

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
CENTRO DE CIÊNCIAS MATEMÁTICAS E DA NATUREZA
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

BRUNA DE JESUS LABANCA

**AVALIAÇÃO DA EXCREÇÃO URINÁRIA DO LETROZOL E SEU
EFEITO NO PERFIL ESTEROIDAL ENDÓGENO**

**RIO DE JANEIRO
2015**

BRUNA DE JESUS LABANCA

**AVALIAÇÃO DA EXCREÇÃO URINÁRIA DO LETROZOL E SEU
EFEITO NO PERFIL ESTEROIDAL ENDÓGENO**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como
requisito parcial para a obtenção do título de
Mestre em Ciências (Química)

Orientadora: Dra. Monica Costa Padilha

**Rio de Janeiro
2015**

L112

Labanca, Bruna de Jesus.

Avaliação da excreção urinária do letrozol e seu efeito no perfil esteroidal endógeno / Bruna de Jesus Labanca – Rio de Janeiro : UFRJ, 2015.
130 f.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Química, 2015.

Orientadora: Monica Costa Padilha

1. Cromatografia gasosa. 2. Letrozol. 3. Aromatase - Inibidores. 4. Espectrometria de massas. I. Padilha, Monica Costa. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Instituto de Química. Programa de Pós-Graduação em Química. III. Título.

CDD 543.85

BRUNA DE JESUS LABANCA

**AVALIAÇÃO DA EXCREÇÃO URINÁRIA DO LETROZOL E SEU
EFEITO NO PERFIL ESTEROIDAL ENDÓGENO**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como
requisito parcial para a obtenção do título de
Mestre em Ciências (Química)

Aprovada em: ____/____/____

Prof^a. Dra. Monica Costa Padilha (Presidente) - DQA/IQ/UFRJ

Prof. Dr. Henrique Marcelo Gualberto Pereira - DQA/IQ/UFRJ

Prof^a. Dra. Valéria Pereira de Sousa - FF/UFRJ

Dedicatória

*Dedico este trabalho
à minha amada e eterna Família, que é e sempre será a minha base.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, ao meu Deus por sempre me iluminar, me dar forças para ultrapassar algumas difíceis barreiras da vida, e assim me permitir concluir o mestrado!

À minha família, em especial aos meus pais, Eliane e Miguel, que sempre estiveram comigo, me amando, respeitando e apoiando as minhas decisões. À minha avó Naiza que é o meu maior orgulho e exemplo a seguir. À minha irmã e cunhado, Priscila e Fábio pelos momentos de descontração e incentivo. Aos meus tios Wilma e Gilson que mesmo distantes estão tão próximos de mim.

À Professora Monica Costa Padilha, que além de ser minha orientadora e chefe, se tornou uma pessoa muito especial. Obrigada por ter me ajudado e ter ficado ao meu lado no momento em que eu mais precisei. Serei eternamente grata!

À toda força de trabalho do LBCD, em especial aos Professores Francisco Radler e Henrique Pereira por terem me ajudado em momentos em que eu precisei e por permitirem que eu desenvolvesse meu trabalho muitas vezes no horário do expediente. É um imenso orgulho fazer parte desta equipe.

À Professora Paula Aguiar por dividir seus conceitos de estatística comigo com tanto carinho e boa vontade e desta forma ter incrementado meu trabalho. Suas sugestões foram excelentes!

À todos os parceiros da triagem IV, Gustavo, Luis Felipe, Lucas, Leonardo, Rafael, Márcio, Juliana, Rodolfo e Daniela por terem me ajudado em alguma etapa e por compreenderem os momentos que eu estava ausente no laboratório. Além desses, não posso deixar de mencionar o trio Felipe, Mariana e Natasha, que além de me ajudarem tanto dentro do laboratório, quanto fora, fazem os meus dias serem muito mais divertidos.

Aos meus amigos da vida, em especial Adriana, Thais, Lidiane, Joyce, Sanair, Ronaldo e Fábio pela amizade, carinho e momentos de alegria.

Aos meus voluntários que com muita boa vontade tomaram um comprimido de Femara cujo princípio ativo é o letrozol e me permitiram desenvolver esse trabalho. Muito obrigada!!!

À todos que contribuíram indiretamente para a conclusão não só dessa dissertação, mas do Mestrado em si.

*“Errando para aprender; Se decepcionando para se proteger; Se machucando para crescer;
Chorando para sorrir; A gente cai uma vez, para aprender a se levantar em outra. No fim,
tudo que for bom, verdadeiro, tudo o que realmente nos fizer bem, permanece.”*
(Tati Bernadi)

RESUMO

LABANCA, Bruna de J. **Avaliação da excreção urinária do Letrozol e seu efeito no perfil esteroideal endógeno**. Rio de Janeiro, 2015. Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2015.

O letrozol (1-(Bis-(4-cianofenil)metil)-1,2,4-triazol) é um fármaco classificado como inibidor de aromatase não esteroideal usado no tratamento de câncer de mama de mulheres na pós-menopausa. A principal forma de eliminação do letrozol é através do carbinol (Bis-(4-cianofenil) metanol), metabólito farmacologicamente inativo, e do triazol. No âmbito do controle de dopagem, os inibidores de aromatase e outros fármacos antiestrogênicos são utilizados por atletas de alto rendimento com a finalidade de minimizar os efeitos colaterais causados pelo excesso de esteróides anabólicos, uma vez que estes são utilizados para aumentar a força física e a massa muscular. O efeito colateral mais indesejável é a ginecomastia, que é o crescimento das mamas nos homens. Esse efeito, além do aumento da retenção de água e de gordura, é causado devido ao elevado nível de estrogênio circulante, substrato da enzima aromatase. Como consequência dessa estratégia usada pelos atletas, o uso de inibidores de aromatase foi proibido pelo Comitê Olímpico Internacional e pela Agência Mundial Antidopagem, tanto para atletas masculinos quanto para femininos, desde setembro de 2001 e janeiro de 2005, respectivamente; permanecendo com esse status até os dias de hoje. De acordo com o documento técnico da WADA de 2014, os inibidores de aromatase são substâncias que não precisam de quantificação. Porém, o limite mínimo de desempenho requerido (LMDR) para identificação (análise qualitativa) pelos laboratórios acreditados é 20 ng/mL. O objetivo do presente trabalho foi avaliar a cinética de excreção do metabólito do letrozol e verificar o efeito da ingestão do letrozol no perfil esteroideal endógeno. Foram realizados estudos de excreção após a administração de uma dose de 2,5 mg do medicamento Femara de cinco voluntários do sexo masculino com peso corporal em torno de 80 Kg. Foram observadas alterações nos níveis de testosterona, epitestosterona, androsterona, etiocolanolona, 5alfa-diol e 5beta-diol após a ingestão da dose. Além disso, foi avaliada a extração líquido-líquido frente à diferentes solventes, o tempo de hidrólise necessário para a desconjugação do metabólito glicoconjugado carbinol e algumas figuras de mérito de validação qualitativa. A técnica instrumental de detecção utilizada foi a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas com analisador de massas triplo quadrupolo.

Palavras-chave: Letrozol; Aromatase, Inibidores de Aromatase, Cromatografia Gasosa, Espectrometria de Massas.

ABSTRACT

LABANCA, Bruna de J. **Estudo de excreção urinária do Letrozol e o seu efeito no perfil esteroide endógeno**. Rio de Janeiro, 2015. Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2015.

Letrozole ((1-(bis-4-cyanophenyl)methyl)-1,2,4-triazole) is a drug classified as nonsteroidal aromatase inhibitor and it is used in breast cancer treatment for women in postmenopause. A main form of elimination of letrozole is in carbinol form, inactive pharmacologically metabolite, and in triazole form. In doping control, aromatase inhibitors and others antiestrogenic drugs are used by high-level athletes to minimize side effects caused by anabolic steroids excess, since these are used to increase physical strength and muscle mass. The most undesirable side effect is gynecomastia, which is the growth of breasts in men. This effect, besides the increased water retention and fat, is caused due to the high level of circulating estrogen, aromatase's substrate. As a result of this strategy used by athletes, the use of aromatase inhibitors has been prohibited by the International Olympic Committee and the World Anti-Doping Agency; both for male and female athletes, since September 2001 and January 2005, respectively, remain on this status until today. According to the WADA Technical Document 2014, aromatase inhibitors are substances that do not require quantification. However, the minimum required performance limit (MRPL) for identification (qualitative analysis) by laboratories accredited by WADA is 20 ng/mL. The objective of this study was to evaluate the excretion kinetics of elimination of letrozole metabolite and verify the effect of letrozol cause in endogenous steroids profile. Excretion studies were used after administration of a dose of 2.5mg Femara for five male volunteers with a body weight around 80 kg. Changes in the testosterone, epitestosterone, androsterone, etiocholanolone, 5alpha-diol and 5beta-diol levels were observed after ingestion of the dose. In addition, liquid-liquid extraction front of different solvents, hydrolysis time for deconjugation of metabolite glicoconjugated carbinol and some partial validation parameters were evaluated. The detection instrumental technique used was gas chromatography coupled to mass spectrometry with triple quadrupole mass analyzer.

Keywords: Letrozole; Aromatase; Aromatase inhibitors, Gas Chromatography, Mass Spectrometry.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Taxa de mortalidade por câncer de mama feminina, específica por faixas etárias, por 100000 mulheres. Brasil, 1990-2012 (INCA, 2015).	23
Figura 2: Estrutura química de alguns agentes com ação antiestrogênica.	25
Figura 3: Reação de conversão da androstenodiona em estrona e da testosterona em estradiol.	26
Figura 4: Biossíntese dos neuroesteróides 3 α -androstano diol e 17 β -estradiol a partir da testosterona (REDDY, 2004).....	29
Figura 5: Estatística de 2014 dos resultados analíticos adversos da classe S4 (Retirado na íntegra de AMA - ADAMS, 2013).....	31
Figura 6: Metabolismo do letrozol em humanos (PRECHT <i>et al.</i> , 2012).....	32
Figura 7: Espectro de massas e fragmentação do metabólito do letrozol, bis-4-cianofenilmetanol (Retirado na íntegra de MARECK <i>et al.</i> , 2005).....	34
Figura 8: Biossíntese e metabolismo dos esteróides endógenos (Retirado na íntegra de MARQUES <i>et al.</i> , 2003).	40
Figura 9: Esquema da ionização e dissociação de compostos ácidos e básicos.....	50
Figura 10: Estrutura do MSTFA, N-metil-N-trimetilsilil-trifluoroacetamida.	52
Figura 11: Mecanismo de Reação proposto para a formação do Iodeto de trimetilsilila (VAN DE KERKHOFF, 2001).....	53
Figura 12: Exemplo de reação de sililação dos esteróides (VAN DE KERKHOFF, 2001).....	53
Figura 13: Esquema da coleta das urinas dos voluntários.	69
Figura 14: Cromatograma de íons totais do extrato metanólico do comprimido Femara.	78
Figura 15: Espectro de massas do pico A.....	79
Figura 16: Espectro de massas do pico B - letrozol.	79
Figura 17: Proposta de fragmentação do letrozol.....	80
Figura 18: Espectro de massas do pico C.	81
Figura 19: Esquema de fragmentação do carbinol bis-TMS.	82
Figura 20: Esquema de fragmentação da metiltestosterona bis-TMS.	83
Figura 21: Estudo de excreção total do carbinol dos cinco voluntários.....	87
Figura 22: Estudo de excreção dos cinco voluntários até 240 h após à ingestão do comprimido.....	87
Figura 23: Cromatograma de íons totais da amostra Let Vol B 24, coletada após 449 horas à ingestão do comprimido.	89

Figura 24: Espectro de massas do pico referente ao metabólito carbinol na amostra LetVolB24.	89
Figura 25: Concentração dos endógenos no estudo de excreção do voluntário A.	93
Figura 26: Razão da Testosterona / Epitestosterona do voluntário A.	95
Figura 27: Concentração dos endógenos no estudo de excreção do voluntário B.	96
Figura 28: Razão da testosterona / Epitestosterona do voluntário B.	98
Figura 29: Concentração dos endógenos no estudo de excreção do voluntário C.	100
Figura 30: Razão da testosterona / Epitestosterona do voluntário C.	102
Figura 31: Concentração dos endógenos no estudo de excreção do voluntário D.	103
Figura 32: Razão da testosterona / Epitestosterona do voluntário D.	105
Figura 33: Concentração dos endógenos no estudo de excreção do voluntário E.	106
Figura 34: Razão da testosterona / Epitestosterona do voluntário E.	108
Figura 35: Cromatograma de íons totais e o cromatograma de íons extraídos para as transições m/z 291 \rightarrow m/z 160 e m/z 291 \rightarrow m/z 217, respectivamente do BU do voluntário A.	110
Figura 36: Cromatograma de íons totais e o cromatograma de íons extraídos para as transições m/z 291 \rightarrow m/z 160 e m/z 291 \rightarrow m/z 217, respectivamente do BU do voluntário B.	111
Figura 37: Cromatograma de íons totais e o cromatograma de íons extraídos para as transições m/z 291 \rightarrow m/z 160 e m/z 291 \rightarrow m/z 217, respectivamente do BU do voluntário C.	112
Figura 38: Cromatograma de íons totais e o cromatograma de íons extraídos para as transições m/z 291 \rightarrow m/z 160 e m/z 291 \rightarrow m/z 217, respectivamente do BU do voluntário D.	113
Figura 39: Cromatograma de íons totais e o cromatograma de íons extraídos para as transições m/z 291 \rightarrow m/z 160 e m/z 291 \rightarrow m/z 217, respectivamente do BU do voluntário E.	114
Figura 40: Cromatograma de íons totais e o cromatograma de íons extraídos para as transições m/z 291 \rightarrow m/z 160 e m/z 291 \rightarrow m/z 217, respectivamente de uma urina positiva de letrozol (Estudo de excreção)	116
Figura 41: Cromatograma de íons totais e o cromatograma de íons para as transições m/z 291 \rightarrow m/z 160 e m/z 291 \rightarrow m/z 217, respectivamente de um branco de urina fortificado com 100 ng/mL do carbinol.	117
Figura 42: Cromatograma de íons totais e o cromatograma de íons para as transições m/z 291 \rightarrow m/z 160 e m/z 291 \rightarrow m/z 217, respectivamente de uma amostra controle contendo todos os analitos monitorados por CG-QqQ.	118
Figura 43: Região considerada representativa do ruído para cálculo da razão sinal / ruído ..	122
Figura 44: Razão da área do Carbinol / área da Metiltestosterona em diferentes tempos de hidrólise.	129

LISTA DE TABELAS

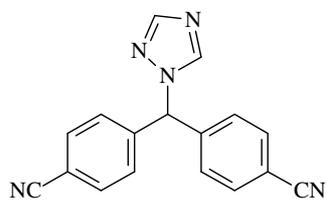
Tabela 1: Exemplos de alguns inibidores de aromatase, classificados quanto à estrutura e à cronologia de síntese.	27
Tabela 2: Potencial dos inibidores de aromatase e supressão estrogênica (Retirado na íntegra de HEROLD E BLACKWELL, 2008).....	28
Tabela 3: Resumo do procedimento experimental de alguns trabalhos encontrados na literatura.....	35
Tabela 4: Resumo do procedimento experimental de alguns trabalhos encontrados na literatura (continuação).....	36
Tabela 5: Resumo do procedimento experimental de alguns trabalhos encontrados na literatura (continuação).....	37
Tabela 6: Resumo do procedimento experimental de alguns trabalhos encontrados na literatura (continuação).....	38
Tabela 7: Processos microssômicos de biotransformação (Retirada na íntegra de BARREIRO e FRAGA, 2001).	45
Tabela 8: Principais processos não-microssômicos de biotransformação (Retirada na íntegra de BARREIRO e FRAGA, 2001).	46
Tabela 9: Principais reações de conjugação envolvidas no metabolismo de fármacos (Retirada na íntegra de BARREIRO e FRAGA, 2001).....	47
Tabela 10: Pureza os padrões analíticos utilizados.	65
Tabela 11: Concentração das substâncias na solução de padrão interno ISTD2.....	67
Tabela 12: Relação do analito alvo e a substância considerada padrão interno e as transições monitoradas.	67
Tabela 13: Condições da análise cromatográfica de CG-EM.....	70
Tabela 14: Condições da análise cromatográfica de CG-QqQ.....	72
Tabela 15: Esquema das análises feitas no planejamento experimental.	75
Tabela 16: Esquema de análises para avaliação do rendimento de extração.....	77
Tabela 17: Áreas do analito (Carbinol) e do padrão interno (Metiltestosterona) das análises realizadas com MTBE, MTBE:AcEt e AcEt usando e não usando NaCl.	85
Tabela 18: Valores das áreas e concentração do calibrante CAL Endo.	92
Tabela 19: Comparação da concentração dos endógenos no BU e na urina coletada após 143 horas à ingestão do comprimido do voluntário A e a porcentagem de aumento.....	94

Tabela 20: Comparação da concentração dos endógenos no BU e na urina coletada após 143 horas à ingestão do comprimido do voluntário B e a porcentagem de aumento.	97
Tabela 21: Comparação da concentração dos endógenos no BU e na urina mais concentrada do voluntário C e a porcentagem de aumento.	101
Tabela 22: Comparação da concentração dos endógenos no BU e na urina coletada após 215,5 horas à ingestão do comprimido do voluntário D e a porcentagem de aumento.	104
Tabela 23: Comparação da concentração dos endógenos no BU e na urina mais concentrada do voluntário E e a porcentagem de aumento.	107
Tabela 24: Valores das áreas do carbinol e da metiltestosterona e a razão entre elas, média e desvio padrão dos valores para repetibilidade (50 ng/mL).	119
Tabela 25: Valores das áreas do carbinol e da metiltestosterona e a razão entre elas, média e desvio padrão dos valores para repetibilidade (20 ng/mL).	120
Tabela 26: Valores das áreas do carbinol e da metiltestosterona e a razão entre elas, média e desvio padrão dos valores para repetibilidade (10 ng/mL).	120
Tabela 27: Valores das áreas do carbinol e da metiltestosterona e a razão entre elas, média e desvio padrão dos valores para repetibilidade (5 ng/mL).	121
Tabela 28: Valores de sinal/ruído no LD.	122
Tabela 29: Valores das áreas do carbinol e da metiltestosterona e a razão entre elas no rendimento de extração (50 ng/mL).	124
Tabela 30: Valores das áreas do carbinol e da metiltestosterona e a razão entre elas no rendimento de extração (20 ng/mL).	125
Tabela 31: Valores das áreas do carbinol e da metiltestosterona e a razão entre elas no rendimento de extração (10 ng/mL).	126
Tabela 32: Valores das áreas do carbinol e da metiltestosterona e a razão entre elas no rendimento de extração (5 ng/mL).	127
Tabela 33: Valores das áreas do carbinol e da metiltestosterona e a razão entre elas no rendimento de extração (2,5 ng/mL).	128
Tabela 34: Razão da área do Carbinol / área da Metiltestosterona para diferentes tempos de hidrólise.	129

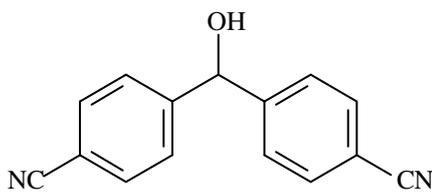
LISTA DE ABREVIACOES E SIGLAS

AcEt	Acetato de Etila
AMA	Agência Mundial Antidopagem
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BR	Branco de reagente
BU	Branco de urina
CG-EM	Cromatografia Gasosa - Espectrometria de Massas
CG-EM/EM	Cromatografia Gasosa- Espectrometria de Massas/Espectrometria de Massas
CG-QqQ	Cromatografia Gasosa - Triplo quadrupolo
CL-EM/EM	Cromatografia Líquida- Espectrometria de Massas/Espectrometria de Massas
COI	Comitê Olímpico Internacional
DIC	<i>Collision-induced dissociation</i>
DPR	Desvio Padrão Relativo
EAA	Esteróides anabólicos androgênicos
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
INCA	Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
ISO	<i>International Standard Organization</i>
LBCD	Laboratório Brasileiro de Contole de Dopagem
LD	Limite de deteco
LHRH	<i>Lutenizing hormone releasing hormone</i>
LQ	Limite de quantificao
<i>m/z</i>	Massa/carga
MRM	Monitoramento de reaes múltiplas
MRPL	<i>Minimum Required Performance Levels</i>
MSTFA	N-metil-N-trimetilsililtrifluoracetamida
MTBE	Metil- <i>terc</i> -butil ter
NaCl	Cloreto de sódio
SERM	Moduladores seletivos do receptor de estrogênio
TMS	Trimetilsilil
TMSI	Iodeto de trimetilsilila
WADA	<i>World Anti-Doping Agency</i>

