

### 3. CONTROLE DE DOPAGEM NA ATIVIDADE TURFÍSTICA

O presente capítulo discute o controle de dopagem na atividade turfística, notadamente os aspectos relacionados (i) à fronteira existente entre medicação terapêutica e doping; (ii) contaminantes; (iii) agentes dopantes; (iv) legislação aplicável e limites de tolerância e (v) métodos analíticos de interesse à atividade turfística. Ênfase é atribuída à tênue fronteira que separa a medicação terapêutica da prática de dopagem de animais e ao controle de dopagem de animais (no presente estudo, cavalos puro-sangue inglês), explicitando-se os contaminantes exógenos e os agentes dopantes dado que pequenas dosagens de medicamentos podem, de forma expressiva, influenciar o desempenho (*performance*) atlético dos animais. O capítulo aborda, ainda, aspectos da legislação aplicável e adotada por laboratórios *antidoping* e por organizações internacionais, estabelecendo os limites de tolerância (*threshold*) para as substâncias dopantes. Completando o capítulo, são caracterizados os métodos analíticos empregados na detecção das 121 substâncias dopantes rastreadas pelo laboratório para controle de dopagem do Jockey Club Brasileiro (LAD/JCB).

O maior desafio para um laboratório *antidoping*<sup>12</sup> reside exatamente no fato de o mesmo estar permanentemente pressionado a manter-se atualizado e capacitado para identificar um elevado número de substâncias (dopantes) que necessitam ser analisadas com base em técnicas atuais e internacionalmente aceitas e praticadas.

#### 3.1. Medicação terapêutica versus doping

O controle de medicação ou controle *antidoping*, como é geralmente designado, é crucial para o bem estar dos cavalos que participam de competições. Durante as diversas competições, estes estão sujeitos a desgastes físicos ou a pequenos incidentes que resultam em danos físicos, principalmente

---

<sup>12</sup> Dentre as principais dificuldades vivenciadas por um laboratório para controle de dopagem (laboratório *antidoping*) destaca-se a complexidade de se manter uma atuação ampla (domínio de técnicas e capacidade de detecção de novas substâncias) e atualizada, assim habilitando-o a cumprir a sua finalidade de provedor das evidências técnicas laboratoriais necessárias à garantia da lisura das carreiras e/ou da saúde dos animais.

no sistema locomotor. Para essa situação a medicina veterinária recomenda repouso e trabalho de recuperação, que requer ou longos períodos de descanso, o que nem sempre é adotado, ou a aplicação de medicamentos, procedimento usualmente praticado.

Incontestavelmente, a regulamentação vigente nas práticas de carreiras de cavalo, que controla a dopagem por meio de ensaios laboratoriais usualmente aceitos, inibiu a participação de animais sem condições físicas adequadas competindo com a ajuda de medicamentos. Dentre outros, este é um forte argumento que justifica este tipo de atividade laboratorial.

### **3.1.1. Medicação terapêutica**

O uso de drogas para tratamento de doenças data da Antigüidade. Acredita-se que a descoberta das drogas envolveu o processo de tentativa e erro, à medida que diversas substâncias de origem animal, vegetal e mineral eram experimentadas como fontes potenciais de alimento do usuário, em seu habitat.

A base científica para a medicina surgiu com Aristóteles (384-322 a.C.), que fez e registrou numerosas observações envolvendo animais. As plantas foram classificadas de forma sistemática, mais com base em suas características individuais do que em suas recomendações em termos de tratamento. Após a queda do Império Romano, os depositários do conhecimento e promotores do pensamento médico à época eram encontrados na cultura muçulmana, os primeiros a regular a prática e desenvolverem a farmacologia, de modo a padronizar o preparo das prescrições. Nessa época, as drogas, e também os venenos foram classificados, verificando-se que a diferença entre estes pode ser uma questão de dose. Uma determinada dose de uma certa droga poderá ser tóxica se fornecida em quantidades suficientemente elevadas. Nos séculos XVII e XVIII (Booth, 1982) as drogas comercializadas proliferaram, surgindo a prática da experimentação médica. O século XIX assinalou o desenvolvimento da Química, que preparou o caminho para a caracterização detalhada e o estudo experimental dos princípios farmacológicos ativos derivados de fontes naturais. Estabeleceram-se os fundamentos da farmacologia moderna e delinearam-se seus únicos problemas científicos: as relações entre dose e resposta, a disponibilidade das drogas no corpo, o mecanismo de ação das mesmas, seu local de ação e as relações entre estrutura e atividade. Assim, a farmacologia se estabeleceu como uma disciplina científica independente, baseada,

essencialmente, na metodologia experimental. No século XX, a farmacologia, enquanto ciência prosperou nas Escolas de Medicina e Farmácia. De um modo geral, todos os aspectos dessas ciências progrediram durante este século, com incrementos consideráveis no tratamento e no controle eficazes das doenças.

