

## 7. FASE 2 DA PESQUISA: DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA DETERMINAÇÃO DA SUBSTÂNCIA DOPANTE CAFEÍNA

Esta fase da pesquisa visa disponibilizar para o Laboratório Antidoping do Jockey Club Brasileiro um método analítico confiável capaz de detectar a presença da substância dopante cafeína em matrizes biológicas de cavalos de corrida, provada ser a substância proibida mais freqüente na atividade turfística brasileira.

O acelerado processo de inovação tecnológica que induz a uma constante atualização e sofisticação da instrumentação laboratorial, em particular da instrumentação analítica, impõe a necessidade de uma permanente atualização de técnicas e métodos. Considerando que o desenvolvimento tecnológico tem superado o desenvolvimento dos recursos humanos, as técnicas ficam obsoletas ou desatualizadas com freqüência, requerendo modificações e validações freqüentes.

No caso dos laboratórios *antidoping* a situação é ainda mais crítica pelo fato de esses laboratórios existirem em números reduzidos, sendo poucos aqueles que logram o reconhecimento internacional da sua competência técnica pela conquista de um credenciamento formal, daí a imperiosa necessidade de acordos de cooperação técnico-científica. O presente bloco descreve essa situação, evidenciando uma técnica desenvolvida em laboratório de renome internacional na França permitindo o desenvolvimento de um método modificado de grande interesse às necessidades do Laboratório Antidoping do Jockey Club Brasileiro, desenvolvimento que motivou a presente pesquisa de mestrado.

### 7.1. Caracterização sucinta do *Methodo ALCALINS SUR C18*

O método fonte para fundamentação do método alternativo proposto foi desenvolvido no *Laboratoire LAB - Controle Antidopage* (França), documentado internamente num Procedimento de Operação Padrão, e aplica-se à detecção de substâncias alcalinas excretadas na forma livre na matriz biológica de cavalos de corrida. O método analisa qualitativamente substâncias dopantes em fluidos

biológicos e estrutura-se em duas etapas, a primeira sendo a extração das amostras em meio alcalino e a segunda a análise do extrato obtido por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas. A etapa de extração, por sua vez, é realizada em duas fases, a preparação e ajuste do valor do pH da amostra de fluido biológico e a extração das substâncias pela técnica de extração por fase sólida. Para o processamento do método também são utilizados soluções analíticas, vidrarias específicas, reagentes e solventes químicos, substâncias-padrão e equipamentos automatizados, especificados no Procedimento de Operação Padrão.

Caracterização do método fonte:

**(i) – Extração das amostras de fluidos biológicos:**

(a) Preparação e ajuste do pH das amostras – As amostras de fluidos biológicos (8 mL), inseridas em béqueres, são preparadas para a análise. Após adição de 4mL de água ultra-pura<sup>19</sup> e 100 µL da solução de padrão interno, as amostras são submetidas a reação de hidrólise após adição de 500 mg de sulfato de amônio por um período de 10 min. O valor do pH das amostras é ajustado na faixa de 9,4 a 9,8 pela adição de solução de amoníaco 10%. As amostras são centrifugadas por 35 min, a 4000 rpm.

(b) Extração por fase sólida – Após condicionar os cartuchos do tipo C18HF com 2 mL de metanol e 2 mL de água ultra-pura, estes são carregados com 9 mL de amostra. Em seguida, os cartuchos são lavados com 3 mL de água ultra-pura e secos por um período de 3 min, lavados com 6 mL de hexano e novamente secos por 2 min. A eluição dos extratos é feita com 3 mL de clorofórmio. Os extratos são recolhidos e evaporados em concentrador à 60 +/- 10 °C. Os resíduos obtidos da evaporação são retomados com 400 µL de diclorometano e transferidos para frascos de amostras do tipo *vial*. Os extratos são evaporados à temperatura ambiente e os resíduos resultantes ressuspensos com 50 µL de acetato de etila.

---

<sup>19</sup> Água produzida pelo sistema de purificação Milli-Q (MILLIPORE Corporation, USA).

