

AVALIAÇÃO POR CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS APLICADA A ESTEROIDES ANABOLIZANTES ANDROGÊNICOS APREENDIDOS PELA POLÍCIA FEDERAL

LUCAS BERNEIRA¹; SAMANTHA DE FREITAS¹; JULIA BALOTA¹; THAIS RODEGHIERO¹; MARCO DOS SANTOS¹; CLAUDIO DE PEREIRA²

¹*Universidade Federal de Pelotas, Grupo de Pesquisa Bioforense - lucas.berneira@hotmail.com*

²*Universidade Federal de Pelotas, Grupo de Pesquisa Bioforense – claudiochemistry@gmail.com*

1. INTRODUÇÃO

Os esteroides anabolizantes androgênicos (EAAs) compreendem uma classe de substâncias quimicamente derivadas da testosterona. Esses compostos são conhecidos devido ao seu uso ilícito por atletas e praticantes de atividades físicas, visto que, estão relacionados com aumento de performance esportiva e desenvolvimento muscular (MESMER e SATZGER, 1997). Todavia, o uso irrestrito de EAAs também está relacionado a uma série de efeitos colaterais que incluem danos no sistema cardiovascular, desenvolvimento de tumores no fígado além de danos físicos (NEVES et al, 2013).

O alto risco associado ao uso dessas substâncias levou diversos países como por exemplo o Brasil, Estados Unidos e Inglaterra a controlarem ou proibirem o uso de agentes anabólicos entre a população (WEBER et al, 2017). No entanto, o volume de apreensões de EAAs vem crescendo consideravelmente de forma que no Brasil, entre os anos de 2008 a 2011, houve um aumento de 200 % nas apreensões realizadas pela Polícia Federal (PF). Cabe também salientar que houve um aumento expressivo no número de anabolizantes falsificadas, os quais representam 33% dos produtos apreendidos (NEVES et al., 2013).

Na área forense, as formulações de EAAs apreendidas pela PF são analisadas a fim de determinar sua constituição química, servindo como prova pericial em processos jurídicos. Inicialmente, as amostras têm seu princípio-ativo extraído por métodos que envolvem extração líquido-líquido (ELL) ou assistida por banho ultrassônico (EABU) (COOPMAN e CORDONNIER, 2012; THEVIS et al., 2008). Todavia, outras formas de extração também se mostram proeminentes como a extração assistida por sonda ultrassônica (EASU) ou por micro-ondas (EAM). Usualmente a Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (GC-MS) é utilizada na detecção dos compostos extraídos (NEVES e CALDAS, 2017).

Nos processos que envolvem a análise de EAAs apreendidos, a extração é um dos passos mais importantes visto que essa etapa afeta os procedimentos posteriores e, assim, os resultados finais acerca de amostras em questão (GALESIO et al., 2011). Nesse contexto, o objetivo do trabalho foi avaliar formulações de EAAs apreendidas pela Polícia Federal de Pelotas, RS pelos métodos de extração líquido-líquido, assistida por banho ultrassônico, por sonda ultrassônica e por micro-ondas empregando Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas.

2. METODOLOGIA

As análises para avaliação dos métodos extractivos foram realizadas utilizando duas formulações oleosas, contendo ésteres de testosterona (Produto

#1) e cipionato de testosterona (Produto #2). As amostras foram cedidas pela Polícia Federal de Pelotas, RS através do convênio INCT Forense e foram previamente analisadas e identificadas através da biblioteca NIST 08. Os resultados representam a média \pm desvio padrão ($n=3$) de forma que foi utilizado uma curva analítica de calibração usando colesterol como padrão interno. Para a análise estatística foi realizada uma Análise de Variância com Teste de Tukey ($p<0.05$). As extrações utilizadas no trabalho seguem as metodologias descritas abaixo:

EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO

Foram utilizados na extração 25 μL do Produto #1 e 25 μL #2, separadamente, os quais foram inseridos em tubos *falcon* e extraídos com 5 mL de metanol sob agitação constante em um vórtex durante 10 min. Ao fim desse período, as amostras foram centrifugadas por 5 min e uma alíquota da camada superior foi injetada no GC-MS.

EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR BANHO ULTRASSÔNICO

A metodologia utilizada para EABU seguiu os procedimentos segundo NEVES e CALDAS, 2017, onde 25 μL do Produto #1 e 25 μL #2, separadamente, foram inseridos em tubos *falcon* e extraídos com 5 mL de metanol em um banho ultrassônico (Unique, modelo USC 1800A) durante 10 min sob temperatura ambiente. Ao fim desse período, as amostras foram centrifugadas por 5 min e uma alíquota da camada superior foi injetada diretamente no GC/MS.

EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR SONDA ULTRASSÔNICA

Na EASU foi utilizado 50 μL do Produto #1 e Produto #2, separadamente, os quais foram inseridos em tubos *falcon* e extraídos com 10 mL de metanol através de sonda ultrassônica (Sonics, modelo VC 505) durante 10 min sob temperatura ambiente e 20 Hz de amplitude. O volume de solvente foi reconstituído ao valor inicial em caso de perdas por volatilização. Ao fim desse período, as amostras foram centrifugadas por 5 min de forma que uma alíquota da camada superior foi injetada no GC-MS.

EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR MICRO-ONDAS

Foram inserido 25 μL do Produto #1 e Produto #2 em um balão e extraídos com 5 mL de metanol em um micro-ondas de sistema aberto (CEM, modelo Discover 9080005) durante 10 min com 150 W de potência e 55 °C de temperatura. O volume de solvente foi reconstituído ao valor inicial em caso de perdas por volatilização. Ao fim desse período, as amostras foram transferidas para tubos *falcon* e centrifugadas por 5 min de forma que uma alíquota da camada superior foi injetada no GC-MS.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com base na avaliação dos métodos de extração (**Tabela 1**), se pode verificar que geralmente houve diferenças significativas nas concentrações obtidas dos constituintes do Produto #1 e Produto #2 entre os procedimentos avaliados. No caso do Produto #1, se pode verificar que compostos com uma baixa concentração na formulação não apresentaram uma diferença significativa nos resultados, porém EAAs em maior concentração apresentaram variações significativas. Isso pode ser visto nos casos do caproato de testosterona com variação entre $2,16 \pm 0,08 \text{ mg.mL}^{-1}$ a $2,39 \pm 0,08 \text{ mg.mL}^{-1}$ e do decanoato de

testosterona que variou entre $3,15 \pm 0,13 \text{ mg.mL}^{-1}$ a $3,44 \pm 0,11 \text{ mg.mL}^{-1}$. Para o cipionato de testosterona (Produto #2) também houve uma variação significativa na concentração do princípio ativo apresentando variação entre $3,47 \pm 0,03 \text{ mg.mL}^{-1}$ a $4,09 \pm 0,04 \text{ mg.mL}^{-1}$ de acordo com o método de extração avaliado.

Tabela 1. Concentrações obtidas através da aplicação de diferentes formas de extração em formulações de EAAs.

Princípio-Ativo	Concentração (mg.mL^{-1})			
	ELL	EABU	EASU	EAM
Produto #1				
Propionato de testosterona	$1,39 \pm 0,02^{\text{a}}$	$1,40 \pm 0,01^{\text{a}}$	$1,45 \pm 0,00^{\text{a}}$	$1,50 \pm 0,03^{\text{a}}$
Isocaproato de testosterona	$0,81 \pm 0,00^{\text{a}}$	$0,81 \pm 0,00^{\text{a}}$	$0,82 \pm 0,00^{\text{a}}$	$0,82 \pm 0,00^{\text{a}}$
Caproato de testosterona	$2,16 \pm 0,08^{\text{a}}$	$2,17 \pm 0,04^{\text{a}}$	$2,28 \pm 0,03^{\text{ab}}$	$2,39 \pm 0,08^{\text{b}}$
Decanoato de testosterona	$3,15 \pm 0,13^{\text{a}}$	$3,15 \pm 0,04^{\text{a}}$	$3,31 \pm 0,07^{\text{b}}$	$3,44 \pm 0,11^{\text{b}}$
Fempropionato de testosterona	$1,98 \pm 0,08^{\text{a}}$	$2,07 \pm 0,04^{\text{ab}}$	$2,15 \pm 0,05^{\text{bc}}$	$2,24 \pm 0,05^{\text{c}}$
Produto #2				
Cipionato de testosterona	$3,47 \pm 0,03^{\text{a}}$	$3,74 \pm 0,06^{\text{b}}$	$4,09 \pm 0,04^{\text{c}}$	$4,08 \pm 0,07^{\text{c}}$

Extração Líquido-Líquido (ELL), Extração Assistida por Banho Ultrassônico (EABU), Extração Assistida por Sonda Ultrassônica (EASU), Extração Asssitiada por Micro-ondas (EAM). Sobreescritos diferentes em cada linha representam diferenças significativas.

