

## 9. CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES

A investigação das substâncias dopantes mais freqüentes na atividade turfística brasileira e a adequação e validação de um método analítico alternativo para detecção de substâncias dopantes presentes em matrizes biológicas de cavalos de corrida caracterizam os principais temas de pesquisa que consubstanciaram a presente dissertação de mestrado. Para fundamentar o desenvolvimento da pesquisa o trabalho considerou o estudo de caso relacionado à experiência do *Laboratório Antidoping do Jockey Club Brasileiro* (LAD/JCB) e o impacto de um novo método analítico proposto na confiabilidade metrológica do laboratório.

Comprovada ser a cafeína a substância proibida mais frequentemente detectada em matrizes biológicas (urina) identificadas pelas análises cromatográficas de rotina realizadas pelo LAD/JCB, a pesquisa concentrou-se na validação do método para essa substância. Tomando por base o método analítico “*Methodes Alcalines Sur C-18*” desenvolvido pelo “*Laboratoire LAB-Contrôle antidopage*” da França, cujo direito de uso resultou de acordo de cooperação entre o Laboratório Francês e o LAD/JCB, denominado na presente dissertação de método fonte, modificações analíticas foram introduzidas para adequá-lo não apenas às condições laboratoriais e instrumentais do Laboratório Antidoping do Jockey Club Brasileiro, mas, principalmente, para validá-lo como um método robusto capaz de impactar de forma decisiva na consolidação da confiabilidade metrológica do próprio LAD/JCB, método este aqui denominado **Método ALCAC-18** já que se fundamenta em pesquisa de substâncias alcalinas com coluna de extração pela fase sólida de octadecil-silano.

Conforme evidenciado pelos resultados consolidados da pesquisa, o método foi validado **(i)** segundo os sete fatores críticos convencionais: limite de detecção, sensibilidade, exatidão, linearidade, precisão (repetitividade e reprodutibilidade), recuperação e robustez e **(ii)** com base em um novo fator crítico proposto e denominado “valor-limite de determinação”. Aprofundando a pesquisa no entendimento desse novo fator crítico proposto, foi possível mostrar que o “valor-limite de determinação” não apenas reflete **(a)** um conhecimento mais preciso do teor de cafeína nas amostras analisadas, para as diferentes

concentrações estudadas, que caracteriza o que se costuma denominar “faixa de não confiança”, mais especificamente faixas de falsos-positivo e falsos-negativo associados à substância dopante cafeína presente nos fluidos biológicos (urina de cavalos de corrida) analisados como também **(b)** mostrou-se como conveniente estimativa da incerteza da medição associada à uma análise qualitativa da presença da cafeína nessas amostras. No que concerne o novo método propriamente dito, para as aplicações do LAD/JCB, o método proposto (ALCAC-18) introduz melhorias no método fonte (*Alcalins SUR C-18*) notadamente nos seguintes aspectos: redução do volume da matriz biológica requerida, de 6 para 4 mL; redução do tempo de centrifugação das referidas amostras, de 35 para 20 min e redução da diluição aquosa da amostra a ser analisada, de 12 para 9 mL, dentre outros benefícios que qualificam o método alternativo para suas aplicações no LAD/JCB e para uso em ambientes laboratoriais que não possuem acesso a instrumentação científica periférica não-automatizada, compatível com a realidade de laboratórios brasileiros que não conseguem manter grau de automação comparável ao dos laboratórios estrangeiros mais sofisticados.

Confirmando a aplicabilidade desse novo fator crítico “valor-limite de determinação” adotado pelo LAD/JCB como um atributo relevante para a validação qualitativa do método, o novo fator crítico proposto estabelece um critério para tomada de decisão que orienta o analista a evitar repetições desnecessárias de análises cromatográficas não triviais. Apresenta-se, ainda, como indicador da confiabilidade dos resultados de positividade em amostras analisadas, agregando credibilidade aos laudos emitidos pelo LAD/JCB, atendendo expectativas de criadores de animais e apostadores, com redução dos conflitos forenses, uma vez que laudos positivos acarretam sanções usualmente aplicada aos infratores segundo as regras preconizadas pelo Código Nacional de Corridas.

Não obstante o complexo processo de validação do método ALCAC-18, que envolveu um número da ordem de 180 experimentos, este se mostrou mais adequado às condições laboratoriais do LAD/JCB que o método original francês “*Methode Alcalins Sur C-18*”, uma vez que permitiu agregar credibilidade aos resultados relacionados à detecção de substâncias dopantes inerentes à atividade turfística brasileira.