Na visão de especialistas, existem evidências de que o grau de desenvolvimento da **farmacologia veterinária** é comparável ao da humana. No curso da história da Medicina e da Veterinária, expressivos foram os avanços na cura e tratamento de doenças, com ambas as Escolas compartilhando origem comum. A **farmacologia** é uma ciência experimental que lida com as propriedades das drogas e seus efeitos nos sistemas vivos. Esta é uma ciência que estuda as fontes de drogas (farmacognosia), sua ação e seu destino no corpo (farmacodinâmica), sua utilização no tratamento de doenças (terapêutica) e seus efeitos tóxicos (toxicologia). A denominação “droga” deriva-se de *drogue*, oriundo do francês antigo que significa “erva”. As drogas foram definidas como os produtos cujo uso destina-se a diagnóstico, alívio, tratamento ou prevenção de doenças em seres das espécies humana e animal (Booth, 1982).

O farmacologista clínico veterinário visa o estudo das drogas nos pacientes animais. Ele atua na essência da farmacologia, estabelecendo a interface com a medicina, contribuindo para integrar os princípios farmacológicos ao conhecimento da medicina interna veterinária. A avaliação controlada da eficácia e da segurança da terapia medicamentosa nos pacientes animais é um dos principais objetivos da farmacologia clínica veterinária.

O veterinário deve ter em mente que não há droga totalmente “segura”, exceto nos casos em que o composto é farmacologicamente inerte. Portanto, a terapêutica requer considerações de riscos potenciais e conhecimento dos possíveis benefícios advindos da aplicação das drogas visando o bem estar do paciente animal. O veterinário deve conhecer não apenas as ações da droga no corpo animal, seus mecanismos de absorção e eliminação, seus efeitos tóxicos, suas indicações clínicas e contra-indicações, bem como a dosagem indicada na espécie de animal a ser tratada. Portanto, um veterinário deve ser capaz de aplicar ou prescrever uma terapia medicamentosa racional, sem prejuízos para o paciente.

### 3.1.2. **Doping: aspectos etimológicos**

A palavra *doping* origina-se do verbo em inglês “to dope”, denominação utilizada em competições hípcas inglesas, que indica a administração de uma

droga ao cavalo de corridas. A palavra *doping* surgiu, pela primeira vez em um dicionário inglês, em 1899, significando mistura de narcóticos usada em cavalos.

A verdadeira etimologia da palavra origina-se de denominação de dialeto holandês “*doopen*” (batizar ou imergir), em que a expressão “*onder doopen*”, era usada para “medir ou oferecer” drogas.

Qualquer que seja a origem da palavra *doping*, não existe dúvida sobre o seu significado. No Brasil, a partir dos anos 50, o jargão *doping* foi incorporado ao linguajar turfístico. Atualmente, *doping* é definido como a “administração de qualquer substância em pessoas ou animais que possa modificar o seu comportamento durante uma prova desportiva”.

A regulamentação de competições de cavalos de corrida é rigorosa no controle do que se denomina “substâncias proibidas” (metabólico ou substância de origem endógena em concentração elevada) presentes em tecidos, fluidos corporais ou excreções. Os cavalos que tomam parte numa competição devem ser saudáveis e competir por mérito próprio. A análise realizada para controle do uso de substâncias consideradas como agentes de dopagem é, na quase totalidade dos casos, somente qualitativa envolvendo extração das substâncias pesquisadas (fármacos e/ou seus produtos de biotransformação) da amostra e identificação por técnicas analíticas. O grande desafio atual é conciliar a terapêutica eqüina com a legislação *antidoping* em vigor. A pergunta que se faz é: até que ponto a utilização de fármacos de uma forma terapêutica pode afetar o rendimento do cavalo?