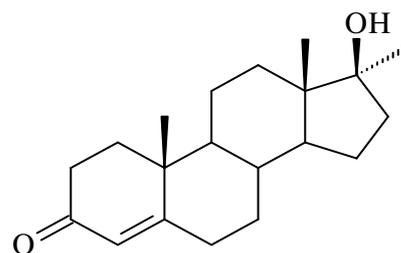
ESTRUTURA DOS COMPOSTOS CITADOS



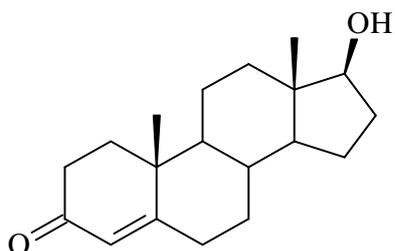
Letrozol



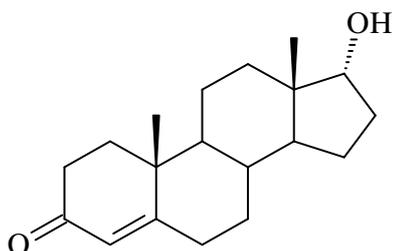
Carbinol



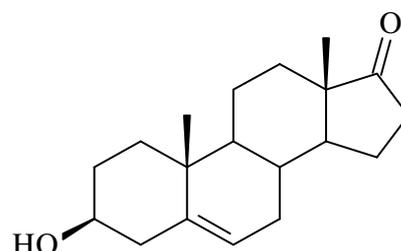
Metilttestosterona



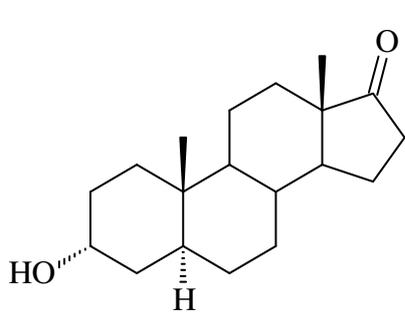
Testosterona



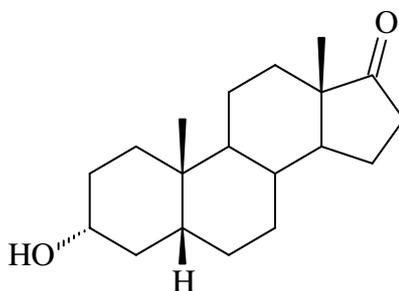
Epitesterona



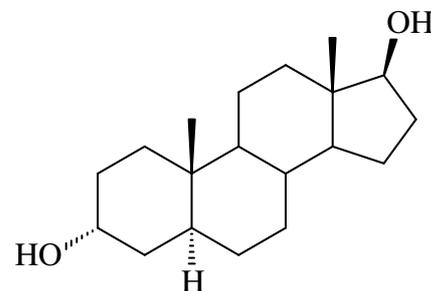
Prasterona



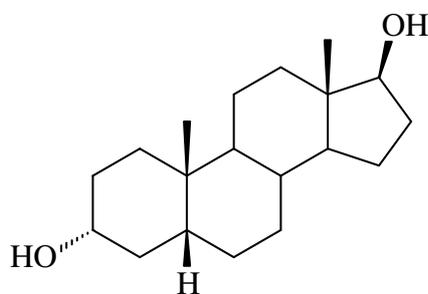
Androsterona



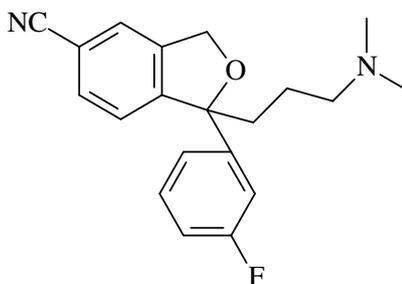
Etiocolanolona



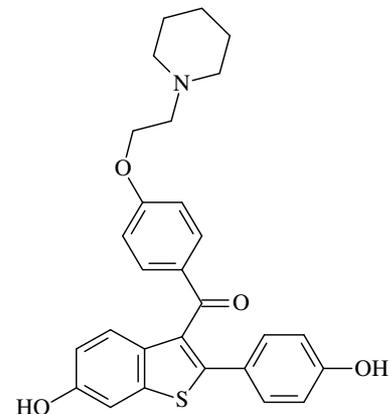
5α-androstanodiol



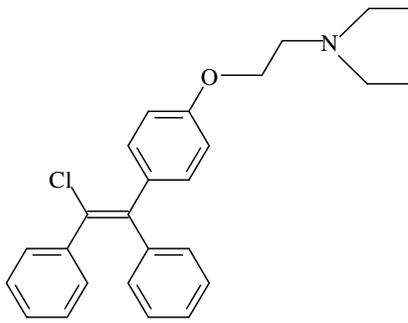
5β-androstanodiol



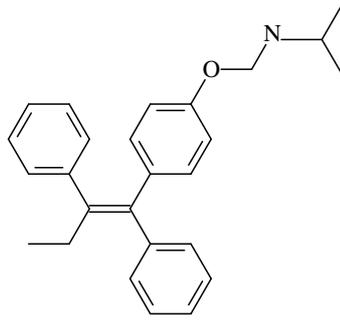
Citalopram



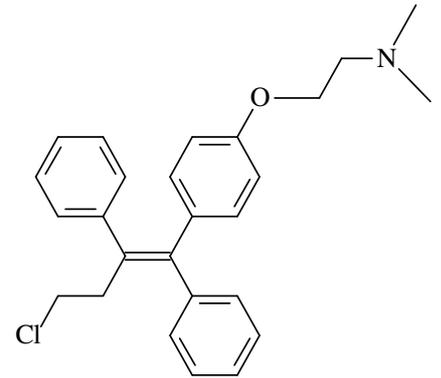
Raloxifeno



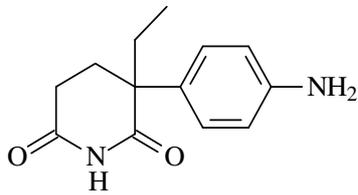
Clomifeno



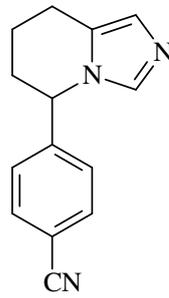
Tamoxifeno



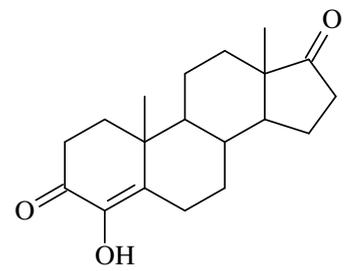
Toremifeno



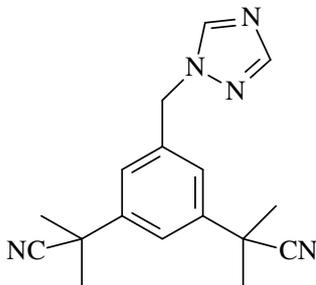
Aminoglutetimida



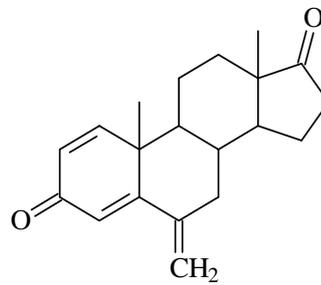
Fadrozol



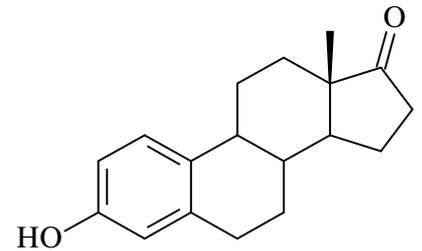
Formestano



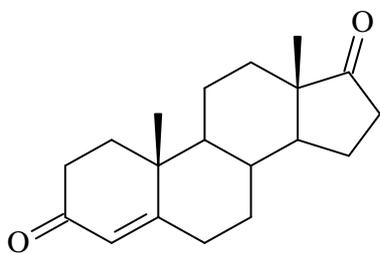
Anastrozol



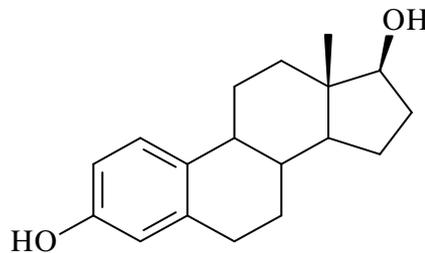
Exemestano



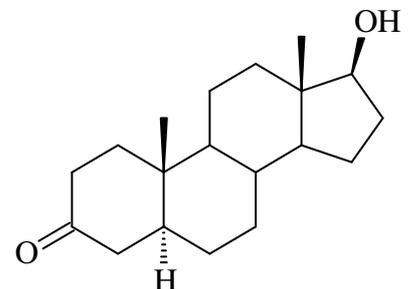
Estrona



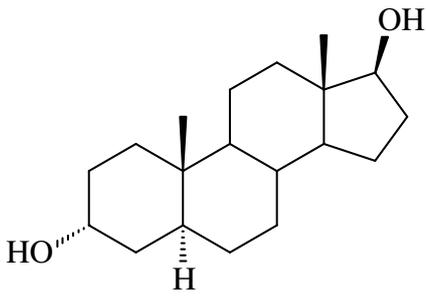
Androstenediona



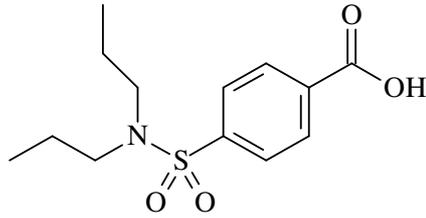
Estradiol



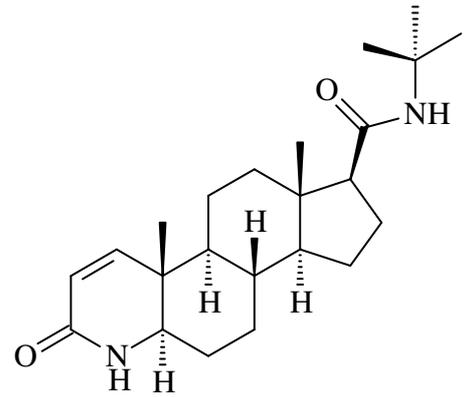
5α-dihidrotestosterona



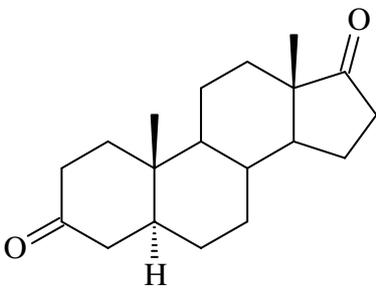
3α-androstanodiol



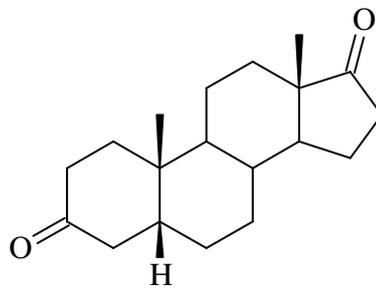
Probenecida



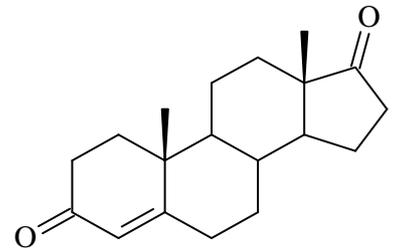
Finasterida



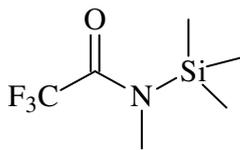
5α-androstanodiona



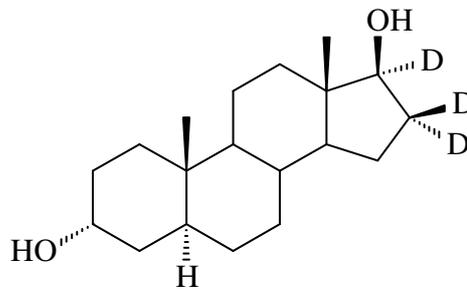
5β-androstanodiona



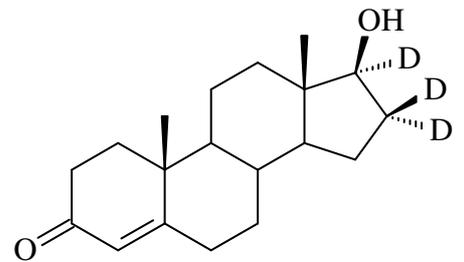
4-androstenodiona



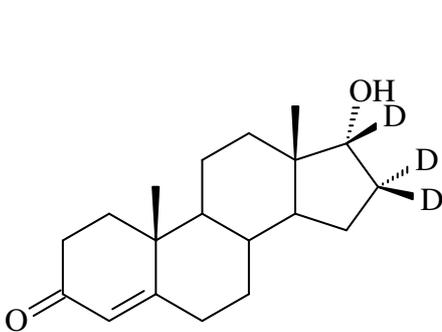
MSTFA



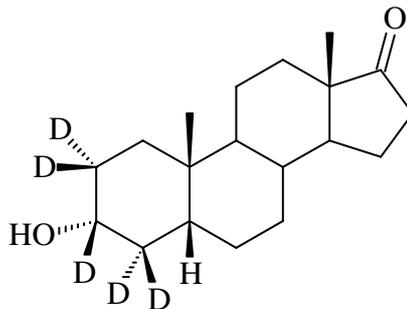
5α-androstanodiol-D3



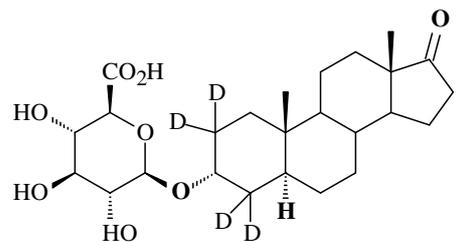
Testosterona-D3



Epitesterona-D3



Etiocolanolona-D5



Androsterona Glicuronídeo-D4

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	22
1.1.	CÂNCER	22
1.2.	TRATAMENTOS DO CÂNCER - HORMONIOTERAPIA.....	23
1.3.	INIBIDORES DA AROMATASE	25
1.4.	INIBIDORES DA AROMATASE NO CONTROLE DE DOPAGEM NO ESPORTE	30
1.5.	LETROZOL E SUA IDENTIFICAÇÃO.....	32
1.6.	PERFIL ESTEROIDAL ENDÓGENO	39
2	OBJETIVOS.....	43
2.1.	OBJETIVO GERAL.....	43
2.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	43
3	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	44
3.1.	NOÇÕES BÁSICAS DO METABOLISMO DE FÁRMACOS	44
3.1.1.	PRIMEIRA FASE DO METABOLISMO - FASE I.....	44
3.1.2.	SEGUNDA FASE DO METABOLISMO - FASE II	46
3.2.	PREPARO DE AMOSTRA.....	47
3.2.1.	HÍDROLISE	48
3.2.2.	EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO.....	49
3.2.3.	EXTRAÇÃO POR FASE SÓLIDA	51
3.2.4.	DERIVATIZAÇÃO	52
3.3.	CROMATOGRAFIA.....	53
3.3.1.	CROMATOGRAFIA GASOSA	54
3.4.	ESPECTROMETRIA DE MASSAS.....	55
3.4.1.	Técnica de Ionização	56
3.4.1.1.	Ionização eletrônica:.....	56
3.4.2.	Analisadores de Massas.....	56
3.4.2.1.	Quadrupolo único (<i>single</i> quadrupolo):	56
3.4.2.2.	Tripo quadrupolo:.....	57
3.4.3.	Experimentos em Espectrometria de massas em série (EM-EM)	57
3.4.3.1.	Varredura do íon produto:	58
3.4.3.2.	Varredura do íon precursor:	58
3.4.3.3.	Varredura de perda de fragmento neutro:.....	58
3.4.3.4.	Monitoramento Seletivo de Reações (MSR) e Monitoramento de Reações Multiplas (MRM):.....	58

3.5.	PADRÃO INTERNO	59
3.6.	PLANEJAMENTO DE EXPERIMENTOS	60
3.7.	FIGURAS DE MÉRITO DE VALIDAÇÃO QUALITATIVA	61
3.7.1.	Seletividade	62
3.7.2.	Repetibilidade.....	62
3.7.3.	Limite de detecção (LD).....	63
3.7.4.	Rendimento de extração	63
4	METODOLOGIA	64
4.1.	SOLVENTES E REAGENTES QUÍMICOS	64
4.1.1.	Solventes	64
4.1.2.	Reagentes.....	64
4.2.	EQUIPAMENTOS	65
4.3.	PREPARO DE SOLUÇÕES	66
4.3.1.	Soluções tampões	66
4.3.1.1.	Solução tampão fosfato de sódio 0,8M (pH 7):.....	66
4.3.1.2.	Solução tampão carbonato: bicarbonato de potássio 20% (pH 10):.....	66
4.3.2.	Solução derivatizante.....	66
4.3.2.1.	Solução mãe (MSTFA:NH ₄ :2-mercaptoetanol)	66
4.3.2.2.	Solução de uso (MSTFA:NH ₄ :2-mercaptoetanol).....	66
4.3.3.	Solução de padrão interno ISTD2	67
4.3.4.	Solução do padrão interno metiltestosterona.....	68
4.3.5.	Branco de urina (BU) e Branco de reagente (BR).....	68
4.4.	LETROZOL.....	68
4.4.1.	Extrato Metanólico de um comprimido.....	68
4.5.	AMOSTRAS DE URINA DE EXCREÇÃO	68
4.6.	PREPARO DAS AMOSTRAS.....	69
4.7.	CONDIÇÕES DE ANÁLISE CROMATOGRÁFICA.....	70
4.8.	PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL - EXTRAÇÃO	74
4.9.	FIGURAS DE MÉRITO DE VALIDAÇÃO QUALITATIVA	75
4.9.1.	Seletividade	75
4.9.2.	Repetibilidade.....	76
4.9.3.	Limite de detecção.....	76
4.9.4.	Rendimento da extração	76
4.10.	CINÉTICA DE HIDRÓLISE	77

5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	78
5.1.	EXTRATO METANÓLICO DO COMPRIMIDO	78
5.2.	IDENTIFICAÇÃO DO CARBINOL (METABÓLITO DO LETROZOL) E DA METILTESTOSTERONA (PADRÃO INTERNO)	81
5.3.	PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL - EXTRAÇÃO	83
5.4.	ESTUDOS DE EXCREÇÃO.....	86
5.4.1.	Avaliação das urinas de excreção - Carbinol.....	86
5.4.2.	Análise do Perfil Endógeno.....	91
5.4.2.1.	Voluntário A.....	92
5.4.2.2.	Voluntário B.....	96
5.4.2.3.	Voluntário C.....	99
5.4.2.4.	Voluntário D.....	103
5.4.2.5.	Voluntário E.....	106
5.5.	FIGURAS DE MÉRITO DE VALIDAÇÃO QUALITATIVA	109
5.5.1.	Seletividade	109
5.5.2.	Repetibilidade.....	119
5.5.2.1.	Controle em 50 ng/mL	119
5.5.2.2.	Controle em 20 ng/mL (LMDR)	120
5.5.2.3.	Controle em 10 ng/mL	120
5.5.2.4.	Controle em 5 ng/mL	121
5.5.3.	Limite de Detecção.....	121
5.5.4.	Rendimento de extração	123
5.5.4.1.	Controle em 50 ng/mL	123
5.5.4.2.	Controle em 20 ng/mL (LMDR)	125
5.5.4.3.	Controle em 10 ng/mL	126
5.5.4.4.	Controle em 5 ng/mL	127
5.5.4.5.	Controle em 2,5 ng/mL	128
5.6.	CINÉTICA DE HIDRÓLISE	129
6	CONCLUSÕES	131
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	132
8	ANEXOS	142
8.1.	VALORES DAS ÁREAS DO ESTUDO DE EXCREÇÃO DO VOLUNTÁRIO A:.....	143
8.2.	VALORES DAS ÁREAS DO ESTUDO DE EXCREÇÃO DO VOLUNTÁRIO B:.....	143
8.3.	VALORES DAS ÁREAS DO ESTUDO DE EXCREÇÃO DO VOLUNTÁRIO C:.....	144
8.4.	VALORES DAS ÁREAS DO ESTUDO DE EXCREÇÃO DO VOLUNTÁRIO D:.....	144

8.5.	VALORES DAS ÁREAS DO ESTUDO DE EXCREÇÃO DO VOLUNTÁRIO E:	145
8.6.	CONCENTRAÇÕES DOS ENDÓGENOS E RAZÃO TEST/EPI DO ESTUDO DE EXCREÇÃO DO VOLUNTÁRIO A:	146
8.7.	CONCENTRAÇÕES DOS ENDÓGENOS E RAZÃO TEST/EPI DO ESTUDO DE EXCREÇÃO DO VOLUNTÁRIO B:.....	147
8.8.	CONCENTRAÇÕES DOS ENDÓGENOS E RAZÃO TEST/EPI DO ESTUDO DE EXCREÇÃO DO VOLUNTÁRIO C:.....	148
8.9.	CONCENTRAÇÕES DOS ENDÓGENOS E RAZÃO TEST/EPI DO ESTUDO DE EXCREÇÃO DO VOLUNTÁRIO D:	150
8.10.	CONCENTRAÇÕES DOS ENDÓGENOS E RAZÃO TEST/EPI DO ESTUDO DE EXCREÇÃO DO VOLUNTÁRIO E:.....	151
8.11.	CONCENTRAÇÕES CORRIGIDAS DOS ENDÓGENOS E DENSIDADE E pH DAS URINAS DO ESTUDO DE EXCREÇÃO DO VOLUNTÁRIO A.....	152
8.12.	CONCENTRAÇÕES CORRIGIDAS DOS ENDÓGENOS E DENSIDADE E pH DAS URINAS DO ESTUDO DE EXCREÇÃO DO VOLUNTÁRIO B	153
8.13.	CONCENTRAÇÕES CORRIGIDAS DOS ENDÓGENOS E DENSIDADE E pH DAS URINAS DO ESTUDO DE EXCREÇÃO DO VOLUNTÁRIO C	154
8.14.	CONCENTRAÇÕES CORRIGIDAS DOS ENDÓGENOS E DENSIDADE E pH DAS URINAS DO ESTUDO DE EXCREÇÃO DO VOLUNTÁRIO D.....	155
8.15.	CONCENTRAÇÕES CORRIGIDAS DOS ENDÓGENOS E DENSIDADE E pH DAS URINAS DO ESTUDO DE EXCREÇÃO DO VOLUNTÁRIO E	156

1 INTRODUÇÃO

1.1. CÂNCER

Câncer é o nome dado a um conjunto de mais de 100 doenças que têm em comum o crescimento desordenado de células que invadem os tecidos e órgãos, podendo espalhar-se para outras regiões do corpo (metástase). Dividindo-se rapidamente, estas células tendem a ser muito agressivas e incontroláveis, determinando a formação de tumores (acúmulo de células cancerosas). Por outro lado, um tumor benigno significa simplesmente uma massa localizada de células que se multiplicam vagarosamente e se assemelham ao seu tecido original, raramente constituindo um risco de vida (ALMEIDA, 2005; INCA, 2014).

