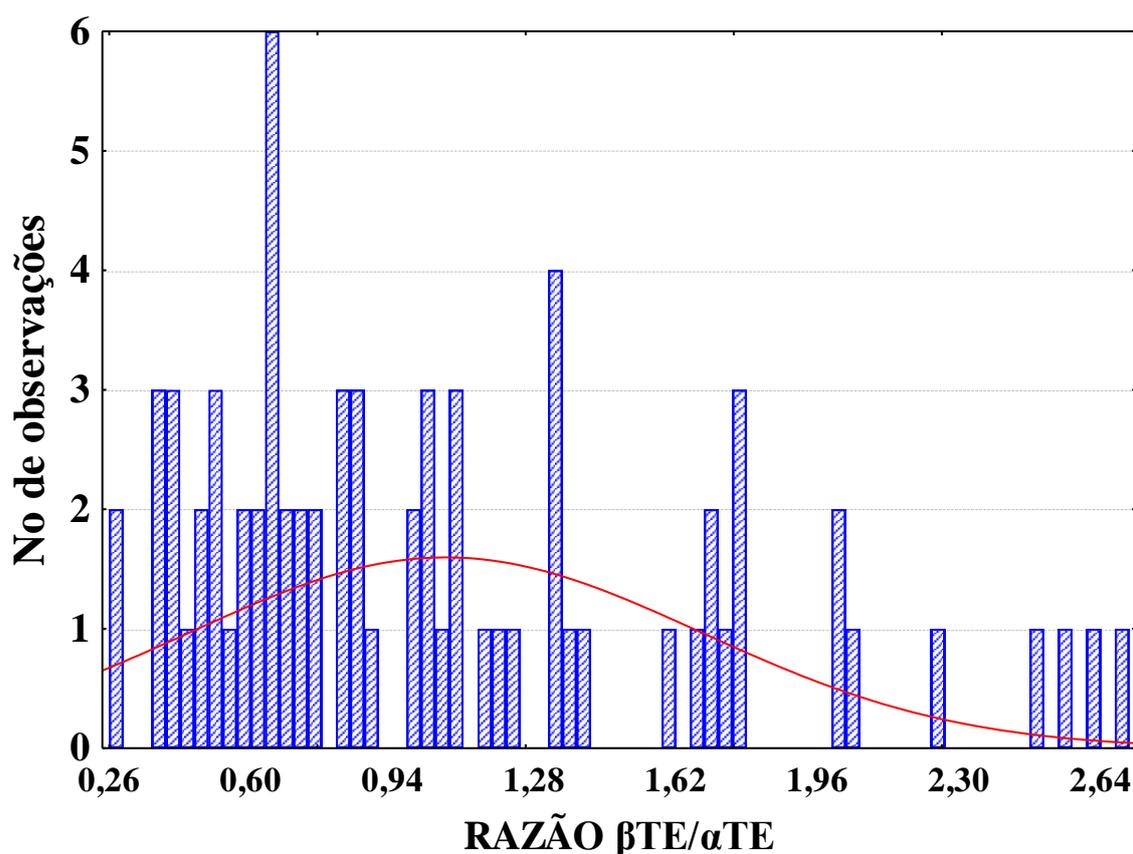
**Figura 5.4:** Cromatogramas de íons extraídos para  $\beta$ TE e  $\alpha$ TE obtidos de soro bovino relativos ao animal T1 no intervalo de tempo de D0 a D17

### 5.3.2.2 Avaliação da Razão $\beta$ TE/ $\alpha$ TE

O estabelecimento de um limite de corte (LC) da razão  $\beta$ TE/ $\alpha$ TE para identificação de tratamento animal exógeno com testosterona foi avaliado. Inicialmente um LC foi estimado a partir das razões calculadas para os grupos sem tratamento com

Androgenol, verificando-se posteriormente esse limite nas amostras coletadas do grupo T.

Para os grupos sem tratamento com testosterona, calcularam-se as razões para amostras de soro coletadas de D-5 a D17 para o Grupo C, e de D0 a D11 para o grupo B. Com o objetivo de avaliar se o tratamento com UNB influenciaria as razões  $\beta\text{TE}/\alpha\text{TE}$  do grupo B, as razões calculadas para os grupos B e C foram comparadas utilizando o teste t de student não-pareado com variância não agrupada ( $F_{\text{calc}} = 1,00 > F_{\text{crítico}(44,28)} = 0,58$ ). O valor de t calculado foi igual a 0,98, inferior ao valor  $t_{\text{crítico}}(0,05, 70) = 1,99$ , indicando que as médias dos dois grupos são estatisticamente equivalentes, a 95% de confiança. Dessa forma, o conjunto de 72 amostras de soro coletadas dos grupos B e C, durante o período de D0 a D17, foi utilizado para avaliação da distribuição das razões  $\beta\text{TE}/\alpha\text{TE}$ , em uma população não submetida a tratamento com testosterona (Figura 5.5).



**Figura 5.5:** Valores de razões  $\beta\text{TE}/\alpha\text{TE}$  calculados para 72 amostras de soro dos grupos B e C

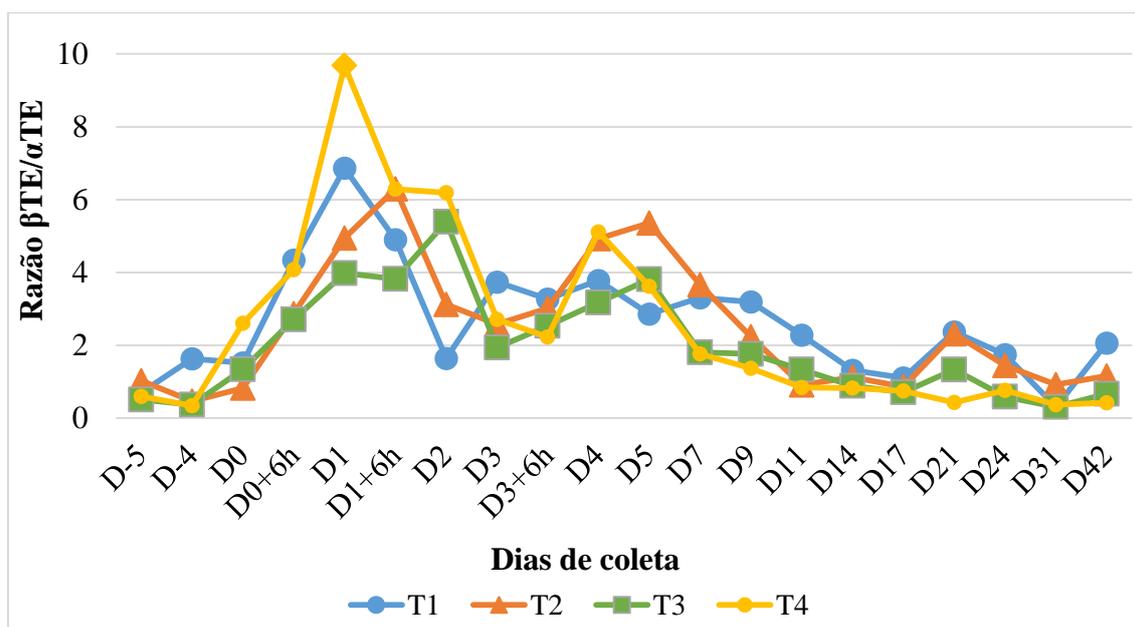
Observou-se que as razões calculadas variaram entre 0,26 e 2,71, sendo que a normalidade dos dados foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk (SHAPIRO, 1968). O

valor calculado da estatística  $w$  foi de 0,90, superior ao valor crítico de  $w$  para 72 amostras, que é igual a 0,00003. Assim, a hipótese nula, de que os dados se distribuem normalmente, foi aceita.

A média ( $\mu$ ) das razões para as 72 amostras avaliadas foi estimada, obtendo-se o valor de 1,06, com desvio padrão ( $s$ ) de 0,61. A partir desses valores foi estabelecido um LC, com um nível de confiança de 99%, dado por:

$$LC = \mu + 2,65s = 2,68$$

Esse LC estimado foi aplicado à população de referência submetida ao tratamento hormonal, grupo T, para avaliar a taxa de resultados falsos negativos. O período de coletas considerado foi de D0+6h a D9, pois nesse intervalo o analito PPT foi detectado em todos os animais. Dessa forma, os sinais analíticos de  $\beta$ TE nesse período não devem corresponder a valores de referência endógenos. As razões calculadas para o grupo T, englobando todas as coletas realizadas (D-5 a D42), são apresentadas graficamente na Figura 5.6.

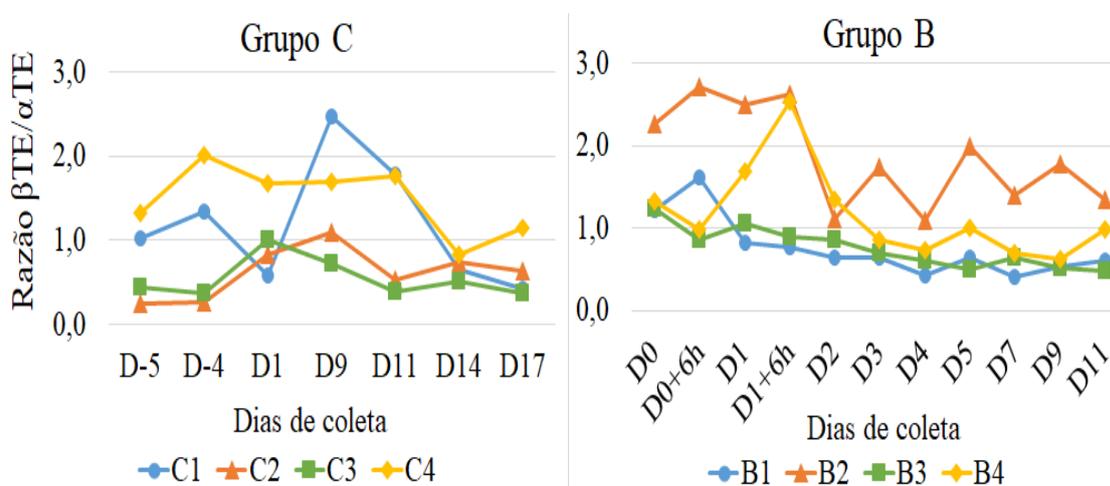


**Figura 5.6:** Razões  $\beta$ TE/ $\alpha$ TE calculadas para o grupo T de D-5 a D42

Para os animais, T1 em D2; T2 em D9; T3 em D3, D7 e D9; e T4 em D7 e D9, razões menores que o LC de 2,68 foram observadas. Para o total de 40 amostras analisadas do grupo T entre esses dias, obteve-se uma taxa de resultados falso-negativos igual a 17,5%, valor superior ao de 5% recomendado em análises de triagem (CRLs,

2010). Destaca-se que, para todos os animais tratados do grupo T, houve pelo menos um resultado falso negativo no período estudado (até D9). Portanto, a aplicação da razão entre as áreas calculadas entre  $\beta$ TE e  $\alpha$ TE não se mostrou adequada, no que se refere às taxas de resultados falso-negativos. Este fato já tinha sido observado em análises *anti-doping* em humanos e em animais (PONZETTO, 2016; VILJANTO, 2017).

Para o cálculo da taxa de resultados falso-positivos, aplicou-se o LC a todo o conjunto de amostras coletadas dos grupos C e B, apresentados graficamente na Figura 5.7.



**Figura 5.7:** Razões  $\beta$ TE/ $\alpha$ TE calculadas para os grupos B e C não submetidos a tratamento com Androgenol

Um valor superior a 2,68 só foi observado para o animal B2, em D0+6h (razão igual a 2,71), o que representa uma taxa de 1,39% de resultados falso-positivos. Levando-se em conta que o LC foi calculado a partir de uma população de 8 animais, restrições quanto à abrangência desse número, no que se refere a variações interindividuais, pode ter levado a valores subestimados para esse limite. De toda forma, apenas 1 valor de razão de áreas calculado para os grupos B e C foi superior ao LC, mas ainda muito próximo ao mesmo. Portanto, a obtenção de uma razão  $\beta$ TE/ $\alpha$ TE superior ao LC para uma amostra real pode levar a uma suspeição do uso hormonal, podendo-se solicitar uma investigação na propriedade em questão.

### 5.3.2.3 Liberação de Resultados Analíticos para Amostras de Soro

Com relação à liberação de resultados de amostras reais de soro com níveis quantificáveis de  $\beta$ TE, deve-se considerar o caráter endógeno desse analito, o que impede uma tomada de ação imediata. Caso seja observada a presença de um éster de testosterona como PPT, ou outros como ATE, CPT, ENT, DET e FPT, pode-se concluir indubitavelmente que houve a administração de uma formulação sintética. A partir dessa observação, pode-se então iniciar um processo de investigação que avalie a indicação do uso do medicamento. Caso seja comprovado o uso ilegal para fins de promoção de crescimento, as medidas previstas na Instrução Normativa N° 55 de 2011 do MAPA (BRASIL, 2011) podem ser aplicadas. Levando-se em conta que as formas esterificadas possuem duração relativamente curta em soro bovino, valores elevados de  $\beta$ TE, relacionados a uma ausência de detecção dos ésteres, podem ainda estar associados a um uso exógeno anterior à janela de detecção dos mesmos.

O uso da técnica GC-C-IRMS seria uma alternativa para comprovar de forma indubitável a administração de formulações comerciais em amostras com concentrações elevadas de  $\beta$ TE. Entretanto, seu elevado custo, a dispendiosidade relacionada a sua execução e sua baixa sensibilidade analítica devem ser consideradas. Ainda como alternativa laboratorial mais acessível, a identificação de uma razão  $\beta$ TE/ $\alpha$ TE elevada pode ser usada para a classificação da amostra em questão como suspeita, e assim iniciar uma investigação, com as devidas ressalvas relacionadas às possíveis especificidades individuais do animal em questão. Nesses casos, um aumento na frequência de coleta amostral, relacionada à propriedade de criação animal em questão, pode ser solicitado, a fim de se verificar se razões elevadas ocorrem de forma sistemática; ou mesmo uma perícia no local pode ser solicitada, a fim de averiguar indícios de uso de medicamentos.

Como no estudo desenvolvido nesta tese não foi detectado sinal analítico correspondente a  $\beta$ BO em nenhum animal não tratado, a presença do mesmo foi considerada como relacionada ao uso do medicamento administrado. Entretanto, o fato de haver relatos na literatura envolvendo essa detecção em animais não submetidos a tratamento hormonal, também é um complicador para a liberação de resultados analíticos. Como esses relatos são relativamente escassos, possíveis estratégias como a avaliação de uma razão  $\beta$ BO/ $\alpha$ BO nunca foram reportadas na literatura. Contudo, a

indicação laboratorial para o início de um processo de investigação não deve necessariamente ser descartada para casos de detecção desses compostos.

Da mesma forma que no caso de  $\beta$ TE e derivados da testosterona, a detecção de ésteres e a técnica GC-C-IRMS continuam como as únicas alternativas atualmente inquestionáveis do ponto de vista analítico/legal para  $\beta$ BO, com as mesmas ressalvas. A aplicação de ferramentas quimiométricas, principalmente as relacionadas à metabolômica, também se apresentam como alternativas promissoras, porém ainda inexistente um arcabouço legal que subsidie seu emprego e aplicação no monitoramento de medicamentos veterinários (DERVILLY-PINEL, 2018).

### 5.3.3 Monitoramento de Resíduos de PPT e UNB na Matriz Urina

A aplicabilidade das matrizes pelo e soro bovino foi comparada com a matriz urina, tradicionalmente elencada para monitoramento de hormônios pelos laboratórios que realizam análise de resíduos de medicamentos e *anti-doping*.

Em nenhuma das amostras de urina os analitos PPT e UNB foram identificados ( $LQ = 3,5 \mu\text{g L}^{-1}$ ), o que impede que a identificação inequívoca do uso exógeno através da detecção das formas esterificadas, em contraste com a matriz soro.