Observa-se, hoje em dia, que dopagem é uma prática indesejável, pois é desonesta e injusta em termos de igualdade de condições, podendo causar danos fisiológicos irreversíveis ao cavalo, interferindo com o processo de seleção dos cavalos para reprodução, podendo, inclusive, colocar em risco a vida de seu condutor ou de outros animais que com ele concorrem.

Com a regulamentação das carreiras que, cada vez mais, ganham credibilidade como esporte reconhecido, a prática desonesta e desleal associada ao *doping* de animais vem sendo reduzida, conforme evidenciam estudos recentes relatados por Tobin (1999).

Não existe uma definição de consenso internacional sobre dopagem, embora, na essência, todas as legislações sejam equivalentes, isto é, visam evitar uma vantagem ilícita, pela administração de substâncias farmacologicamente ativas, que possam influenciar o desempenho do animal em competição (Salvadori, 1997).

Como a química analítica atualmente está muito desenvolvida nas suas metodologias de triagem e confirmação, fármacos legítimos e substâncias endógenas e nutricionais podem ser detectados em baixas concentrações e até mesmo após o tempo dos seus efeitos terapêuticos. Estes são os chamados casos de dopagem terapêutica e dopagem acidental, que, não necessariamente, constituem indicadores de que o cavalo possa estar competindo dopado, fato polêmico no âmbito de controle de dopagem.

Foi com o propósito de estabelecer padrões universais para controle do *doping* que surgiram organizações internacionais de controle, com competência e autoridade para definir regras e procedimentos que devem ser respeitados e cumpridos, assim garantindo a credibilidade das competições e coibindo a prática ilícita do *doping*. Um relato sucinto sobre a ação dessas organizações (órgãos regulamentadores) constituiu objeto do Capítulo 2 desta dissertação. Dentre outras atividades, competem a essas organizações de esportes eqüestres relacionar as “substâncias proibidas”. Em conformidade com as recomendações internacionais, o Brasil reestruturou o seu Código Nacional de Corridas, que caracteriza punições aos infratores em função do artigo 163, seção VI que dispõe: “É proibido ministrar medicamentos e empregar substâncias ou qualquer agente físico capaz de alterar, efetiva ou potencialmente, o desempenho do cavalo por ocasião da corrida”, as substâncias proibidas encontram-se categorizadas em quatro grupos, conforme documentado no Quadro 2 do Capítulo 1.

### 3.2. Contaminantes exógenos

Em conformidade à terminologia clássica e conforme identificado no presente trabalho, entende-se por contaminantes exógenos aquelas substâncias que não devem ser encontradas nas matrizes biológicas de animais participantes em competição e que o são, por contaminação, ou via alimentação ou qualquer outra via exógena. Cabe aqui a clara distinção entre o que se denomina contaminante (tolerável desde que dentro dos limites de tolerância) e um agente dopante, este último considerado substância proibida na matriz biológica do cavalo de corrida. Conforme será descrito em itens próprios deste capítulo (Legislação aplicável e limites de tolerância) uma mesma substância poderá ser considerada contaminante ou dopante em função do limite de tolerância estabelecido. O Quadro 3 incluído no próximo item fará esta distinção,

estabelecendo limites muito bem definidos (critério) para especificar esta distinção entre contaminantes e substâncias dopantes.

### 3.3. Legislação e limites de tolerância

Entende-se por legislação aplicável à atividade turfística ao conjunto de regras estabelecidas por um determinado laboratório *antidoping* ou acordadas por organizações que regulamentam esta atividade, definindo-se substâncias contaminantes e seus respectivos limites de tolerância. Segundo critério próprio estabelecido por esses laboratórios *antidoping* e/ou organizações turfísticas internacionais, uma determinada substância será considerada contaminante ou dopante dependendo do limite de tolerância previamente estabelecido. Em alguns casos, essa distinção é ainda mais dramática, como é o caso da cafeína (objeto de estudo desta dissertação) que, para a atividade turfística brasileira simplesmente não é tolerada independentemente do seu teor na matriz biológica (urina). Já em Hong Kong, por exemplo, a presença de cafeína é tolerada (portanto não considerada substância dopante, i.e: substância proibida) desde que seu teor seja inferior a 30 ng/mL.