No caso de tumores malignos ou câncer, as causas são variadas, podendo ser externas ou internas ao organismo, estando ambas inter-relacionadas. As causas externas representam aproximadamente 80 a 90% de todos os casos e relacionam-se ao meio ambiente e aos hábitos sociais e culturais. As causas internas são, na maioria das vezes, geneticamente pré-determinadas, e estão ligadas à capacidade do organismo de se defender das agressões externas (INCA, 2014).

O processo de carcinogênese ou a formação do tumor maligno ocorre geralmente de maneira lenta. Este processo passa por três estágios antes de chegar ao tumor propriamente dito: no primeiro estágio, de iniciação, a célula encontra-se geneticamente alterada, mas não é possível detectar clinicamente o tumor; o segundo estágio, de promoção, a célula iniciada é transformada em célula maligna, de forma lenta e gradual pela ação de agentes oncopromotores; e o terceiro estágio, de progressão, caracterizado pela multiplicação desordenada das células (ALMEIDA, 2005).

O câncer de mama é a causa de muitas mortes por câncer em mulheres brasileiras e norte-americanas. Suas taxas de incidência variam entre as diferentes regiões do mundo, mas é frequente tanto em países desenvolvidos, quanto em países em desenvolvimento. De acordo com o Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA), a taxa de mortalidade por câncer de mama ajustada pela população mundial apresenta uma curva ascendente e representa a primeira causa de morte por câncer na população feminina brasileira, com 11,88 óbitos/100000 mulheres em 2011. Foram estimados para 2014 e 2015, que fossem diagnosticados 57.120 novos casos de câncer de mama no Brasil com um risco estimado de 56,09 casos a cada 100 mil mulheres. (INCA - ATLAS DA MORTALIDADE, 2013; ONCOGUIA, 2015).

É importante ressaltar que, proporcionalmente, as diferenças entre as taxas de incidência e mortalidade nos países desenvolvidos são maiores, sugerindo maior alcance das ações de rastreamento em diagnosticar precocemente a doença e acesso aos avanços no tratamento. Se for diagnosticado e tratado no início, o prognóstico é considerado bom para o câncer de mama, sendo então a prevenção e a identificação precoce de fundamental importância para a redução das taxas de morbidade e mortalidade dessa neoplasia (MARTINS, 2013).

O câncer de mama é raro antes dos 40 anos e a partir dessa idade a incidência tende a crescer. Além disso, segundo dados apresentados pelo Ministério da Saúde no Brasil a mortalidade também aumenta progressivamente com a idade (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013).

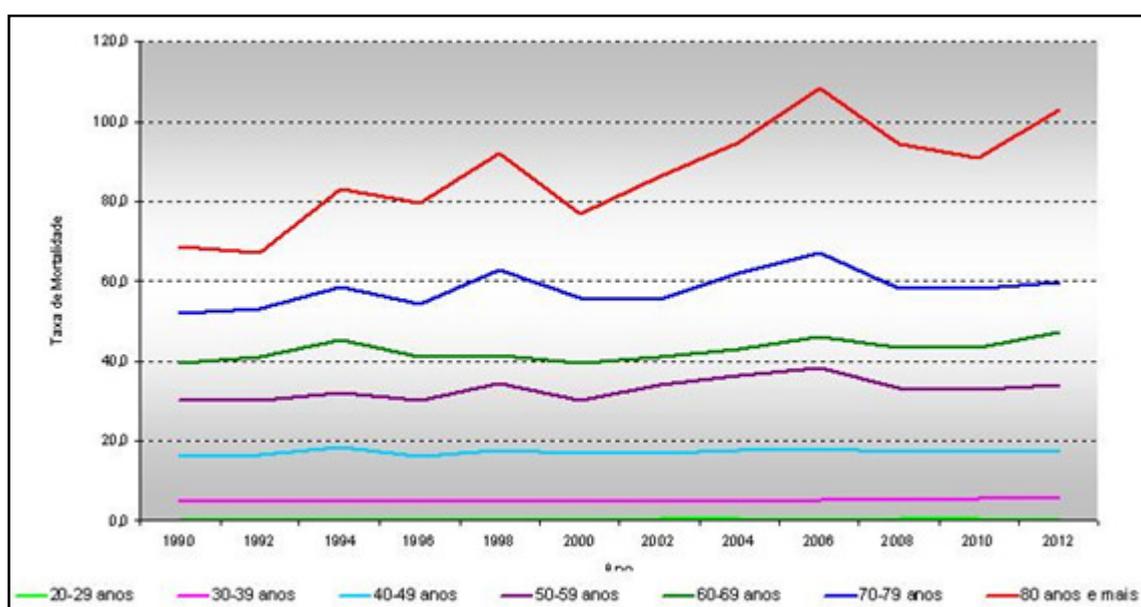


Figura 1: Taxa de mortalidade por câncer de mama feminina, específica por faixas etárias, por 100000 mulheres. Brasil, 1990-2012 (INCA, 2015).

1.2. TRATAMENTOS DO CÂNCER - HORMONIOTERAPIA

Importantes avanços na abordagem do câncer de mama aconteceram nos últimos anos, principalmente no que diz respeito a cirurgias menos agressivas, assim como a busca da individualização do tratamento. O tratamento varia de acordo com o estado da doença, suas características biológicas, além das condições da paciente, como por exemplo, idade, *status* menopausal, comorbidades e preferências. As modalidades de tratamento do câncer de mama podem ser divididas em tratamento local, que englobam as cirurgias e radioterapia ou o

tratamento sistêmico, que engloba a quimioterapia, a terapia biológica e a hormonioterapia (INCA, 2014).

Em virtude da presença de receptores hormonais em mais da metade dos tumores, o que provoca uma dependência da presença de estrógenos para o crescimento do tecido tumoral, tratamentos que interferem com a ação do estrógeno e da progesterona sobre as células tumorais são relativamente eficazes e pouco tóxicos no manejo clínico do câncer de mama. Entre as diversas formas de tratamento hormonal, destacam-se os antiestrógenos e os progestágenos, que podem ser usados antes ou depois da menopausa (SAAD *et al.*, 2002; NOVARTIS - Bula do Femara, 2015).

Antes da menopausa, a maior parte dos estrógenos é sintetizada nos ovários. Nesse *status* menopausal, a inibição da ação estrogênica pode ser alcançada através de meios cirúrgicos ou através do agonista do hormônio liberador do hormônio luteinizante (HISCOX *et al.*, 2009).

Já após a menopausa, e conseqüentemente com a insuficiência ovariana, as glândulas supra-renais passam a ser a principal fonte de síntese de esteróides sexuais, produzidos na forma de andrógenos. Estes andrógenos são metabolizados pela aromatase, em tecidos periféricos como gordura, músculos, fígado e o próprio tumor mamário, dando origem aos estrógenos. Desta forma, diferentemente de antes da menopausa, a supressão da biossíntese de estrógenos nesses tecidos pode ser concebida através de duas estratégias hormonais: a primeira é desenhada para bloquear a ação do estrogênio utilizando moduladores seletivos do receptor de estrogênio (SERMs), chamados também de antiestrogênios. Já a segunda, utiliza inibidores da aromatase para impedir a conversão de andrógenos em estrógenos (BRODIE E NJAR, 2000; SANTEN, 2003; HISCOX *et al.*, 2009).

Os antiestrogênicos foram descobertos antes dos inibidores de aromatase. O citrato de clomifeno foi o primeiro antiestrogênico aprovado pelo FDA (*Food and Drug Administration*) nos Estados Unidos em 1967 e era usado tanto no tratamento do câncer de mama hormônio dependente, como também na indução da ovulação. Posteriormente, em meados de 1970, o tamoxifeno foi aprovado para uso no tratamento de câncer de mama, sendo seguido pelo toremifeno e o raloxifeno. Todos esses quatro fármacos, estruturas apresentadas na Figura 2, exercem forte efeito antagonista de estrogênio em certos tecidos (útero e mama) e atividade como agonista parcial do estrogênio em outros tecidos (fígado, osso e cérebro), sendo portanto considerados moduladores seletivos para o receptor de estrogênio (SANTEN, 2003; GERACE *et al.*, 2012; SHARMA *et al.*, 2014).

Embora as terapias com os moduladores seletivos para o receptor de estrogênio apresentem benefícios no tratamento de pacientes com câncer de mama com tumores estrógenos dependentes, os efeitos estrogênicos desses tratamentos provocam sérios efeitos colaterais em outro tecidos. Por exemplo, o tratamento com tamoxifeno provoca problemas no útero, na vascularização, além de aumentar o risco de câncer de endométrio, eventos tromboembólicos venosos e acidente vascular cerebral. Em virtude disso, o desenvolvimento de inibidores de aromatase representou uma nova estratégia no tratamento de câncer de mama (CASSOL e GARICOCHEA, 2005; HISCOX *et al.*, 2009).

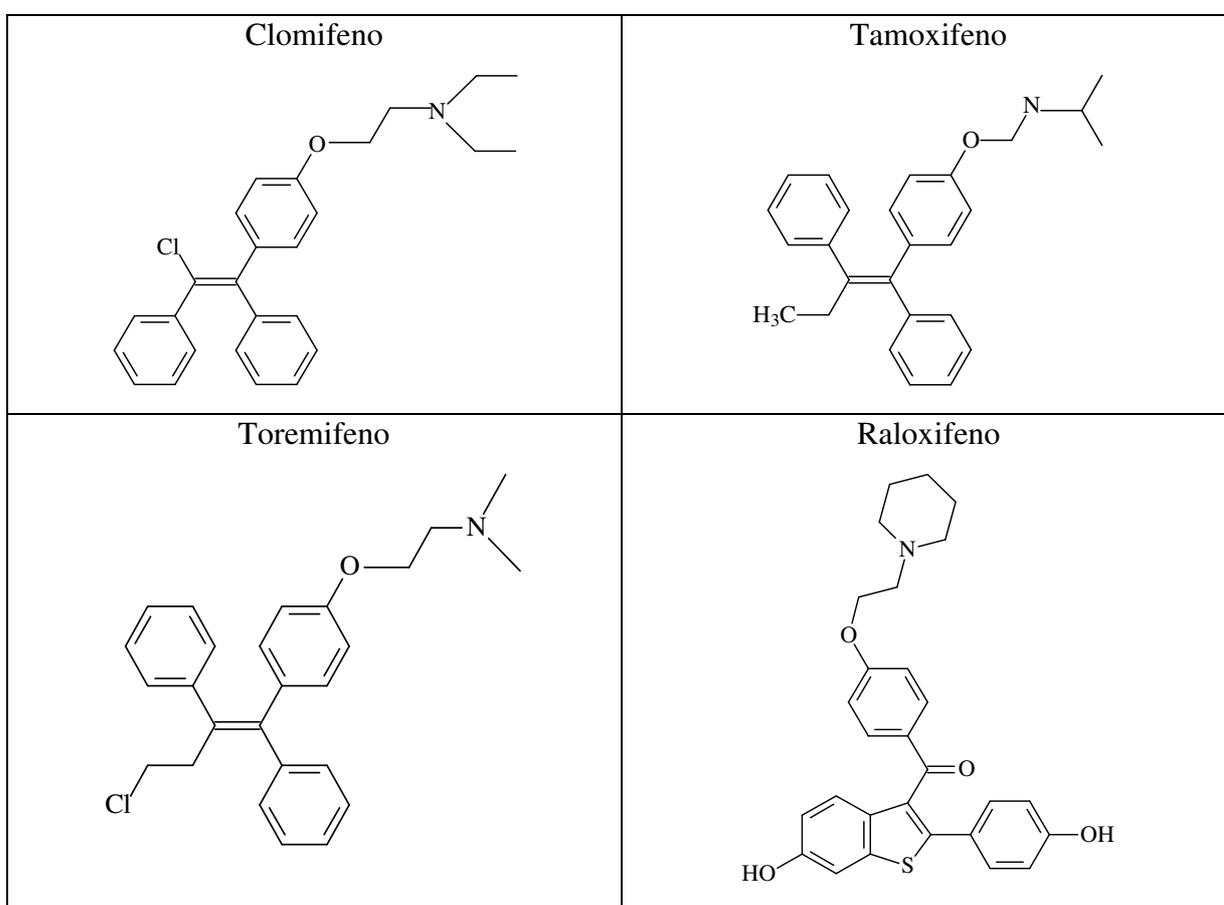


Figura 2: Estrutura química de alguns agentes com ação antiestrogênica.

1.3. INIBIDORES DA AROMATASE

Em 1960, pesquisadores desenvolveram o conceito do uso de inibidores da enzima aromatase para o tratamento de diversos processos estrogênio dependente. Depois de alguns anos, experiências clínicas com a primeira geração de inibidores da aromatase comprovaram

que estes poderiam ser usados no tratamento de câncer de mama hormônio dependente (SANTEN, 2003).

É importante lembrar que nos casos em que o crescimento do tecido tumoral depende da presença desses hormônios, a supressão dos estrógenos pode ocorrer de diferentes formas. Dependendo do caso, pode acontecer a morte da célula tumoral, a redução da proliferação ou a regressão do tumor (MARECK *et al.*, 2005; MILLER *et al.*, 2007).

A aromatase pertence ao grupo das enzimas do citocromo P450 e age, como já dito anteriormente, como mediador da aromatização de andrógenos em estrógenos. É responsável pela última etapa da biossíntese de estrógenos catalisando a aromatização da androstenodiona e testosterona em estrona e estradiol, respectivamente, demonstrada na Figura 3 (HAYNES *et al.*, 2003). Desta forma, a inibição da aromatase e consequentemente da síntese de estrógenos, é uma estratégia comprovadamente eficaz utilizada no tratamento de câncer de mama hormônio - dependente (SAAD *et al.*, 2002; HISCOX *et al.*, 2009; CHUMSRI *et al.*, 2011).

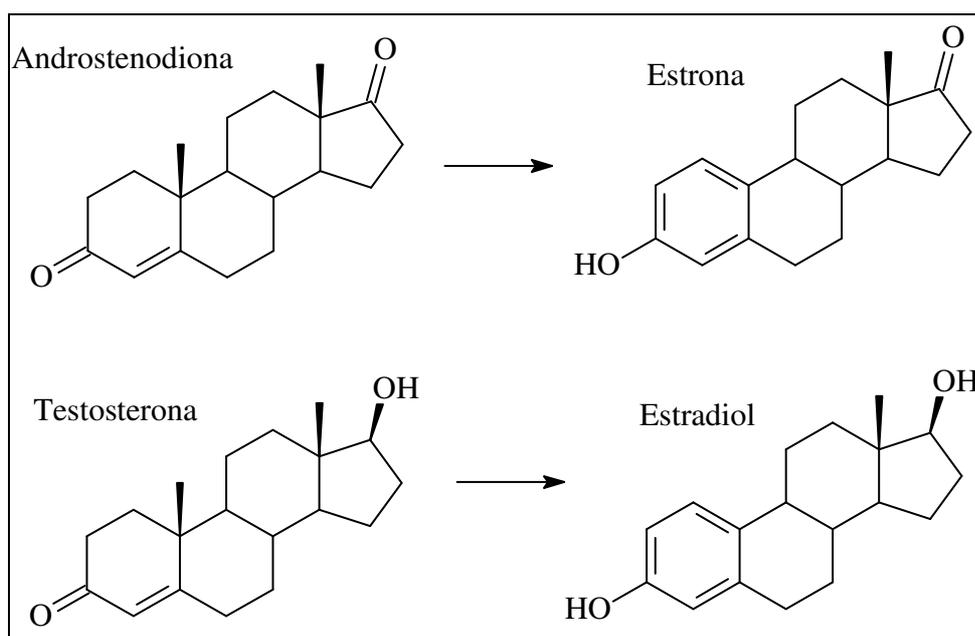
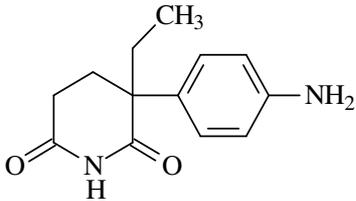
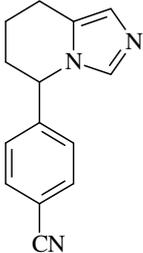
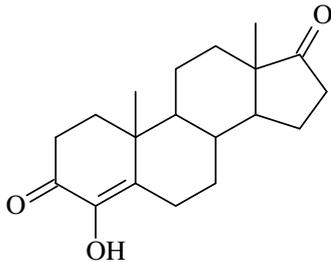
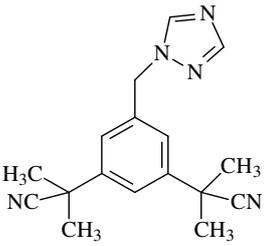
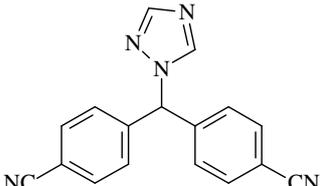
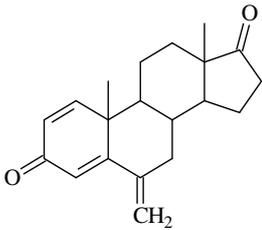


Figura 3: Reação de conversão da androstenodiona em estrona e da testosterona em estradiol.

Os inibidores de aromatase podem ser classificados de várias formas. Uma maneira de classificá-los é quanto à cronologia da síntese dos fármacos: desta forma foram designados os inibidores de 1^a, 2^a e 3^a geração. Outra classificação possível é quanto à sua estrutura química e tipo de inibição enzimática: os fármacos classificados em inibidores propriamente ditos têm estrutura não esteroideal, enquanto os classificados inativadores têm estrutura esteroideal

(SAAD *et al.*, 2002). A Tabela 1 demonstra como alguns inibidores de aromatase são classificados.

Tabela 1: Exemplos de alguns inibidores de aromatase, classificados quanto à estrutura e à cronologia de síntese.

Geração	Inibidores (núcleo não esteroidal)	Inativadores (núcleo esteroidal)	
Primeira	<p>Aminoglutetimida</p> 	-----	
Segunda	<p>Fadrozol</p> 	<p>Formestano</p> 	
Terceira	<p>Anastrozol</p> 	<p>Letrozol</p> 	<p>Exemestano</p> 

A diferença principal, do ponto de vista químico e farmacológico entre os inibidores e os inativadores é que estes últimos se ligam de forma definitiva à enzima, enquanto que os primeiros funcionam principalmente como antagonistas competitivos, ligando-se à enzima apenas temporariamente. Ou seja, os compostos esteroidais são análogos aos substratos naturais androstenodiona e testosterona e competitivamente, ligam-se ao sítio de ligação ao substrato da enzima, formando ligações covalentes irreversíveis que resultam em inativação permanente da aromatase. Seus efeitos persistem mesmo sem a ingestão de outras doses do fármaco e a atividade da aromatase retorna apenas quando novas enzimas são geradas. Já os

inibidores não esteroidais interagem reversivelmente com o grupo heme da aromatase, inibindo a interação do ligante com o complexo enzimático e consequentemente, impedindo a aromatização esteroidal. A inibição é reversível e o efeito depende da presença contínua do fármaco (SAAD *et al.*, 2002; HAYNES *et al.*, 2003; CASSOL *et al.*, 2005).

De uma forma geral, os inibidores da aromatase são fármacos bem tolerados. Porém, devido à falta de estrógeno no organismo, algumas reações adversas podem ocorrer no começo do tratamento, como por exemplo, ondas de calor, perda de cabelo ou sangramento vaginal (NOVARTIS - Bula do Femara, 2015).

Na Tabela 2 estão resumidos três estudos comparativos do efeito de diferentes inibidores da aromatase na supressão estrogênica. No primeiro estudo, três inibidores de aromatase foram analisados, examestano, anastrozol e letrozol. Já no segundo e terceiro estudo, foram comparados apenas dois inibidores da aromatase, anastrozol e letrozol. Pode-se observar que nos três estudos, o letrozol demonstrou maior eficiência na inibição da enzima aromatase e consequentemente maior supressão dos estrógenos.

Tabela 2: Potencial dos inibidores de aromatase e supressão estrogênica (Retirado na íntegra de HEROLD E BLACKWELL, 2008).

Estudo	Número de pacientes	Inibidor da aromatase	Supressão estrogênica (%)		
			Estrona	Estrona - Sulfato	Estradiol
Bernardi <i>et al.</i> (2002)	6	Examestano	25	NA	21
	8	Anastrozol	72	NA	26
	7	Letrozol	84	NA	47
Geisler <i>et al.</i> (2006)	6	Anastrozol	83	80	89
	6	Letrozol	91	90	98
Dixo <i>et al.</i> (2006)	27	Anastrozol	NA	95	90
	27	Letrozol	NA	98	94

A enzima aromatase também é considerada um novo alvo na terapia contra epilepsia: Como mostra a Figura 4, a testosterona é metabolizada em neuroesteróides por duas vias distintas: Na via androgênica, o 3α -androstanodiol é formado após duas reduções do anel A e na via estrogênica, a testosterona é metabolizada em 17β -estradiol, a partir da enzima aromatase (MARTINI, 1992).