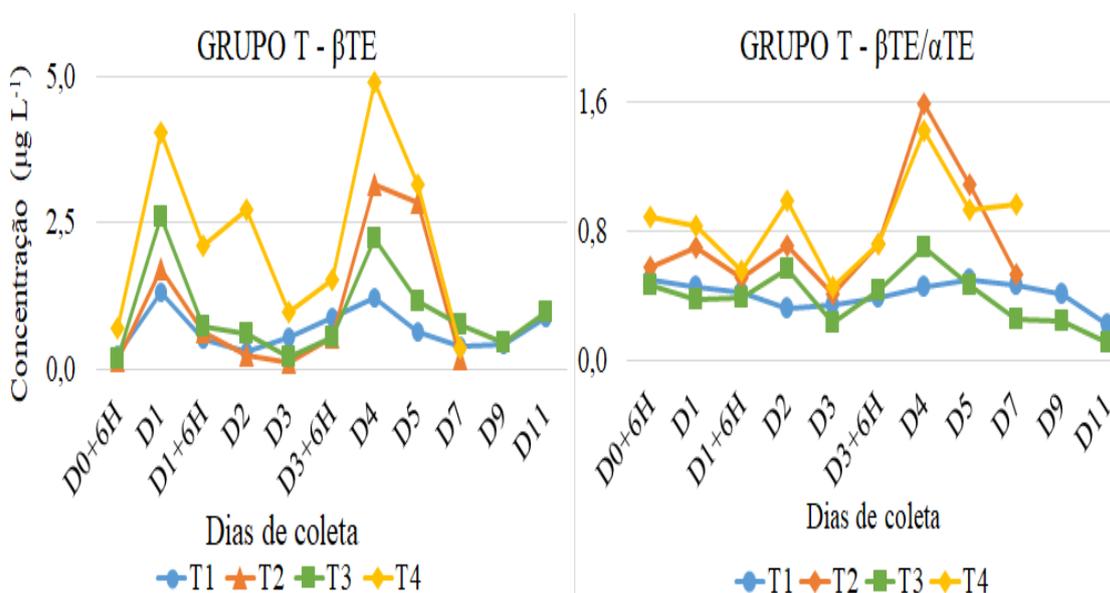
Conforme relatado na literatura, o principal metabólito marcador para uso de boldenona em urina é o  $\alpha$ BO, seguido de  $\beta$ BO, e para os casos envolvendo testosterona o metabólito em maior concentração circulante é o  $\alpha$ TE, seguido de  $\beta$ TE (ANGELETTI, 2006). Em todos os cromatogramas avaliados as intensidades das formas alfa foram superiores às das formas beta, tanto para  $\alpha$ BO quanto  $\alpha$ TE. Como apresentado na Figura 5.9, diferentemente da matriz soro, em urina as intensidades das formas alfa foram superiores mesmo após o tratamento com Androgenol no grupo T. Além disso, o analito  $\beta$ TE não foi detectado na grande maioria das amostras dos animais não tratados com esse medicamento (grupos B e C), provavelmente devido ao fato de os mesmos serem castrados. Portanto, uma avaliação por um intervalo de tempo prolongado correspondendo a níveis endógenos para a razão  $\beta$ TE/ $\alpha$ TE não foi possível para a matriz urina. A Tabela 5.6 apresenta as concentrações de  $\beta$ TE nas amostras de urina analisadas, e as razões  $\beta$ TE/ $\alpha$ TE obtidas após tratamento com Androgenol:

**Tabela 5.6:** Concentrações calculadas para  $\beta$ TE e razões  $\beta$ TE/ $\alpha$ TE para o grupo T em urina bovina

Dia de coleta	Concentração $\beta$ TE ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )				Razão $\beta$ TE/ $\alpha$ TE			
	T1	T2	T3	T4	T1	T2	T3	T4
D0+6H	0,22	0,15	0,17	0,70	0,49	0,58	0,46	0,89
D1	1,30	1,71	2,59	4,03	0,45	0,70	0,37	0,84
D1+6H	0,50	0,62	0,71	2,10	0,42	0,51	0,39	0,55
D2	0,31	0,23	0,60	2,73	0,32	0,71	0,57	0,99
D3	0,55	0,12	0,20	0,96	0,34	0,41	0,23	0,45
D3+6H	0,89	0,53	0,53	1,52	0,39	0,72	0,43	0,72
D4	1,21	3,14	2,24	4,90	0,45	1,59	0,70	1,43
D5	0,62	2,86	1,15	3,14	0,49	1,09	0,46	0,93
D7	0,38	0,18	0,76	0,36	0,47	0,53	0,26	0,97
D9	0,41	ND	0,44	ND	0,41	ND	0,24	ND
D11	0,88	ND	0,97	ND	0,22	ND	0,10	ND

ND: Ausência de detecção para  $\beta$ TE

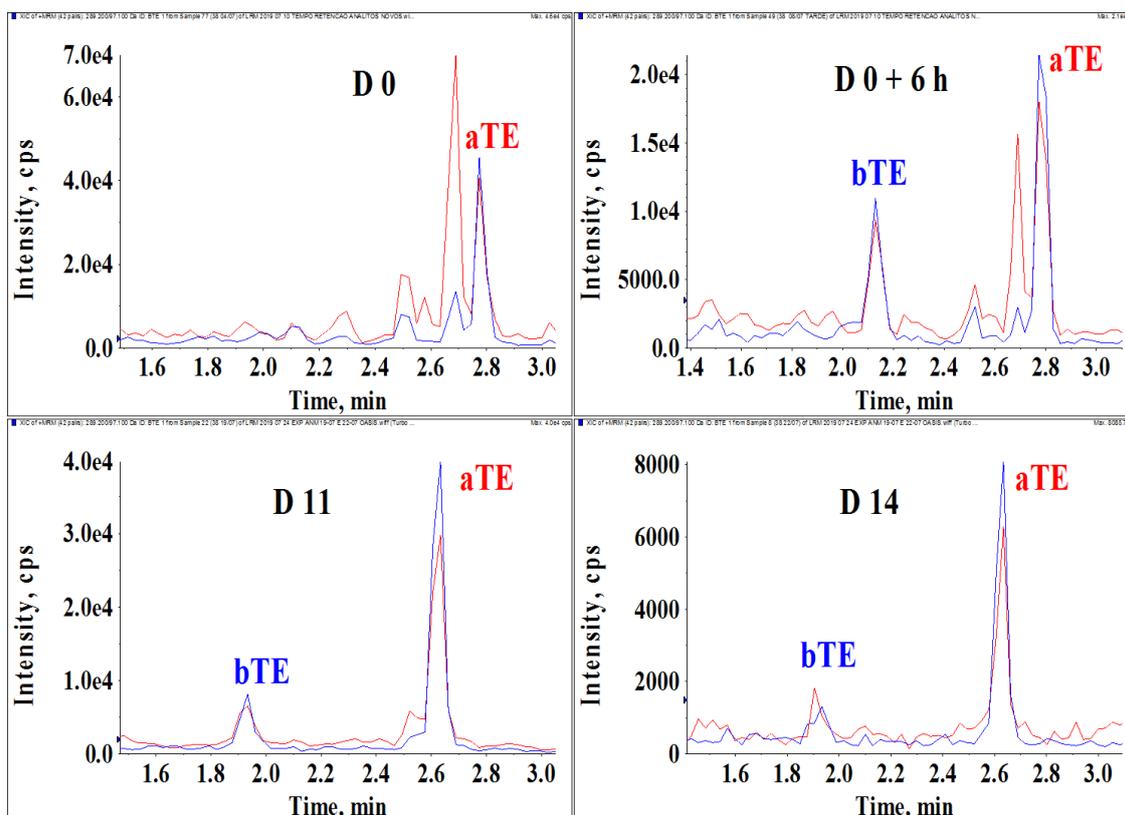
A Figura 5.8 apresenta graficamente a variação das concentrações de  $\beta$ TE e das razões  $\beta$ TE/ $\alpha$ TE obtidas nas amostras de urina analisadas.



**Figura 5.8:** Representação gráfica das concentrações calculadas para  $\beta$ TE e razões  $\beta$ TE/ $\alpha$ TE para o grupo T em urina bovina

Da mesma forma que para a matriz soro, observa-se um período de 3 dias entre a aplicação de Androgenol e o retorno às concentrações iniciais, porém a detecção de  $\beta$ TE

foi observada até D7 para T2 e T4, e D11 para T1 e T3, no caso da urina. Para o monitoramento em soro, esse período se estendeu até D11 para 3 animais e D14 para T3. Com relação às razões  $\beta\text{TE}/\alpha\text{TE}$  calculadas, oscilações nesses valores mais pronunciadas foram observadas para T2 e T4, sendo que para T1 a variação das razões não demonstrou influência do tratamento. Deve-se levar em conta também que razões relacionadas a níveis endógenos não puderam ser calculadas, uma vez que não houve a detecção de  $\beta\text{TE}$  nos grupos B e C. A Figura 5.9 apresenta a variação das intensidades observadas para  $\beta\text{TE}$  e  $\alpha\text{TE}$  para o animal T1.



**Figura 5.9:** Cromatogramas de íons extraídos obtidos de urina bovina relativos ao animal T1 no intervalo de tempo de D0 a D17

Observa-se que antes do tratamento com Androgenol (D0), apenas o analito  $\alpha\text{TE}$  foi detectado para o animal T1 com baixa intensidade, e se manteve superior ao sinal de  $\beta\text{TE}$  durante todo o tratamento. Deve-se levar em conta que, para a maioria dos trabalhos descritos na literatura, a razão  $\beta\text{TE}/\alpha\text{TE}$  apresenta valores superiores a 1 em animais tratados, com LCs propostos na faixa de 4 a 6. Entretanto, esses LCs foram aplicados quando elevadas concentrações de  $\beta\text{TE}$  foram obtidas, o que não ocorreu com nenhum animal estudado neste trabalho (AFSCA, 2013; VILJANTO, 2017).

Verificou-se também que, após D11, a relação entre o sinal e o ruído de  $\beta$ TE foi menor que 3, caracterizando a não detecção desse composto. Dessa forma, notou-se que a matriz soro apresentou uma melhor sensibilidade no que se refere à detecção de  $\beta$ TE em animais contendo baixos níveis desse hormônio, como os castrados. Deve-se levar em conta que essa condição animal, em comparação com animais não castrados, é mais vantajosa do ponto de vista zootécnico, no que se refere a produção de carne com maior percentual de gordura, fazendo com que a castração animal seja uma prática veterinária comumente empregada na criação desses animais.

Vale ressaltar que no caso das análises *anti-doping* em urina de humanos, outros metabólitos, além de  $\beta$ TE e  $\alpha$ TE, são analisados por triagem: androsterona, eticolanona,  $5\beta$ -androstano- $3\alpha,17\beta$ -diol e  $5\alpha$ -androstano- $3\alpha,17\beta$ -diol. Nesse caso, o perfil do metabolismo é traçado e avaliado quanto a uma possível alteração em relação a um perfil previamente conhecido do atleta em questão, numa abordagem longitudinal denominada Passaporte Biológico do Atleta - (*Athlete Biological Passport* - ABP), ou passaporte esteroideal (WADA, 2018). Entretanto, do ponto de vista do monitoramento de drogas veterinárias, uma eventual abordagem desse tipo somente se aplicaria no caso de animais de competições oficiais, em que o custo e a disponibilidade animal seriam condizentes com o objetivo do monitoramento.

Para os resíduos de UNB no grupo B, as concentrações calculadas de  $\alpha$ BO e  $\beta$ BO são apresentadas na Tabela 5.7:

**Tabela 5.7:** Concentrações calculadas em urina bovina para os metabólitos  $\alpha$ BO e  $\beta$ BO no grupo B (continua)

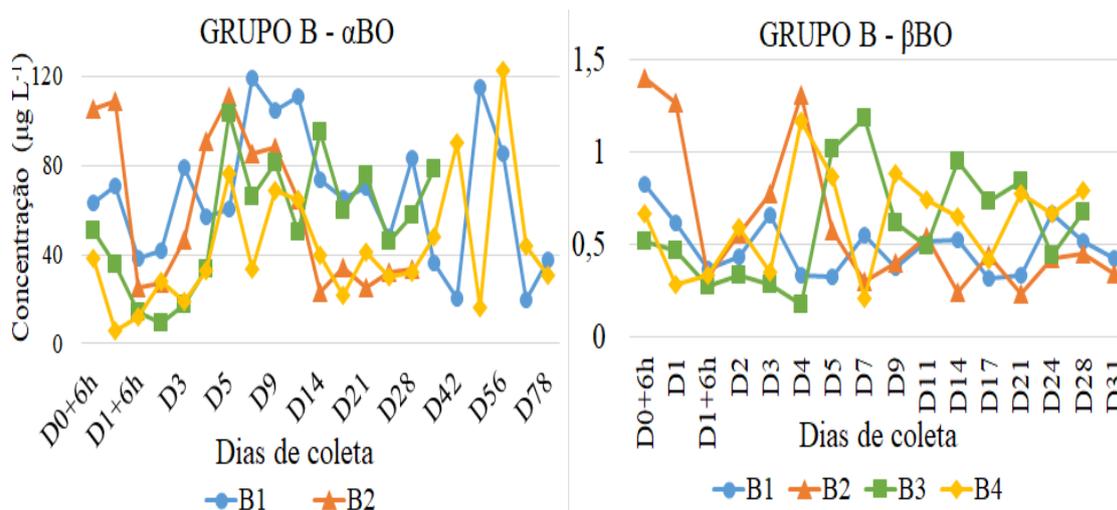
Dias de coleta	Concentração ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )							
	$\alpha$ BO ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )				$\beta$ BO ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )			
	B1	B2	B3	B4	B1	B2	B3	B4
D0+6h	63,34	105,37	50,39	38,08	0,83	1,40	0,52	0,67
D1	70,69	108,56	35,53	6,01	0,62	1,27	0,47	0,29
D1+6h	38,08	25,13	14,14	12,25	0,37	0,33	0,27	0,34
D2	41,72	27,09	9,17	28,00	0,43	0,56	0,34	0,59
D3	79,10	46,83	17,29	18,97	0,66	0,78	0,28	0,35

**Tabela 5.7:** Concentrações calculadas em urina bovina para os metabólitos  $\alpha$ BO e  $\beta$ BO no grupo B (conclusão)

Dias de coleta	Concentração ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )							
	$\alpha$ BO ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )				$\beta$ BO ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )			
	B1	B2	B3	B4	B1	B2	B3	B4
D4	56,84	91,00	33,39	32,69	0,34	1,31	0,18	1,17
D5	60,41	110,60	102,90	76,30	0,33	0,58	1,02	0,87
D7	119,00	85,40	66,22	33,53	0,55	0,30	1,19	0,21
D9	104,30	88,20	81,20	68,81	0,38	0,40	0,62	0,88
D11	110,60	64,47	49,91	64,54	0,52	0,54	0,49	0,74
D14	73,50	23,45	95,20	39,83	0,52	0,24	0,96	0,65
D17	65,38	34,16	59,57	21,77	0,31	0,44	0,74	0,42
D21	70,00	25,48	75,60	41,30	0,33	0,24	0,84	0,78
D24	47,95	32,27	45,57	30,17	0,67	0,42	0,44	0,67
D28	83,30	33,74	57,75	32,27	0,52	0,45	0,68	0,80
D31	36,05	ND	78,40	48,16	0,43	0,34	ND	ND
D42	20,23	ND	ND	90,30	ND	ND	ND	ND
D49	114,80	ND	ND	16,52	ND	ND	ND	ND
D56	85,40	ND	ND	122,50	ND	ND	ND	ND
D67	19,53	ND	ND	43,47	ND	ND	ND	ND
D78	37,31	ND	ND	30,59	ND	ND	ND	ND

ND: analito não detectado

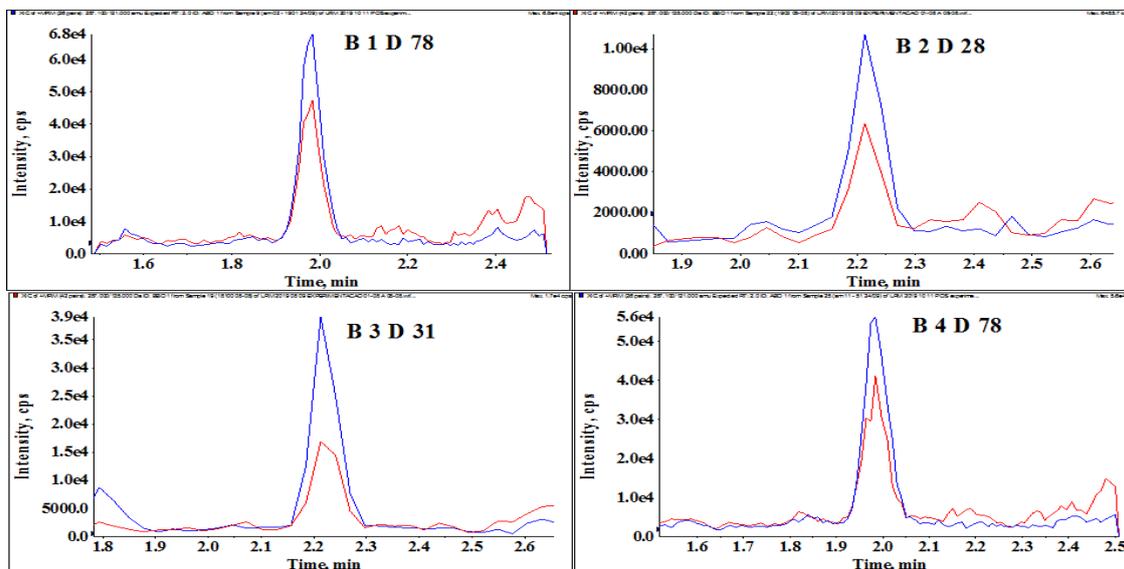
A Figura 5.10 representa graficamente as concentrações calculadas de  $\alpha$ BO e  $\beta$ BO em urina bovina.