As políticas de controle *antidoping* em esportes eqüestres são criadas para conter, dentre outros motivos, a desonestidade e os riscos com a saúde dos animais, colaborando, também, para a preservação da raça. Por décadas, as autoridades civis mundiais envolvidas com esportes eqüestres, se empenham nesse tema, dando-lhe alta prioridade, com desenvolvimento de estratégias e pesquisas para enfrentá-lo, bem como seu impacto na integridade das carreiras (Houghton, 2001). Observa-se, entretanto, que as formas de encarar o controle antidopagem podem ser distintas, uma vez que, essas autoridades podem possuir diferentes filosofias *antidoping* e diferentes disponibilidades e prioridades no que concerne ao desenvolvimento de suas pesquisas para controle de dopagem.

Observa-se, atualmente, nos laboratórios de controle e pesquisa antidopagem, devido a melhoria das habilidades analíticas, uma crescente frequência de detecção de “substâncias contaminantes”, que de modo algum devem ser encontradas nos fluídos biológicos de animais participantes em competição. Essas substâncias podem ser provenientes de (a) plantas, que contenham substâncias farmacologicamente ativas e que, de fato, podem, se excederem os limites de tolerância previamente acordados, permanecer como fontes indesejáveis de drogas, em alguns casos com poder ativo eficaz, a

exemplo, dos alcalóides ou (b) de produtos de nutrição derivados dessas plantas (Smith, 2001).

No início da década de 80, as indústrias que se beneficiam e/ou operam no mercado afeto às corridas de cavalo pressionaram as autoridades civis mundiais envolvidas com esportes eqüestres no sentido de implementar o controle de certas substâncias endógenas e de substâncias utilizadas no balanceamento de rações administradas aos cavalos de corrida, assim assegurando uma alimentação mais equilibrada isenta de ação dopante induzida capaz de garantir uniformidade de condições para as carreiras, ou seja, para evitar que uma simples substância contaminante pudesse se transformar em substância proibida por exceder os limites de tolerância preestabelecidos (Houghton, 2001).

É nesse contexto que se aplica o que é denominado de *threshold* (limite de tolerância), ou seja, limites analíticos quantitativos que são determinados para essas substâncias, consistentes com seus atributos como fonte de alimentação ou substâncias endógenas. Nesse contexto, entende-se por *Threshold* o limite de tolerância (medido em massa da substância por mL de fluido biológico do cavalo de corrida objeto da análise), como o indicador a partir do qual a presença de uma determinada substância será considerada causadora de efeito dopante na *performance* do cavalo de corrida. Com o tempo de utilização, este conceito de *threshold* ganhou aceitação internacional. Dentre as substâncias mais comumente pesquisadas em laboratórios *antidoping*, incluindo-se o laboratório para controle de dopagem do Jockey Club Brasileiro (LAD/JCB), destacam-se as substâncias dopantes (assim consideradas quando encontradas acima do citado limite de tolerância) a seguir identificadas: nandrolona, hidrocortisona, testosterona, CO<sub>2</sub> livre, arsênico, dimetilsulfóxido, ácido salicílico e teobromina, cada qual com um determinado *threshold*, ou seja, um determinado nível de tolerância. As três primeiras substâncias são esteróides endógenos, o ácido salicílico é um ingrediente natural na alimentação enquanto a teobromina é um contaminante no processo de manufatura da alimentação.

O conceito de *threshold* (limite de tolerância) está atualmente bem estabelecido para substâncias endógenas e substâncias presentes no alimento ministrado aos cavalos, que constitui parte integrante da sua dieta alimentar, típico do esporte eqüino. Obviamente, para cada nova droga pesquisada um limite de tolerância (*threshold*), se houver necessidade, lhe será atribuído. Usualmente, as substâncias são classificadas em quatro famílias distintas (categorias): substâncias endógenas, produtos naturais (plantas tradicionais de pasto) para alimentação, contaminantes do meio ambiente em alimentação

(cultivo) e contaminantes no processo de manufatura da alimentação, cada qual com seu *threshold* atribuído.