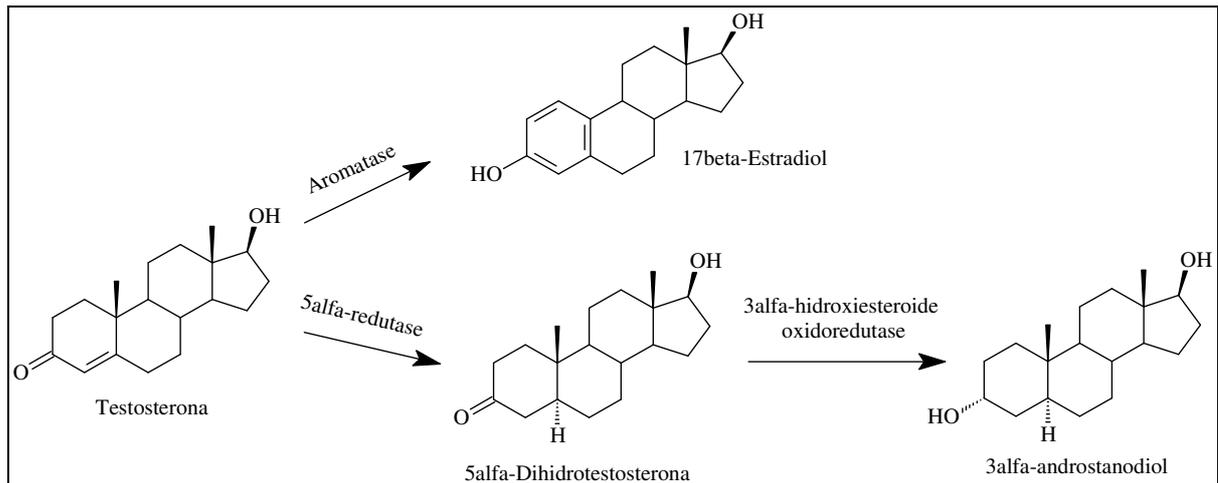


Figura 4: Biossíntese dos neuroesteróides 3α -androstanodiol e 17β -estradiol a partir da testosterona (REDDY, 2004).

O 17β -estradiol é um esteróide neuroativo que promove convulsões. A aromatase é liberada em áreas distintas do cérebro tais como o hipocampo e neocórtex que estão envolvidas na epileptogênese. Desta forma, os inibidores de aromatase são eficientes nesse tratamento não só por diminuir o nível de estradiol no local reduzindo a excitabilidade cerebral, mas também por aumentarem o nível dos neuroesteróides androgênicos, que têm atividade neuroprotetora e anticonvulsivante (MARTINI, 1992; REDDY, 2004).

Alguns inibidores de aromatase, como a testolactona e o letrozol, já foram testados em homens com epilepsia com o objetivo de normalizar o nível de testosterona: Herzog e colaboradores, em 1998, testaram a eficácia do uso da testosterona e testolactona em homens com crises de convulsões intratáveis e foi obtida melhora considerável no controle das crises. Em outro estudo, o letrozol também demonstrou ser eficiente no controle das convulsões em um homem de 61 anos de idade com epilepsia (HARDEN e MACLUSKY, 2004).

Durante o tratamento com o letrozol, foi observado um aumento do nível de testosterona no soro humano. Segundo a literatura, uma dose do letrozol deve ser usada uma ou duas vezes na semana por homens que desejam diminuir os níveis de estrogênio e aumentar o nível de testosterona (HARDEN e MACLUSKY, 2004).

1.4. INIBIDORES DA AROMATASE NO CONTROLE DE DOPAGEM NO ESPORTE

Os inibidores de aromatase e outros fármacos antiestrogênicos são utilizados por atletas de alto rendimento com a finalidade de minimizar os efeitos colaterais causados pelo uso excessivo de esteróides anabólicos (PADILHA, 2007).

Os esteróides anabólicos androgênicos (EAA) ou esteróides anabolizantes referem-se aos hormônios esteróides da classe dos hormônios sexuais masculinos e são um grupo de substâncias naturais e sintéticas formadas a partir da testosterona ou de um de seus derivados. Os EAA são promotores e responsáveis pelos efeitos androgênicos e efeitos anabólicos. Os efeitos androgênicos são relacionados especificamente com a função reprodutora e com as características sexuais secundárias. Já os efeitos anabólicos, dizem respeito, de maneira geral, à estimulação do crescimento e maturação dos tecidos não-reprodutores. Apesar disso, alguns autores referem os esteróides anabolizantes como os derivados sintéticos da testosterona que possuem atividade anabólica (promoção do crescimento) superior à atividade androgênica (masculinização) (SILVA *et al.*, 2002; CUNHA, 2004).

Na medicina, os EAA são utilizados geralmente no tratamento de sarcopenias (perda de massa e força na musculatura esquelética com o envelhecimento), do hipogonadismo, do câncer de mama e da osteoporose e nos esportes, onde são utilizados para o aumento da força física e da massa muscular (SILVA *et al.*, 2002). Estudos têm descrito que a forma com que os EAA são utilizados por atletas obedecem, basicamente, a três metodologias: a primeira, conhecida como "ciclo", refere-se a qualquer período de utilização de tempos em tempos, que varia de quatro a 18 meses; a segunda, denominada "pirâmide", começa com pequenas doses, aumentando progressivamente até o ápice e, após atingir esta dosagem máxima, existe a redução regressiva até o final do período; e a terceira, conhecida como "stacking" (uso alternado de esteróides de acordo com a toxicidade), refere-se à utilização de vários esteróides ao mesmo tempo. Há também entre os atletas o hábito comum de utilizar a mistura dos três métodos descritos acima (SILVA *et al.*, 2002).

Com o uso de inibidores de aromatase, um dos principais efeitos colaterais do uso de anabolizantes, que é a ginecomastia (crescimento das mamas nos homens) é minimizado. Esse efeito, além do aumento da retenção de água e de gordura, é causado devido ao elevado nível de estrogênio circulante, que é formado pela ação da aromatase a partir da aromatização do excesso de esteróides anabólicos. Conseqüentemente, o uso de inibidores de aromatase possibilita o uso de maior quantidade de anabolizantes sem que os efeitos colaterais como a ginecomastia sejam notados (SILVA *et al.*, 2002; CUNHA, 2004).

Como consequência dessa estratégia usada pelos atletas, o uso de inibidores de aromatase foi proibido pelo COI (Comitê Olímpico Internacional) e pela AMA (Agência Mundial Antidopagem), tanto para atletas masculinos quanto para femininos, desde setembro de 2001 e janeiro de 2005, respectivamente, permanecendo até os dias de hoje (PADILHA, 2007).

Na lista de substâncias proibidas da AMA de 2015, o letrozol está no grupo S4, que se refere aos hormônios e moduladores metabólicos (AMA - Prohibited list, 2015). Atualmente, de acordo com o documento técnico TD2014MRPL da AMA de 2014, os inibidores de aromatase são considerados substâncias *non-threshold*, ou seja, que não precisam de quantificação. Porém, o limite mínimo de desempenho requerido (MRPL - *Minimum Required Performance Levels*) para detecção do fármaco na urina dos atletas dos laboratórios acreditados é de 20 ng/mL (AMA - TD2014MRPL, 2014).

Alguns inibidores de aromatase têm sido relatados recentemente nas estatísticas dos laboratórios acreditados pela AMA. Nas estatísticas do ano de 2014, a classe S4 de hormônios e moduladores metabólicos representou 1,8% de todos resultados analíticos adversos reportados, sendo 93 de um total de 5271 casos. Desses 93 casos, o letrozol é o quinto mais usado, representando 5,4% da classe, com apenas 5 resultados analíticos adversos.

S.4	Hormônio e Moduladores Metabólicos	Ocorrências	% Na classe de drogas
	Tamoxifeno	40	43,0
	Clomifeno	24	25,8
	Agonista dos receptores δ ativados por proliferador de peroxissoma	11	11,8
	Anastrozol	6	6,5
	Letrozol	5	5,4
	Androstatrienodiona	2	2,2
	Androsteno-3,6,17-triona(6-oxo)	2	2,2
	Insulina (aspart)	1	1,1
	Insulina (humalog)	1	1,1
	Toremifeno	1	1,1
	Total	93	

Figura 5: Estatística de 2014 dos resultados analíticos adversos da classe S4 (Retirado na íntegra de AMA - ADAMS, 2013).

Em razão desses dados recentemente publicados, há o interesse de buscar novos alvos analíticos (metabólitos) para a detecção desses inibidores além de investigar o metabolismo e

o perfil de excreção dos mesmos (THUYNE *et al.*, 2008; EENOO *et al.*, 2011 e CAVALCANTI, 2012).

1.5. LETROZOL E SUA IDENTIFICAÇÃO

O letrozol (1-(bis-(4-cianofenil)metil)-1,2,4-triazol) é um inibidor de aromatase não esteroideal classificado como de terceira geração e é usado no tratamento de câncer de mama de mulheres na pós-menopausa. A principal via de eliminação do letrozol é através do carbinol glicuronídeo ou livre, metabólito farmacologicamente inativo, e do triazol (PRECHT *et al.*, 2012).

Em um período de duas semanas, após a administração de 2,5 mg de Femara marcado com ^{14}C em voluntárias sadias na pós-menopausa, aproximadamente 88% da radioatividade foram recuperados na urina e 4% nas fezes. Além disso, no mínimo 75% da radioatividade recuperados na urina em até 216 horas foi na forma de glicuronídeo do metabólito carbinol (ANNAPURA *et al.*, 2012; RODRÍGUEZ *et al.*, 2013; NOVARTIS - Bula do Femara, 2015;).

Na Figura 6, está demonstrado o metabolismo do letrozol em humanos.

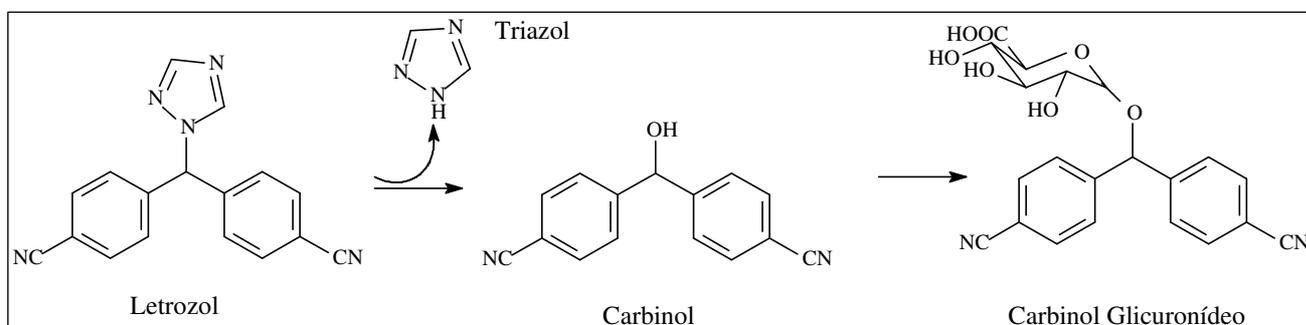


Figura 6: Metabolismo do letrozol em humanos (PRECHT *et al.*, 2012).

Em voluntárias saudáveis o letrozol é rápida e completamente absorvido depois da administração oral e tem um grande volume de distribuição 1,87 l/kg. Depois de uma dosagem única, o tempo de meia vida no plasma é de 42 horas para voluntárias saudáveis e de 82 horas para pacientes com câncer de mama. Essa diferença pode provavelmente ser atribuída à redução do metabolismo e da taxa de eliminação. A farmacocinética do letrozol não apresentou diferença significativa em dois grupos de pacientes de câncer de mama na menopausa com idades média de 61 e 71 anos, respectivamente (PFISTER *et al.*, 2001; HAYNES *et al.*, 2003).

Duas técnicas de extração do letrozol e de seus metabólitos da urina são comumente usadas: extração por fase sólida e extração líquido-líquido. Além disso, são usadas diversas técnicas analíticas como, por exemplo, eletroforese, cromatografia gasosa e/ou cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas.

Mareck e colaboradores, em 2005, usaram a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas com analisador do tipo quadrupolo único (CG-EM) na identificação do letrozol na urina humana. Para extrair o analito, foi feita uma extração líquido-líquido como MTBE em pH 9,6 após a hidrólise com a enzima beta-glicuronidase de *E.coli* em pH 7. A completa desconjugação do analito alvo foi verificada usando como padrão interno a androsterona glicuronídeo deuterada. Após a extração, a fase orgânica foi evaporada e derivatizada com MSTFA:NH₄I:etanetiol e em seguida injetada no CG-EM. A análise foi feita usando o monitoramento seletivo de íon. O metabólito principal derivatizado, o bis-4-cianofenilmetanol O-TMS apresentou o íon molecular m/z 306. A perda de um radical metila indica a formação do íon m/z 291. O pico base, m/z 217, é gerado a partir da eliminação do grupo trimetilsilil. A perda subsequente do HCN forma o íon m/z 190. Mareck e colaboradores também avaliaram alguns fatores como tempo de hidrólise, pH da extração e o solvente da purificação. A hidrólise demonstrou ser completa com menos de 5 minutos e a extração do carbinol em pH 7 e 9,6 apresentaram rendimentos similares em torno de 90%. Já a extração em pH 14 apresentou um rendimento inferior de aproximadamente 50%. Com relação ao solvente da purificação, foi recomendado o uso de uma extração com n-pentano como uma etapa adicional de pré-extração.

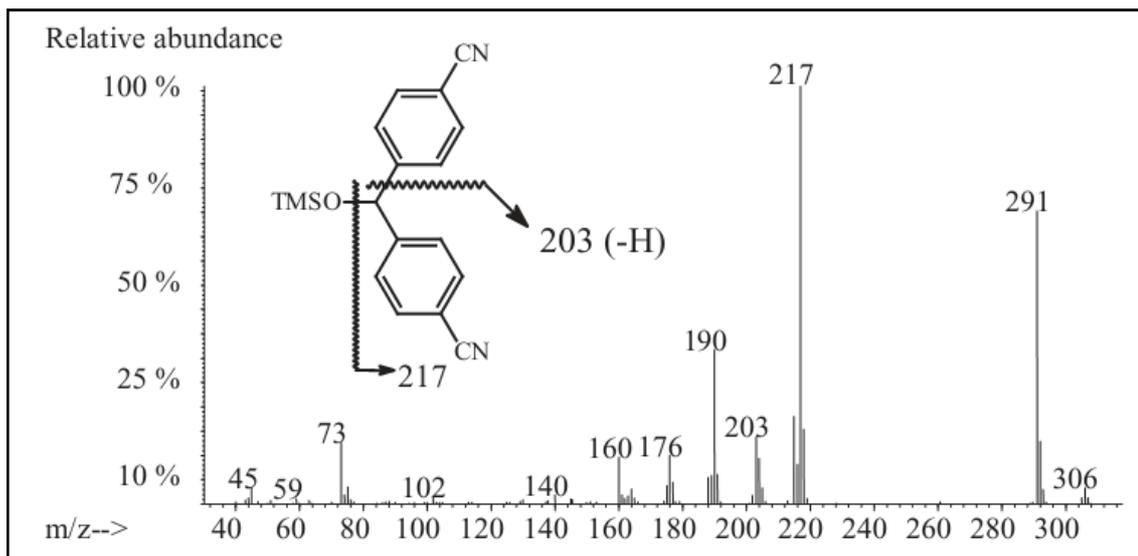


Figura 7: Espectro de massas e fragmentação do metabólito do letrozol, bis-4-cianofenilmetanol (Retirado na íntegra de MARECK *et al.*, 2005).

Thuyne e colaboradores, em 2007, descreveram um método de triagem para detecção qualitativa de narcóticos, estimulantes, beta-agonistas e antiestrogênicos, onde o letrozol estava incluído. Neste método, primeiramente, uma alíquota de 4 mL de urina é dividida em duas alíquotas, uma de 3mL e outra de 1mL para extração dos componentes conjugados e livres, respectivamente. Na alíquota de 3 mL, são feitas a fortificação com o padrão interno, a hidrólise com a beta-glicuronidase de *E. coli*, a extração com $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (9/1) em pH 9,5 seguida da separação das fases e evaporação da fase orgânica. Já na alíquota de 1 mL de urina, foi feita a fortificação com o padrão interno e a extração com MTBE em pH alcalino e usando NaCl, para promover o *salting out*. A fase orgânica foi adicionada ao resíduo seco obtido na extração em pH 9,5 e evaporada. O resíduo final da combinação dos dois extratos foi derivatizado com 100 μL de MSTFA. A análise foi feita em CG-EM com o quadrupolo único como analisador de massa. Esse método é capaz de detectar mais de 90 substâncias presentes na lista de substâncias controladas pela AMA, respeitando os critérios de identificação determinados pelo documento técnico da época.

Nas tabelas a seguir, estão apresentados alguns outros resumos do procedimento de preparo de amostra de alguns trabalhos encontrados na literatura que estão relacionados com agentes de dopagem, mais especificamente com o letrozol e inibidores de aromatase.

Tabela 3: Resumo do procedimento experimental de alguns trabalhos encontrados na literatura.

Artigo	Rápida Determinação de Anti-Estrogênicos por GC/MS em Urina: Método Validado e com Aplicação em Amostras Reais (Gerace <i>et al.</i> , 2012)	Identificação do Inibidor de Aromatase Letrozol em Urina por GC/MS (Mareck <i>et al.</i> , 2005)	Implementação da Cromatografia Gasosa com simultâneo Monitoramento de Íon Selecionado e Espectrometria de Massas com Varredura Total em Análise de Doping (Thuyne <i>et al.</i> , 2008)	
Amostra	Urina	Urina	Urina	
Volume da amostra	3mL	2mL	4mL divididos em 2 alíquotas: 3mL e 1mL	
Padrão Interno	Metiltestosterona	Metiltestosterona, androsterona glicuronídeo e eticolanolona	3mL: Conjugados 17 α -Metiltestosterona	1mL: Não conjugados Ciclopentanima
Sol. Tampão da Hidrólise	KH ₂ PO ₄ /Na ₂ HPO ₄ - pH 7,4 - 2 mL de 0,1M	NaHPO ₄ /Na ₂ PO ₄ - pH 7,0 - 0,75mL de 0,8M	NaHPO ₄ /Na ₂ PO ₄ - pH 7,0 - 1 mL	↓
Hidrólise	30 μ L de β -Glicuronidase from <i>E. coli</i> 55 °C - 1hora	25 μ L de β -Glicuronidase from <i>E. coli</i> 50 °C - 1hora	50 μ L de β -Glicuronidase from <i>E. coli</i> 42 °C - Noite	
Sol. Tampão da Extração	Na ₂ CO ₃ / NaHCO ₃ - pH 9,6 - 2mL de 0,1M	Temperatura ambiente Na ₂ CO ₃ / NaHCO ₃ - pH 9,6 - 0,5mL de 20%	Tampão de amônio - pH9,5 - 1mL	
Solvente da Extração	10mL de TBME	5mL de TBME	5mL de Dietil éter recém destilado	1mL KOH (5M, pH14) 1g NaCl, 1mL MTBE
Agitação	10min	5min	20min	20min
Centrifugação	3min	5min	5min	5min
Evaporação	Fase orgânica separada e evaporada à 70°C	Fase orgânica separada e evaporada à 50°C e pressão reduzida	Fase orgânica separada e evaporada à temperatura ambiente	Fase orgânica separada e adicionada ao extrato de pH 9,5
Derivatização	50 μ L de MSTFA/NH ₄ I/ditioeritriol (1000:2:4, v/m/m) - 30min à 70°C	50 μ L de MSTFA/NH ₄ I/etanetiol (1000:2:3, v/m/v) - 20min à 60°C	100 μ L de MSTFA/NH ₄ I/etanetiol (640:1:2, v/m/v) - 1 hora à 80°C	
Equipamento	CG/EM	CG/EM quadrupolo único	CG/EM	
Condições das análises	Coluna: HP-1 Isoterma 180°C por 3 min, taxa de 5°C/min até 240°C, taxa de 10°C/min até 270°C, taxa de 40°C até 320°C, isoterma por 32min. Temperatura da transferline 280°C.	Coluna: OV-1 Temperatura 181°C, taxa de 3°C/min até 230°C, taxa de 40°C/min até 310°C. Temperatura da transferline 300°C. Monitoramento de íons seletivos	Coluna: J&W- Ultra 1 Temperatura 70°C, taxa de 90°C/min até 100°C (5min), taxa de 30°C/min até 180°C, taxa de 3°C/min 232°C (0min), taxa de 40°C/min até 310°C (3min). SIM/Scan	
Observação	Metabólito: Bis-4-cianofenilmetanol <i>m/z</i> 309, <i>m/z</i> 291, <i>m/z</i> 217, <i>m/z</i> 190	Metabólito: Bis-4-cianofenilmetanol <i>m/z</i> 291, <i>m/z</i> 217	Identifica Letrozol entre outros.	

Tabela 4: Resumo do procedimento experimental de alguns trabalhos encontrados na literatura (continuação).