**Figura 5.10:** Representação gráfica das concentrações calculadas em urina bovina para os metabólitos  $\alpha$ BO e  $\beta$ BO no grupo B

Nota-se uma grande variação das concentrações calculadas na matriz urina, principalmente para  $\alpha$ BO, em comparação com a matriz soro. Deve-se levar em conta que a matriz urina possui densidade altamente relacionada ao grau de hidratação dos animais, o que pode explicar as oscilações observadas durante o longo período de monitoramento (EDMANDS, 2014).

A Figura 5.11 apresenta os cromatogramas referentes ao último dia de detecção de  $\alpha$ BO reportado para os quatro animais do grupo B em urina:



**Figura 5.11:** Cromatogramas de íons extraídos obtidos de urina bovina relativos ao grupo B evidenciando o último dia de detecção de  $\alpha$ BO para os quatro animais monitorados

Nota-se uma variação individual, no que se refere à janela de detecção de  $\alpha$ BO nos quatro animais estudados, observando-se dois comportamentos temporais, sendo que, de acordo com a Tabela 5.1, os animais de maior peso foram os que apresentaram o maior período de detecção de resíduos de UNB. Os animais B1 e B4 apresentaram maiores janelas de detecção dos resíduos em ambas as matrizes, de forma que se detectou  $\alpha$ BO em urina até D78 e  $\beta$ BO em soro até D92 para ambos. Para B2 e B3 a diferença entre as duas matrizes foi mais pronunciada, em urina B3 foi detectado até D31 e B2 até D28 (em soro até D56 para  $\beta$ BO em ambos).

Destaca-se que na matriz soro apenas o isômero beta da boldenona é presente. No caso da urina o metabólito marcador é a forma alfa, presente em maiores intensidades, sendo que o metabólito menos intenso  $\beta$ BO foi detectado nessa última matriz até D31 para B1 e B2, e D28 para B3 e B4.

Dessa forma, o monitoramento de resíduos de UNB em soro bovino mostrou-se mais eficaz devido a uma maior janela de detecção para  $\beta$ BO, do que o monitoramento de  $\alpha$ BO e  $\beta$ BO em urina. Observou-se também que os valores nominais de concentração para  $\alpha$ BO, nessa última matriz, foram superiores aos obtidos para soro, uma vez que a excreção desses metabólitos em urina é a principal via de eliminação desses compostos (AFSCA, 2013). Portanto, uma avaliação concomitante das duas matrizes seria a abordagem mais adequada para o monitoramento de resíduos.

## 5.4 CONCLUSÕES

Neste capítulo foram apresentados o delineamento e os resultados referentes a um procedimento de experimentação animal envolvendo a administração de duas formulações comerciais de anabolizantes em animais bovinos. As dosagens utilizadas seguiram as orientações contidas nas bulas dos medicamentos Androgenol (PPT) e Equi-Boost (UNB). A avaliação concomitante das matrizes pelo, soro e urina permitiu o estudo do potencial de aplicação das duas primeiras matrizes em comparação com a urina, tradicionalmente usada em laboratórios de resíduos de medicamentos e *anti-doping*.

Com relação à matriz pelo bovino, concentrações elevadas de resíduos de PPT e UNB foram encontradas nas amostras coletadas nos primeiros dias após a aplicação dos medicamentos, o que indica que resíduos destes podem sofrer um acúmulo temporal na

região de aplicação. Observou-se que os resíduos detectados nessa matriz mostraram-se distribuídos apenas próximos ao pescoço dos animais, local de aplicação das injeções intramusculares. Mesmo em algumas coletas realizadas nessa região não houve detecção dos analitos pesquisados em dias específicos. Devido a esse efeito, sugere-se que um resultado negativo relacionado à presença de anabolizantes em pelo bovino não deve caracterizar uma conformidade referente a não utilização de medicamentos. No entanto, um eventual resultado confirmatório para a presença de ésteres de anabolizantes indica o uso de medicamento hormonal, tendo em vista a não existência de formas esterificadas endógenas dessa classe de compostos.

O monitoramento de soro bovino coletado dos animais tratados possibilitou a detecção das formas esterificadas para todos eles, com janela de detecção das mesmas entre 9 e 11 dias após o início do tratamento hormonal. Tentou-se estabelecer um limite de corte para a razão entre as formas detectadas  $\beta$ TE e  $\alpha$ TE a partir dos valores calculados para animais não tratados. No entanto, as taxas de resultados falso-negativos excedeu a recomendação de 5%, o que levou à proposição dessa estratégia apenas como uma indicação de uma anormalidade a ser investigada, no caso de razões calculadas elevadas. Portanto, neste trabalho, para o caso de tratamento animal envolvendo derivados de testosterona, a identificação inequívoca do uso do medicamento Androgenol só seria possível a partir da detecção da forma esterificada PPT.

Com relação ao uso de compostos de boldenona em tratamento animal, a janela de detecção do produto de desesterificação  $\beta$ BO alcançou 56 dias para dois animais e 92 para os outros dois do mesmo grupo. Não foi observado sinal analítico desse analito em nenhuma amostra derivada de animais não tratados com UNB. Relatos na literatura referentes à observação de  $\beta$ BO em animais não submetidos a tratamento hormonal não devem ser desconsiderados, principalmente em questões legais envolvendo medidas punitivas aos responsáveis pela criação animal em questão. Da mesma forma que para testosterona, neste trabalho um abuso de boldenona só seria considerado inequívoco quando as formas esterificadas fossem detectadas. No entanto, não é impeditivo que em ambos os casos a detecção de uma razão  $\beta$ TE/ $\alpha$ TE elevada ou uma detecção de uma forma livre da boldenona subsidiem uma requisição de investigação dos produtores relacionados à criação animal em questão, com uma indicação formal de anormalidade observada, por exemplo.

A matriz soro bovino apresentou melhor desempenho quanto a uma maior janela de detecção para resíduos de UNB, além de ter permitido o estabelecimento de um LC para a razão  $\beta$ TE/ $\alpha$ TE, pois houve detecção de  $\beta$ TE em todas as amostras não submetidas ao tratamento com Androgenol. Deve-se considerar também que é possível a detecção dos ésteres dos medicamentos administrados no soro. Além disso, o método empregado para soro possui um custo inferior ao de urina, principalmente devido ao fato de não empregar cartuchos de SPE, e também apresenta um menor tempo de execução, por não necessitar da hidrólise enzimática realizada por 16h para a urina, o que requer dois dias de análise laboratorial.

Diante dessas considerações, pode-se sugerir a inclusão da matriz soro em programas de monitoramento de uso de substâncias anabolizantes na criação de animais bovinos, e o uso da matriz pelo em casos específicos relacionados a processos de investigação de amostras suspeitas quanto à presença de esteroides endógenos.

## 5.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas - ABNT NBR ISO/IEC 17025:2017. **Requisitos gerais para a competência de laboratórios de ensaio e calibração.** Rio de Janeiro, 2017, 43 p.

AFSCA - Agence fédérale pour la sécurité de la chaîne alimentaire. **Presence of substances with an endogenous origin known or suspected to a certain level through the metabolism and/or feed in different matrices of animal species producing food, 2013.** Disponível em:

“[http://www.afsca.be/comitescientifique/avis/2013/\\_documents/ADVIESAVIS072013\\_Annex2\\_substanceswithanendogenousoriginknownorsuspected.pdf](http://www.afsca.be/comitescientifique/avis/2013/_documents/ADVIESAVIS072013_Annex2_substanceswithanendogenousoriginknownorsuspected.pdf)”, acesso em 02/09/2019.

ANGELETTI, R., CONTIERO, L., GALLINA, G., MONTESISSA, C. The Urinary Ratio of Testosterone to Epitetosterone: A Good Marker of Illegal Treatment also in Cattle? **Vet Res Commun**, 30, s.1, p.127–131, 2006.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento - MAPA. **Instrução Normativa N° 55, de 1 de Dezembro de 2011.** Disponível em “<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumospecuarios/ali>

[mentacao-animal/arquivos-alimentacao-animal/legislacao/instrucaonormativa-no-55-de-1o-de-dezembro-de-2011.pdf.view](http://www.agricultura.gov.br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumospecuarios/ali)” acesso em 12/11/2019.

CHIESA, L., PASQUALE, E., PANSERI, S., CANNIZZO, F. T., BIOLATTI, B., PAVLOVIC, R., ARIOLI, F. Pseudoendogenous presence of  $\beta$ -boldenone sulphate and glucuronide in untreated young bulls from the food chain. **Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess**, Itália, v.32, n.6, p.825-832, 2015.

CRLs - Community Reference Laboratories Residues. **Guidelines for the validation of screening methods for residues of veterinary medicine (initial validation and transfer)**, 2010. Disponível em: “[https://ec.europa.eu/food/sites/fod/files/safety/doc/cs-vet\\_med\\_guideline\\_validation\\_screening\\_en-pdf](https://ec.europa.eu/food/sites/fod/files/safety/doc/cs-vet_med_guideline_validation_screening_en-pdf)”, acesso em 01/09/2019.

DE KOCK, N., ACHARYA, S. R., UBHAYASEKERA, S. J. K. A., BERGQUIST, J. A. Novel Targeted Analysis of Peripheral Steroids by UltraPerformance Supercritical Fluid Chromatography Hyphenated to Tandem Mass Spectrometry. **Sci. Rep.**, Suécia, v.8, p.16993-17002, 2018.

DERVILLY-PINEL, G., ROYER, A.L., BOZZETTA, E., PEZZOLATO, M., HERPIN, L., PREVOST, S., LE BIZEC, B. When LC-HRMS metabolomics gets ISO17025 accredited and ready for official controls – application to the screening of forbidden compounds in livestock. **Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess**, França, v.35, n.10, p.1948-1958, 2018.

DESTREZ, B., BICHON, E., RAMBAUD, L., COURANT, F., MONTEAU, F., PINEL, G., ANTIGNAC, J. P., LE BIZEC, B. Criteria to distinguish between natural situations and illegal use of boldenone, boldenone esters and boldione in cattle 2. Direct measurement of 17 $\beta$ -boldenone sulpho-conjugate in calf urine by liquid chromatography--high resolution and tandem mass spectrometry. **Steroids**, França, v.74, n.10-11, p.803-808, 2009.

EDMANDS, W. M., FERRARI, P., SCALBERT, A. Normalization to specific gravity prior to analysis improves information recovery from high resolution mass spectrometry metabolomic profiles of human urine. **Anal. Chem.**, França, v.86, n.21, p.10925-10931, 2014.

FERRETTI, G., *et al.* Excretion profile of boldenone and its metabolites after oral administration to veal calves. **Anal. Chim. Acta**, Itália, v.589, n.2, p.269–274, 2007.

GENANGELI, M., *et al.* Development and application of a UHPLC-MS/MS method for the simultaneous determination of 17 steroidal hormones in equine serum. **J. Mass Spectrom.**, Itália, v.52, p.22–29, 2017.

GÓMEZ, C., POZO, O. J., GEYER, H., MARCOS, J., THEVIS, M., SCHÄNZER, W., SEGURA, J., VENTURA, R. New potential markers for the detection of boldenone misuse. **J. Steroid Biochem. Mol. Biol.**, Espanha, v.132, p.239-246, 2012.

GRAY, B. P., TEALE, P., PEARCE, C. M. Analysis of methyloxime derivatives of intact esters of testosterone and boldenone in equine plasma using ultra high

performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Drug Test. Anal.**, Reino Unido, v.3, n.4, p.206–213, 2011.

KAABIA, Z., DERVILLY-PINEL, G., HANGANU, F., CESBRON, N., BICHON, E., POPOT, M. A., BONNAIRE, Y., LE BIZEC, B. Ultra high performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry based identification of steroid esters in serum and plasma: An efficient strategy to detect natural steroids abuse in breeding and racing animals. **J. Chromatogr. A**, França, v.1284, p.126– 140, 2013.

KAABIA, Z., LAPARRE, J., CESBRON, N., LE BIZEC, B., DERVILLY-PINEL, G. Comprehensive steroid profiling by liquid chromatography coupled to high resolution mass spectrometry. **J Steroid Biochem Mol Biol.**, França, v.183, p.106-115, 2018.

POELMANS S., *et al.* Endogenous occurrence of some anabolic steroids in swine matrices. **Food Addit Contam.**, Bélgica, v.22, n.9, p.808-815, 2005.

POMPA, G., ARIOLI, F., FRACCHIOLLA, M. L., ROSSI, C. A., BASSINI, A. L., STELLA, S., BIONDI, P. A. Neof ormation of boldenone and related steroids in faeces of veal calves. **Food Addit Contam.**, Itália, v.23, n.2, p.126–132, 2006.

PONZETTO, F., MEHL, F., BOCCARD, J., BAUME, N., RUDAZ, S., SAUGY, M., NICOLI, R. Longitudinal monitoring of endogenous steroids in human serum by UHPLC-MS/MS as a tool to detect testosterone abuse in sports. **Anal Bioanal Chem**, Suíça, v.408, n.3, p.705-719, 2016.

SAMPAIO, I. B. M. Estatística Aplicada à Experimentação Animal. **FEPMVZ - Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia**, 4ª edição, Belo Horizonte, 2011.

WANG, J., MACNEIL, J. D., KAY, J. F. Chemical Analysis of Antibiotic Residues in Food. **Wiley**, 1ª edição, EUA, 2012.

SHAPIRO, S. S., WILK, M. B., CHEN, H. J. A comparative study of various tests for normality. **J. Am. Stat. Assoc.**, EUA, v.63, n.324, p.1343-1372, 1968.

SNOJ, T., DOLENC, J., KOBAL, S. Sex steroid levels in urine of cattle of different ages: evaluation of abuse control procedures. **Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess**, Eslovênia, v. 31, n. 4, p.614–620, 2014.

SOMA, L. R., UBOH, C. E., GUAN, F., MCDONNELL, S., PACK, J. Pharmacokinetics of boldenone and stanozolol and the results of quantification of anabolic and androgenic steroids in race horses and nonrace horses. **J. Vet. Pharmacol. Therap.**, EUA, v.30, p.101–108, 2007.

VILJANTO, M., *et al.* Application of testosterone to epitestosterone ratio to horse urine – a complementary approach to detect the administrations of testosterone and its pro-

drugs in Thoroughbred geldings. **Drug Test. Anal.**, Reino Unido, v.9, n. 9, p.1328-1336, 2017.

VILJANTO, M., KICMAN, A. T., WALKER, C. J., WOLFF, K., MUIR, T., HINCKS, P., BIDDLE, S., SCARTH, J. Bioformation of boldenone and related precursors/metabolites in equine faeces and urine, with relevance to doping control. **Drug Test. Anal.**, Reino Unido, 2019. <https://doi.org/10.1002/dta.2706>

WADA – World Anti-Doping Agency. **WADA Technical Document – TD2018EAAS - Endogenous Anabolic Androgenic Steroids Measurement and Reporting, 2018.**

Disponível em: “<https://www.wada-ama.org/en/resources/science-medicine/td2018eaas-0>”, acesso em 18/11/2019.

## **Capítulo 6**

### **Considerações Finais**

## 6.1 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Esta tese de doutorado foi desenvolvida com o objetivo de fortalecer o monitoramento de resíduos de compostos de ação anabolizante no âmbito do PNCRC do MAPA, uma vez que o uso de anabolizantes para fins de promoção de crescimento animal é proibido. A crescente intensificação das relações comerciais envolvendo *commodities* brasileiras nos últimos anos levou à conclusão de acordos comerciais que propuseram a importação de produtos cárneos de países em que o uso de anabolizantes é permitido, em contrapartida à liberação dos mercados internos parceiros aos produtos brasileiros. Dessa forma, a circulação de produtos importados em território nacional levou à necessidade do desenvolvimento de um método de ensaio para determinação de compostos anabolizantes na matriz músculo, a que a população brasileira poderia ser exposta. Além dessa questão, o monitoramento interno brasileiro necessita de alternativas analíticas para compostos como  $\beta$ BO,  $\beta$ TE,  $\beta$ NAN e seus respectivos metabólitos, uma vez que a presença dos mesmos em produtos de origem animal pode ser tanto endógena quanto resultante de tratamento exógeno.