**(ii) – Análise por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas:**

Concluída a etapa de extração das amostras, seus extratos são submetidos a uma análise cromatográfica. A coluna cromatográfica é do tipo capilar (0,20 mm de diâmetro interno) com as seguintes especificações: fase estacionária de 5% fenilmetilpolisiloxano, 25 m de comprimento, e 0,33 µm de espessura de filme. O método é aplicado com os parâmetros instrumentais: as temperaturas do injetor e da interface são fixadas em 280 °C e 295 °C, respectivamente. Os modos de operação do forno são programados para as seguintes condições: temperatura inicial 60 °C; taxas de programação: 22°C/min até 200°C; 10°C/min até 270 °C e 30°C/min até 305 °C por 6 min. As injeções são feitas no modo sem divisão de fluxo “*Splitless*” utilizando-se Hélio como gás de arraste. O volume de injeção da amostra é de 1 µL. As análises são realizadas no modo de impacto de elétrons (IE), com energia de ionização de 70 eV. A faixa de varredura (modo: “scan”) é de (40 a 550) u (unidade de massa atômica)<sup>20</sup>.

Não obstante as evidências de robustez do método utilizado no laboratório francês que o desenvolveu, provou-se necessário adaptá-lo às condições laboratoriais do LAD/JCB tendo em vista principalmente (i) substancial diferença de instrumentação periférica (sistema automático de extração por fase sólida) e (ii) diferenças de práticas da rotina laboratorial interna. Considerando as possibilidades de introdução de melhorias no método para atender especificidades do LAD/JCB, optou-se por desenvolver um método alternativo baseado no *Method Alcalins Sur C18*, notadamente, para reduzir o volume da amostra de matriz biológica; sua diluição e o tempo de centrifugação, desenvolvimento esse que motivou a presente dissertação de mestrado. O item a seguir descreve as características básicas do método alternativo proposto, denominado ALCAC-18. O processo de validação do ALCAC-18, objeto do estudo e caracterizado nos capítulos subseqüentes, referem-se à validação do referido método modificado, essência da contribuição desta pesquisa de mestrado.

## 7.2. Formulação do Método ALCAC-18

O método ALCAC-18 assim denominado pelo LAD/JCB (modificado a partir do Método francês *Alcalins Sur C18*) fundamenta-se na detecção de substâncias alcalinas excretadas na forma livre nos fluídos biológicos de cavalos de corrida utilizando duas etapas: (i) extração das amostras em meio alcalino e (ii) análise do extrato obtido por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas. A adequação do método foi realizada, principalmente na etapa de extração por fase sólida, substituindo a instrumentação automatizada de extração pela técnica clássica que adota um sistema de cuba a vácuo e que é amplamente utilizado em laboratórios de controle de dopagem.

Na adequação proposta do método modificado, as alterações no volume de amostra de fluido biológico empregado na extração, o processo de diluição e centrifugação das amostras representam simplificação e redução de tempo de análise. A diminuição do volume de amostra possibilitou (i) redução de substâncias interferentes e (ii) aproveitamento de todo volume da amostra, na etapa de extração, uma vez que, o volume de água utilizado para a sua diluição também foi reduzido. No próximo bloco são descritos os desenvolvimentos que viabilizaram a adequação proposta e a especialização do método alternativo (ALCAC-18) validando-o para a detecção da substância dopante cafeína, identificada como a mais freqüente substância proibida detectada em amostras coletadas de cavalos de corrida que participam de torneios no Jockey Club Brasileiro.

## 7.3. Aplicação do Método ALCAC-18 para determinação da cafeína

A aplicação do método ALCAC-18 obtido pela adequação do Método *Alcalins Sur C18* para detecção da substância dopante cafeína em matrizes biológicas requer sua caracterização à luz dos procedimentos analíticos praticados no LAD/JCB. Por questões didáticas, o tema será abordado segundo os subitens a seguir apresentados que descrevem os procedimentos relacionados à extração e detecção por análise cromatográfica da cafeína.

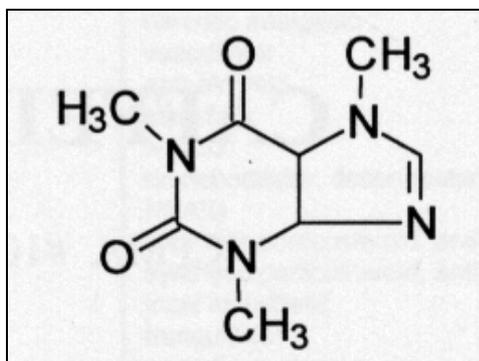
---

<sup>20</sup> A atual denominação “u” para caracterizar unidade de massa atômica substitui a denominação hoje arcaica “uma” originada do inglês “amu” (*atomic mass unit*).