Artigo	Rápido Método de Triagem para Detecção para Agentes de Dopagem em Urina por CG-EM Triplo Quadrupolo (Eeno <i>et al.</i> , 2011)	Detecção de Esteróides no Controle de Dopagem (Parr e Schanzer, 2010)	Método de Triagem para Detecção Qualitativa de Narcóticos e Estimulantes usando uma Etapa de Derivatização (Thuyne <i>et al.</i> , 2007)	
Amostra	Urina	Urina	Urina	
Volume da amostra	1mL	3mL	4mL divididos em 2 alíquotas: 3mL e 1mL	
Padrão Interno	Mistura de padrões deuterados	Informação não dada	3mL: Conjugados nolorfina	1mL: Não conjugados Ciclopentanima
Sol. Tampão da Hidrólise	NaHPO ₄ /Na ₂ PO ₄ - pH 7,0 - 0,75mL de 0,8M	NaHPO ₄ /Na ₂ PO ₄ - pH 7,0	NaHPO ₄ /Na ₂ PO ₄ - pH 7,0 - 1mL	↓
Hidrólise	50µL de β-Glicuronidase from <i>E. coli</i> 56°C - 1,5hora	β-Glicuronidase from <i>E. coli</i> 50°C - 1hora	50µL de β-Glicuronidase from <i>E. coli</i> 42°C - Noite	
Sol. Tampão da Extração	Na ₂ CO ₃ / NaHCO ₃ - pH 9,5 - 1mL	K ₂ CO ₃ / NaHCO ₃	Tampão de amônio - 0,5mL	
Solvente da Extração	5mL de Dietil éter recém destilado	6mL de TBME	5mL CH ₂ Cl ₂ /MeOH (9:1)	1mL KOH (5M, pH14) 1g NaCl 1mL TBME
Agitação	20min	↓	20min	1hora
Centrifugação	Informação não dada.		5min	Informação não dada.
Evaporação	Fase orgânica separada e evaporada à temperatura ambiente	4mL 2mL	Fase orgânica separada e evaporada à 40°C	Fase orgânica separada e adicionada ao extrato de pH 9,5
Derivatização	20µL de acetonitrila 50µL de MSTFA/etanetio/NH ₄ I (500:4:2) - 1hora à 80°C	TMS	↓	Evaporado à temperatura ambiente 100µL MSTFA - 10min à 80°C
Equipamento	CG/EM Quadrupolo único	GC/MS LC-MS/MS	GC/MS	
Condições das análises	Coluna: HP-Ultra 1 Temperatura 100°C (0,2min), taxa de 90°C/min até 185°C, taxa de 9°C/min até 230°C, taxa de 90°C/min até 310°C (0,95min), Temperatura da transferline 310°C. SIM/Scan	Informação não dada	Coluna: J&W- Ultra 1 Temperatura 60°C, taxa de 90°C/min até 100°C (5min), taxa de 20°C/min até 300°C (3min) Temperatura da transferline 320°C Varredura total	
Observação	Não é dito o nome do metabólito do letrozol: Transições <i>m/z</i> 291→160 e <i>m/z</i> 291→217	Não trabalhou com o Letrozol (mas com outros inibidores de aromatase)	Não é dito o nome do metabólito do letrozol: <i>m/z</i> 190, <i>m/z</i> 217 e <i>m/z</i> 291	

Tabela 5: Resumo do procedimento experimental de alguns trabalhos encontrados na literatura (continuação).

Artigo	Método de Cromatografia Eletrocinética Micelar para Determinação de Letrozol, Citalopram e seus Metabólitos em Urina Humana (Flores <i>et al.</i> , 2008)	Uso de UHPLC Acoplada à Espectrometria de Massas de Alta Resolução para uma Triagem de Controle de Doping Rápida e com Alto Rendimento (Musenga e Cowan, 2013)	Método de Triagem para Agentes de Doping em Urina Humana Usando SPE e LC/TOFMS (Kolmonen <i>et al.</i> , 2007)	Rápida Determinação de Letrozol, Citalopram e seus Metabólitos por HPLC- Detector de Fluorescência em Urina. Método Validado e Aplicado em Amostras Reais (Rodríguez <i>et al.</i> , 2013)
Amostra	Urina	Urina	Urina	Urina
Volume da amostra	Entre 2 e 8 mL	1mL	1mL	1mL
Procedimento	<p>Extração - SPE Cartucho C18:</p> <p>1) Condicionamento: 5mL de MeOH 5mL tampão fosfato pH7</p> <p>2) Amostra:</p> <p>3) Lavagem do cartucho: 8 mL do tampão fosfato pH7 2 mL MeOH; Água (25:75)</p> <p>4) Eluição dos analitos: 2mL MeOH ↓ Extrato evaporado ↓ Reconstituído em com 1mL de água miliQ</p>	<p>1ml de urina + 100µL de padrão interno (mefrusida e epitestosterona glic. D3) + 1mL de Solução de K-12 β-Glicuronidase (10mL de enzima + 500mL de tampão de fosfato pH6,2) ↓ Hidrólise: 50°C - 1hora ↓ 2mL de Ácido Fórmico 2% ↓ Centrifugação ↓ Extração - SPE 1) Condicionamento: 0,5mL de MeOH 0,5mL Ácido Fórmico 2% 2) Amostra 3) Lavagem do cartucho: 1mL de ácido fórmico 2% 1 mL água 1 mL MeOH: Água(20%) 4) Eluição dos analitos: 3mL de NH4OH:ACN (50:50) ↓ Extrato evaporado ↓ Reconstituído em com 100µL de ACN (5%) em água (ácido fórmico 3%)</p>	<p>1mL de urina + 10µL de β-Glicuronidase ↓ Hidrólise: 56°C - 2horas ↓ 10µL de dibenzepin (10µg/mL) ↓ pH ajustado entre 5-6 com tampão de acetato de amônio ↓ centrifugação por 5 min ↓ Extração SPE 1) Condicionamento: 1mL de MeOH 1mL tampão pH6 2) Amostra: 3) Lavagem do cartucho: 1 ml de água 1 mL de HCl 0,01M 4) Eluição dos analitos: 1mL MeOH e 1mL de MeOH:Amônia (98:2) ↓ Extrato evaporado ↓ Reconstituído em com 150µL ACN:Ácido fórmico 0,1%(1:9)</p>	<p>1mL de urina + 10µL de padrão interno (Letrozol e Metabólito do Letrozol) ↓ Diluição 1:2 com a fase móvel ↓ Centrifugação por 2 min ↓ 20µL do sobrenadante foi injetado</p>
Equipamento	Eletroforese Capilar	UHPLC-HRMS	LC/TOFMS	HPLC- Detector de Fluorescência
Condições das análises	...	Coluna: Acquity UHPL BEH C18 Solvente A: 0,3% de ácido fórmico em água, Solvente B: 0,3% de ácido fórmico em acetonitrila. Gradiente: 5% de solvente B até 0,5 minuto, aumento linear da % de solvente B ate 20% (3,5min), aumento linear até 25%(5,5min), 57%(7min) e 90%(8min).	Coluna: Phenomenex Luna C18. Fase móvel: 5mM de acetato de amônia em 0,1% de ácido fórmico e acetonitrila. Aumento da % de acetonitrila: 10% até 40% (10min), até 75%(13,5min), até 80% (16min) e mais 5minutos em 80%. Temperatura 40°C...	Coluna: kromasil C18. Fase móvel: solução tampão fosfato 80mM pH3 e acetonitrila (65:35 v/v).
Observação	Citalopram é um antidepressivo geralmente usado em pacientes que estão fazendo o tratamento do câncer com o Letrozol. O metabólito estudado do letrozol é o bis-4-cianofenilmetanol.	Metabólito do Letrozol: C ₁₅ H ₁₀ N ₂ O	O pH não é elevado após a hidrólise.	Foram testados várias fases móveis e vários fluxos. Metabólito estudado: carbinol

Tabela 6: Resumo do procedimento experimental de alguns trabalhos encontrados na literatura (continuação).

Artigo	Validação e Aplicação de HPLC-MS na Análise de Letrozol em Plasma Humano (Joshi <i>et al.</i> , 2011)	Biotransformação do Letrozol no Microsomas do Fígado: Efeitos do Sexo (Gênero) e do Tamoxifeno (Tao <i>et al.</i> , 2007)	Análise Quantitativa Simultânea do Letrozol, Metabólito Carbinol e Carbinol Glicuronídeo em Plasma Humano por LC-MS/MS (Precht <i>et al.</i> , 2012)	Análise do Estradiol por GC/MS/MS para o Monitoramento da Terapia com Inibidor de Aromatase (Santen <i>et al.</i> , 2007)
Amostra	Plasma	Microsomas do Fígado	Plasma	Plasma
Volume da amostra	250µL	100µL	150µL	1mL
Procedimento	<p>250µL de plasma + 50µL de letrozol-D4 (20ng/mL)</p> <p>↓</p> <p>vórtex 30s</p> <p>↓</p> <p>Extração líq-líq: 3mL de TBME</p> <p>↓</p> <p>Vórtex: 3 min</p> <p>↓</p> <p>Fase orgânica é separada e evaporada à 40°C</p> <p>↓</p> <p>Reconstituição em 500µL de Fase móvel: 10mM de acetato de amônio (pH 3 com ácido acético) - acetonitrila (10:90)</p> <p>↓</p> <p>Injeção: 10µL</p>	<p>Extração dos Microsomas (no artigo) ↓</p> <p>10µL da mistura + 500µL de tampão fosfato pH6,8</p> <p>↓</p> <p>Extração SPE: C8</p> <p>1) Condicionamento: 1mL de MeOH</p> <p>1mL tampão pH6,8</p> <p>2) Amostra:</p> <p>3) Lavagem do cartucho: 1 mL de tampão fosfato pH6,8</p> <p>1 mL de tampão: ACN (80:20)</p> <p>4) Eluição dos analitos: 500mL de Acetonitrila</p> <p>↓</p> <p>Extrato evaporado</p> <p>↓</p> <p>Reconstituição em 100mL de fase móvel</p>	<p>Diluição: 150µL de plasma + 850µL de ácido acético 0,1M</p> <p>↓</p> <p>Extração SPE:</p> <p>1) Condicionamento: Ácido acético 0,1M MeOH 10% em água</p> <p>2) Amostra:</p> <p>3) Lavagem do cartucho: 2 mL de ácido acético 0,1M 1mL de MeOH 10% em água</p> <p>4) Eluição dos analitos: 500µL de Acetonitrila</p> <p>↓</p> <p>Extrato evaporado</p> <p>↓</p> <p>Reconstituição em 40µL de fase móvel: (0,1% Ácido acético/Acetonitrila 80:20).</p> <p>↓</p> <p>Centrifugação: sobrenadante</p> <p>↓</p> <p>Injeção: 20µL</p>	<p>Padrão Interno: Estradiol deuterado</p> <p>↓</p> <p>Extração SPE: Eluição com acetato de etila</p> <p>↓</p> <p>Derivatização: Pentafluorobenzoilcloreto (PFB) MSTFA o-(2,3,4,5,6-pentafluorobenzil)-hidroxilamina hidrocloreto</p> <p>↓</p> <p>Injeção</p>
Equipamento	HPLC-MS	HPLC-MS	UHPLC-MS/MS	GC/MS/MS
Condições das análises	Coluna: Hypersil BDS C18. Fase móvel: 10mM Acetato de amônio (pH 3 com ácido acético) - acetonitrila (10:90, v/v). Temperatura 40°C.	Coluna: Zorbax C18. Fase móvel: acetonitrila e 0,1% de ácido fórmico. Isocrático à 25°.	Coluna: Zorbax Eclipse XDB-C18. Fase móvel: Solvente A: 0,1% de ácido acético em água e Solvente B: acetonitrila. Gradiente: 20% de B por 0,5min, aumento até 70% B até 3,5min seguido de 1 min 70% de B. Decréscimo de B até 20% por 0,1min. Temperatura 40°C.	Coluna: DB-17.
Observação		Metabólito estudado: carbinol	Metabólito estudado: carbinol e carbinol glicuronídeo.	

Pode-se observar de uma forma geral, que os procedimentos de preparo de amostras são bem similares: a maioria inicia com uma etapa de fortificação com um padrão interno ou uma mistura de padrões internos, seguido da adição de uma solução tampão neutra, da enzima beta-glicuronidase de *E. coli* e da etapa de hidrólise. Posteriormente, adiciona-se uma solução

de tampão alcalino e um solvente de extração para depois separação de fase e evaporação. Após isso, ocorre a etapa de derivatização para então análise nos respectivos instrumentos.

1.6. PERFIL ESTEROIDAL ENDÓGENO

O perfil esteroideal endógeno pode ser definido como um conjunto de dados, apresentados de forma quantitativa, que mostram uma tendência para a identificação de dopagem por esteróides endógenos (MARQUES *et al.*, 2003).

Os hormônios esteróides são sintetizados a partir do colesterol através de várias reações enzimáticas e são liberados pelo córtex supra-renal na circulação. Alguns desses esteróides possuem atividade biológica mínima e atuam como precursores de outros hormônios. Existem três classificações possíveis para os hormônios esteróides: os que possuem efeitos importantes sobre o metabolismo intermediário (glicocorticosteróides), os que exercem principalmente atividade de retenção salina (mineralocorticosteróides) e os que exercem atividade estrogênica ou androgênica, os quais são mais importantes no controle de dopagem (MARQUES *et al.*, 2003).

A Figura 8 apresenta a biossíntese e o metabolismo dos esteróides endógenos. A primeira etapa de síntese de pregnenolona através da clivagem oxidativa da cadeia lateral do colesterol é o principal processo da esteroidogênese e é controlada pelo hormônio adrenocorticotrópico (ACTH). Essa etapa é limitadora da taxa de sequência de reações que levam à síntese dos hormônios esteroidais adrenais (MARQUES *et al.*, 2003).

Nos seres humanos, a testosterona é o androgênio mais importante, sendo que nos homens cerca de 95% é secretada pelos testículos e apenas 5% pelas glândulas supra-renais. Já do ponto de vista quantitativo, a desidroepiandrosterona (DHEA), também conhecido como prasterona, é o principal androgênio, uma vez que são secretados cerca de 20 mg por dia (em parte na forma de sulfato). Entretanto, tanto o DHEA quanto a androstenodiona são androgênios muito fracos. Nas mulheres, estes hormônios são produzidos apenas pelas glândulas supra-renais, porém em quantidades reduzidas. Como por exemplo, a testosterona circulante nas mulheres é aproximadamente dez vezes inferior em relação ao homem. (MARQUES *et al.*, 2003; CUNHA *et al.*, 2004; GUYTON e HALL, 2006).

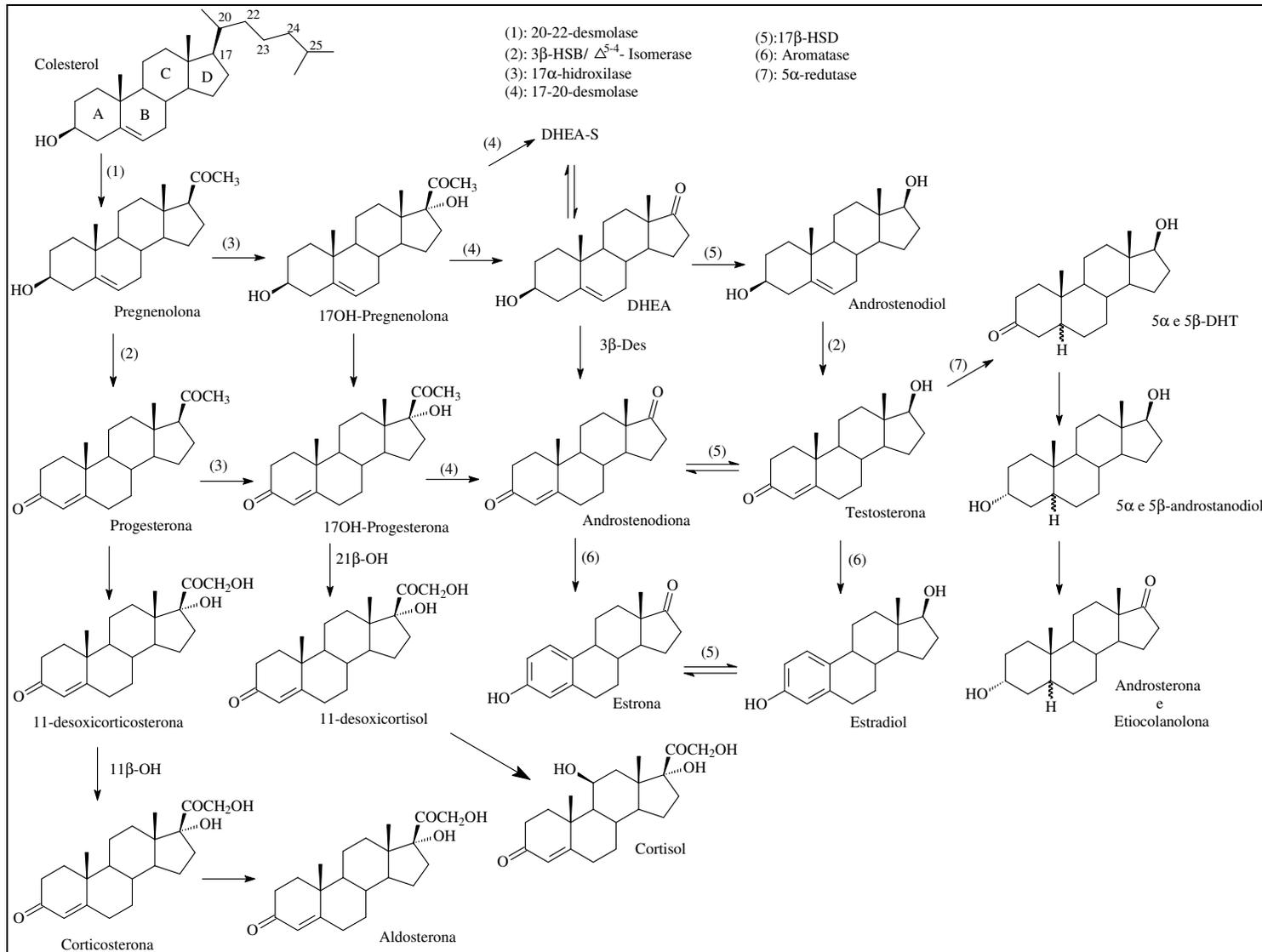


Figura 8: Biossíntese e metabolismo dos esteróides endógenos (Retirado na íntegra de MARQUES *et al.*, 2003).

A principal via de degradação da testosterona é realizada no fígado com a redução da ligação dupla entre o carbono 4 e 5, seguida da redução da carbonila do anel A. Assim, são formadas as substâncias inativas, como androsterona e eticolanolona, que são posteriormente conjugadas e excretadas na urina (MARQUES *et al.*, 2003).

De acordo com o documento técnico da AMA, TD2014EAAS, específico para esteróides androgênicos anabólicos endógenos (EAAE), a avaliação do perfil esteroidal é realizada monitorando alguns desses EAAE e algumas razões entre as suas concentrações, uma vez que essas são alteradas se tiver ocorrido a administração de EAA sintéticos. Os parâmetros avaliados são:

- Testosterona (T)
- Epitestosterona (E)
- Androsterona (A)
- Etiocolanolona (Etio)
- 5 α -androstandio-3 α , 17 β -diol (5 α Adiol)
- 5 β -androstandio-3 α , 17 β -diol (5 β Adiol)
- Razão Testosterona/Epitestosterona (T/E)

Outras razões entre essas concentrações também podem ser avaliadas no monitoramento do perfil esteroidal endógeno.

Além da administração exógena de esteróides endógenos, outros fatores também provocam alterações no perfil esteroidal, como por exemplo, os citados a seguir.

- Administração de esteróides exógenos

A administração de esteróides exógenos diminui a secreção de esteróides endógenos por um mecanismo de retroalimentação negativa (HAYNES e MURAD, 1987).

- Administração de álcool

A ingestão de grandes quantidades de álcool pode provocar o aumento da razão T/E e diminuir a razão A/T através do aumento da excreção da testosterona conjugada e decréscimo na excreção de androsterona conjugada (MARQUES *et al.*, 2003).

- Administração de probenecida e diuréticos

O uso de probenecida reduz a excreção dos esteróides conjugados, mas as razões entre os esteróides não se modificam. Já os diuréticos, por aumentarem o fluxo de urina, eles reduzem apenas a concentração na urina excretada e não a excreção dos esteróides excretados não alterando as razões entre eles. (DONIKE *et al.*, 1993; MARQUES *et al.*, 2003).

- Administração de finasterida

O uso de finasterida provoca à inibição da enzima 5 α -redutase, e conseqüentemente a redução da razão A/E, da razão 3 α ,5 α -Diol/ 3 α ,5 β -Diol e na concentração de DHT (MARQUES *et al.*, 1999).

Outro fator que também altera o perfil esteroidal, além de outros, é a atividade bacteriana. Essa atividade é avaliada pela presença de 5 α e 5 β -androstano-diona ou 4-androstenediona (AMA - TD2014EAAS, 2015).

De acordo com o documento técnico TD2014EAAS, os critérios que indicam perfil endógeno alterado são:

- Razão T/E superior a 4;
- Concentração de testosterona ou epitestosterona (corrigida pela densidade) superior à 200 ng/mL para homens ou 50 ng/mL para atletas femininas.
- Concentração de androsterona ou etiolanolona (corrigida pela densidade) superior à 10000 ng/mL combinada com a razão A/Etio menor que 0,4 para homens e maior que 4 para os dois sexos.

De acordo com o mesmo documento, a correção da densidade é realizada através da Equação 1:

$$\text{Conc}_{\text{corr}} = \text{Conc}_{\text{mens}} \times (1.020-1)/(d - 1) \quad \text{Equação 1}$$

onde, $\text{Conc}_{\text{corr}}$ é a concentração corrigida, $\text{Conc}_{\text{mens}}$ é a concentração mensurada e d é a densidade.