Nesse contexto, o segundo capítulo descreveu a validação de um método para a determinação de 39 compostos de ação anabolizante em músculo bovino, em que todos os compostos autorizados para uso animal em países como EUA, Canadá e Austrália, foram contemplados. Foi realizado um estudo para avaliação das condições da reação de hidrólise enzimática, bem como uma aplicação do método na análise de amostras reais coletadas em diferentes regiões do Brasil e provenientes de importação de países parceiros. O método desenvolvido e validado já se encontra inserido oficialmente no sistema de gestão da qualidade do LFDA/MG, sendo que essa validação foi expandida para as matrizes músculo de pescado e fígado de aves, regularmente monitoradas pelo PNCRC desde 2018.

O terceiro capítulo apresentou a validação de um método de ensaio para determinação de 25 esteroides e ésteres de esteroides na matriz pelo bovino, nunca antes avaliada para monitoramento animal no âmbito do PNCRC. Foi empregada, pela primeira vez, a derivatização química dos esteroides pesquisados com MOX em forno de micro-ondas doméstico, a fim de se aumentar seus sinais instrumentais. No capítulo 5, essa matriz foi avaliada criticamente frente a um procedimento de experimentação animal envolvendo a aplicação de formulações contendo PPT e UNB em animais

bovinos. Os resultados obtidos mostraram que a incorporação dos analitos estudados na matriz apenas ocorreu no pelo localizado próximo à região da aplicação das injeções intramusculares. Além disso, em alguns dias de coleta nessa mesma região os analitos pesquisados não foram detectados, o que aponta para uma distribuição não homogênea dos mesmos nas áreas coletadas. Tendo em vista os resultados obtidos, não se recomenda a inclusão do pelo como uma matriz no PNCRC do MAPA. Não obstante, o método desenvolvido pode ser aplicado como uma ferramenta adicional em processos de investigação de amostras já classificadas como suspeitas para a presença de anabolizantes.

O quarto capítulo descreveu a validação de um método de ensaio para a determinação de resíduos de 30 esteroides e ésteres de esteroides em soro bovino, que também é uma matriz ainda não incluída no PNCRC do MAPA. No capítulo 5 essa matriz foi avaliada no procedimento de experimentação animal descrito, em que também coletaram-se amostras de urina dos mesmos animais, a fim de comparar essas duas matrizes. Observaram-se vantagens consideráveis no monitoramento de anabolizantes em soro bovino frente a urina, tais como: detecção dos ésteres de esteroides intactos, maiores janelas de detecção observadas para os metabólitos da boldenona, bem como a possibilidade da utilização do cálculo da razão entre  $\beta$ TE e  $\alpha$ TE, como indicativo de uso de testosterona exógena. Dessa forma, a inclusão dessa matriz é indicada do ponto de vista analítico, tanto para um para o monitoramento de anabolizantes de forma regular pelo PNCRC do MAPA, quanto como uma ferramenta adicional para fins de investigação de amostras suspeitas.

Assim, o desenvolvimento dessa tese contribuiu para o fortalecimento da defesa agropecuária brasileira ao desenvolver metodologias analíticas em matrizes não antes monitoradas, com uma avaliação crítica de pelo e soro bovino por meio de experimentação animal. Trabalhos futuros envolvendo estudos de estabilidade nas matrizes coletadas, bem como avaliação da aplicabilidade de ferramentas quimiométricas serão realizados, em consonância com as tendências recentes reportadas na literatura da área de análise de resíduos.

## **ANEXOS E APÊNDICES**

## ANEXO I

Principais formulações comerciais disponíveis para tratamento animal com substâncias de ação anabolizante

(continua)

<b>Nome comercial</b>	<b>Composição</b>	<b>Modo de administração</b>	<b>Animais alvo</b>	<b>Duração (dias)</b>	<b>Empresa</b>
Revalor <sup>®</sup> -H	ATR (140 mg) + βES (14 mg)		Novilhas	< 130*	
Revalor <sup>®</sup> -S	ATR (120 mg) + βES (24 mg)		Novilhos	< 130*	
Revalor <sup>®</sup> -G	ATR 40 mg) + βES (8 mg)	Implante subcutâneo na orelha	Novilhos e novilhas desmamados	<120	Intervet
Finaplix <sup>®</sup> -H	ATR (200 mg)		Novilhas	<100	
Forplix <sup>®</sup>	ATR (140 mg) + ZER (36 mg)		Novilhos e novilhas	120	
Component <sup>™</sup> TE-S	ATR (120 mg) + βES (24 mg)		Novilhos 250-450 kg	90-120	
Component <sup>™</sup> TE-H	ATR (140 mg) + βES (14 mg)		Novilhos 300-450 kg	90-120	
Component <sup>™</sup> E-H	PPT (200 mg) + BET(20 mg)	Implante subcutâneo na orelha	Novilhos 185-450 kg	-	Ivy Animal Health
Component <sup>™</sup> E-S	PRG (200 mg) + βES (20 mg)		Novilhos 185-450 kg	-	
Synovex <sup>®</sup> -H	PPT (200 mg) + BET (20 mg)		Novilhas (>180 kg)	90-120	
Synovex <sup>®</sup> - Plus	ATR (200 mg) +BET (28 mg)		Novilhos	120-150	

## ANEXO I

Principais formulações comerciais disponíveis para tratamento animal com substâncias de ação anabolizante  
(conclusão)

Nome comercial	Composição	Modo de administração	Animais alvo	Duração (dias)	Empresa
Synovex®-S	PRG (200 mg) +BET (20 mg)		Novilhos (> 180 kg)	-	
Compudose	$\beta$ ES (25,7/43,9 mg)	Implante subcutâneo na orelha	Novilhos e novilhas	200/400	Elanco Animal Health
Ralgro®	ZER (36 mg)	Implante subcutâneo na orelha	Novilhas desmamadas	70-120	Schering-Plough Animal Health
Ralgro® Magnum	ZER (72 mg)	Implante subcutâneo na orelha	Novilhos	70-120	
Equipoise®	UNB (25/50 mg/mL)	Solução injetável		-	
Winstrol	STI (50 mg/mL ou 2 mg)	Solução injetável ou comprimido	Equinos	-	Zoetis INC.
MGA	AME (0,5 mg/aminal/dia)	Alimentação	Novilhas	140	Pharmacia e Upjohn

PPT: propionato de testosterona; BET: benzoato de estradiol; UNB: undecilenato de boldenona.

## ANEXO II

Resumo das metodologias mais relevantes descritas na literatura para análise de substâncias dos grupos A1, A3 e A4 em músculo (continua)

Analitos	Amostra	Extração	Quantificação	Referência
AME, $\beta$ TE, MPR, MTT, PRG hidrocortisona, cortisona, prednisona, prednisolone, acetato de hidrocortisona, acetato de cortisona, propionato de testosterona, 6-metilprednisolona, 17-hidroxiprogesterona	Músculo de ave, bovino e porcino	<ol style="list-style-type: none"> <li>1) Adição de 4,0 mL de ACN + agitação</li> <li>2) Adição 0,2 g de NaCl e 0,8 g de MgSO<sub>4</sub></li> <li>3) <i>Clean-up</i> com 50 mg de Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> e 50 mg de frorisil</li> <li>4) Filtração com filtro de nylon 0,22 <math>\mu</math>m</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1) UHPLC- orbitrap-MS</li> <li>2) Coluna Zorbax Eclipse Plus C18 (2,1<math>\times</math>100 mm, 1,8 <math>\mu</math>m)</li> <li>3) Fase móvel A: metanol/água</li> </ol> Fase móvel B: água/ácido fórmico 0,1% v/v	LÓPEZ-GARCÍA, 2018
ATR, AME, $\beta$ TE, PRG, pregnolona, cortisona, hidrocortisona, androsterona,	Músculo	<ol style="list-style-type: none"> <li>1) Extração de 5 g amostra com 15 mL metanol/ H<sub>2</sub>O (80:20 v/v) a 60 °C</li> <li>2) Purificação com HEX (2 x 5 mL)</li> <li>3) Purificação SPE C18</li> <li>4) Derivatização química com MOX 1 mol/L</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1) UHPLC-MS/MS</li> <li>2) Fase móvel A: metanol</li> </ol> Fase móvel B: água/ácido fórmico 0,1% v/v	DI DONNA, 2015
$\alpha$ TB, $\beta$ TB, STL16OH, MTD, MTTT, ACM, AMG, AME, DIE, HEX, dexametasona, flumetasona e fluoximesterona	Músculo bovino	<ol style="list-style-type: none"> <li>1) Digestão enzimática a 55°C por 3h</li> <li>2) Adição de 30 mL de solução de EtOAc/ éter dietílico (50:50 v/v), agitação em vortex, seguida de shaker, centrifugação</li> <li>3) Evaporação do solvente com N<sub>2</sub></li> <li>4) Dissolução em metanol, seguida da adição de água</li> <li>5) Filtragem em filtro de seringa PTFE</li> <li>6) SPE com cartucho Strata-X</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1) LC-MS/MS ESI</li> <li>2) Coluna Agilent Eclipse Plus C18 (2,1<math>\times</math>50mm, 1,8 <math>\mu</math>m)</li> <li>3) Fase móvel: 0,5 mmol L<sup>-1</sup> acetato de amônio/metanol (70:30, v/v – Fase móvel A) e acetato de amônio/metanol (5:95, v/v - Fase móvel B)</li> </ol>	MALONE 2009

## ANEXO II

Resumo das metodologias mais relevantes descritas na literatura para análise de substâncias dos grupos A1, A3 e A4 em músculo (continuação)

Analitos	Amostra	Extração	Quantificação	Referência
βNAN, PRG, βES, αES, DES, DIE, TAL, ZER, βTE, αTE, HEX, ACM, MTT, MTD, NOT, αNAN, ATB, AMG, ACC, AME, βBO, αBO, βTB, estrona, estriol, norgestrel, flugestona, acetoxiprogesterona, fluoximesterona, 17α-hidroxiprogesterona, 17β-etinilestradiol, 4-androstenediona, caproxiprogesterona, metandriol	Músculo bovino	<ol style="list-style-type: none"> <li>1) Adição de 2 mL tampão acetato de sódio e 8 mL de água</li> <li>2) Aquecimento em micro-ondas por 72s a 100 W</li> <li>3) Homogeneização com Ultra-turrax por 1 min</li> <li>4) Adição de 10 mL de metanol, agitação em vortex por 1 min e centrifugação 10 min.</li> <li>5) Adição de 5 mL de HEX, agitação em shaker por 2 min, seguida de centrifugação por 10 min</li> <li>6) Extração através da adição de 20 mL de dietiléter</li> <li>7) O resíduo foi reconstituído com 500 µL de CLF e diluído com 5 mL de HEX</li> <li>8) Purificação SPE cartucho Si e NH<sub>2</sub></li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1) UHPLC-MS/MS ESI-</li> <li>2) Coluna Hypersil Gold C18 (100 x 2,1 mm, 1,9 µm)</li> <li>3) Fase móvel: metanol/água</li> </ol>	VANHAECK 2011
ZER, TAL, αZE, βZE, ZEA, DES, DIE, HEX e zearalanona	Músculo de bovino, suíno e ave	<ol style="list-style-type: none"> <li>1) A amostra foi homogeneizada com 10 mL água</li> <li>2) Em seguida, adicionou-se 10 mL de EtOAc e agitou-se num vortex por 1 min</li> <li>3) Após centrifugação, a fase contendo EtOAc foi transferida para um tubo do kit QuEChERS contendo C18 e PSA</li> <li>4) Após agitação e centrifugação, o EtOAc foi transferido para outro tubo e evaporado</li> <li>5) O resíduo foi reconstituído em metanol, realizou uma lavagem com HEX em duplicata</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1) LC/MS-MS ESI-</li> <li>2) Coluna Poroshell 120 EC-C18 (150 x 2,1 mm, 2,7 µm)</li> <li>3) Fase móvel: metanol/água (65:35 v/v)</li> </ol>	WOZNIAK 2013

## ANEXO II

Resumo das metodologias mais relevantes descritas na literatura para análise de substâncias dos grupos A1, A3 e A4 em músculo (conclusão)

<p><math>\beta</math>TE, <math>\alpha</math>TE, <math>\alpha</math>ES, <math>\beta</math>ES, PRG, dehidroepiandrosterona, hidrocortisona, etiocholanolona, androsterona, estriol, pregnanetriol, estrona</p>	<p>Músculo bovino</p>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1) Digestão enzimática com <math>\beta</math>-glucuronidase /arilsulfatase a 37° por uma noite</li> <li>2) Extração com ACN em ultrassom por 15 min</li> <li>3) Adição de NaCl</li> <li>4) Evaporação da fase orgânica e dissolução em metanol</li> <li>5) Adição de <math>ZnCl_2</math> para remover os lípidos</li> <li>6) SPE com cartuchos: C18, Si e amônia</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1) LC-MS/MS ESI</li> <li>2) Glucocorticóides, androgênios e progesteronas foram separados na coluna Agilent Poroshell 120 EC C18 (150 x 2,1 mm, 3,5 <math>\mu</math>m);</li> <li>3) Estrogênios foram separados na coluna YMC Hidrosfera C<sub>18</sub> n (100 x 2,0 mm, 3.0 <math>\mu</math>m);</li> <li>4) Fase móvel: A: ACN B: água</li> </ol>	<p>ZHAO 2014</p>
<p>ACC, AMG, ACM, MTT, <math>\beta</math>TE, <math>\alpha</math>TE, <math>\beta</math>BO, MTD, <math>\beta</math>TB, <math>\beta</math>NAN, altrenogest, adrostenediona e acetato de clostebol</p>	<p>Músculo bovino</p>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1) 1 g de amostra foi digerida em 2 mL de protease em pH 9,5 por 50 °C por 2h</li> <li>2) Extração em duplicata com 2 mL de metanol</li> <li>3) Lavagem com 3 mL de heptano</li> <li>4) Adição de 15 mL de água</li> <li>5) Purificação em cartucho C18 e <math>NH_2</math></li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1) LC-MS/MS ESI<sup>+</sup></li> <li>2) Coluna Atlantis C18 (150 x 2.1 mm, 3.0 <math>\mu</math>m)</li> <li>3) Fases móveis: A: ACN/solução aquosa de ácido acético (65:35:0,1 v/v); B:ACN</li> </ol>	<p>PEDERSEN 2011</p>
<p><math>\beta</math>BO, ACC, DIE, DES, <math>\beta</math>ES, <math>\alpha</math>ES, <math>\alpha</math>EE, HEX, ACM,AMG, MTD, MTT, NOT, <math>\beta</math>NAN, PRG, STL16OH, <math>\beta</math>TE, <math>\alpha</math>TE, <math>\beta</math>TB, ZER, Acetoxiprogesterona, fluoximesterona e norgestel</p>	<p>Músculo</p>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1) 5 g de amostra é digerida com a enzima subtilisina</li> <li>2) Extração com 5 mL de metanol (2x)</li> <li>3) Purificação com 5 mL de HEX</li> <li>4) Adição de 55 mL de água à fase metanólica</li> <li>5) Purificação com cartuchos C18 e <math>NH_2</math></li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1) LC-MS/MS ESI<sup>+</sup> e ESI<sup>-</sup></li> <li>2) Coluna Symmetry C18 (2,1 x 150mm, 5 <math>\mu</math>m)</li> <li>3) Fase móvel: ESI<sup>+</sup> solução metanol/água (65:35 v/v) com 0,3% ácido fórmico; ESI<sup>-</sup> solução metanol/água (80:20 v/v) com 0,5% de amônia</li> </ol>	<p>BLASCO 2007</p>

### ANEXO III

Valores dos limites máximos estabelecidos oficialmente por organismos internacionais na matriz músculo (AUSTRALIA, 2018; CANADÁ, 2017; CFR/USFD; CODEX, 2017; CRLs, 2007, JAPÃO, 2018)

(continua)