Conforme descrito no Capítulo 2, a *International Federation of Horseracing Authorities* é o organismo oficial que define e recomenda a relação das substâncias com seus respectivos *thresholds* (limites de tolerância). Dentre outros, também o LAD/JCB acata na íntegra essa recomendação internacional como referência para orientar a sua ação laboratorial. O Quadro 3, abaixo, apresenta a relação dessas substâncias, cabendo observar que a cafeína não se fez presente pelo fato de não ser tolerável na atividade turfística brasileira. A cafeína é, portanto, considerada agente dopante sob qualquer hipótese e, por este fato, motivou a seleção do método analítico que será desenvolvido e validado de sorte a assegurar a sua detecção.

**Quadro 3.** Lista de substâncias contaminantes ou dopantes em função dos respectivos limites de tolerância predefinidos pela International Federation of Horseracing Authorities (IFHA)

Substâncias	Limites de tolerância definidos ("Thresholds")*
Cafeína**	<b>Não se aplica (considerada substância dopante independentemente do seu teor na matriz biológica)</b>
Arsênico	0,3 µg/mL em urina (arsênico total)
Dióxido de carbono	37 milimoles/mL em plasma
Dimetil sulfóxido	15 µg/mL em urina e 1 µg/mL em plasma.
Estranediol em machos (a exceção dos castrados)	<u>5a-estrane-3b, 17a -diol</u> = 1 (livre e conj.) 5(10)-estrene-3b, 17a-diol
Hidrocortizona	1 µg/mL em urina
Metoxitiramina	4 µg mL em urina (livre e conjugada)
Ácido salicílico	750 µg/mL em urina ou 6,5 µg/mL em plasma
Testosterona	0,02 µg/mL ( livre e conjugada) em urina para castrados ou 0,055 µg mL em urina para potranças e éguas (não prenhas)
Teobromina	2 µg/mL em urina

\* Excedido o limite de tolerância indicado (*threshold*) a substância contaminante passa a ser considerada substância dopante.

\*\* A substância cafeína não consta da Tabela original proposta pela International Federation of Horseracing Authorities, entretanto aqui inserida por tratar-se da substância dopante objeto da presente pesquisa.



### 3.4. Substâncias dopantes controladas no LAD/JCB

O Anexo A (Tabela A-1) caracteriza as 121 substâncias dopantes controladas no laboratório para controle de dopagem do Jockey Club Brasileiro (LAD/JCB), subdivididas em “famílias” segundo as suas ações farmacológicas com o intuito de facilitar a compreensão da sua atuação no organismo animal.

Cada uma dessas 121 substâncias é perfeitamente conhecida e encontra-se caracterizada na farmacopéia especializada (*The Pharmaceutical Society of Great Britain*, 1986).

### 3.5. Métodos analíticos

Os métodos analíticos constituem objeto de estudo da Química Analítica, ciência experimental por excelência, cujos resultados são, usualmente, de aplicação imediata. A química analítica atua direcionada por “problemas analíticos” que são fatos concretos resultantes da necessidade de se conhecer qualitativamente e quantitativamente a natureza de uma amostra.

A técnica analítica, de aplicação ampla, refere-se ao princípio científico empregado na obtenção da informação analítica com o objetivo de prover a identificação da composição de uma amostra. O processo analítico necessita para a sua execução de métodos analíticos efetivamente consolidados e validados, de domínio do laboratório que o pratica, devendo satisfazer as seguintes características: (i) constituir-se em procedimento analítico, que estabelece as diretrizes necessárias ao seu uso e (ii) dispor de protocolo analítico, de rigor adequado, que estabelece as diretrizes que devem ser seguidas, sem exceção, para que os resultados analíticos possam ser aceitos para um determinado propósito.

Via de regra, os métodos subdividem-se em: (i) métodos analíticos qualitativos e (ii) métodos analíticos quantitativos.

Os métodos analíticos qualitativos são aqueles com base nos quais é possível determinar quais elementos ou íons estão presentes numa substância ou em mistura das mesmas. Os métodos analíticos quantitativos são aqueles com base nos quais é possível se estabelecer a quantidade de cada elemento ou íon presente numa determinada substância e suas proporções.

Atualmente, a maioria das análises químicas é feita mediante métodos instrumentais, cabendo a eles a função de traduzir a composição em uma informação diretamente observável pelo analista. Em quase todos os casos, os

instrumentos atuam direta ou indiretamente como se fossem “comparadores”, no sentido de que se avalia a amostra desconhecida em relação a um padrão.