### 7.3.1. A Substância dopante cafeína

Conforme caracterizado no Capítulo 5 no contexto das 121 substâncias (agentes dopantes) rastreadas, a **cafeína** possui papel de destaque tal o grau de sua incidência nos ensaios realizados no laboratório de controle de dopagem do Jockey Club Brasileiro (LAD/JCB).

Os incidentes de *doping* que deram estímulo à introdução da rotina de testes de dopagem aconteceram na Inglaterra entre os anos de 1960 e 1965. Nesses primeiros casos, várias tentativas foram realizadas de dopar os cavalos, com o uso de cafeína, com o objetivo de vencer (Tobin, 1981). A cafeína [1,3,7-trimetilpurina-2,6 (3H,1H)-diona] é um derivado trimetilado da xantina (2,6-dioxipurina), estruturalmente relacionada ao ácido úrico. A Figura 14 representa a fórmula estrutural da cafeína.



**Figura 14.** Fórmula estrutural da cafeína.

Cafeína (1,3,7 – trimetilxantina) (CAS<sup>21</sup>–58–08–2)

Presente em muitos alimentos (café, alguns tipos de chá, guaraná, cacau, dentre outros) a cafeína é consumida pelo homem e pelos animais. Suas propriedades estimulantes são conhecidas há muitos anos, e a maioria dos consumidores regulares dos alimentos xantínicos afirma ser beneficiada por essas propriedades.

Nos esportes, em geral, a cafeína tem sido empregada como agente de dopagem. Com o propósito de coibir o uso abusivo da cafeína durante os eventos esportivos, ela passou a ser controlada e seu uso excessivo proibido, independentemente da fonte e da forma de exposição. A utilização da cafeína em animais que competem em corridas é ilegal.

Em virtude da inclusão acidental de casca de cacau na ração de cavalos, e conseqüente aumento do aparecimento de casos positivos para cafeína, o

<sup>21</sup> CAS, Chemical Abstracts Service Registry Number.

metabolismo e a eliminação da cafeína no organismo de cavalos foram amplamente estudados na Inglaterra. Dentre as razões pelas quais a cafeína poderá se tornar um problema forense encontramos sua fácil detecção, sua longa meia-vida plasmática e sua tendência a se metabolizar em outras drogas de fácil detecção como a teobromina.

Os principais efeitos da cafeína no organismo são de estimular o sistema nervoso central, dilatar os vasos sanguíneos coronarianos e estimular a diurese.

Pelo fato da cafeína ou de seus derivados metabólicos serem detectados na urina por um longo período após a exposição do animal à mesma, as chances de se encontrar um positivo de cafeína são relativamente grandes em comparação a outras drogas excretadas mais rapidamente (Tobin, 1981).

### **7.3.2. O processo de coleta de amostras de urina**

A urina e o plasma sanguíneo constituem as matrizes biológicas típicas nas análises antidopagem. No contexto da presente pesquisa, que se relaciona ao controle de dopagem em animais vivos, optou-se por utilizar a urina por ser biologicamente menos complexa que o sangue, pela simplicidade dos métodos que lhe são associados, pelo fato do processo de coleta da urina não representar um procedimento invasivo intrínseco ao procedimento de coleta de sangue e porque as concentrações da maioria das substâncias dopantes e seus metabólicos são maiores nesse fluido biológico, contrapondo-se àquelas correspondentes às análises realizadas no plasma sanguíneo do animal.

Como material de referência para análise, utiliza-se uma urina negativa<sup>22</sup> coletada de cavalos puro-sangue inglês, pertencentes ao laboratório para controle de dopagem do Jockey Club Brasileiro (LAD/JCB). Como referências para análises em diferentes concentrações da presença da cafeína na urina utilizam-se amostras-padrão de urina “fortificada” com diferentes quantidades pré-conhecidas de cafeína pura (material certificado), conforme descrito no bloco a seguir.

### **7.3.3. Preparo da solução estoque padrão de cafeína**

No preparo da solução estoque padrão utilizada no processo de extração e identificação da cafeína presente na urina do cavalo de corrida (objeto da análise

---

<sup>22</sup> Amostra de urina testada para todas as substâncias dopantes antes da sua utilização como material de referência.