Substância	Espécie	Limites ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )					
		Codex	CFR - USFD <sup>1</sup>	FFCR <sup>2</sup>	Australian Government <sup>3</sup>	CRLs <sup>4</sup>	Canadá
17 $\beta$ -estradiol		NA	0,12	-	-	1*	NA
Acetato de melengestrol		1	-	30	-	1**	-
Progesterona	Bovino	NA	5	-	-	-	NA
Testosterona		NA	-	-	-	-	NA
Acetato de trembolona		2	-	2	2	-	-
Zeranol		2	NA	2	5	2****	2
	Suíno	-	-	2	-	-	-
Propionato de testosterona	Bovino	-	0,64	-	-	-	-
Trembolona	-	-	-	-	-	1*****	10
Dietilestilbestrol	-	-	-	-	-	1	-
Dienestrol	-	-	-	-	-	1	-
Hexestrol	-	-	-	-	-	1	-
17 $\beta$ -19-nortestosterona	-	-	-	-	-	1	-
17 $\alpha$ -19-nortestosterona							
Boldenona (17 $\beta$ -boldenona conjugada)	-	-	-	-	-	1	-
Estanozolol (16 $\beta$ -hidróxiestanozolol)	-	-	-	-	-	1	-

### ANEXO III

Valores dos limites máximos estabelecidos oficialmente por organismos internacionais na matriz músculo (AUSTRALIA, 2018; CANADÁ, 2017; CFR/USFD; CODEX, 2017; CRLs, 2007, JAPÃO, 2018)

(conclusão)

Substância	Espécie	Limites ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )					
		Codex	CFR - USFD <sup>1</sup>	FFCR <sup>2</sup>	Australian Government <sup>3</sup>	CRLs <sup>4</sup>	Canadá
Metiltestosterona	-	-	-	-	-	1	-
Etinilestradiol	-	-	-	-	-	1	-
Megestrol (acetato de megestrol)	-	-	-	-	-	1	-
Medróxi-progesterona (acetato de medróxi-progesterona)	-	-	-	-	-	1	-
Clormadinona (acetato de clormadinona)	-	-	-	-	-	0,5	-

<sup>1</sup> Code of Federal Regulations US Food & Drug

<sup>2</sup> The Japan Food Chemical Research Foundation

<sup>3</sup> Australian Government Federal Register of Legislation

<sup>4</sup> Community Reference Laboratories Residues (EU)

\* para qualquer espécie

\*\* para qualquer espécie e considerando-se também a forma livre

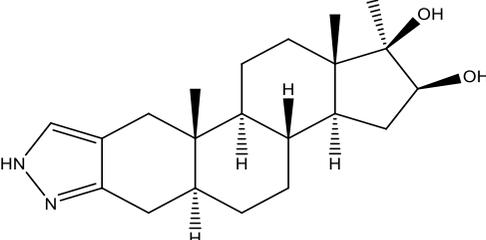
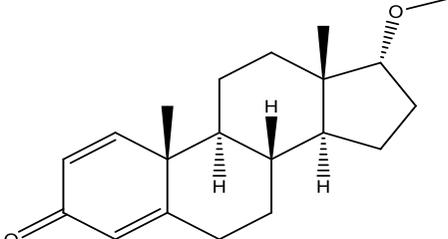
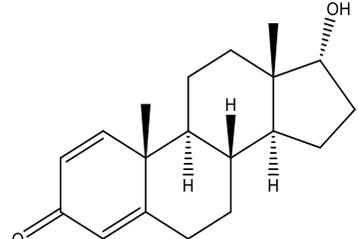
\*\*\* para qualquer espécie e considerando-se também o metabólito taleranol

\*\*\*\* para qualquer espécie e considerando-se os isômeros alfa e beta

NA - não se aplica (monitoramento desnecessário)

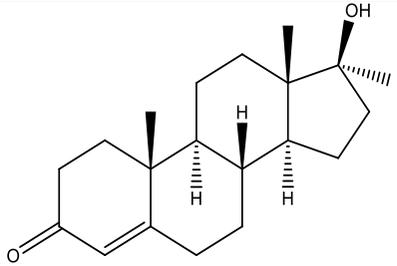
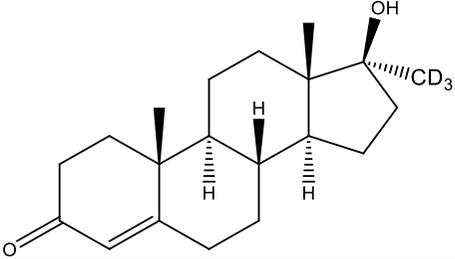
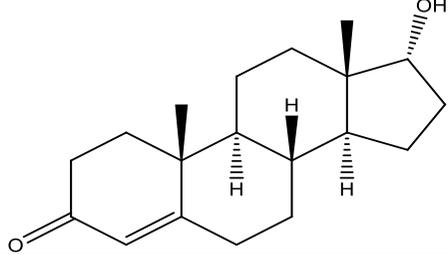
## APÊNDICE I

Descrição dos padrões analíticos utilizados contendo abreviatura, número CAS, fórmulas molecular e estrutural, massa molar e marca (continua)

Composto	Abreviatura	Número CAS	Fórmula molecular	Fórmula estrutural	Massa molar (g mol <sup>-1</sup> )	Marca (Local)
16β-hidróxi-estanozolol	STL16OH	125590-76-3	C <sub>21</sub> H <sub>32</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>		344,49	Toronto Research Chemicals (North York, Canadá)
17-O-Metilboldenona	17OMBO	20401-12-1	C <sub>20</sub> H <sub>28</sub> O <sub>2</sub>		300,44	Toronto Research Chemicals (North York, Canadá)
17α-boldenona	αBO	27833-18-7	C <sub>19</sub> H <sub>26</sub> O <sub>2</sub>		286,41	Toronto Research Chemicals (North York, Canadá)

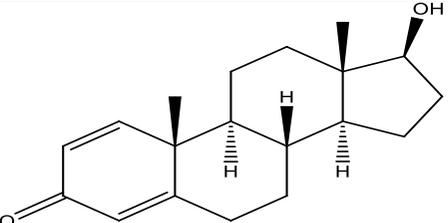
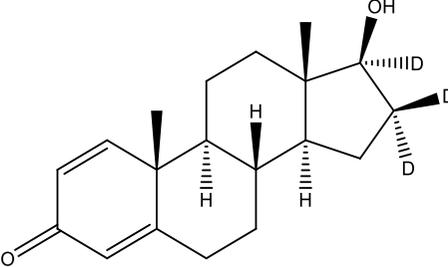
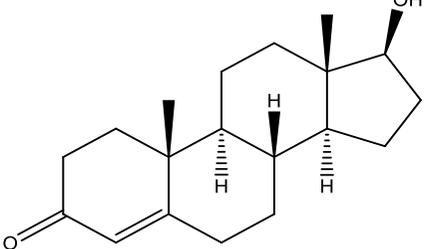
## APÊNDICE I

Descrição dos padrões analíticos utilizados contendo abreviatura, número CAS, fórmulas molecular e estrutural, massa molar e marca (continuação)

Composto	Abreviatura	Número CAS	Fórmula molecular	Fórmula estrutural	Massa molar (g mol <sup>-1</sup> )	Marca (Local)
17 $\alpha$ -Metiltestosterona	MTT	58-18-4	C <sub>20</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>		302,22	LGC Standards (Augsburgo, Alemanha)
17 $\alpha$ -Metiltestosterona-d <sub>3</sub>	MTT-d3	96425-03-5	C <sub>20</sub> H <sub>27</sub> D <sub>3</sub> O <sub>2</sub>		305,22	Toronto Research Chemicals (North York, Canadá)
17 $\alpha$ -testosterona	$\alpha$ TE	481-30-1	C <sub>19</sub> H <sub>28</sub> O <sub>2</sub>		288,42	LGC Standards (Augsburgo, Alemanha)

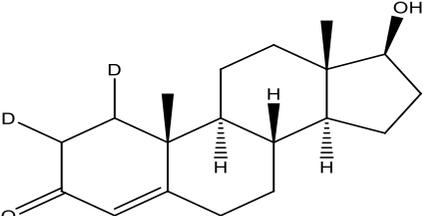
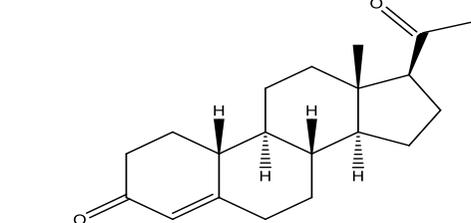
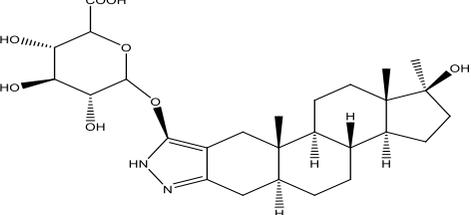
## APÊNDICE I

Descrição dos padrões analíticos utilizados contendo abreviatura, número CAS, fórmulas molecular e estrutural, massa molar e marca (continuação)

Composto	Abreviatura	Número CAS	Fórmula molecular	Fórmula estrutural	Massa molar (g mol <sup>-1</sup> )	Marca (Local)
17β-boldenona	βBO	846-48-0	C <sub>19</sub> H <sub>26</sub> O <sub>2</sub>		286,41	LGC Standards (Augsburgo, Alemanha)
17β-boldenona-d3	βBO-d3	361432-76-0	C <sub>19</sub> H <sub>23</sub> D <sub>3</sub> O <sub>2</sub>		289,4	Australian NMI (Canberra, Austrália)
17β-testosterona	βTE	58-22-0	C <sub>19</sub> H <sub>28</sub> O <sub>2</sub>		288,42	LGC Standards (Augsburgo, Alemanha)

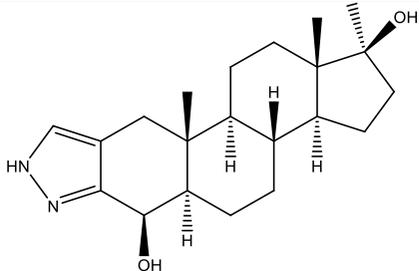
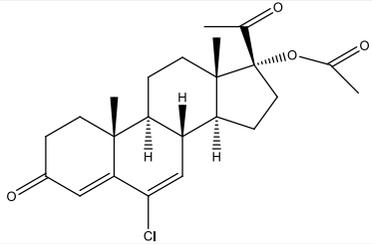
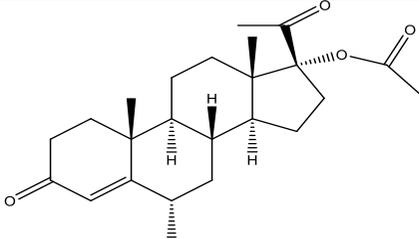
## APÊNDICE I

Descrição dos padrões analíticos utilizados contendo abreviatura, número CAS, fórmulas molecular e estrutural, massa molar e marca (continuação)

Composto	Abreviatura	Número CAS	Fórmula molecular	Fórmula estrutural	Massa molar (g mol <sup>-1</sup> )	Marca (Local)
17β-testosterona-d2	TES-d2	204244-83-7	C <sub>19</sub> H <sub>26</sub> D <sub>2</sub> O <sub>2</sub>		290,44	Cambridge Isotope Lab. (Massachusetts, EUA)
19-norprogesterona	NOP	472-54-8	C <sub>20</sub> H <sub>28</sub> O <sub>2</sub>		300,44	Sigma-Aldrich (Saint Louis, EUA)
3-hidróxiestanozolol glucuronídeo	STL3OHG	-	C <sub>27</sub> H <sub>40</sub> N <sub>2</sub> O <sub>8</sub>		520,61	Toronto Research Chemicals (North York, Canadá)

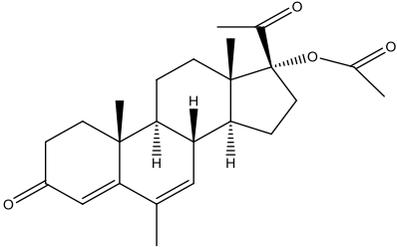
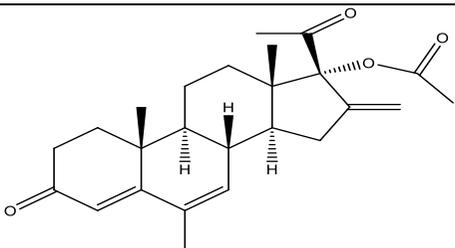
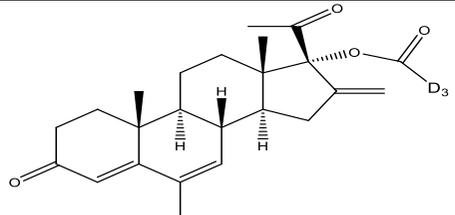
## APÊNDICE I

Descrição dos padrões analíticos utilizados contendo abreviatura, número CAS, fórmulas molecular e estrutural, massa molar e marca (continuação)

Composto	Abreviatura	Número CAS	Fórmula molecular	Fórmula estrutural	Massa molar (g mol <sup>-1</sup> )	Marca (Local)
4β-hidróxi-estanozolol	STL4OH	125636-92-2	C <sub>27</sub> H <sub>39</sub> N <sub>2</sub> NaO <sub>8</sub>		344,49	Toronto Research Chemicals (North York, Canadá)
Acetato de clormadinona	ACC	302-22-7	C <sub>23</sub> H <sub>29</sub> ClO <sub>4</sub>		404,93	LGC Standards (Augsburgo, Alemanha)
Acetato de medróxiprogesterona	ACM	71-58-9	C <sub>24</sub> H <sub>34</sub> O <sub>4</sub>		386,52	LGC Standards (Augsburgo, Alemanha)

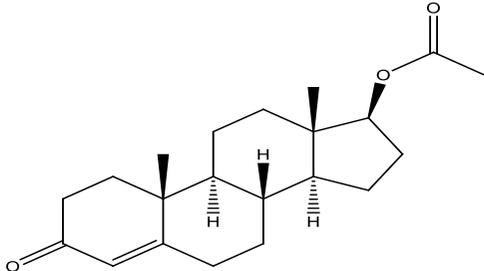
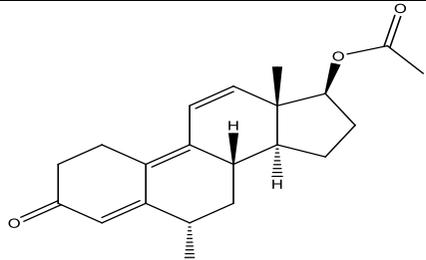
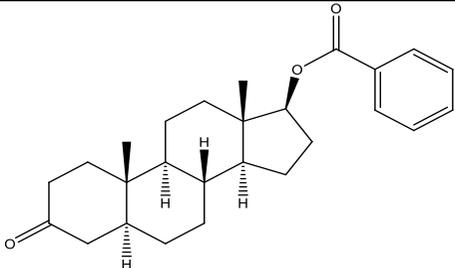
## APÊNDICE I

Descrição dos padrões analíticos utilizados contendo abreviatura, número CAS, fórmulas molecular e estrutural, massa molar e marca (continuação)

Composto	Abreviatura	Número CAS	Fórmula molecular	Fórmula estrutural	Massa molar (g mol <sup>-1</sup> )	Marca (Local)
Acetato de megestrol	AMG	3562-63-8	C <sub>24</sub> H <sub>32</sub> O <sub>4</sub>		384,51	EDQM - European Directorate for the Quality of Medicines (Estrasburgo, França)
Acetato de melengestrol	AME	2919-66-6	C <sub>25</sub> H <sub>32</sub> O <sub>4</sub>		396,53	Australian NMI (Canberra, Austrália)
Acetato de melengestrol-d3	AME-d3	-	C <sub>25</sub> H <sub>29</sub> O <sub>4</sub> D <sub>3</sub>		399,5192	RIVM (Bilthoven, Países Baixos)

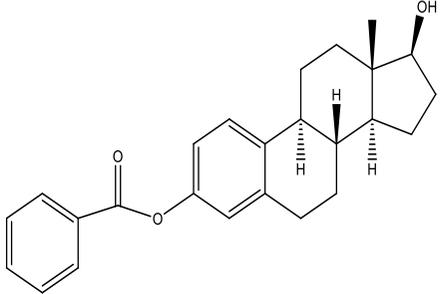
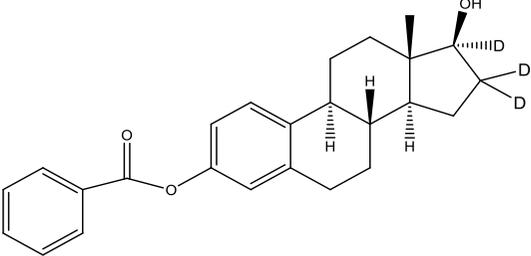
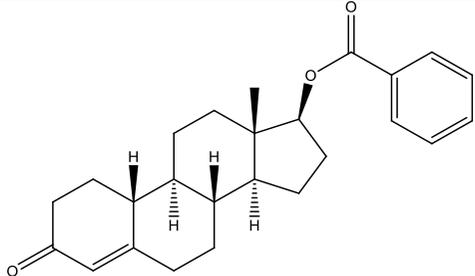
## APÊNDICE I