2 OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

O objetivo deste trabalho é avaliar a excreção do letrozol e sua influência no perfil esteroidal endógeno em urina humana.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a cinética de eliminação do metabólito principal do letrozol a partir do estudo de excreção após a administração de uma dose do medicamento Femara;

- Avaliar a alteração dos esteróides endógenos testosterona, epitestosterona, androsterona, eticolanolona, 5α -diol e 5β -diol nas urinas obtidas através do estudo de excreção.

- Avaliar a extração líquido-líquido frente à diferentes solventes.

- Avaliar o tempo de hidrólise necessário para análise do carbinol.

- Avaliar algumas figuras de mérito presentes no protocolo de validação qualitativa do LBCD como seletividade, repetibilidade, limite de detecção e rendimento de extração.

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1. NOÇÕES BÁSICAS DO METABOLISMO DE FÁRMACOS

O metabolismo dos fármacos compreende os processos enzimaticamente catalisados capazes de produzir modificações estruturais no fármaco. Dificilmente, um fármaco ou um medicamento sobrevive à ação catalítica dos diversos sistemas enzimáticos presentes nas células dos organismos vivos. Essa biotransformação ocorre através de dois mecanismos principais, o de fase I e o de fase II. A primeira fase do metabolismo engloba reações de oxidação, redução e hidrólise. Já a segunda fase compreende a etapa de conjugação, envolvendo reações de glicuronidação, sulfatação, acilação, metilação e a formação de adutos com glutatona (BARREIRO *et al.*, 1996; BARREIRO e FRAGA, 2001; PEREIRA, 2007).

O conhecimento prévio das prováveis mudanças estruturais que um determinado fármaco pode sofrer na biofase permite que se antecipem dados sobre sua provável estabilidade frente ao método de isolamento escolhido, garantindo sua eficiência em termos qualitativos e quantitativos (BARREIRO *et al.*, 1996; BARREIRO e FRAGA, 2001; PEREIRA, 2007).

Em termos estruturais, os fármacos podem ser considerados, em sua grande maioria, como micromoléculas orgânicas, lipossolúveis, polifuncionais. Como consequência, um determinado fármaco produz, não raramente, distintos metabólitos, em função das diversas enzimas envolvidas no seu metabolismo (BARREIRO *et al.*, 1996; BARREIRO e FRAGA, 2001; PEREIRA, 2007).

3.1.1. PRIMEIRA FASE DO METABOLISMO - FASE I

A primeira fase do metabolismo é caracterizada por envolver diversas reações redox ou hidrolíticas, responsáveis pela conversão do fármaco lipofílico em um primeiro metabólito mais polar. Esta etapa, na maioria das vezes envolve o citocromo hepático P450, e compreende, basicamente, a inserção de um átomo de oxigênio, originário de uma molécula de O₂, na estrutura do (BARREIRO *et al.*, 1996; BARREIRO e FRAGA, 2001; PEREIRA, 2007).

Várias reações de bioconversão de diferentes grupos funcionais podem ocorrer na fase I do metabolismo. Entre os processos microssomais encontram-se aqueles descritos na Tabela 7, englobando reações oxidativas. Já os processos não-microssomais estão demonstrados na Tabela 8.

Tabela 7: Processos microssômicos de biotransformação (Retirada na íntegra de BARREIRO e FRAGA, 2001).

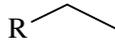
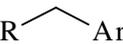
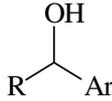
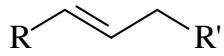
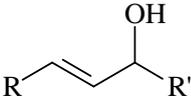
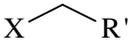
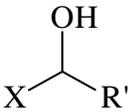
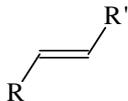
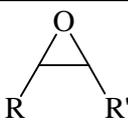
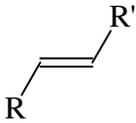
<i>Oxidações catalisadas por citocromo P450</i>			
Carbono	Hidroxilação alifática		
	Hidroxilação benzílica		
	Hidroxilação alílica		
	Hidroxilação α a heteroátomo		
	Hidroxilação aromática	ArH	ArOH
	Epoxidação		
Nitrogênio	Aminas primárias	RNH ₂	RNHOH
	Aminas secundárias	R ₁ R ₂ NH	R ₁ R ₂ NOH
	Aminas terciárias	R ₁ R ₂ R ₃ N	R ₁ R ₂ R ₃ N-O
	Amidas	RCONHR'	RCON(R)OH
Enxofre	Sulfetos	RSR'	RSOR'
	Sulfóxidos	RSOR'	RSO ₂ R'
<i>Reduções</i>			
	Azo	R-N=N-R'	R-NH ₂ + R'NH ₂
	Nitro	R-NO ₂	R-NH ₂
	Cetonas	RCOR'	RCH(OH)R'

Tabela 8: Principais processos não-microsômicos de biotransformação (Retirada na íntegra de BARREIRO e FRAGA, 2001).

<i>Fármaco</i>	<i>Metabólito</i>
RCH_2OH	$RCHO$
$RCHO$	RCO_2H
$R(RCH_2)_2CO_2H$	RCO_2H
RCH_2NH_2	RCO_2H
$RCOR'$	$RCH(OH)R'$
 <p>The diagram shows a skeletal structure of an alkene. It consists of two carbon atoms connected by a double bond. The left carbon is bonded to a substituent labeled 'R'. The right carbon is bonded to a substituent labeled 'R'.</p>	RCH_2CH_2R'

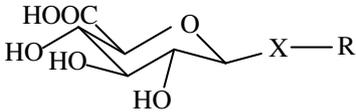
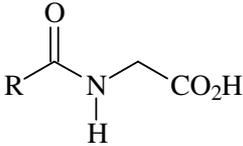
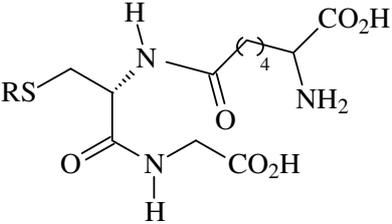
Com base na estrutura do letrozol, foi pesquisado como costuma ser a biotransformação do grupamento nitrila: O grupo nitrila é muito robusto e, na maioria dos casos, não é prontamente metabolizado pela fase I. Metabolicamente, esse grupo não é modificado na maioria dos fármacos em que ele está presente na estrutura. Isso pode ser atribuído à força da ligação tripla entre o carbono e o nitrogênio. Para efeitos comparativos, o grupamento CN é oito vezes menor que o grupamento metila, o que demonstra que a força dessa ligação é muito maior do que a ligação entre o carbono e o hidrogênio (FLEMING *et al.*, 2010).

3.1.2. SEGUNDA FASE DO METABOLISMO - FASE II

De maneira geral, os metabólitos de fase I apresentam coeficiente de partição inferior ao do fármaco original, dependendo do nível de variação estrutural do mesmo. Entretanto, a maior polaridade destes metabólitos de fase I não é suficiente para assegurar sua eliminação pela principal via de excreção dos fármacos, a renal. Portanto, estes metabólitos sofrem reações subseqüentes de conjugação com pequenas moléculas endógenas de alta polaridade, formando conjugados altamente hidrossolúveis, que são excretados pela urina.

A Tabela 9 demonstra as principais reações de conjugação envolvidas no metabolismo de fármacos.

Tabela 9: Principais reações de conjugação envolvidas no metabolismo de fármacos (Retirada na íntegra de BARREIRO e FRAGA, 2001).

<i>Reação de fase II</i>	<i>Grupo funcional presente no metabólito de fase I</i>	<i>Conjugado</i>
Glicuronidação	OH, COOH, NH ₂ , CH	
Sulfatação	OH, NH ₂	R-OSO ₃ , R-NHSO ₃ H
Conjugação com glicina	COOH	
Conjugação com glutationa	Grupos eletrolíticos (óxido de areno, epóxidos, carbocátions, enonas)	
Acetilação	OH, NH ₂	R-OAc, RNHAc
Metilação	OH, NH ₂ , SH, N heterocíclico	R-OMe, R-NHMe

3.2. PREPARO DE AMOSTRA

A primeira etapa de um estudo analítico, usualmente, consiste no isolamento de uma parte do universo em estudo que é denominada amostragem. É de fundamental importância que a amostra seja representativa do todo, pois caso contrário, os resultados obtidos não são válidos (LANÇAS, 2009).

A próxima etapa é a preservação de parte da amostra original, de maneira a garantir a integridade física e química da mesma (LANÇAS, 2009). No caso de estudos de excreção em urinas, é importante que as amostras sejam armazenadas congeladas de modo a minimizar a proliferação de bactérias, a degradação do analito estudado e de seus metabólitos.

A etapa seguinte é o preparo da amostra, cuja finalidade é adequar o soluto a ser determinado às condições da técnica e do método de análise a serem utilizados. Várias operações, como por exemplo, extração ou filtração, entre outras, podem ser necessárias, dependendo da natureza da amostra, da matriz e da concentração dos analitos de interesse (LANÇAS, 2009).

Apesar de todas as etapas serem importantes, o preparo da amostra é uma das mais críticas por envolver maior tempo e atenção do analista. No caso de análises de urina por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas, quando o fármaco apresenta a possibilidade de conjugação, a primeira etapa do preparo, geralmente, é a etapa de hidrólise. Nela, há a conversão dos analitos esteróides ou não glicocjugados nas suas formas livres. Além disso, esta etapa é comumente seguida pelo isolamento do analito da matriz original e a sua transferência para um solvente apropriado, denominado solvente de extração.

O número de técnicas de extração é grande, mas nesse trabalho, são citadas as duas mais usadas em estudos de excreção envolvendo urina, que são a extração líquido-líquido e a extração por fase sólida.

Outra técnica frequentemente usada no preparo da amostra analisada por cromatografia gasosa é a derivatização. Esta é usada com a finalidade de formar compostos mais voláteis e termicamente estáveis, permitindo a análise por cromatografia gasosa acoplada à qualquer detector.

3.2.1. HÍDROLISE

A hidrólise pode ser efetuada através de meios biológicos, com o uso de enzimas, ou meios químicos. A hidrólise enzimática é mais comumente usada porque quando as enzimas são escolhidas de forma ideal, elas costumam ser mais específicas em relação à reação que catalisam, ou seja, tem um alto grau de especificidade em relação ao substrato. Além disso, a hidrólise química pode causar degradação dos analitos ou de moléculas presentes na matriz, formando interferentes na amostra (GEYER *et al.*, 1997; GOMES *et al.*, 2009).

As enzimas são proteínas produzidas por seres vivos e diminuem a energia de ativação de uma reação, permitindo o aumento da velocidade da reação. Existem três fontes principais de enzimas: bactérias, mamíferos e moluscos. As fontes provenientes de mamíferos e bactérias têm atividade beta-glicuronidase, o que permite a clivagem da molécula no grupo glicuronídeo. Já as fontes de molusco possuem atividade beta-glicuronidase e sulfatase,

permitindo a clivagem das moléculas nos grupos glicuronídeo e sulfatos (GEYER *et al.*, 1997; GOMES *et al.*, 2009). A enzima utilizada neste trabalho é de origem bacteriana, *Escherichia coli*.

A velocidade de reação enzimática ou a eficiência da enzima é função de diversos fatores como concentração de enzima, concentração de substrato, temperatura, pH, força iônica, tempo de incubação, entre outros. Devido a isto, uma etapa muito importante e trabalhosa, mas que pode ser facilitada pela pesquisa bibliográfica, é a otimização das condições de hidrólise. Como a concentração de um analito glicoconjugado é desconhecida, para se determinar a quantidade de enzima correta e suficiente para provocar a hidrólise completa dos analitos conjugados na amostra, é necessário testar diversas quantidades até que se encontre uma quantidade razoável. Outro fator preocupante, é que o excesso muito grande de enzima pode diminuir a eficiência de hidrólise (GEYER *et al.*, 1997; LEHNINGER, 2006; GOMES *et al.*, 2009; VENTURELLI *et al.*, 1995)

Para encontrar as condições adequadas, é necessário conhecer a temperatura e o pH ideal para a ação enzimática, e esses parâmetros variam para cada enzima. Na utilização de *E. coli*, o pH neutro favorece as condições de hidrólise enquanto o pH alcalino interrompe a ação enzimática. Na análise de urina, como o valor de pH varia em cada amostra em função dos analitos presentes na mesma, é comum nos procedimentos de preparo de amostra, encontrados na literatura, a adição de uma solução tampão neutro antes da hidrólise.

O tempo de incubação também deve ser testado e pode ser diminuído com o aumento da temperatura da reação. Primeiramente, o aumento da temperatura aumenta a energia cinética das moléculas componentes do sistema aumentando a velocidade de reação. Entretanto, deve-se ter atenção à esse parâmetro: o excesso da temperatura pode alterar as ligações que conservam a estrutura tridimensional da enzima, desnaturando e provocando a perda da atividade da mesma (LEHNINGER, 2006; GOMES *et al.*, 2009).

3.2.2. EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO

A extração líquido-líquido é um método de separação que se baseia na partição de um analito ou de um conjunto de substâncias específicas entre duas fases líquidas imiscíveis, geralmente água e um solvente orgânico. Como não existem dois líquidos completamente imiscíveis, recomenda-se o uso de solventes cuja solubilidade de um no outro não ultrapasse

10%. Além disso, as densidades devem ser diferentes de modo a formar duas fases bem definidas e evitando a formação de emulsões (LANÇAS, 2009).

As vantagens desta técnica são a simplicidade, rapidez além da diversidade de solventes disponíveis para a extração. Já como desvantagens, podem ser destacadas o grande consumo de solvente orgânico, a baixa seletividade e a dificuldade de automação.

Analitos ácidos devem ser extraídos em meio ácido e analitos básicos devem ser extraídos em meio básico. Se a espécie orgânica é ácida, ao se manter baixo o pH da solução aquosa, o analito orgânico existe principalmente na forma não dissociada e é rapidamente extraído para a camada orgânica. Ao se aumentar o pH da solução aquosa o analito se converte na forma ionizada (ânion), que tende a permanecer na fase aquosa. Paralelamente, no caso de analitos básicos, um pH elevado favorece a solubilização na fase orgânica, enquanto um pH baixo favorece a permanência na fase aquosa. Esta explicação pode ser demonstrada mais facilmente pelo esquema a seguir:

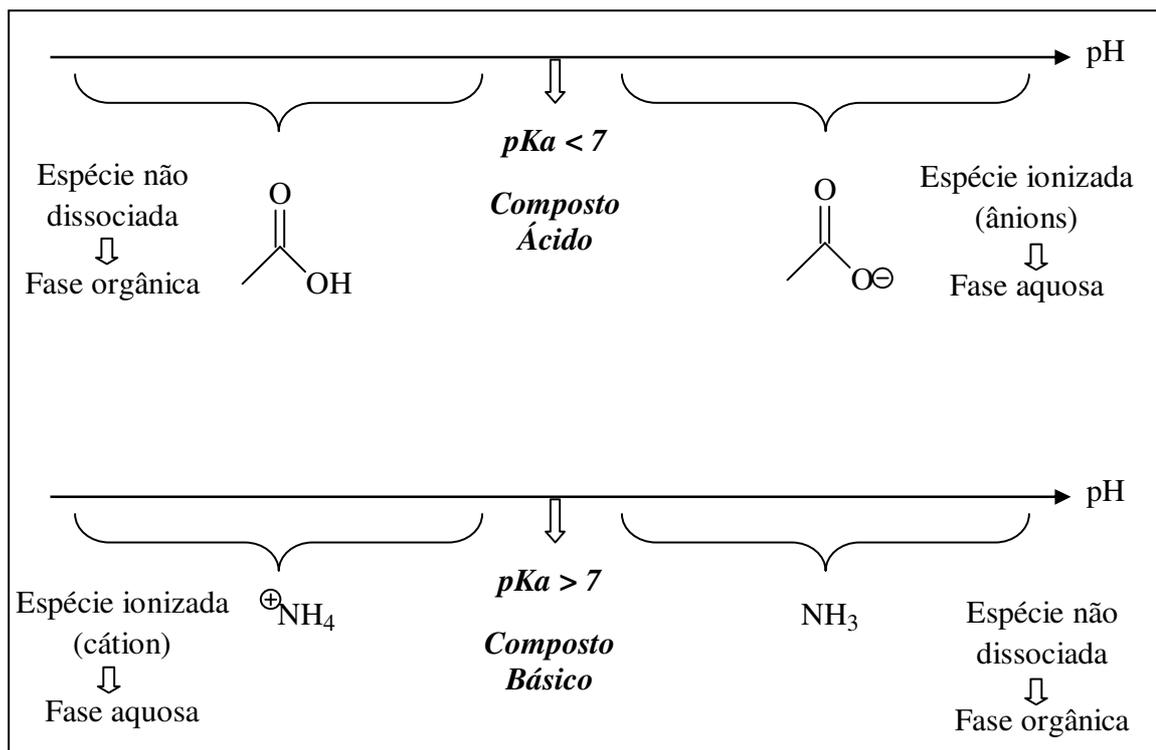


Figura 9: Esquema da ionização e dissociação de compostos ácidos e básicos.

3.2.3. EXTRAÇÃO POR FASE SÓLIDA

Na extração em fase sólida a amostra é percolada através de um pequeno tubo preenchido com partículas sólidas porosas. A escolha da fase estacionária depende da natureza do analito de interesse e da matriz na qual ele se encontra e influencia diretamente o mecanismo de separação. Os mais comuns são a adsorção (majoritário), partição, troca iônica e exclusão por tamanho. Estes mecanismos estão associados a processos químicos e físicos que atuam durante a separação.

Dentre os principais modos de operação em extração em fase sólida, os mais importantes são a concentração da amostra, o isolamento do analito, o isolamento da matriz e a estocagem da amostra (LANÇAS, 2009).

As etapas envolvidas na extração em fase sólida são:

- *Condicionamento*: Ativa o material existente dentro do cartucho. Geralmente, usa-se metanol ou água e um dos fatores mais importantes é não deixar a fase estacionária secar evitando a formação de caminhos preferenciais.
- *Adição da amostra*: É realizada na maioria das vezes com o auxílio de uma pipeta de forma quantitativa. Idealmente, a velocidade de aplicação da amostra deve ser lenta, controlando-se o vácuo ou a pressão aplicada.
- *Lavagem ou remoção da matriz*: Adição de um solvente que não possua força suficiente para eluir o analito. O solvente ideal é o próprio solvente da amostra, caso ele não remova, também o analito de interesse.
- *Eluição dos analitos*: A eluição deve ser realizada, de preferência, em um pequeno volume de solvente de forma que a solução coletada já se encontre em uma concentração apropriada para a análise. A escolha do eluente é de grande importância, pois deve eluir os analitos de interesse, mas não permitir a eluição de interferentes que não tenham sido eliminados na etapa anterior.

As vantagens da extração em fase sólida são a rapidez, a pouca manipulação da amostra, a facilidade de automação e miniaturização, além de gastar menos solvente orgânico. Já as desvantagens são o maior tempo para a realização do procedimento, e necessidade de treinamento intensivo do analista, além do custo ser mais elevado que o da extração líquido-líquido.

3.2.4. DERIVATIZAÇÃO

A análise por cromatografia gasosa só é viável na análise de gases, de substâncias voláteis, termicamente estáveis ou substâncias que possam ser transformadas em derivados voláteis. Quando isso não acontece, principalmente no caso de substâncias de alta massa molar e/ou compostos com grupos funcionais polares, há a necessidade de derivatização. Isso pode ser atribuído ao fato das moléculas polares sofrerem interações intermoleculares fortes, como por exemplo, ligação de hidrogênio, resultando em moléculas pouco voláteis (LANÇAS, 1993; COLLINS *et al.*, 2006).

A derivatização pode ser usada também para a introdução de grupos específicos, no sentido de aumentar a detectabilidade da substância.

As reações de derivatização são reações de transformação molecular, e as principais são a alquilação e a acilação, além da silanização, usada no presente trabalho. As reações de silanização ou sililação visam substituir os prótons lábeis em compostos polares pelo grupo trimetilsilil [-Si(CH₃)₃]. Várias funções químicas que apresentam grupos polares podem ser derivatizados por esta técnica. Dentre eles, destacam-se álcoois, ácidos carboxílicos, aminas, fenóis, carboidratos, esteróides, entre outros (LANÇAS, 1993).

O agente sililante usado no procedimento experimental deste trabalho é o N-metil-N-trimetilsilil-trifluoroacetamida, MSTFA.

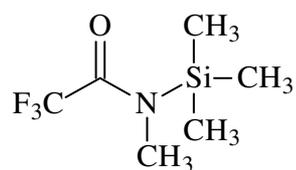


Figura 10: Estrutura do MSTFA, N-metil-N-trimetilsilil-trifluoroacetamida.

Utiliza-se uma solução derivatizante de MSTFA:NH₄I:2-mercaptoetanol. Nessa mistura, o iodeto de trimetilsilila (TMSI) é formado na reação do iodeto com o MSTFA. Na figura a seguir está demonstrado um dos mecanismos sugeridos para esta reação. Primeiramente, há um ataque do par de elétrons livres do nitrogênio do TMSI no hidrogênio do HI. Conseqüentemente, com a formação de nucleófilo I⁻, este forma uma ligação com o silício, formando o iodeto de trimetilsilil. A figura a seguir mostra um dos mecanismos propostos para a formação de TMSI (VAN DE KERKOHOF, 2001).