Em relação à análise quantitativa, os meios tecnológicos proporcionaram o desenvolvimento de inúmeras técnicas para a determinação de concentrações cada vez mais diminutas, que constituem atualmente o grande campo de trabalho e fonte de preocupações dos analistas.

### **3.5.1. Métodos analíticos empregados no LAD/JCB: descrição sucinta**

O laboratório para controle de dopagem em matrizes biológicas de animais em competição do Jockey Club Brasileiro, na sua rotina de trabalho, dispõe, hoje, de tecnologia laboratorial para detectar 121 substâncias dopantes, fazendo uso de oito métodos analíticos, descritos sucintamente no bloco a seguir.

**Método 1 – Método Lab12** – desenvolvido no “*Laboratoire LAB - Contrôle antidopage*” (França) este método aplica-se à detecção de substâncias ácidas excretadas nos fluídos biológicos por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas. O método é composto por quatro etapas: (i) hidrólise alcalina; (ii) extração em cartucho de fase sólida C18 por solvente orgânico; (iii) evaporação do solvente de eluição e (iv) derivação do resíduo obtido. Por intermédio desse método é possível detectar as seguintes vinte e uma substâncias: ácido etacrínico; ácido flufenâmico; ácido meclofenâmico; ácido niflúmico; ácido salicílico; ácido tolfenâmico; bumetanide, carprofeno; diclofenaco; fenilbutazona; fenoprofeno; flunixinina; furosemida; hidroclorotiazida; ibuprofeno; indometacina; ketoprofeno; ketorolac; naproxeno, oxifenilbutazona e tolmetin.

**Método 2 – Método Hidrofra** – desenvolvido no “*Laboratoire LAB - Contrôle antidopage*” (França) este método é utilizado para detecção de substâncias excretadas sob as formas gluco e sulfo conjugadas nos fluídos biológicos por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas. O método é composto por quatro etapas: (i) hidrólise enzimática; (ii) extração em cartucho de fase sólida Narc-2 por solvente orgânico; (iii) evaporação do solvente de eluição e (iv) derivação do resíduo obtido. Por intermédio desse método é possível detectar as seguintes doze substâncias: acebutolol; albuterol; atropina; ciproheptadina; clenbuterol; codeína; isoxsuprina; propranolol; terbutalina; timolol; trimetoprim e xilazina.

**Método 3 – Método Anfetam** – desenvolvido no “*Laboratoire LAB - Contrôle antidopage*” (França) este método descreve o procedimento de trabalho para a detecção de aminas voláteis excretadas de forma livre nos fluidos biológicos por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas. O método é composto por três etapas: (i) extração em cartucho de fase sólida C18 por solvente orgânico; (ii) evaporação do solvente de eluição e (iii) retomada do resíduo obtido. Por intermédio desse método é possível detectar as seguintes sete substâncias: anfetamina; efedrina; fentermina; heptaminol; mefentermina; metanfetamina e norefedrina.

**Método 4 – Método Barbitu** – desenvolvido no “*Laboratoire LAB - Contrôle antidopage*” (França) este método foi adotado pelo LAD/JCB para a detecção das substâncias químicas classificadas como barbitúricos excretadas de forma livre nos fluidos biológicos, em meio ácido, por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas. O método é composto por três etapas: (i) extração em cartucho de fase sólida C18 por solvente orgânico; (ii) evaporação do solvente de eluição e (iii) retomada do resíduo obtido. Por intermédio desse método é possível detectar as seguintes cinco substâncias: barbital; butalbital; fenobarbital; pentobarbital e secobarbital.

**Método 5 – Método Cortico** – desenvolvido no próprio LAD/JCB, este método aplica-se à detecção das substâncias químicas classificadas como corticosteróides, excretadas nos fluidos biológicos em meio alcalino. O método utiliza a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detecção fotométrica. O método é composto por três etapas: (i) extração em cartucho de fase sólida por imunoafinidade por solvente orgânico; (ii) evaporação do solvente de eluição e (iii) retomada do resíduo obtido. Por intermédio desse método é possível detectar as seguintes oito substâncias: betametasona; dexametasona; flumetasona; fluocinolona; hidrocortisona; metilprednisolona; prednisolona e triancinolona.