Descrição dos padrões analíticos utilizados contendo abreviatura, número CAS, fórmulas molecular e estrutural, massa molar e marca (continuação)

Composto	Abreviatura	Número CAS	Fórmula molecular	Fórmula estrutural	Massa molar (g mol <sup>-1</sup> )	Marca (Local)
Acetato de testosterona	ATE	1045-69-8	C <sub>21</sub> H <sub>30</sub> O <sub>3</sub>		330,46	LGC Standards (Augsburgo, Alemanha)
Acetato de trembolona	ATB	10161-34-9	C <sub>20</sub> H <sub>24</sub> O <sub>3</sub>		312,40	Australian NMI (Canberra, Austrália)
Benzoato de androstanolona	BAD	1057-07-4	C <sub>26</sub> H <sub>34</sub> O <sub>3</sub>		394,55	Dr Ehrenstorfer (Augsburgo, Alemanha)

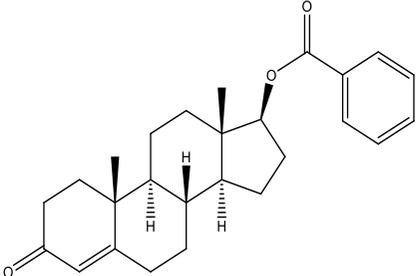
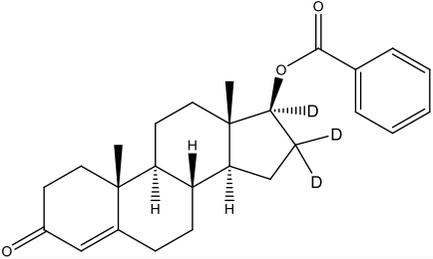
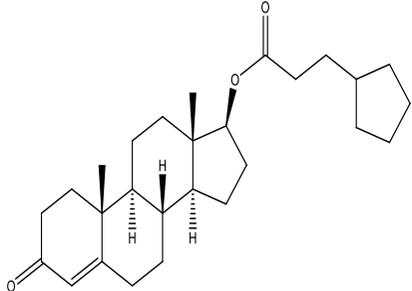
## APÊNDICE I

Descrição dos padrões analíticos utilizados contendo abreviatura, número CAS, fórmulas molecular e estrutural, massa molar e marca (continuação)

Composto	Abreviatura	Número CAS	Fórmula molecular	Fórmula estrutural	Massa molar (g mol <sup>-1</sup> )	Marca (Local)
Benzoato de estradiol	BET	50-50-0	C <sub>25</sub> H <sub>28</sub> O <sub>3</sub>		376.49	Dr. Ehrenstophher (Augsburg, Alemanha)
Benzoato de estradiol-d3	BET-d3	1192354-74-7	C <sub>25</sub> H <sub>25</sub> D <sub>3</sub> O <sub>3</sub>		379.51	CDN Isotopes (Quebec, Canadá)
Benzoato de nandrolona	BNA	1474-55-1	C <sub>25</sub> H <sub>30</sub> O <sub>3</sub>		378,50	CDN Isotopes (Quebec, Canadá)

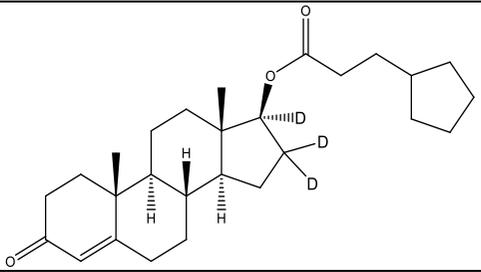
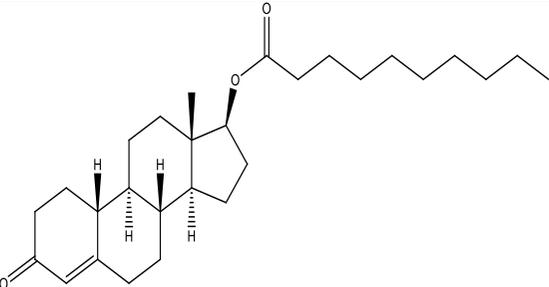
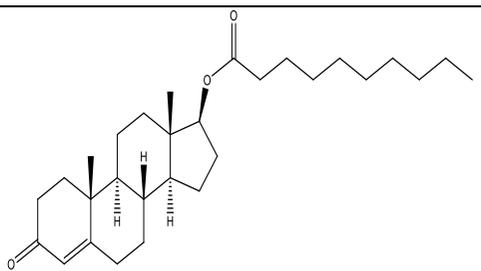
## APÊNDICE I

Descrição dos padrões analíticos utilizados contendo abreviatura, número CAS, fórmulas molecular e estrutural, massa molar e marca (continuação)

Composto	Abreviatura	Número CAS	Fórmula molecular	Fórmula estrutural	Massa molar (g mol <sup>-1</sup> )	Marca (Local)
Benzoato de testosterona	BZT	2088-71-3	C <sub>26</sub> H <sub>32</sub> O <sub>3</sub>		392,53	LGC Standards (Augsburgo, Alemanha)
Benzoato de testosterona-d3	BZT-d3	-	C <sub>26</sub> H <sub>29</sub> D <sub>3</sub> O <sub>3</sub>		395,53	RIVM National Institute for Public Health and the Environment (Bilthoven, Países Baixos)
Cipionato de testosterona	CPT	58-20-8	C <sub>27</sub> H <sub>40</sub> O <sub>3</sub>		412,60	LGC Standards (Augsburgo, Alemanha)

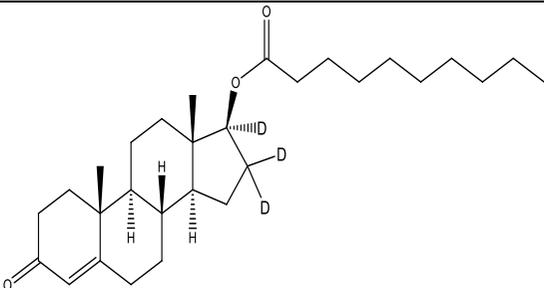
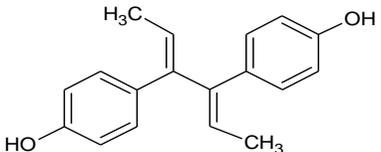
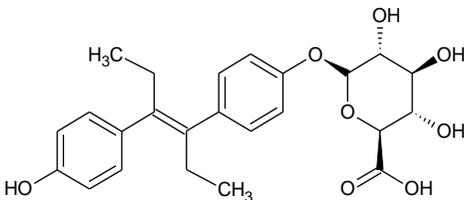
## APÊNDICE I

Descrição dos padrões analíticos utilizados contendo abreviatura, número CAS, fórmulas molecular e estrutural, massa molar e marca (continuação)

Composto	Abreviatura	Número CAS	Fórmula molecular	Fórmula estrutural	Massa molar (g mol <sup>-1</sup> )	Marca (Local)
Cipionato de testosterona-d3	CIP-d3	876054-56-7	C <sub>27</sub> H <sub>37</sub> D <sub>3</sub> O <sub>3</sub>			RIVM National Institute for Public Health and the Environment (Bilthoven, Países Baixos)
Decanoato de nandrolona	DEN	360-70-3	C <sub>28</sub> H <sub>44</sub> O <sub>3</sub>		428,65	LGC Standards (Augsburgo, Alemanha)
Decanoato de testosterona	DET	5721-91-5	C <sub>29</sub> H <sub>46</sub> O <sub>3</sub>		442,7	Dr Ehrenstorfer (Augsburgo, Alemanha)

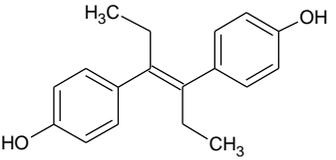
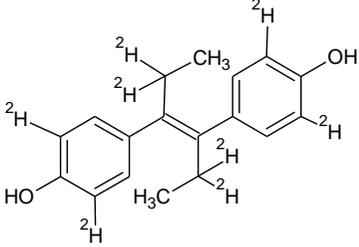
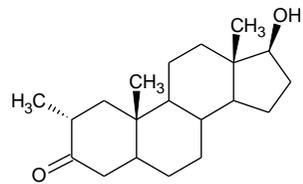
## APÊNDICE I

Descrição dos padrões analíticos utilizados contendo abreviatura, número CAS, fórmulas molecular e estrutural, massa molar e marca (continuação)

Composto	Abreviatura	Número CAS	Fórmula molecular	Fórmula estrutural	Massa molar (g mol <sup>-1</sup> )	Marca (Local)
Decanoato de testosterona-d3	DET-d3	1610974-51-0	C <sub>29</sub> H <sub>43</sub> D <sub>3</sub> O <sub>3</sub>		445,7	RIVM National Institute for Public Health and the Environment (Bilthoven, Países Baixos)
Dienestrol	DIE	84-17-3	C <sub>18</sub> H <sub>18</sub> O <sub>2</sub>		266,1307	Dr Ehrenstorfer (Augsburgo, Alemanha)
Dietilestilbestrol glucuronídeo	DESG	2408-40-4	C <sub>24</sub> H <sub>28</sub> O <sub>8</sub>		444,47	Toronto Research Chemicals (North York, Canadá)

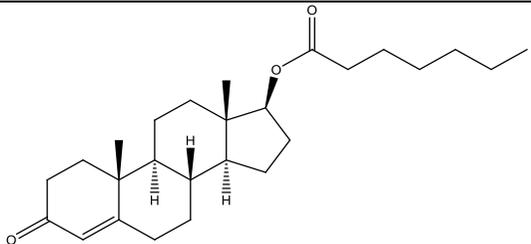
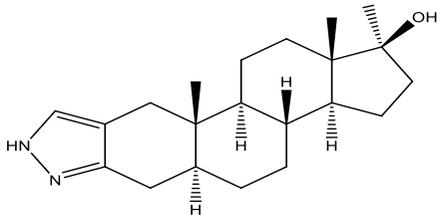
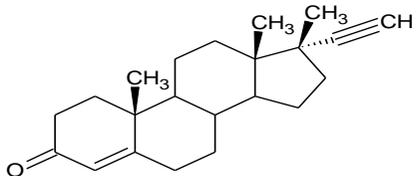
## APÊNDICE I

Descrição dos padrões analíticos utilizados contendo abreviatura, número CAS, fórmulas molecular e estrutural, massa molar e marca (continuação)

Composto	Abreviatura	Número CAS	Fórmula molecular	Fórmula estrutural	Massa molar (g mol <sup>-1</sup> )	Marca (Local)
Dietilestilbestrol trans	DES	56-53-1	C <sub>18</sub> H <sub>20</sub> O <sub>2</sub>		268,1463	Dr Ehrenstorfer (Augsburgo, Alemanha)
Dietilestilbestrol-d8	DES-d8	91318-10-4	C <sub>26</sub> H <sub>28</sub> D <sub>8</sub> O <sub>2</sub>		276,4	Cambridge Isotope Lab (Massachusetts, EUA)
Drostanolona (dromostanolona)	DRO	58-19-5	C <sub>20</sub> H <sub>33</sub> O <sub>2</sub>		304,2402	Australian NMI (Canberra, Austrália)

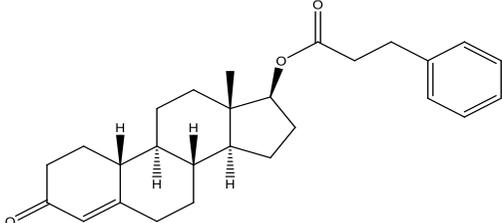
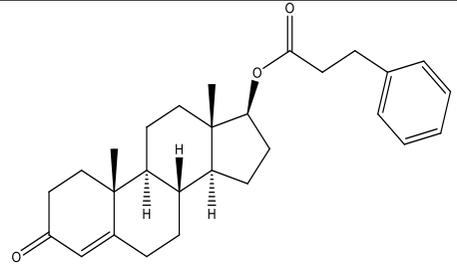
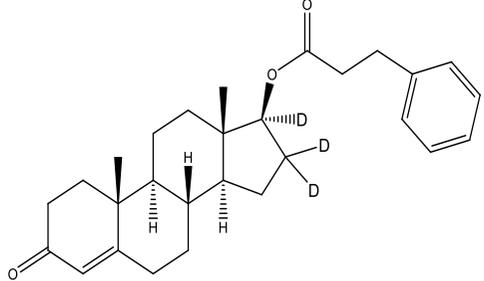
## APÊNDICE I

Descrição dos padrões analíticos utilizados contendo abreviatura, número CAS, fórmulas molecular e estrutural, massa molar e marca (continuação)

Composto	Abreviatura	Número CAS	Fórmula molecular	Fórmula estrutural	Massa molar (g mol <sup>-1</sup> )	Marca (Local)
Enantato de testosterona	ENT	315-37-7	C <sub>26</sub> H <sub>40</sub> O <sub>3</sub>		400,6	LGC Standards (Augsburgo, Alemanha)
Estanozolol	STL	10418-03-8	C <sub>21</sub> H <sub>32</sub> N <sub>2</sub> O		328,49	Toronto Research Chemicals (North York, Canadá)
Etisterona	ETN	434-03-7/ 17554-63-1 (isômero)	C <sub>21</sub> H <sub>28</sub> O <sub>2</sub>		312,2089	Dr Ehrenstorfer (Augsburgo, Alemanha)

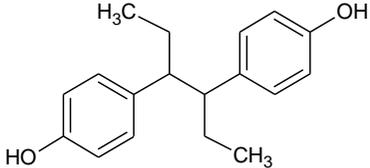
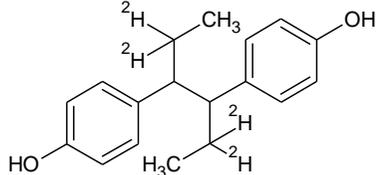
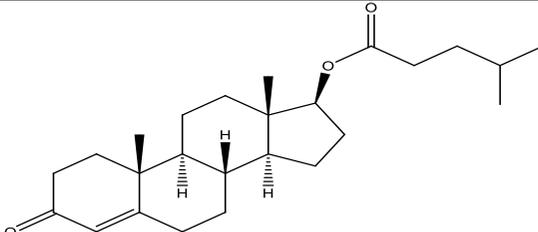
## APÊNDICE I

Descrição dos padrões analíticos utilizados contendo abreviatura, número CAS, fórmulas molecular e estrutural, massa molar e marca (continuação)

Composto	Abreviatura	Número CAS	Fórmula molecular	Fórmula estrutural	Massa molar (g mol <sup>-1</sup> )	Marca (Local)
Fenilpropionato de nandrolona	FPN	62-90-8	C <sub>27</sub> H <sub>34</sub> O <sub>3</sub>		406.56	Australian NMI (Canberra, Austrália)
Fenilpropionato de testosterona	FPT	1255-49-8	C <sub>28</sub> H <sub>36</sub> O <sub>3</sub>		420.58	RIVM National Institute for Public Health and the Environment (Bilthoven, Países Baixos)
Fenilpropionato de testosterona-d3	FPT-d3	87-6054-55-6	C <sub>28</sub> H <sub>33</sub> D <sub>3</sub> O <sub>3</sub>			RIVM National Institute for Public Health and the Environment (Bilthoven, Países Baixos)

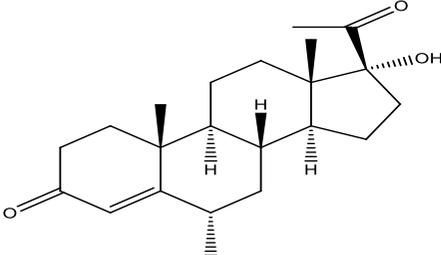
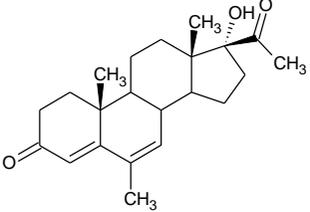
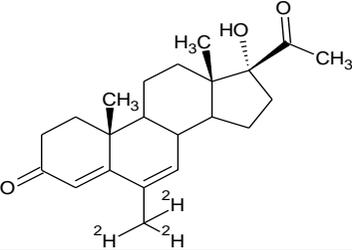
## APÊNDICE I

Descrição dos padrões analíticos utilizados contendo abreviatura, número CAS, fórmulas molecular e estrutural, massa molar e marca (continuação)