Ainda como contribuição considerada relevante, destaca-se o novo método proposto de correção dos resultados originais da cromatografia, resultados esses corrigidos pelo desvio local em relação à média do padrão interno de diazepam

utilizado na calibração da medição de cafeína. A técnica mostrou-se eficaz uma vez que reduz o desvio padrão relativo do resultado cromatográfico dos íons característicos e suas razões.

Outra contribuição do presente desenvolvimento refere-se ao complexo procedimento de preparo das amostras de urina, antes fortificadas por um método independente fragmentado e atualmente, por uma “solução fortificada em batelada”, para posterior fragmentação e análise. Embora possa parecer trivial, expressivo componente dos desvios do padrão interno de diazepam ( que deram origem ao fator de correção da cromatografia da cafeína) resultou dessa técnica hoje substituída de preparação das amostras de urina. Mesmo não tendo sido utilizada na formulação desta pesquisa (já que percebida na sua fase conclusiva) se encontra hoje efetivamente implementada nas rotinas internas do LAD/JCB tendo reduzido incertezas, tempo de preparo e maior confiabilidade nos atuais resultados analíticos.

Como contribuições indiretas da pesquisa, creditam-se ainda os seguintes benefícios da presente dissertação de mestrado **(i)** a elaboração de um Procedimento Operacional Padrão (POP) para validação qualitativa de métodos analíticos (internamente denominado “Método Genérico de Validação Qualitativa”), aplicável a todos os métodos qualitativos praticados no LAD/JCB, fundamentado nos fatores críticos tradicionais e no novo fator crítico proposto valor-limite de determinação acima caracterizado; **(ii)** a solução de um problema interno de ordem técnica do laboratório para controle de dopagem do Jockey Club Brasileiro, com impacto em questões essenciais que são inerentes à confiabilidade metrológica do laboratório; **(iii)** atribuição de maior independência técnico-científica ao LAD/JCB, que tendo enfrentado os desafios associados à necessidade de adequação e validação de novas metodologias analíticas de seu interesse, sente-se mais capacitado para enfrentar outros desafios que ou limitam a sua atuação ou impactam na confiabilidade metrológica de sua ação global e **(iv)** a introdução de uma nova linguagem mais científica, colaborando para interromper uma cadeia de dificuldades com a prática de “jargões” usuais nem sempre corretos e adequados ao ambiente técnico-científico laboratorial.

Nem sempre tangíveis ou mensuráveis, credita-se, também, ao presente trabalho experimental um expressivo avanço na implementação do sistema da qualidade do Laboratorio Antidoping do Jockey Club Brasileiro, certamente hoje melhor capacitado para perseguir na importante conquista de um processo de acreditação junto ao INMETRO da sua competência técnica, assegurando-lhe não apenas ampla credibilidade por parte de seus usuários e associados mas

reconhecimento internacional assegurado pelo acordo de reconhecimento mútuo que lhe confere o cobiçado processo de acreditação.

Entendendo que nenhum trabalho dessa complexidade se esgota em si mesmo requerendo um esforço continuado, **recomendam-se**, como continuação natural dos desenvolvimentos consolidados pela presente pesquisa de mestrado: **(i)** a implementação de melhorias visando uma redução da incerteza associada ao método analítico proposto, hoje estimada em patamares superiores a 15%, valor que, aparentemente elevado, ainda reflete os níveis das principais técnicas cromatográficas aplicáveis às análises para identificação da substância cafeína em fluidos biológicos de cavalos de corrida; **(ii)** sucessivas validações do novo método proposto no sentido de estabelecer o grau de sua aplicabilidade (incerteza) na detecção de outras substâncias proibidas usualmente presentes em fluidos biológicos inerentes à atividade turfística e **(iii)** a busca de uma maior universalização dessas metodologias analíticas hoje fortemente atreladas às condições laboratoriais e instrumentais.

Considerando o escasso número de laboratórios antidoping (para humanos e animais) ainda existentes no País e a pouca experiência internacional na operação dessa atividade no Brasil, a exemplo da excelente cooperação científica estabelecida pelo LAD/JCB, que culminou com a cessão pelo laboratório francês "*Laboratoire LAB-Contrôle Antidopage* do método fonte "*Methodes Alcalins Sur C-18*" e que viabilizou o presente desenvolvimento, fortemente recomenda-se investir no intercâmbio científico interlaboratorial, principalmente com laboratórios congêneres de países que acumulam maior experiência na área. Constitui crença não apenas da direção do LAD/JCB, mas de toda a sua equipe técnica, que a acreditação do LAD/JCB como forma explícita de reconhecimento formal de sua competência técnica constitui pré-requisito inevitável à conquista e materialização desses novos desafios ora delineados.