*antidoping*), utilizou-se a substância cafeína como material de referência certificado e uma balança analítica MT5-Mettler-Toledo AG de propriedade do laboratório como forma de se assegurar a rastreabilidade do processo de medição, tendo em vista que a referida balança possui certificado de calibração concedido pelo IPEM (Instituto de Pesos e Medidas do Rio de Janeiro)<sup>23</sup> que, por sua vez, é controlado pelo INMETRO, garantindo dessa forma a integridade da cadeia contínua da rastreabilidade.

A solução-estoque padrão de cafeína com concentração final de 0,01 mg/mL foi preparada diluindo-se a substância cafeína (proveniente da empresa americana Sigma Chemical Company) em solvente metanol (adquirido da empresa nacional Tédia Brazil Produtos para Laboratórios Ltda).

Pelo fato de esta solução padrão (solução-estoque) ter sido preparada a partir do padrão de Cafeína cuja massa (mg) foi determinada em uma balança analítica com resolução de 1 µg com credibilidade assegurada pelo Certificado de Calibração (Anexo G) que estabelece, inclusive, a incerteza expandida associada à medição ( $\pm 0,001$  mg) pode-se assegurar que a confiabilidade metrológica da solução-estoque na concentração de 0,01 mg/mL é expressa pela própria incerteza de medição da balança, ou seja, uma concentração de  $(0,010 \pm 0,001)$  mg/mL. Cabe ainda mencionar que, independentemente da incerteza de medição associada às análises cromatográficas que identificam a cafeína como substância dopante, a confiabilidade da solução-estoque é suficiente para assegurar a presença ou ausência desta substância, já que é assim considerada independentemente do limite de tolerância (*Threshold*).

#### **7.3.4. Padrão interno para validação do método analítico**

O monitoramento do processo analítico de determinação da presença de cafeína na urina (indicador de dopagem) foi realizado pela técnica clássica da padronização interna, utilizada para validar as medições de massas (massa/carga, expressas em “abundância de íons”). Esta solução padrão-interno foi preparada diluindo-se a substância Diazepam (com concentração final de 10 µg/mL, adquirida da empresa americana Sigma Chemical Company), utilizada como material de referência certificado em solvente metanol (adquirido da empresa nacional Tédia Brazil Produtos para Laboratórios Ltda).

---

<sup>23</sup> Mais recentemente, o LAD/JCB passou a calibrar sua balança analítica em um laboratório credenciado pelo INMETRO (Toledo do Brasil), portanto integrante da Rede Brasileira de calibração (RBC), o que lhe assegura rastreabilidade ao Sistema Internacional de Unidades, por intermédio do padrão de massa do INMETRO.

### 7.3.5. Extração das amostras

A extração de analitos de amostras de matrizes biológicas constitui uma etapa crítica em todo o processo de análise de substâncias dopantes já que deve ser minimizada a presença de interferentes extraídos com os analitos em questão. Essa etapa de pré-tratamento da amostra viabiliza a extração do composto de interesse (no presente estudo: cafeína) presente na matriz biológica utilizada (urina). A técnica utilizada para a extração dos analitos da amostra biológica foi por fase sólida (EFS), vantajosa uma vez que permite o processamento em sistemas de lotes.

Como material de extração, utiliza-se o cartucho C18 HF (alto fluxo) 3cc/500mg fabricado pela empresa americana Varian Incorporated.

#### 7.3.5.1. Reagentes

Visando caracterizar o processo como um todo, relacionam-se, a seguir, os reagentes utilizados no procedimento de preparação das amostras. Reagentes: Acetato de etila, clorofórmio, diclorometano, hexano, metanol, estes fornecidos pela empresa nacional Tédia Brazil Produtos para Laboratórios Ltda e hidróxido de amônio PA, sulfato de amônio PA, fornecidos pela empresa nacional Isofar Indústria e Comércio de Produtos Químicos Ltda. Em todas as etapas do processo, utiliza-se água grau-reagente I<sup>24</sup>, obtida por intermédio do sistema Milli-Q de purificação do próprio laboratório do JCB.

#### 7.3.5.2. Instrumentação utilizada

Os instrumentos básicos utilizados resumem-se a: (i) balança analítica (MT5-Mettler-Toledo AG, com resolução de 1µg); (ii) cuba à vácuo, para extração das amostras por fase sólida (Varian Incorporated); (iii) centrífuga (Marathon, modelo 22K) e (iv) agitador mecânico (Max-Mix II-série 871, fornecido por Thermolyne Dubuque IA,USA).