Composto	Abreviatura	Número CAS	Fórmula molecular	Fórmula estrutural	Massa molar (g mol <sup>-1</sup> )	Marca (Local)
Hexestrol	HEX	84-16-2	C <sub>18</sub> H <sub>22</sub> O <sub>2</sub>		270,1620	LGC Standards (Augsburgo, Alemanha)
Hexestrol-d4	HEX-d4	1189950-25-1	C <sub>18</sub> H <sub>18</sub> D <sub>4</sub> O <sub>2</sub>		270,3661	Toronto Research Chemicals (North York, Canadá)
Isocaproato de testosterona	IST	15262-86-9	C <sub>25</sub> H <sub>38</sub> O <sub>3</sub>		386,6	LGC Standards (Augsburgo, Alemanha)

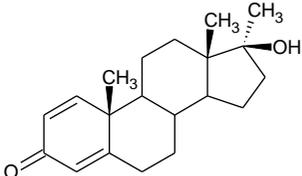
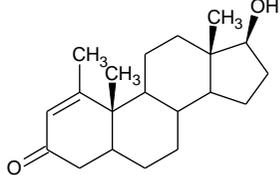
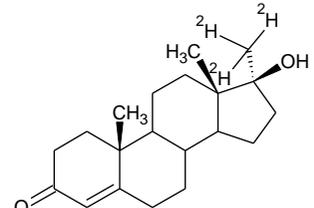
## APÊNDICE I

Descrição dos padrões analíticos utilizados contendo abreviatura, número CAS, fórmulas molecular e estrutural, massa molar e marca (continuação)

Composto	Abreviatura	Número CAS	Fórmula molecular	Fórmula estrutural	Massa molar (g mol <sup>-1</sup> )	Marca (Local)
Medróxiprogesterona	MPR	520-85-4	C <sub>22</sub> H <sub>32</sub> O <sub>3</sub>		344,49	LGC Standards (Augsburgo, Alemanha)
Megestrol	MEG	3562-63-8	C <sub>22</sub> H <sub>30</sub> O <sub>3</sub>		342,2195	Australian NMI (Canberra, Austrália)
Megestrol-d3	MEG-d3	162462-71-7	C <sub>22</sub> H <sub>27</sub> D <sub>3</sub> O <sub>3</sub>		345,49	RIVM National Institute for Public Health and the Environment (Bilthoven, Países Baixos)

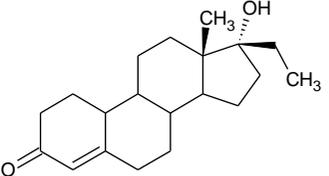
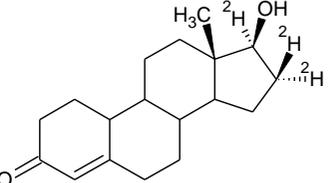
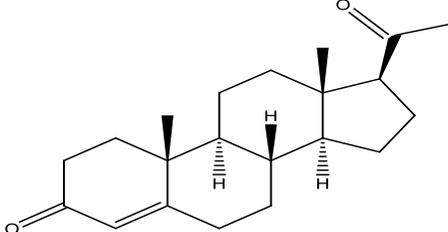
## APÊNDICE I

Descrição dos padrões analíticos utilizados contendo abreviatura, número CAS, fórmulas molecular e estrutural, massa molar e marca (continuação)

Composto	Abreviatura	Número CAS	Fórmula molecular	Fórmula estrutural	Massa molar (g mol <sup>-1</sup> )	Marca (Local)
Metandienona (Metandrostenolona ou dianabol)	MTD	72-63-9	C <sub>20</sub> H <sub>28</sub> O <sub>2</sub>		300,4351	LGC Standards (Augsburgo, Alemanha)
Metenolona	MTN	153-00-4	C <sub>20</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>		302,4510	Toronto Research Chemicals (North York, Canadá)
Metiltestosterona-d <sub>3</sub>	MTT-d3	NA	C <sub>20</sub> H <sub>27</sub> O <sub>2</sub> D <sub>3</sub>		305,47	RIVM National Institute for Public Health and the Environment (Bilthoven, Países Baixos)

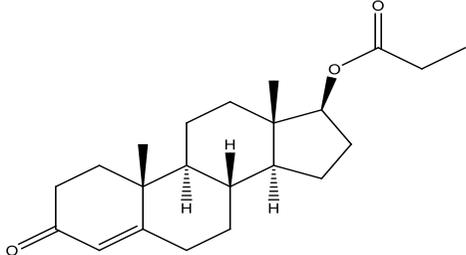
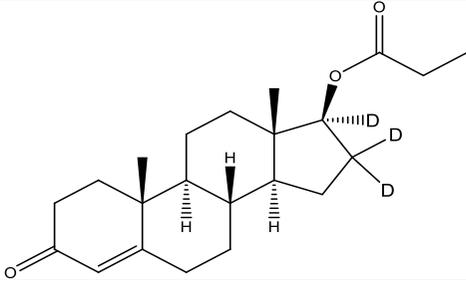
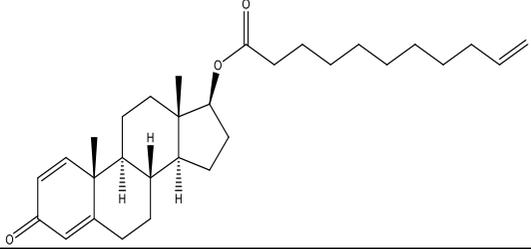
## APÊNDICE I

Descrição dos padrões analíticos utilizados contendo abreviatura, número CAS, fórmulas molecular e estrutural, massa molar e marca (continuação)

Composto	Abreviatura	Número CAS	Fórmula molecular	Fórmula estrutural	Massa molar (g mol <sup>-1</sup> )	Marca (Local)
Noretandrolona	NOT	52-78-8	C <sub>20</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>		302,4510	LGC Standards (Augsburgo, Alemanha)
Nortestosterona-d3	NOR-d3	NA	C <sub>18</sub> H <sub>23</sub> D <sub>3</sub> O <sub>2</sub>		277,42	Cambridge Isotope Lab (Massachusetts, EUA)
Progesterona	PRG	57-83-0	C <sub>21</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>		314,46	Cerilliant/Sigma-Aldrich (Saint Louis, EUA)

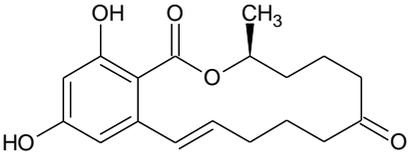
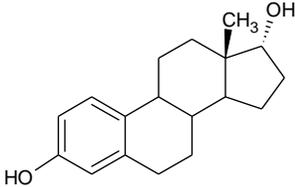
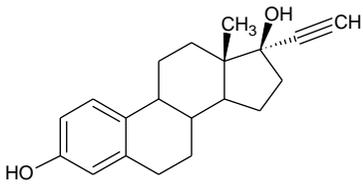
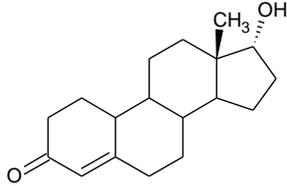
## APÊNDICE I

Descrição dos padrões analíticos utilizados contendo abreviatura, número CAS, fórmulas molecular e estrutural, massa molar e marca (continuação)

Composto	Abreviatura	Número CAS	Fórmula molecular	Fórmula estrutural	Massa molar (g mol <sup>-1</sup> )	Marca (Local)
Propionato de testosterona	PPT	57-85-2	C <sub>22</sub> H <sub>32</sub> O <sub>3</sub>		344,51	LGC Standards (Augsburgo, Alemanha)
Propionato de testosterona-d3		876054-54-5	C <sub>22</sub> H <sub>29</sub> D <sub>3</sub> O <sub>3</sub>		347,51	RIVM National Institute for Public Health and the Environment (Bilthoven, Países Baixos)
Undecilenato de boldenona	UNB	13103-34-9	C <sub>30</sub> H <sub>44</sub> O <sub>3</sub>		452,67	LGC Standards (Augsburgo, Alemanha)

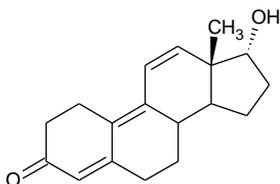
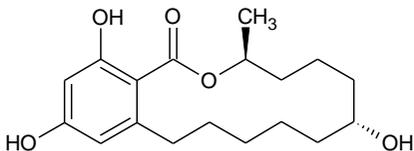
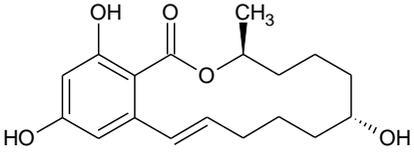
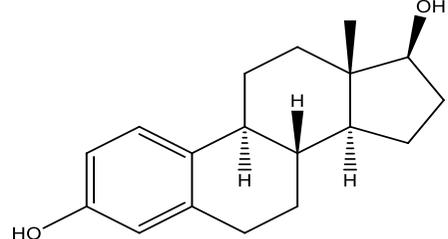
## APÊNDICE I

Descrição dos padrões analíticos utilizados contendo abreviatura, número CAS, fórmulas molecular e estrutural, massa molar e marca (continuação)

Composto	Abreviatura	Número CAS	Fórmula molecular	Fórmula estrutural	Massa molar (g mol <sup>-1</sup> )	Marca (Local)
Zearalenona	ZEA	18695-28-8	C <sub>18</sub> H <sub>22</sub> O <sub>5</sub>		318,1467	Australian NMI (Canberra, Austrália)
α-estradiol	αES	57-91-0	C <sub>18</sub> H <sub>24</sub> O <sub>2</sub>		272,1776	Sigma Aldrich (Saint Louis, EUA)
α-etinilestradiol	αEE	57-63-6	C <sub>20</sub> H <sub>24</sub> O <sub>2</sub>		296,1776	LGC Standards (Augsburgo, Alemanha)
α-Nandrolona	αNAN	4409-34-1	C <sub>18</sub> H <sub>26</sub> O <sub>2</sub>		274,1933	Australian NMI (Canberra, Austrália)

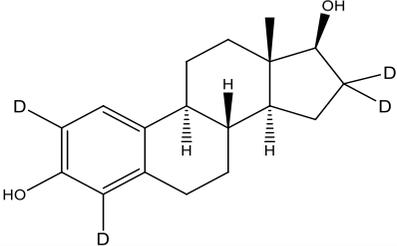
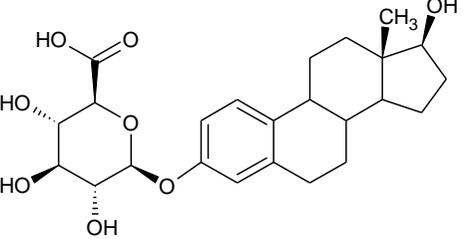
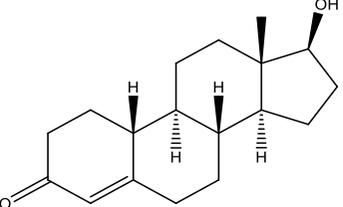
## APÊNDICE I

Descrição dos padrões analíticos utilizados contendo abreviatura, número CAS, fórmulas molecular e estrutural, massa molar e marca (continuação)

Composto	Abreviatura	Número CAS	Fórmula molecular	Fórmula estrutural	Massa molar (g mol <sup>-1</sup> )	Marca (Local)
$\alpha$ -trembolona	$\alpha$ TB	80657-17-6	C <sub>18</sub> H <sub>22</sub> O <sub>2</sub>		270,1620	Toronto Research Chemicals (North York, Canadá)
$\alpha$ -zearalanol (zeranol)	ZER	26538-44-3	C <sub>18</sub> H <sub>26</sub> O <sub>5</sub>		322,1780	Dr Ehrenstorfer (Augsburgo, Alemanha)
$\alpha$ -zearalenol	$\alpha$ ZE	36455-72-8	C <sub>18</sub> H <sub>24</sub> O <sub>5</sub>		320,1624	Australian NMI (Canberra, Austrália)
$\beta$ -estradiol	$\beta$ ES	50-28-2	C <sub>18</sub> H <sub>24</sub> O <sub>2</sub>		272,1776	Cambridge Isotope Lab (Massachusetts, EUA)

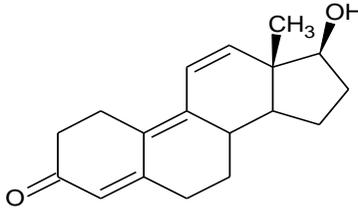
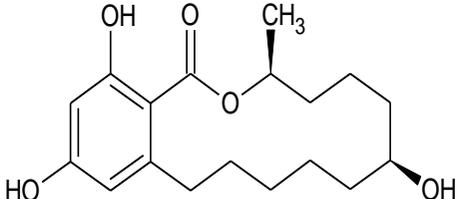
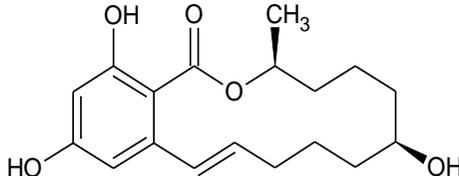
## APÊNDICE I

Descrição dos padrões analíticos utilizados contendo abreviatura, número CAS, fórmulas molecular e estrutural, massa molar e marca (continuação)

Composto	Abreviatura	Número CAS	Fórmula molecular	Fórmula estrutural	Massa molar (g mol <sup>-1</sup> )	Marca (Local)
β-estradiol-d4	βES-d4	66789-03-5	C <sub>18</sub> H <sub>20</sub> D <sub>4</sub> O <sub>2</sub>		276.41	TRC (North York, Canada)
β-estradiol glucuronídeo	βESG	14982-12-8	C <sub>24</sub> H <sub>31</sub> NaO <sub>8</sub>		470,49	Sigma (Saint Louis, EUA)
β-Nandrolona	βNAN	434-22-0	C <sub>18</sub> H <sub>26</sub> O <sub>2</sub>		274,1933	Dr Ehrenstorfer (Augsburgo, Alemanha)

## APÊNDICE I

Descrição dos padrões analíticos utilizados contendo abreviatura, número CAS, fórmulas molecular e estrutural, massa molar e marca (conclusão)

Composto	Abreviatura	Número CAS	Fórmula molecular	Fórmula estrutural	Massa molar (g mol <sup>-1</sup> )	Marca (Local)
β-trembolona	βTB	10161-33-8	C <sub>18</sub> H <sub>22</sub> O <sub>2</sub>		270,1620	Toronto Research Chemicals (North York, Canadá)
β-zearalanol (taleranol)	TAL	42422-68-4	C <sub>18</sub> H <sub>26</sub> O <sub>5</sub>		322,1780	Australian NMI (Canberra, Austrália)
β-zearalenol	βZE	71030-11-0	C <sub>18</sub> H <sub>24</sub> O <sub>5</sub>		320,1624	Australian NMI (Canberra, Austrália)

## APÊNDICE II

Transições monitoradas e condições do espectrômetro de massas API5000 para análise de anabolizantes em músculo bovino  
(continua)

<b>Analito</b>	<b>Q1</b>	<b>Q3</b>	<b>Intensidade relativa (%)</b>	<b>PD</b>	<b>EC</b>	<b>PSC</b>
17OMBO	301,3	121,2 <sup>1</sup>	-	90	36	6
		135,2	59,9	90	23	10
		149,3	11,6	90	25	10
		269,5	17	90	17	16
αBO	287,1	121,1 <sup>1</sup>	-	96	37	44
		135,1	19,0	96	37	44
		173,1	25,1	101	25	22
		147,0	-	101	29	10
ACC	405,3	309,4 <sup>1</sup>	-	111	23	18
		345,4	71,9	111	25	20
		301,4	98,8	111	31	16
ACM	387,2	327,4 <sup>1</sup>	-	110	23	26
		123,2	159,8	110	45	22
		285,4	24,4	110	27	20
αES	271,2	145,0 <sup>1</sup>	-	-120	-52	-7
		239,2	31,8	-105	-52	-7
		183,0	5,4	-230	-40	-12
AME	397,3	279,1	-	56	27	18
		337,3	78	56	30	18
		236,2	55	81	35	12
AME-d3	400,2	279,3 <sup>2</sup>	-	71	31	26
		337,4	-	100	31	26
AMG	385,4	267,2 <sup>1</sup>	-	81	27	14
		224,2	76,3	81	39	14
		325,3	91,4	81	23	24

## APÊNDICE II

Transições monitoradas e condições do espectrômetro de massas API5000 para análise de anabolizantes em músculo bovino  
(continuação)