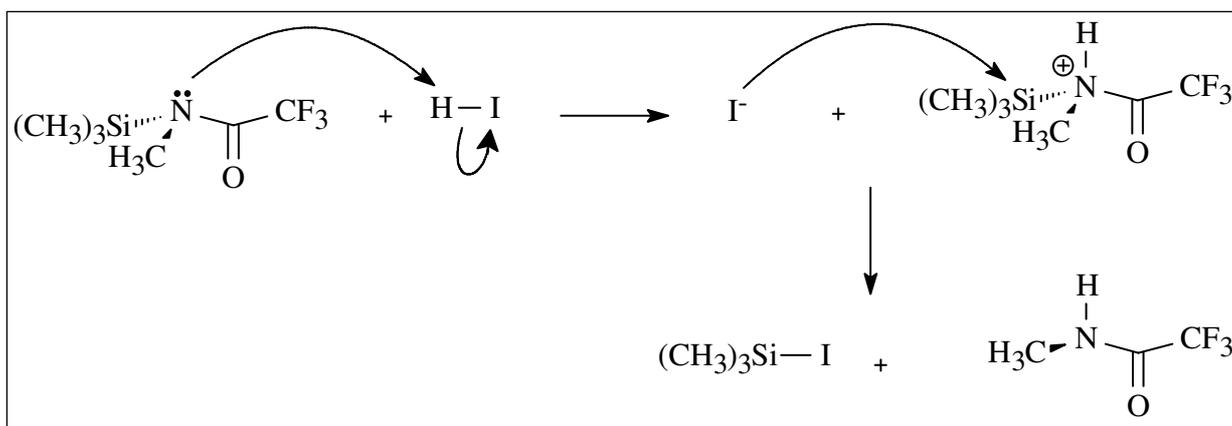


Figura 11: Mecanismo de Reação proposto para a formação do Iodeto de trimetilsilila (VAN DE KERKHOFF, 2001).

Como o TMSI é altamente sensível à hidrólise e à decomposição por oxigênio e luz, adiciona-se à mistura um agente redutor, 2-mercaptoetanol, minimizando a formação de iodo, ou seja, a oxidação e aumentando o tempo útil da mistura derivatizante. (VAN DE KERKHOFF, 2001, ALVES, 2012).

Na Figura 12, pode-se ver um exemplo de uma reação de silição a partir do iodeto de trimetilsilila.

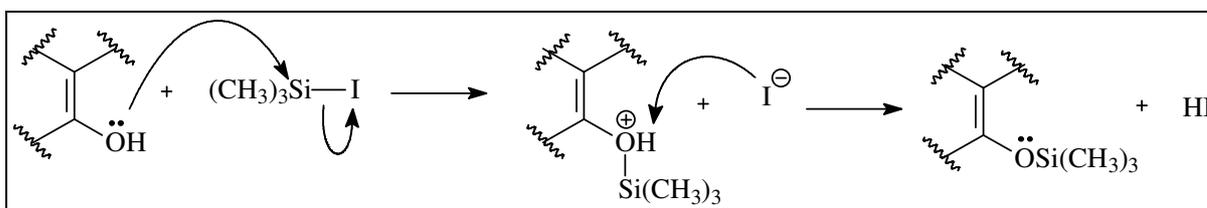


Figura 12: Exemplo de reação de silição dos esteróides (VAN DE KERKHOFF, 2001).

3.3. CROMATOGRAFIA

A cromatografia é um método físico-químico de separação. Ela está fundamentada na migração diferencial dos componentes de uma mistura, que ocorre devido a diferentes interações, entre duas fases imiscíveis, a fase móvel e a fase estacionária. A grande variedade de combinações entre fases móveis e estacionárias a torna uma técnica extremamente versátil e de grande aplicação (LANÇAS, 1993; COLLINS *et al.*, 2006).

A cromatografia pode ser utilizada para a identificação de compostos, por comparação com padrões previamente existentes, para a purificação de compostos, separando-se as substâncias indesejáveis para a separação dos componentes de uma mistura complexa usando a análise qualitativa e/ou quantitativa.

Dentre os vários tipos de cromatografia, será dado destaque a cromatografia gasosa.

3.3.1. CROMATOGRAFIA GASOSA

A cromatografia gasosa é uma técnica analítica muito usada em várias áreas da pesquisa. Além de possuir um alto poder de resolução, é muito atrativa devido à possibilidade de detecção em escala de nano a picogramas (10^{-9} - 10^{-12} g). É utilizada para a separação de gases ou de compostos volatilizáveis e que sejam termicamente estáveis (PEREIRA e AQUINO NETO, 2000; AQUINO NETO, 2003; COLLINS *et al.*, 2006).

Os gases utilizados como fase móvel, chamados de gás de arraste ou gás carreador, devem ter alta pureza e serem inertes em relação à fase estacionária. Os mais utilizados são hidrogênio e hélio.

A injeção da amostra é feita através de microseringas com agulhas de pontas hipodérmicas, manualmente ou com injetores automáticos. A injeção pode ser com ou sem divisão de fluxo. A injeção com divisão de fluxo tem a vantagem de garantir uma banda inicial de amostra estreita e uma quantidade de amostra compatível com as colunas capilares, garantindo dessa forma, uma melhor resolução do cromatograma. Esse tipo de injeção também tem a vantagem de permitir a análise de soluções concentradas ou de concentrações desconhecidas e ter boa repetibilidade para taxas altas de divisão como 1:100. Já a injeção sem divisão de fluxo é mais indicada para soluções mais diluídas. Além disso, devido ao fato da amostra ser transferida para a coluna mais lentamente, recomenda-se o uso de mecanismos de reconcentração da amostra de modo a minimizar o alargamento dos picos cromatográficos (AQUINO NETO, 2010).

De acordo com o tipo de fase estacionária usada, a cromatografia gasosa pode ser classificada em cromatografia gás-sólido e cromatografia gás-líquido. Na cromatografia gás-sólido, a fase estacionária é um sólido com uma grande área superficial e a separação baseia-se em mecanismos de adsorção das substâncias nesse sólido. É usada principalmente na análise de gases permanentes e compostos apolares de massa molar baixa. Na cromatografia gás-líquido, a fase estacionária é um líquido pouco volátil, imobilizado em um suporte sólido.

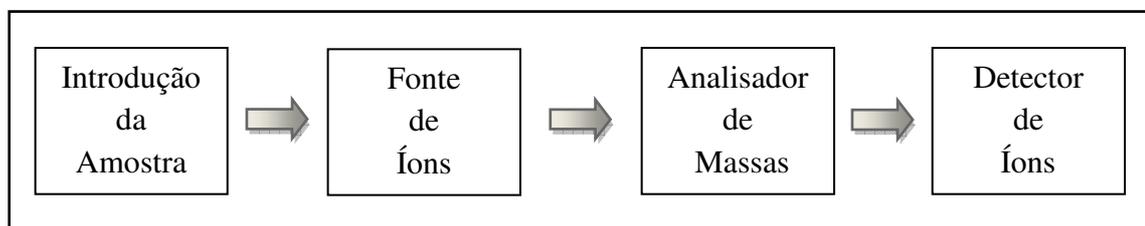
A separação baseia-se em mecanismos de partição das substâncias entre a fase líquida e a fase gasosa. A utilização desse tipo de cromatografia corresponde aproximadamente 95% do total de aplicações (AQUINO NETO, 2003; COLLINS *et al.*, 2006).

Os detectores mais usados são o detector de ionização em chama e o espectrômetro de massas. Este último será abordado com mais atenção, pois foi o detector usado no desenvolvimento deste trabalho.

3.4. ESPECTROMETRIA DE MASSAS

A espectrometria de massas é uma técnica analítica poderosa para identificar compostos desconhecidos, quantificar materiais conhecidos e elucidar as propriedades químicas e estruturas das moléculas. Pode ser realizada com quantidades e com concentrações de analitos na ordem de pg/mL em misturas complexas (PAVIA *et al.*, 2010).

Os espectrômetros de massas são formados pelos seguintes compartimentos:



A introdução da amostra pode ser realizada diretamente no espectrômetro através de uma sonda direta ou por meio do acoplamento com equipamentos de cromatografia gasosa ou líquida, por exemplo. Essa técnica de introdução de amostra possibilita que uma mistura complexa de componentes seja separada no cromatógrafo, e o espectro de massa de cada componente pode, então, ser determinado individualmente (CHIARADIA *et al.*, 2008; PAVIA *et al.*, 2010).

Existem vários modos de ionização, como ionização eletrônica (antigamente chamada de impacto por elétrons), ionização química, *electrospray*, ionização química a pressão atmosférica, fotoionização a pressão atmosférica, entre outras. Existem também diversos analisadores de massas como quadrupolo, triplo quadrupolo, armadilha de íons ou *ion trap*, tempo de voo, entre outros (CHIARADIA *et al.*, 2008). Geralmente, os equipamentos são conhecidos pelo analisador de massas que possui.

Na execução deste trabalho as análises por cromatografia gasosa foram realizadas usando como detectores espectrômetros de massas com ionização eletrônica como técnica de ionização e o triplo quadrupolo como analisador de massas.

3.4.1. Técnica de Ionização

3.4.1.1. Ionização eletrônica:

Na técnica de ionização eletrônica, um feixe de elétrons de alta energia atinge o fluxo de moléculas admitidas pela unidade de entrada da amostra. Com a colisão entre elétrons e moléculas, há a retirada de um elétron de uma molécula, criando um cátion. A energia necessária para remover um elétron de um átomo ou uma molécula no seu estado gasoso é o seu potencial de ionização. Apesar da maioria dos compostos orgânicos terem potenciais de ionização entre 8 e 15 eV, geralmente utiliza-se feixes de elétrons com energia entre 50 e 70 eV para que os íons sejam formados. O excesso de energia cinética transmitido para as moléculas leva a uma fragmentação significativa de íons moleculares. O padrão de fragmentação de uma substância é reprodutível e permite a comparação com espectros de bibliotecas ou a comparação com a fragmentação de algum padrão estudado (CHIARADIA *et al.*, 2008; PAVIA *et al.*, 2010).

Essa técnica de ionização é recomendada para analitos de média a baixa polaridade e para analitos que não sofrem degradação em alta temperatura.

3.4.2. Analisadores de Massas

3.4.2.1. Quadrupolo único (*single* quadrupolo):

Um quadrupolo é formado por quatro barras sólidas paralelas na direção de um feixe de íons. Uma voltagem de corrente contínua e uma radiofrequência são aplicadas às barras, gerando um campo eletrostático oscilante na região entre as barras. Dependendo da razão entre a amplitude da radiofrequência e a voltagem da corrente contínua, os íons adquirem uma oscilação nesse campo eletrostático. Desta forma, os íons são separados com base na estabilidade de suas trajetórias no campo elétrico formado. Suas trajetórias serão dependentes ao campo elétrico produzido de modo que apenas íons de uma particular razão m/z terão uma trajetória estável e chegarão ao detector. Todos os outros valores de m/z terão trajetórias

instáveis e irão colidir ou escapar da região central do quadrupolo, não atingindo o detector. Devido a esse processo, é comum dizer que o analisador de massas do tipo quadrupolo único é um filtro de massas (CHIARADIA *et al.*, 2008; PAVIA *et al.*, 2010).

O vácuo é imprescindível nesse sistema por remover o ar e a umidade do mesmo. Para alcançar o vácuo necessário, duas bombas são usadas. A primeira é uma bomba mecânica que alcança um pré-vácuo e a segunda, é uma bomba de alto vácuo, que pode ser a difusora ou a turbo e estas alcançam uma pressão em torno de 10^{-6} Torr.

3.4.2.2. Triplo quadrupolo:

O triplo quadrupolo é constituído por três quadrupolos em série (QqQ), sendo que o segundo quadrupolo não é de fato um quadrupolo e sim uma câmara de colisão. Nessa cela, ocorre a fragmentação dos íons selecionados no primeiro quadrupolo geralmente por dissociação induzida por colisão (DIC) com um gás reagente (geralmente Ar, He ou N₂) e o direcionamento dos íons produzidos para o terceiro quadrupolo. Na DIC, o íon precursor proveniente do primeiro quadrupolo é acelerado por um potencial elétrico para uma região de alto vácuo no interior da câmara de colisão, onde sofre repetidas colisões com um gás inerte de elevada energia, o que leva a um aumento na energia potencial deste íon até ocasionar sua fragmentação, conduzindo à formação dos íons produto. Dependendo da energia utilizada na dissociação induzida por colisão, podem ocorrer diferentes formas de fragmentação. Quando a DIC é realizada com baixa energia, geralmente as fragmentações levam à perda de fragmentos neutros, como por exemplo, H₂O, MeOH, CO, etc..., dependendo da natureza do íon precursor. Quando a DIC é realizadas com elevada energia, as reações de fragmentação geram informações mais específicas, uma vez que podem levar à quebra das moléculas em posições características. Por outro lado, quando a energia é muito elevada, há uma fragmentação extensa dos íons resultando em íons de pequena razão m/z (<50) (CHIARADIA *et al.*, 2008; PAVIA *et al.*, 2010).

3.4.3. Experimentos em Espectrometria de massas em série (EM-EM)

Diversos experimentos podem ser realizados por espectrometria de massas em série (EM-EM), e os mais utilizados serão brevemente explicados a seguir:

3.4.3.1. Varredura do íon produto:

No primeiro quadrupolo (Q1) o íon de interesse é isolado e depois é fragmentado na cela de colisão. Posteriormente, é feita uma varredura no terceiro quadrupolo dos íons produzidos a partir da fragmentação do íon selecionado no Q1, para obtenção do espectro de massas (CHIARADIA *et al.*, 2008; BORRÀS *et al.*, 2013).

3.4.3.2. Varredura do íon precursor:

Ao contrário do experimento anterior, o primeiro quadrupolo (Q1) é ajustado para transmitir íons dentro de um intervalo de m/z de interesse, os quais são fragmentados na cela de colisão e posteriormente, no terceiro quadrupolo (Q3) é isolado apenas os íons de interesse de determinada m/z . O sinal só é gerado no detector quando um íon transmitido no Q1 se fragmenta na cela de colisão gerando o íon produto selecionado que atravessa o Q3 (CHIARADIA *et al.*, 2008; BORRÀS *et al.*, 2013).

3.4.3.3. Varredura de perda de fragmento neutro:

Esta varredura permite observar íons que se fragmentam perdendo uma massa de estrutura química conhecida específica e neutra. É realizada no triplo quadrupolo a partir da varredura simultânea nos dois quadrupolos, Q1 e Q3.

Por exemplo, quando Q1 transmite um íon de m/z 100 ao mesmo tempo em que Q3 transmite um íon de m/z 58 e, posteriormente Q1 passa a transmitir o íon de m/z 101 e Q2 o íon de m/z 59, isso indica que está ocorrendo uma perda constante de massa neutra de 42 Da (CHIARADIA *et al.*, 2008).

3.4.3.4. Monitoramento Seletivo de Reações (MSR) e Monitoramento de Reações Múltiplas (MRM):

No monitoramento seletivo de reações, monitora-se a fragmentação de um íon precursor selecionado no primeiro quadrupolo, Q1, aos seus correspondentes íons produtos que atravessam o terceiro quadrupolo, Q3 (CHIARADIA *et al.*, 2008; KITTERINGHAM *et al.*, 2009).

O monitoramento de relações múltiplas é uma extensão do monitoramento seletivo de reações. Quando se monitora a fragmentação de vários íons precursores simultaneamente, este

modo de varredura é denominado monitoramento de reações múltiplas (MRM) (KITTINGHAM *et al.*, 2009; ZHI *et al.*, 2011). Ou seja, as duas técnicas têm como finalidade monitorar a presença e a intensidade da transição de um determinado íon precursor para um determinado íon produto.

Neste trabalho, o experimento utilizado para a identificação do metabólito carbinol foi o monitoramento de reações múltiplas e no caso do carbinol, as duas transições monitoradas foram m/z 291 \rightarrow m/z 217 e m/z 291 \rightarrow m/z 160.

3.5. PADRÃO INTERNO

O padrão interno é um composto, de concentração conhecida, que se adiciona à amostra contendo o componente cuja concentração se pretende determinar, de forma que nunca interfira na análise. Idealmente, a substância usada como padrão interno deve ser similar e ter comportamento cromatográfico semelhante à substância a ser quantificada ou identificada, e não pode estar presente e nem reagir com nenhuma substância ou outro componente da matriz. Além disso, idealmente, quando cromatografada, deve ficar separada de todas as demais substâncias presentes na matriz, ou seja, ser bem resolvida das demais, e principalmente do analito alvo.

O método de padronização interna é um método simples e eficiente que consiste na adição da mesma quantidade de solução padrão em todas as soluções de análise ou em todas as amostras. Quando se deseja quantificar, após análise dessas soluções, constrói-se um gráfico, relacionando a razão de áreas (área do analito/área do padrão interno que tem concentração constante), com a concentração da substância nas soluções. A amostra também é analisada após a adição da mesma quantidade conhecida do padrão interno. Através da razão de áreas obtidas no cromatograma tem-se a concentração da substância na amostra (RIBANI *et al.*, 2004; LANÇAS, 2009).

O método de padronização interna é extremamente útil, especialmente pelo fato de que independe de pequenas mudanças em variáveis experimentais.

O uso de padrões internos deuterados, ou melhor, a molécula do analito alvo deuterada é sempre uma boa opção por garantir o comportamento cromatográfico similar, sem que ocorra coeluição de ambas. Apesar disso, os padrões internos deuterados devem ser monitorados

periodicamente para se garantir que não esteja ocorrendo a diluição isotópica, que é a perda do deutério e a substituição por hidrogênio.

Neste trabalho, foi usado como solução de padrão interno uma solução de padrões, denominada ISTD2, contendo metiltestosterona, 5beta-diol-D5, 5alfa-diol-D3, Epitestosterona-D3, Testosterona-D3, Etiocolanolona-D5 e Androsterona glicuronídeo-D4.

3.6. PLANEJAMENTO DE EXPERIMENTOS

O planejamento experimental é uma ferramenta usada em diversas áreas de pesquisa com a finalidade de determinar não só as variáveis que exercem maior influência no desempenho de um processo ou análise, mas também definir as melhores condições experimentais para estes.

Tem-se como objetivo obter um modelo matemático apropriado para descrever um certo fenômeno, usando um número mínimo de experimentos. O planejamento experimental permite eficiência e economia no processo experimental e o uso de métodos estatísticos na análise dos dados obtidos resulta em objetividade científica nas conclusões (CALADO, 2003 e BARROS NETO *et al.*, 2010).

Todo planejamento experimental começa com uma série inicial de experimentos, com o objetivo de definir as variáveis e os níveis importantes. Podem-se ter variáveis qualitativas como tipo de catalisador, uso ou não do *salting out*, e quantitativas como, por exemplo, temperatura e a concentração de algum reagente (CALADO, 2003 e BARROS NETO *et al.*, 2010).

Por exemplo, num estudo que se deseja obter o rendimento máximo de uma reação química, variando a temperatura da reação e a concentração de algum reagente. Neste caso, o rendimento é a propriedade de interesse, denominada resposta; a temperatura e a concentração são os fatores e a função que descreve essa influência é chamada de superfície de resposta. O objetivo do pesquisador é descobrir quais valores - os níveis - dos dois fatores que produzem a maior resposta possível, traduzida pela massa do produto formado (rendimento da reação) (BARROS NETO *et al.*, 2010).

Não se pode simplesmente fixar um dos fatores num certo nível e variar o outro até descobrir qual o nível desse outro fator que produz o maior rendimento. Primeiramente, esse pensamento seria o mais lógico, porém existe uma maneira mais eficaz de fazer o

experimento. Ao contrário do que se poderia esperar, é muito melhor variar todos os fatores ao mesmo tempo. A razão para isso é que as variáveis podem se influenciar mutuamente, e o valor ideal para uma delas pode depender do valor da outra. Esse comportamento é chamado de interação entre os fatores e é um fenômeno que ocorre com muita frequência (BREITKREITZ, *et al.*, 2014 e BARROS NETO *et al.*, 2010).

É importante lembrar que não se deve desprezar o conhecimento técnico, afinal ele é insubstituível. As ferramentas estatísticas são um complemento a esse conhecimento. Ou seja, é importante que as escolhas dos fatores e dos níveis tenham embasamento técnico ou teórico.

Antes de começar a realizar os experimentos, os objetivos e os critérios devem estar bem claros, de modo a dar subsídios para a escolha:

- das variáveis envolvidas nos experimentos;
- da faixa de variação das variáveis selecionadas;
- dos níveis escolhidos para essas variáveis;
- da variável de resposta;

No caso do presente estudo, a eficiência de extração do carbinol foi avaliada variando não só o solvente, mas também o uso ou não do NaCl para fazer o *salting out*.

3.7. FIGURAS DE MÉRITO DE VALIDAÇÃO QUALITATIVA

Validação é o conjunto de operações necessárias para demonstrar que um procedimento de análise é adequado para a aplicação pretendida (LBCD, 2011).

A validação completa envolve todas as características de desempenho de um método e um estudo interlaboratorial que é utilizado para verificar como a metodologia se comporta com uma determinada matriz em vários laboratórios, estabelecendo a reprodutibilidade da metodologia e a incerteza expandida associada à metodologia como um todo. Só assim a metodologia pode ser aceita como uma metodologia oficial para uma determinada aplicação (RIBANI *et al.*, 2004).

Protocolos internacionalmente aceitos têm sido estabelecidos para a validação completa, mais precisamente o Protocolo Harmonizado Internacional e o procedimento ISO-*International Standard Organization* (RIBANI *et al.*, 2004).

No Brasil, há duas agências responsáveis por verificar a competência de laboratórios de ensaios: a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) e o INMETRO (Instituto

Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial). Estes órgãos disponibilizam guias para o procedimento de validação de métodos analíticos, respectivamente, a Resolução ANVISA RE n. 899, de 29/05/20034 e o documento INMETRO DOQ-CGCRE-008, de julho/2011 (RIBANI *et al.*, 2004).