---

<sup>24</sup> Água ultrapura produzida pelo sistema MILLI-Q plus (MILLIPORE Corporation, USA) que utiliza cartucho de purificação do modelo QPAK1 específico para água de alimentação destilada.

### 7.3.5.3. Purificação e ajuste de pH das amostras

As amostras de urina (6 mL) foram colocadas em béqueres. Após adição de 3mL de água ultra-pura e 100  $\mu$ L da solução de padrão interno, estas foram submetidas a hidrólise com 500 mg de sulfato de amônio, deixando-se em repouso por 10 min, o pH de cada uma foi ajustado na faixa de 9,4 a 9,8 pela adição de solução de amoníaco 10%. As amostras foram centrifugadas por 20 min a 4000 rpm.

### 7.3.5.4. Técnica de extração por fase sólida

Após o condicionamento dos cartuchos C18HF com 3 mL de metanol e 3mL de água grau – reagente 1, estes foram carregados com 9 mL da fração sobrenadante oriunda da centrifugação das amostras. Em seguida, os cartuchos foram lavados com 3 mL de água grau – reagente 1 e secos por 3 min, lavados com 6 mL de hexano e novamente secos por 2 min; todas as frações recolhidas foram descartadas. Foram colocados tubos de ensaio limpos e identificados para a eluição com 6 mL de clorofórmio. Os extratos foram recolhidos e transferidos para cápsulas de evaporação, onde permaneceram por uma noite. A Figura 15 ilustra a extração por fase sólida.

Os resíduos obtidos da evaporação foram retomados com 400  $\mu$ L de diclorometano e transferidos para frascos de amostras do tipo *vial*, identificados de maneira correspondente aos tubos de ensaio. Os extratos foram novamente evaporados à temperatura ambiente e os resíduos resultantes ressuspensos com 50  $\mu$ L de acetato de etila.



**Figura 15.** Extração por fase sólida com equipamento denominado cuba a vácuo.

### 7.3.6. Procedimento analítico de separação e detecção das amostras

Para a análise e detecção das amostras a técnica utilizada foi a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas. O Jockey Club Brasileiro dispõe de um cromatógrafo a gás (modelo 5890) acoplado ao espectrômetro de massas (modelo 5972, CGEM, fabricado pela Hewlett Packard). Neste equipamento foram realizadas todas as análises pertinentes ao trabalho. A Figura 16 ilustra o sistema cromatógrafo a gás/espectrômetro de massas.



**Figura 16.** Sistema cromatógrafo a gás / espectrômetro de massas.

#### 7.3.6.1. Gás de arraste utilizado na cromatografia

Para a análise instrumental utilizou-se o gás Hélio como fase móvel (gás de arraste). Foram usados cilindros de Hélio N-50 (pureza > 99,999%) fornecidos pela empresa nacional Air Liquide Brasil Ltda.

#### 7.3.6.2. Análise cromatográfica

Concluída a etapa de extração das amostras, seus extratos foram submetidos a uma análise cromatográfica. A coluna cromatográfica é do tipo capilar (0,25 mm de diâmetro interno) com as seguintes especificações: fase estacionária de 35% fenilmetilpolisiloxano, 30 m de comprimento, e 0,25  $\mu\text{m}$  de espessura de filme. O método é aplicado com os parâmetros instrumentais: as temperaturas do injetor e da interface são fixadas em 280 °C e 295 °C, respectivamente. Os modos de operação do forno são programados para as seguintes condições: temperatura inicial 60 °C; taxas de programação: 22°C/min

até 200°C; 10°C/min até 270 °C e 30°C/min até 305 °C por 6 min. As injeções são feitas no modo sem divisão de fluxo “*Splitless*” utilizando-se Hélio como gás de arraste. (fluxo: 0,9 ml/min) O volume de injeção da amostra foi de 1 µL. As análises foram realizadas no modo de impacto de elétrons (IE), com energia de ionização de 70 eV. A faixa de varredura (modo: “scan”) é de (40 a 550) u (unidade de massa atômica).

#### **7.4. Qualificação do Método ALCAC-18**

Não obstante a adequabilidade do método acima descrito à detecção da substância dopante cafeína, faz-se necessário qualificá-lo à luz de fatores críticos (atributos da robustez do método) de sorte a sua incorporação à prática do LAD/JCB. A validação do método constitui objeto do próximo capítulo.