

Análise de Esteróides Endógenos por CG/C/EMRI nos XV Jogos Pan-Americanos de 2007

Renata Pascoal Illanes^{1*} (PG), Telma Fagundes Fernandes¹ (PG), Giselle de Carvalho Oliveira¹ (TC), Raphael Luiz Santos Prazeres¹ (TC), Débora de Almeida Azevedo¹ (PQ), Henrique Marcelo Gualberto Pereira¹ (PQ), Rodrigo Aguilera² (PQ), Francisco Radler de A. Neto¹ (PQ) [*renataillanes@iq.ufrj.br](mailto:renataillanes@iq.ufrj.br)

¹LAB DOP-LADETEC, Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Ilha do Fundão, CT, Bloco A, CEP 21949-900, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

²Team Leader Support Proteomics & Clinical/Toxicology, Applied Biosystems, 25 Avenue de la Baltique, 91943, Courtaboeuf, France.

Palavras Chave: Controle de dopagem, esteróides endógenos, CG/C/EMRI.

Introdução

Com o objetivo de confirmar o uso de testosterona ou seus precursores nos XV Jogos Pan-Americanos do Rio de Janeiro, foi desenvolvido no Laboratório de Controle de Dopagem do Rio de Janeiro um protocolo para análise de esteróides endógenos por cromatografia gasosa acoplada a forno de combustão acoplado a espectrômetro de massas por razão isotópica (CG/C/EMRI). O método empregado foi adaptado do publicado por Maître *et al.* (2004) e possibilita determinar o valor de $d^{13}C$ (‰) dos metabólitos da testosterona: etiolanolona, androsterona, 5β -androstenodiol, 5α -androstenodiol e pregnanodiol (referência endógena). Resumidamente, após a etapa de hidrólise enzimática, 10 mL de urina foram tratados por extração com fase sólida com cartucho C₁₈ (500 mg). Após evaporação do eluato, o resíduo foi acetilado com 50 µL de piridina e 50 µL de anidrido acético a 60 °C por 1 hora. Os esteróides foram fracionados em um segundo cartucho C₁₈, sendo obtidas três frações de diferentes polaridades, das quais duas continham os esteróides de interesse: fração 2 (etiolanolona e androsterona) e fração 3 (5β -androstenodiol, 5α -androstenodiol e pregnanodiol). Estas foram submetidas à análise por CG/C/EMRI em um equipamento Thermo-Finnigan Delta-Plus (coluna capilar com 30 m x 0,25 µm x 0,25 mm, 50 % fenil – 50 % metilsiloxano). A estabilidade e a reprodutibilidade das medidas foram avaliadas pela determinação do valor de $d^{13}C$ ($d^{13}C$ (‰) = $(R_{amostra} - R_{ref})/R_{ref}$, onde $R = {}^{13}C/{}^{12}C$) do padrão de calibração n-heneicosano, o qual apresentou um valor médio de -30,09‰ com desvio padrão de -0,51‰. A fim de avaliar a conformidade do instrumento, o padrão de alcanos foi injetado diariamente, em triplicata, antes de cada lote analítico, sendo este analisado apenas após os resultados apresentarem-se entre $\pm 2 \times SD$ em relação à série histórica. Durante a interpretação dos resultados, os controles positivos e negativos referentes a cada lote analítico foram comparados com série histórica pré-estabelecida, devendo estar entre $\pm 2 \times SD$ para que o lote fosse considerado válido.

Resultados e Discussão

A seleção das amostras para confirmação por CG/C/EMRI foi baseada no documento técnico da Agência Mundial Antidopagem (WADA Technical Document – TD2004EAAS). No total, 57 amostras foram processadas, sendo apenas 1 resultado analítico adverso (RAA) confirmado. Os dados referentes à triagem apresentaram o valor da razão testosterona/ epitestosterona (T/Epit) igual a 4,6.

31ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química

Todos os outros parâmetros de avaliação do perfil endógeno apresentaram-se dentro dos intervalos típicos. Os valores de $d^{13}C$ (‰) encontrados para os endógenos estão apresentados na tabela 1.

Tabela 1. Valores de $d^{13}C$ (‰) da amostra suspeita.

Esteróides endógenos	$d^{13}C$ (‰)*
Androsterona	-25,45‰
Etiocolanolona	-24,90 ‰
5β -androstenodiol	-25,51‰
5α -androstenodiol	-31,42‰
Pregnanodiol	-22,25 ‰

* Valores para esteróides acetilados.

O diagnóstico de abuso de testosterona ou precursores foi baseado no valor de $d^{13}C$ (‰) encontrado para o 5α -androstenodiol. Tal resultado baseou-se no critério pré-estabelecido para geração de RAA em razão isotópica: diferença entre $\delta^{13}C$ ‰ (metabólito) - $\delta^{13}C$ ‰ (referência endógena) superior a 3. No caso a diferença encontrada foi de 9,1 ‰, sendo o resultado relatado à autoridade de dopagem dos XV Jogos Pan-americanos.

Conclusões

Embora o caso pudesse ser considerado como limite por estar baseado no valor de $d^{13}C$ (‰) de apenas um metabólito, não houve solicitação de contra-prova ou qualquer contestação sobre o resultado. O RAA resultou na retirada da medalha de bronze e do diploma de premiação de um atleta de levantamento de peso brasileiro, comprovando a eficiência da técnica CG/C/EMRI na confirmação do abuso de esteróides anabolizantes no esporte.

Agradecimentos

CNPq, FAPERJ, FUJB e Ministério dos Esportes.

¹ Maître, A.; Saudan, C.; Mangin, P.; Saugy, M., *J. Anal.Toxicol.* **2004**, 28, 426.