<b>Analito</b>	<b>Q1</b>	<b>Q3</b>	<b>Intensidade relativa (%)</b>	<b>PD</b>	<b>EC</b>	<b>PSC</b>
$\alpha$ NAN	275,4	109,2 <sup>1</sup>	-	96	47	14
		239,1	26	106	23	16
$\alpha$ TB	271,2	253,2 <sup>1</sup>	-	100	39	30
		199,2	90,2	100	25	20
$\alpha$ TE	289,2	97,1 <sup>1</sup>	-	56	33	18
		109,1	91,2	56	35	10
ATR	313,4	253,4 <sup>1</sup>	-	100	31	16
		165,1	12	100	89	14
$\alpha$ ZE	319,0	275,0 <sup>1</sup>	-	-130	-28	-13
		160,0	50,5	-135	-48	-19
$\beta$ BO	287,0	121,0 <sup>1</sup>	-	96	37	44
		135,0	16,3	96	37	44
		173,0	27,5	101	25	22
		147,1	-	101	29	10
$\beta$ BO-d3	290,4	121,2 <sup>1</sup>	-	60	36	12
		138,3	-	60	25	20
$\beta$ ES	271,2	145,0 <sup>1</sup>	29,9	-130	-50	-19
		239,2	17,8	-90	-50	-19
		183,0	-	-230	-40	-12
$\beta$ NAN	275,4	109,0 <sup>1</sup>	22,6	81	47	28
		239,3	-	96	25	18
$\beta$ TB	271,2	199,2 <sup>1</sup>	34,7	101	37	24
		253,2	-	100	39	14
$\beta$ TE	289,2	97,1 <sup>1</sup>	78,8	91	37	14
		109,1	-	91	39	26

## APÊNDICE II

Transições monitoradas e condições do espectrômetro de massas API5000 para análise de anabolizantes em músculo bovino  
(continuação)

<b>Analito</b>	<b>Q1</b>	<b>Q3</b>	<b>Intensidade relativa (%)</b>	<b>PD</b>	<b>EC</b>	<b>PSC</b>
$\beta$ ZE	319,0	275,0 <sup>1</sup>	51,3	-130	-28	-13
		160,0	-	-130	-48	-19
CLD	363,3	309,4 <sup>1</sup>	32,9	91	23	18
		207,3	21,2	147	31	20
		301,2	-	147	31	20
DES	267,4	222,1 <sup>1</sup>	83,0	-105	-44	-7
		237,4	-	-105	-44	-9
DES-d8	275,4	245,3 <sup>2</sup>	-	-90	-42	-13
		259,4	-	-55	-42	-11
DIE	265,2	93,1 <sup>1</sup>	-	-105	-38	-13
		249,0	18,6	-120	-36	-23
		117,0	13,8	-135	-44	-17
DRO	305,0	269,0 <sup>1</sup>	-	40	19	24
		119,0	68,5	40	47	8
		215,0	70,4	146	31	34
$\beta$ ES-d4	275,2	146,9 <sup>2</sup>	-	18	-56	-13
		187,1	-	18	-56	-13
ETE	295,3	145,0 <sup>1</sup>	-	-205	-44	-7
		159,0	57,7	-35	-50	-45
ETN	313,3	109,2 <sup>1</sup>	-	100	37	8
		97,1	112,3	100	35	8
HEX	269,0	119,1 <sup>1</sup>	-	-105	-52	-5
		134,0	64,6	-105	-22	-15
HEX-d4	273,1	121,3 <sup>2</sup>	-	-60	-56	-7

## APÊNDICE II

Transições monitoradas e condições do espectrômetro de massas API5000 para análise de anabolizantes em músculo bovino  
(continuação)

<b>Analito</b>	<b>Q1</b>	<b>Q3</b>	<b>Intensidade relativa (%)</b>	<b>PD</b>	<b>EC</b>	<b>PSC</b>
MEG	343,3	187,0 <sup>1</sup>	-	100	29	22
		267,0	84,1	106	29	22
		325,0	75,9	101	29	22
MEG-d3	346,5	270,2 <sup>1</sup>	-	136	31	26
		190,3	-	136	37	12
MPR	345,3	123,0 <sup>1</sup>	-	76	37	18
		97,1	46,1	76	39	16
MTD	301,2	121,2 <sup>1</sup>	-	70	33	15
		149,4	46,8	70	21	15
MTN	303,3	83,1 <sup>1</sup>	-	86	31	14
		187,2	22,2	86	33	12
		205,5	5,8	86	25	12
MTT	303,5	97,2 <sup>1</sup>	-	25	53	16
		109,1	164,4	96	33	16
MTT-d3	306,3	97,0 <sup>2</sup>	-	111	39	20
		109,2	-	111	39	20
NOP	301,4	109,0 <sup>1</sup>	-	100	37	18
		265,3	17	101	25	26
		241,2	12,5	101	25	16
NOR-d3	278,5	109,1 <sup>2</sup>	-	85	36	18
		260,4	-	85	23	18
NOT	303,3	109,1 <sup>1</sup>	-	106	37	14
		231,5	18,2	106	29	18
		285,3	52,7	106	27	18
PRG	315,3	97,1 <sup>1</sup>	-	76	53	14
		109,1	100,5	81	53	14

## APÊNDICE II

Transições monitoradas e condições do espectrômetro de massas API5000 para análise de anabolizantes em músculo bovino (conclusão)

<b>Analito</b>	<b>Q1</b>	<b>Q3</b>	<b>Intensidade relativa (%)</b>	<b>PD</b>	<b>EC</b>	<b>PSC</b>
STL	329,5	81,0 <sup>1</sup>	-	36	57	32
		95,1	31,2	80	57	34
		107,3	29,5	91	53	14
		121,2	31,1	26	53	12
STL16OH	345,4	81,0 <sup>1</sup>	-	90	73	34
		95,0	46,7	90	69	16
		105,0	16,2	90	70	14
STL4OH	345,3	309,5 <sup>1</sup>	-	68	21	18
		327,5	81,7	68	25	18
		145,3	121,3	68	45	18
TAL	321,1	277,0 <sup>1</sup>	-	-125	-34	-29
		303,3	46,14	-130	-28	-5
		293,2	8,4	-130	-36	-9
TES-d2	291,3	99,0 <sup>2</sup>	-	106	45	20
		111,2	-	76	45	20
ZEA	317,0	175,0 <sup>1</sup>	-	-230	-40	-12
		273,0	250,7	-145	-26	-43
ZER	321,1	277,0 <sup>1</sup>	-	-125	-34	-29
		303,3	48,3	-130	-28	-5
		293,2	9,5	-130	-36	-9

Q1: íon precursor; Q3: íon produto; PD: potencial de declusterização, EC: energia de colisão; PSC: potencial de saída da célula de colisão; <sup>1</sup> Transição usada para quantificação; <sup>2</sup> Transição usada para padrão interno na razão de áreas

### APÊNDICE III

Transições monitoradas e condições do espectrômetro de massas API5000 para análise de anabolizantes em pelo bovino

(continua)

<b>Analito</b>	<b>Q1</b>	<b>Q3</b>	<b>Intensidade relativa (%)</b>	<b>PD</b>	<b>EC</b>	<b>PSC</b>
ACC	434,3	374,0 <sup>1</sup>	-	112	39	23
		300,3	47,2			
		175,0	29,3			
ACM	416,2	152,2 <sup>1</sup>	-	125	53	24
		126,2	59,9		52	23
		356	40,7		37	41
AME	426,3	292,3 <sup>1</sup>	-	114	39	46
		320,4	31,6		37	30
		235,0	20,1		52	30
AME-d3	429,3	320,4 <sup>2</sup>	-	114	39	25
AMG	414,4	354,2 <sup>1</sup>	-	120	34	41
		280,3	52,9		38	37
		265,3	30,9		40	33
ATE	360,2	126,2 <sup>1</sup>	-	110	44	19
		138,2	122,3		52	
		152,0	13,7			
ATR	342,4	251,4 <sup>1</sup>	-	140	32	28
		236,4	22,0		45	26
		197,0	6,4		41	
BAD	424,4	105,0 <sup>1</sup>	-	125	54	17
		77,0	57,6		105	12
		96,1	22,0		50	17
βBO-d3	319,1	120,1 <sup>2</sup>	-	100	30	18
BET	377,2	105,0 <sup>1</sup>	-	76	33	12
		95,1	23,5		70	
BET-d3	380,4	105 <sup>2</sup>	-	100	30	18
BNA	408,3	105,0 <sup>1</sup>	-	110	53	16
		77,0	76,9		105	15
		138,1	22,6		48	21
BZT	422,2	126,1 <sup>1</sup>	-	120	45	16
		105,0	83,4		53	
		138,4	68,3		50	
BZT-d3	425,3	126,1 <sup>2</sup>	-	142	47	20
CPB	440,3	79,0 <sup>1</sup>	-	108	67	14
		107,1	56,9		41	
CPT-d3	445,5	126,1 <sup>2</sup>	-	105	50	20
DEN	458,4	138,1 <sup>1</sup>	-	89	51	24
		79,2	57,8		75	13
		107,1	23,9		49	18

### APÊNDICE III

Transições monitoradas e condições do espectrômetro de massas API5000 para análise de anabolizantes em pelo bovino (conclusão)

Analito	Q1	Q3	Intensidade relativa (%)	PD	EC	PSC
DET	472,3	126,1 <sup>1</sup>	-	58	50	22
		138,1	89,6		54	
		152,1	13,2		50	
DET-d3	475,6	126,2	-	95	54	22
DRO	334,3	288,2 <sup>1</sup>	-	110	38	18
		93,1	98,2		40	
ENT	430,1	126,1 <sup>1</sup>	-	140	49	20
		138,1	97,3		49	
		152,2	13,2		55	
ETN	342,1	138,2 <sup>1</sup>	-	110	39	18
		126,0	79,4		36	
FPN	436,3	105,0 <sup>1</sup>	-	130	57	16
		138,1	30,6		50	
		91,2	52,3		80	
FPT	450,0	126,0 <sup>1</sup>	-	140	48	19
		138,0	100,2		50	
		105,3	74,1		60	
FPT-d3	453,4	126,1 <sup>2</sup>	-	105	49	21
IST	416,3	152,2 <sup>1</sup>	-	140	55	22
		126,3	11,7		47	
MTD	330,2	120,1 <sup>1</sup>	-	95	30	18
		150,1	179,2			
MTN	332,3	187,1 <sup>1</sup>	-	100	37	17
		107,5	35,6		40	
MTT	332,4	126,3 <sup>1</sup>	-	100	36	18
		138,3	143,4		38	
MTT-d3	335,4	138,3 <sup>2</sup>	-	100	39	18
NOT	332,1	112,1 <sup>1</sup>	-	100	38	16
		138,2	79,0		32	
PPT	374,2	126,2 <sup>1</sup>	-	70	43	18
		138,3	107,5		45	
		152,2	15,7		48	
PPT-d3	377,4	126,2 <sup>2</sup>	-	110	45	20
UNB	482,3	120,1 <sup>1</sup>	-	65	49	17
		150,0	49,0		44	
		133,2	14,9		32	

Q1: íon precursor; Q3: íon produto; PD: potencial de declusterização, EC: energia de colisão; PSC: potencial de saída da célula de colisão; <sup>1</sup> Transição usada para quantificação; <sup>2</sup> Transição usada para padrão interno na razão de áreas.

## APÊNDICE IV

Transições monitoradas e condições do espectrômetro de massas API5000 para análise de anabolizantes em soro bovino

(continua)

Analito	Q1	Q3	Intensidade relativa (%)	Tempo (ms)	PD	EC
ACC	434,3	374,0 <sup>1</sup>	-	112	39	23
		300,3	72,2			
		175,0	39,5			
ACM	416,2	152,2 <sup>1</sup>	-	125	53	24
		126,2	72,7		52	23
		356	37,0		37	41
AME	426,3	292,3 <sup>1</sup>	-	114	39	46
		320,4	37,6		37	30
		235,0	21,4		52	30
AME-d3	429,3	320,4 <sup>2</sup>	-	114	39	25
AMG	414,4	354,2 <sup>1</sup>	-	120	34	41
		280,3	55,6		38	37
		265,3	31,4		40	33
ATE	360,2	126,2 <sup>1</sup>	-	110	44	19
		138,2	123,6		44	
		152,0	16,7		52	
ATR	342,4	251,4 <sup>1</sup>	-	140	32	28
		236,4	25,4		45	26
		197,0	8,2		41	26
BAD	424,4	105,0 <sup>1</sup>	-	125	54	17
		77,0	32,4		105	12
		96,1	21,4		50	17
βBO	316,1	120,1 <sup>1</sup>	-	100	30	18
		121,0	48,5		52	23
		150,0	36,1		37	41
βBO-d3	319,1	120,1 <sup>2</sup>	-	100	30	18
BET	377,2	105,0 <sup>1</sup>	-	76	33	12
		95,1	26,8		70	
BET-d3	380,4	105 <sup>2</sup>	-	100	30	18
BNA	408,3	105,0 <sup>1</sup>	-	110	53	16
		77,0	41,5		105	15
		138,1	22,5		48	21
βTB	300,2	269,2 <sup>1</sup>	-	90	31	18
		251,2	75,4		34	
βTE	318,1	126,1 <sup>1</sup>	-	100	37	12
		138,1	93,3		35	
BZT	422,2	126,1 <sup>1</sup>	-	120	45	16
		105,0	75,4		53	
		138,4	52,6		50	
BZT-d3	425,3	126,1 <sup>2</sup>	-	142	47	20

## APÊNDICE IV

Transições monitoradas e condições do espectrômetro de massas API5000 para análise de anabolizantes em soro bovino

(continuação)

Analito	Q1	Q3	Intensidade relativa (%)	Tempo (ms)	PD	EC
CNA	428,4	79,0 <sup>1</sup>	-	100	64	16
		138,1	42,8		53	24
		107,3	45,5		50	18
CPB	440,3	120,0 <sup>1</sup>	-	108	41	18
		107,1	81,1		41	18
		150,0	60,1		67	14
CPT-d3	445,5	126,1 <sup>2</sup>	-	105	50	20
DEN	458,4	138,1 <sup>1</sup>	-	89	51	24
		79,2	58,2		75	13
		107,1	22,9		49	18
DET	472,3	126,1 <sup>1</sup>	-	58	50	22
		138,1	92,9		54	
		152,1	11,0		50	
FPT-d3	453,4	126,1 <sup>2</sup>	-	105	49	21
DRO	334,3	288,2 <sup>1</sup>	-	110	38	18
		93,1	151,1		40	
ENT	430,1	126,1 <sup>1</sup>	-	140	49	20
		138,1	110,5		49	
		152,2	12,8		55	
ETN	342,1	138,2 <sup>1</sup>	-	110	39	18
		126,0	91,8	110	36	
FPN	436,3	105,0 <sup>1</sup>	-	130	57	16
		138,1	30,5		50	22
		91,2	41,1		80	14
FPT	450,0	126,0 <sup>1</sup>	-	140	48	19
		138,0	82,3		50	
		105,3	57,3		60	
FPT-d3	453,4	126,1 <sup>2</sup>	-	105	49	21
IST	416,3	152,2 <sup>1</sup>	-	140	55	22
		126,3	11,6		47	
MTD	330,2	120,1 <sup>1</sup>	-	95	30	18
		150,1	51,7			
MTN	332,3	187,1 <sup>1</sup>	-	100	37	17
		107,5	46,4		40	
MTT	332,4	126,3 <sup>1</sup>	-	100	36	18
		138,3	85,0		38	
MTT-d3	335,4	138,3 <sup>2</sup>	-	100	39	18
NOT	332,1	112,1 <sup>1</sup>	-	100	38	16
		138,2	77,0		32	

## APÊNDICE IV

Transições monitoradas e condições do espectrômetro de massas API5000 para análise de anabolizantes em soro bovino

(conclusão)

<b>Analito</b>	<b>Q1</b>	<b>Q3</b>	<b>Intensidade relativa (%)</b>	<b>Tempo (ms)</b>	<b>PD</b>	<b>EC</b>
PPT	374,2	126,2 <sup>1</sup>	-	70	43	18
		138,3	111,3		45	
		152,2	14,2		48	
PPT-d3	377,4	126,2 <sup>2</sup>	-	110	45	20
UNB	482,3	120,1 <sup>1</sup>	-	65	49	17
		150,0	47,4		44	37
		133,2	14,3		32	33

Q1: íon precursor; Q3: íon produto; PD: potencial de declusterização, EC: energia de colisão; PSC: potencial de saída da célula de colisão; <sup>1</sup> Transição usada para quantificação; <sup>2</sup> Transição usada para padrão interno na razão de áreas.