**Método 6 – Método Hong-Kong 2** – desenvolvido no laboratório “*Hong Kong Jockey Club*” (Hong-Kong) este método aplica-se à detecção de esteróides anabolizantes excretadas nos fluidos biológicos por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas. O método é composto por quatro etapas: (i) hidrólise ácida; (ii) extração em cartuchos de fase sólida C18 e de sílica por solventes orgânicos; (iii) evaporação do solvente de eluição e (iv) derivação do

resíduo obtido. Por intermédio desse método é possível detectar as seguintes dezenove substâncias: 5 $\alpha$ -dihydrotestosterona; 17 $\alpha$ -estradiol; 17 $\beta$ -estradiol; androstanediol; androsterona; bolasterona; boldenona; dihidroandrosterona; epitestosterona; estanozolol; estranediol; estrenediol; estrone; metandriol; metiltestosterona; nandrolona; noretandrolona; testosterona e trembolona. No contexto de uma pesquisa de mestrado desenvolvida pela atual gerente do LAD/JCB (Tozzi, 2002), o presente método foi otimizado (etapas de extração de esteróides anabolizantes) e adotado como método de análise da atual rotina laboratorial.

**Método 7 – Elisa** – Métodos de Ensaio imunológicos adotados pelo LAD/JCB e comercializados pela empresa americana Neogen Corporation. Este método baseia-se na formação do complexo antígeno-anticorpo. Disponíveis na forma de “Kits” para triagem de uma única substância ou família de substâncias. Por intermédio desse método é possível detectar as seguintes famílias de substâncias: anfetaminas; barbitúricos; benzodiazepínicos;  *$\beta$ -agonists*; corticosteróides; furosemida; isoxsuprina; metilfenidato; opiáceos e triancinolona acetono.

**Método 8 – Methodes Alcalines Sur C18** –, desenvolvido no “*Laboratoire LAB - Contrôle antidopage*” (França), aplica-se à detecção de substâncias alcalinas excretadas livres nos fluidos biológicos por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas. Composto por quatro etapas: (i) hidrólise; (ii) extração em cartucho de fase sólida C18 por solvente orgânico; (iii) evaporação do solvente de eluição e (iv) retomada do resíduo obtido este método permite detectar as seguintes trinta e nove substâncias: acepromazina; benzidamina; benzocaína; bufotenina; bupivacaína; butorfanol; cafeína; celecoxibe; clorpromazina; diazepam; difenildramina; dipirona; efedrina; escopolamina; fenilbutazona; fenspirida; fentanil; hidroxina; imipramina; lidocaína; mefenesin; mepivacaína; metocarbamol; nimesulide reduzida; paracetamol; pentazocina; pentoxifilina; pirilamina; procaína; procainamida; promazina; propionilpromazina; salicilamida; teobromina; teofilina; tetracaína; trimetoprim; tripelnamina e xilazina.

Embora considerados métodos incorporados à rotina de laboratórios *antidoping* de outros países com tradição nas atividades turísticas e atuantes nas organizações internacionais afetas à essas atividades, cabe destacar que cada um desses métodos requer validação própria que deve ser realizada por

cada laboratório que o utiliza, já que o processo de validação deve estar adequado às condições locais do laboratório.

Dentre os oito métodos acima descritos e incorporados à prática laboratorial do LAD/JCB, apenas o **Método Hong-Kong 2** havia sido validado até a conclusão da presente pesquisa que modificou e validou um novo método para uso no LAD/JCB, a seguir caracterizado.

### 3.5.2. Proposição de um novo método adequado ao LAD/JCB

Após estudo da aplicabilidade e especificidades dos métodos acima caracterizados, foi possível conceber as bases conceituais que deveriam consubstanciar o desenvolvimento de um método próprio adequado às necessidades do LAD/JCB. Dentre as alternativas acima, o método que melhor se adequou para constituir-se em “método-fonte” para detecção da substância dopante mais comum (cafeína) na atividade turfística brasileira foi o “*Methode Alcalins Sur C18*” que, após adequação e validação passou a ser denominado **ALCAC-18**. Os próximos capítulos tratarão da caracterização da substância dopante cafeína e do desenvolvimento e validação desse método.