Com base nos resultados expostos na **Tabela 1**, se pode observar que a ELL foi o procedimento menos efetivo para a extração de EAAs para os componentes do Produto #1 e Produto #2. Por sua vez, houve um aumento na recuperação dos analitos a partir da aplicação de alguma forma de energia como, por exemplo, através do uso do banho ultrassônico. Esse aumento na concentração pode ser explicada pelo fenômeno de cavitação gerado pelas ondas ultrassônicas ao interagirem com as amostras. Dessa forma, o analito pode migrar da sua matriz oleosa para o solvente extrator (GALESIO et al., 2011).

O uso de formas de extração mais eficientes observadas em EASU e EAM possibilitou um aumento substancial na recuperação dos constituintes do Produto #1 e Produto #2. Dentre as explicações para esse aumento na eficiência extrativa se deve a aplicação direta de ondas ultrassônicas ou de irradiação de micro-ondas sob a amostras de maneira que as perdas da energia assistida para o meio externo foram diminuídas. Dessa forma, a focalização da energia assistida permitiu uma maior interação e, consequentemente, extração pelo solvente orgânico. Esse fator foi essencial visto que os longas cadeias carbônicas presentes nos ésteres de testosterona aumentavam a afinidade dos constituintes pela sua matriz oleosa (GALESIO et al., 2011).

A avaliação de métodos de extração é bastante recorrente na literatura para várias classes de substâncias, no entanto para os EAAs, existe um número ínfimo de pesquisas que façam a comparação entre os procedimentos analíticos descritos. Dentre esses trabalhos, NEVES e CALDAS (2017) reportaram que houve um aumento de 5 % na recuperação de ésteres de testosterona, de nandrolona ou de trembolona com o uso de banho ultrassônico comparado a ELL.

Paralelamente, métodos que utilizam sonda ultrassônica ou irradiação de micro-ondas para a análise de formulações de EAAs também ainda não são recorrentes na literatura. Nesse sentido, somente existem trabalhos que avaliam esses procedimentos extractivos para a recuperação de agentes anabólicos em matrizes de urina e alimentos (BARREIRO et al., 2015; GALESIO et al., 2011). Segundo a literatura, estas energias assistidas podem ser efetivamente aplicadas a formulações de EAAs de forma a aumentar o rendimento da extração frente aos métodos convencionais (NEVES e CALDAS, 2017; COOPMAN e CORDONNIER, 2012).

4. CONCLUSÕES

Portanto, com base nos resultados obtidos, se pode verificar que formas de extração que se utilizaram de sonda ultrassônica ou de micro-ondas geralmente foram mais eficientes a métodos que empregavam banho ultrassônico ou extração líquido-líquido para as amostras avaliadas. Assim, se evidenciou que os procedimentos de extração afetam diretamente os resultados obtidos o que é essencial a fim de obter resultados adequados em uma análise forense.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARREIRO, R., REGAL, P., DIAZ-BAO, M., FENTE, C. A., CEPEDA, A. Analysis of naturally occurring steroid hormones in infant formulas by HPLC-MS/MS and contribution to dietary intake. **Foods**, v.4, n.4, 605-621, 2015.
- COOPMAN, V., CORDONNIER, C.V., Counterfeit drugs and pharmaceutical preparations seized from the black market among bodybuilders. **Annales de Toxicologie Analytique**, v.24, n.1, 73–80, 2012.
- GALESIO, M., MAZZARINO, M., DE LA TORRE, X., BOTRÉ, F., CAPELO, J.L. Accelerated sample treatment for screening of banned doping substances by GC-MS: ultrasonication versus microwave energy. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 399, n. 2, p. 861-875, 2011.
- MESMER, M.Z., SATZGER, R.D. Determination of anabolic steroids by HPLC with UV-vis-particle beam mass spectrometry. **Journal of Chromatographic Science**, v.35, n.1, 38-42, 1997.
- NEVES, D.B.J., CALDAS, E.D. GC-MS quantitative analysis of black market pharmaceutical products containing anabolic androgenic steroids seized by the Brazilian Federal Police, **Forensic Science International**, v. 275, n. 1, 272–281, 2017.
- NEVES, D.B.J., MARCHETI, R.G.A., CALDAS, E.D. Incidence of anabolic steroid counterfeiting in Brazil, **Forensic Science International**, v. 228, n.1, e81–e83, 2013.
- THEVIS, M., SCHRADER, Y., THOMAS, A., SIGMUND, G., GEYER, H., SCHANZER, W. Analysis of confiscated black market drugs using chromatographic and mass spectrometric approaches. **Journal of Analytical Toxicology**, v.32, n.3, 232-240, 2008.