As figuras de mérito normalmente ensaiadas para validação de métodos analíticos são: seletividade, linearidade, faixa de trabalho, repetibilidade, exatidão; limite de detecção, limite de quantificação e rendimento de extração (RIBANI *et al.*, 2004; LBCD, 2011).

Não há uma regra sobre quais parâmetros devem ser avaliados durante a validação, pois há uma variação em diferentes áreas, além da variação dos métodos utilizados. Por exemplo, alguns parâmetros importantes na área farmacêutica são praticamente ignorados na área ambiental.

No presente trabalho foi utilizado o Protocolo de Validação de Métodos de Análise Qualitativa do LBCD, que é baseado nas recomendações do INMETRO e da AMA. Apenas alguns parâmetros foram avaliados, sendo os mesmos definidos a seguir:

3.7.1. Seletividade

A seletividade é a capacidade de identificar um analito em misturas complexas sem a interferência de outros componentes da mistura. A seletividade garante que o pico de resposta (do cromatograma) seja do composto de interesse (RIBANI *et al.*, 2004; LBCD, 2011).

3.7.2. Repetibilidade

A repetibilidade, também conhecida como precisão intra-ensaio, é uma medida do erro aleatório expressa pela dispersão obtida em uma série de medidas repetidas no menor espaço de tempo possível. A repetibilidade do método envolve a análise de uma amostra, sem variar analista, condições, tempo, instrumento (RIBANI *et al.*, 2004; LBCD, 2011).

O desvio padrão é expresso através do desvio padrão relativo percentual (DPR%) dos valores de resposta obtidos.

$$DPR\% = \frac{s}{\bar{y}} \times 100$$

onde:

s é o desvio padrão dos valores;

\bar{y} é a média dos valores.

De acordo com o com o Protocolo de Validação de Métodos de Análise Qualitativa do LBCD, é recomendado que os valores de DPR% sejam inferiores a 20%.

3.7.3. Limite de detecção (LD)

O limite de detecção é a quantidade mínima do analito que pode ser detectada com confiança. Existem várias formas de se estimar o limite de detecção (RIBANI *et al.*, 2004 e LBCD, 2011).

- Estimativa do LOD a partir do controle inferior, estabelecendo visualmente se os analitos podem ser detectados com confiança nesta concentração. Ou seja, se o pico cromatográfico estiver apresentado numa intensidade confiável.
- Estimativa do limite de detecção baseado na relação sinal-ruído; após se determinar a relação ruído nos picos de analito no controle inferior, será considerada aceitável uma relação de sinal-ruído maior ou igual a 3.

De qualquer forma, é necessário fortificar uma amostra (mínimo de seis replicatas) no nível de concentração estabelecido e submetê-la ao procedimento de extração.

3.7.4. Rendimento de extração

O rendimento de extração é a relação entre a resposta obtida quando se analisa uma quantidade definida de analito presente na matriz biológica seguindo o procedimento analítico completo; e a resposta obtida quando se analisa a mesma quantidade de analito, sendo este adicionado à matriz após todas as etapas do procedimento analítico, exceto naquelas onde o analito necessariamente já estará presente; multiplicado por 100 (LBCD, 2011).

De acordo com o Protocolo de Validação de Métodos de Análise Qualitativa do LBCD, é aconselhável que o rendimento de extração seja superior a 50%, sendo melhor quanto mais próximo de 100%.

4 METODOLOGIA

Os procedimentos analíticos descritos nessa dissertação foram realizados no Laboratório Brasileiro de Controle de Dopagem do IQ/UFRJ, credenciado pelo INMETRO, tanto para ensaios quanto para calibração segundo a norma ISO - 17025. O Laboratório também é credenciado pela Agencia Mundial Antidopagem (AMA) para o controle de dopagem em atletas, pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), para análise de resíduos em alimentos e pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA - MS) para análises toxicológicas. Além disso, é integrado à rede de laboratórios acreditados RBLE (n° ANALI 029), RBC (n° 328) e REBLAS. O LBCD possui projeto aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho (número de protocolo: 020/00) para realização de estudos de excreção. O laboratório é acreditado no Conselho Regional de Química - Terceira Região para atividades de análise química, físico-química, química-biológica, toxicológica, bromatológica e legal, padronização e controle de qualidade de produtos químicos; além de vistoria, perícia, avaliação, arbitragem, elaboração de pareceres, laudos e atestados da especialidade.

4.1.SOLVENTES E REAGENTES QUÍMICOS

4.1.1. Solventes

Acetona, metanol, e metil *terc*-butil éter (MTBE) foram adquiridos da Tedia com grau CG. O acetato de etila foi adquirido da Sigma Aldrich e também é grau CG.

4.1.2. Reagentes

Fosfato de sódio monobásico monohidratado P.A. e bicarbonato de potássio P.A. foram adquiridos da Merck. O reagente de derivatização N-metil-N-trimetilsililtrifluoracetamida (MSTFA) foi adquirido da Chem Fabrik. O iodeto de amônio e o 2-mercaptoetanol foram obtidos da Sigma. A enzima utilizada para a hidrólise das urinas, β -glicuronidase de *E. Coli*, foi adquirida pela Roche. Segundo o certificado da enzima, usando como substrato o 4-nitrofenil- β -D-Glicuronídeo, a atividade específica da β -glicuronidase é aproximadamente 140 U/mg à 37 °C ou 80 U/mg à 25 °C.

O padrão interno metiltestosterona foi adquirido pela Steraloids. Os padrões internos testosterona-D3, epitestosterona-D3, etiocolanolona-D5 e 5 α -diol-D3 e o padrão de carbinol foram adquiridos da National Measurement Institute (NMI). As purezas estão descritas na tabela a seguir.

Tabela 10: Pureza os padrões analíticos utilizados.

Padrão	Pureza
Carbinol	99%
Metiltestosterona	98%
Testosterona-D3	91%
Epitestosterona-D3	94%
Etiocolanolona-D5	92%
5 α -diol-D3	93%

4.2. EQUIPAMENTOS

Para medir a densidade das urinas foi utilizado o refratômetro Pocket PAL-105 da marca ATAGO.

Para os procedimentos de preparo de amostra e das soluções foram utilizados os seguintes equipamentos: Agitador de tubos (vórtex) da Barnsted / Thermolune (Dubuque, EUA); Centrífuga Excelsa Baby II, modelo 206-R, série HI6730, da Fane, (São Paulo, Brasil); Evaporador Reach-Therm III da Pierce (Rockford, EUA); Balança de precisão modelo BP210D, com cinco casas decimais, da Sartotius (Gottingen, Alemanha); Banho de hidrólise, Nova Ética, modelo 500/4D; e Banho seco Isotemp, Fischer Scientific, modelo 2053FS.

Para as análises instrumentais, dois sistemas foram utilizados:

- Cromatógrafo Gasoso, Agilent (7890A) acoplado à um Espectrômetro de Massas Quadrupolo Único (5975C VL MSD). Este sistema foi equipado com um injetor automático, Agilent modelo G4513A.
- Cromatógrafo Gasoso, Agilent (7890A) acoplado à um Espectrômetro de Massas Triplo Quadrupolo (7000C). Este sistema foi equipado com um injetor automático, Agilent modelo G4513A.

4.3. PREPARO DE SOLUÇÕES

4.3.1. Soluções tampões

4.3.1.1. Solução tampão fosfato de sódio 0,8M (pH 7):

Solubilizar 17,6 g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ e 34,6 g de Na_2HPO_4 em 460 mL de água destilada à temperatura ambiente (método LADETEC n° 5.108).

4.3.1.2. Solução tampão carbonato: bicarbonato de potássio 20% (pH 10):

Solubilizar 40,0 g de K_2CO_3 e 40,0 g de KHCO_3 em 320 mL de água destilada à temperatura ambiente (método LADETEC n° 5.052).

Essas soluções devem ser armazenadas em lugar fresco e à temperatura ambiente e têm validade de 6 meses.

4.3.2. Solução derivatizante

4.3.2.1. Solução mãe (MSTFA: NH_4 :2-mercaptoetanol)

Em um frasco de vidro âmbar com tampa, pesar 20 mg de NH_4I e adicionar 1 mL de MSTFA e 60 μL de 2-mercaptoetanol. Tampar o frasco, agitar em vórtex por 20 segundos e aquecer até solubilização total do NH_4I . Todo o volume da solução mãe é transferido para a solução de uso (método LADETEC n° 5.045).

4.3.2.2. Solução de uso (MSTFA: NH_4 :2-mercaptoetanol)

Transferir 1 mL da solução mãe para um frasco de vidro âmbar com tampa. Adicionar, com pipeta graduada de 10 mL, 9 mL de MSTFA. Tampar o frasco e agitar em vórtex por 20 segundos (método LADETEC n° 5.044).

Essas soluções devem ser armazenadas em dessecador com sílica gel azul à temperatura ambiente e têm validade de 7 dias.

O preparo dessas soluções deve ser feito cautelosamente, com luvas e óculos de proteção e na capela com exaustão ligada.

4.3.3. Solução de padrão interno ISTD2

Neste trabalho, foi usado como solução de padrão interno uma solução de padrões, denominada ISTD2, contendo metiltestosterona, 5beta-diol-D5, 5alfa-diol-D3, Epitestosterona-D3, Testosterona-D3, Etiocolanolona-D5 e Androsterona glicuronídeo-D4.

Na tabela a seguir encontram-se as concentrações de cada substância na solução de padrão interno ISTD2.

Tabela 11: Concentração das substâncias na solução de padrão interno ISTD2.

Substância	Concentração (ug/mL)
Metiltestosterona	25
Testosterona-D3	3
Epitestosterona-D3	0,75
Etiocolanolona-D5	25
5 α -Diol-D3	4
5 β -Diol-D5	9
Androsterona glicuronídeo-D4	25

Foi feita a identificação tanto do carbinol quanto dos seis endógenos monitorados no perfil esteroidal endógeno. Para cada analito, escolheu-se a substância contida na mistura de padrão interno mais apropriada para usá-la como referência. Na tabela a seguir estão relacionados os analitos alvos com os padrões internos escolhidos em cada caso (da solução de padrões), juntamente com as respectivas transições monitoradas.

Tabela 12: Relação do analito alvo e a substância considerada padrão interno e as transições monitoradas.

Analito Alvo		Padrão interno	
Substância	Transições	Substância	Transições
Carbinol	m/z 291 \rightarrow m/z 160	Metiltestosterona	m/z 446 \rightarrow m/z 301
	m/z 291 \rightarrow m/z 217		m/z 446 \rightarrow m/z 198
Testosterona	m/z 432 \rightarrow m/z 209	Testosterona-D3	m/z 435 \rightarrow m/z 209
Epitestosterona	m/z 432 \rightarrow m/z 327	Epitestosterona-D3	m/z 435 \rightarrow m/z 330
Androsterona	m/z 434 \rightarrow m/z 239	Etiocolanolona-D5	m/z 424 \rightarrow m/z 244
Etiocolanolona	m/z 434 \rightarrow m/z 329		m/z 424 \rightarrow m/z 334
5 α -diol	m/z 256 \rightarrow m/z 157	5 α -Diol-D3	m/z 244 \rightarrow m/z 188
5 β -diol	m/z 256 \rightarrow m/z 185		m/z 244 \rightarrow m/z 202

4.3.4. Solução do padrão interno metiltestosterona

Foi usada como padrão interno uma solução de 10 ng/ μ L de metiltestosterona. Primeiramente foi feito 2 mL de uma solução inicial na concentração de 1 mg/mL, pesando 2 mg do padrão e transferindo para um balão de 2 mL. Depois, foi feita uma diluição dessa solução inicial: 100 μ L foram transferidos para um balão de 10 mL e o mesmo foi avolumado com metanol.

4.3.5. Branco de urina (BU) e Branco de reagente (BR)

Branco de urina são urinas humanas previamente analisadas e que não tem nenhuma substância considerada interferente frente aos analitos monitorados. Já branco de reagente são 2 mL de água destilada ou Milli-Q utilizados como amostra. O BR é feito para exclusão de interferentes provenientes dos reagentes.

4.4. LETROZOL

O medicamento usado para o estudo de excreção foi o Femara, fabricado pela Novartis. Cada caixa contém 30 comprimidos com 2,5 mg do fármaco.

4.4.1. Extrato Metanólico de um comprimido

Um comprimido de Femara foi triturado e o pó foi transferido para um tubo com metanol para se fazer a extração do analito alvo. O tubo foi colocado no *shaker* por 5 minutos e depois centrifugado à 3000 rpm por 5 minutos. O extrato metanólico foi transferido para um *vial* e 1 μ L foi injetado em modo varredura total (*scan*), com faixa de massa estabelecida entre m/z 50 e m/z 750, no CG-EM.

As condições do equipamento estão descritas no item 4.7.

4.5. AMOSTRAS DE URINA DE EXCREÇÃO

Um estudo de excreção foi realizado com cinco voluntários sadios do sexo masculino com idade entre 20-34 anos e peso entre 70-85 Kg.

As amostras foram coletadas após a administração oral de um comprimido do Femara. Antes do comprimido ser administrado, foi recolhido aproximadamente 300 mL de urina de cada voluntário, o que foi denominado branco de urina, BU. Foi solicitado aos voluntários que as urinas fossem coletadas durante 1 mês de acordo com o esquema demonstrado na figura a seguir.

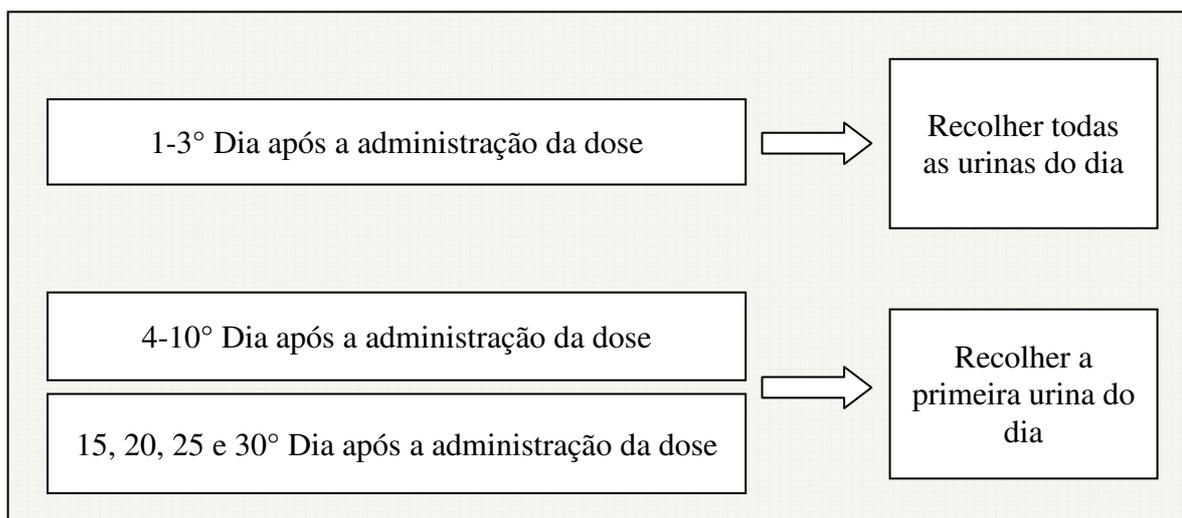


Figura 13: Esquema da coleta das urinas dos voluntários.

Todas as amostras foram coletadas separadamente, guardadas e mantidas na câmara fria à -18 °C até o início das análises.

Foram medidos o pH e a densidade de todas as urinas coletadas.

4.6. PREPARO DAS AMOSTRAS

O procedimento de preparo de amostras é o mesmo utilizado no método de análises de agentes dopantes por CG-QqQ (Compostos exógenos), da triagem IV do LBCD (método LBCD n° 5.423). No âmbito do LBCD, a triagem IV é responsável pela análise da maioria dos agentes anabólicos e todos os outros compostos analisados por cromatografia gasosa, incluindo o letrozol.

Este procedimento inclui a hidrólise dos compostos glicoconjugados como o carbinol-glicuronídeo, a extração da matriz e a sua posterior derivatização com MSTFA:NH₄I:2-mercaptoetanol.

A cada 2 mL de urina, adicionar 40 μ L da solução do padrão interno ISTD2, 750 μ L de solução tampão fosfato de sódio 0,8M pH 7 e 30 μ L da enzima β -glicuronidase de *E.coli*. Agitar em vórtex por 10 segundos e submeter à hidrólise à 50°C durante 1 hora. Após este tempo, adicionar 500 μ L de solução tampão carbonato: bicarbonato de potássio 20% (pH 10). Adicionar 5 mL do solvente MTBE, tampar os tubos e verificar se não existe vazamento. Agitar em *shaker* por 5 minutos e depois centrifugar à 3000 rpm por 5 minutos. Transferir a fase orgânica, com uma pipeta Pasteur, para outro tubo limpo e descartar a fase aquosa. Evaporar o solvente orgânico sob fluxo de nitrogênio à 40°C e manter em dessecador à vácuo por pelo menos 30 minutos. Para a derivatização, adicionar 100 μ L da solução derivatizante MSTFA:NH₄I:2-mercaptoetanol (1000:2:6; v/m/v) e aquecer à 60 °C por 20 minutos. Para finalizar, transferir a amostra, com a pipeta Pasteur, para um *vial*, com capacidade para 2 mL, com *insert*, com capacidade para 250 μ L e injetar 3 μ L em CG-QqQ.

4.7. CONDIÇÕES DE ANÁLISE CROMATOGRÁFICA

Na tabela a seguir estão descritos todos os parâmetros e condições cromatográficas usados no método de análise no CG-EM no modo varredura total (*scan*) (método LBCD n° 5.423).

Tabela 13: Condições da análise cromatográfica de CG-EM.

Instrumento: CG-EM	
Coluna analítica:	
Tipo	HP Ultra 1 (100% polimetilsiloxano)
Comprimento	15,5 m
Espessura de filme	0,11 μ m
Diâmetro da coluna	200 μ m
Gás carreador:	Hélio (ultrapuro-99,9999%)
Pressão:	9,453 psi
Modo de pressão :	Fluxo constante
Fluxo nominal	0,61393 mL/min
Velocidade linear média	41,32 cm/seg
Liner:	Com/sem divisão de fluxo, 4mm D.I. com lã de vidro silanizada.
Modo de injeção:	Com divisão de fluxo ("split")
Divisor de fluxo	10:1

Fluxo do divisor	6,1393 mL/min
Fluxo total	9,7532 mL/min
Gas saver:	20,0 mL/min
	2 min
Septo:	Septo de sangramento baixo
Temperatura do injetor:	280 °C
Volume de injeção:	1 µL
Programa de temperatura:	
Temperatura inicial	140 °C
Tempo	0 min
Razão 1	40 °C/min
Temperatura	180 °C
Razão 2	3 °C/min
Temperatura	230 °C
Razão 3	40 °C/min
Temperatura Final	300 °C
Tempo Final	2 min
Tempo total de corrida	21,42 min
Tamanho da seringa	10 µL
Solvente A	Acetona
Solvente B	Acetato de etila
Lavagem de pré-injeção Sol. A	2
Lavagem de pré-injeção Sol. B	2
Lavagem de pós-injeção Sol. A	5
Lavagem de pós-injeção Sol. B	5
Volume de solvente na lavagem	8 µL
Rinsagem na amostra	6
Parâmetros EM	
Temperatura da fonte iônica	230 °C
Temperatura do Quadrupolo	150 °C
Temperatura da interface	300 °C
Corrente de emissão	35 µA (pelo tune ou calibração)
Modo de aquisição	Varredura total (<i>scan</i>)
Faixa de massa	<i>m/z</i> 50 - <i>m/z</i> 750
Retardo de solvente	1,9 min
Método	ANABSCA_X.M

Na tabela a seguir estão descritos todos os parâmetros e condições cromatográficas usados no método de análise no CG-QqQ (método LBCD n° 5.423).

Tabela 14: Condições da análise cromatográfica de CG-QqQ.

Instrumento: CG-QqQ	
Coluna analítica:	
Tipo	HP Ultra 1 (100% polimetilsiloxano)
Comprimento	17 m
Espessura de filme	0,11 μm
Diâmetro da coluna	200 μm
Gás carreador:	Hélio (ultrapuro-99,9999%)
Pressão:	12,52 psi
Modo de pressão :	Fluxo constante
Fluxo nominal	0,71203 mL/min
Velocidade linear média	42,49 cm/seg
Liner:	Com/sem divisão de fluxo, 4mm D.I. com lã de vidro silanizada.
Modo de injeção:	Com divisão de fluxo ("split")
Divisor de fluxo	10:1
Fluxo do divisor	7,1203 mL/min
Fluxo total	10,832 mL/min
Gas saver:	20,0 mL/min
	2 min
Septo:	Septo de sangramento baixo
Temperatura do injetor:	280 °C
Volume de injeção:	3 μL
Programa de temperatura:	
Temperatura inicial	140 °C
Tempo	0 min
Razão 1	40 °C/min
Temperatura	180 °C
Razão 2	3 °C/min
Temperatura	230 °C
Razão 3	40 °C/min
Temperatura Final	300 °C
Tempo Final	2 min
Tempo total de corrida	21,42 min
Tamanho da seringa	10 μL
Solvente A	Acetona
Solvente B	Acetato de etila
Lavagem de pré-injeção Sol. A	0
Lavagem de pré-injeção Sol. B	0
Lavagem de pós-injeção Sol. A	5
Lavagem de pós-injeção Sol. B	5

Volume de solvente na lavagem	8 μ L
Rinsagem na amostra	4
Parâmetros EM	
Gás de colisão	N ₂ 5.0 (ou 99,999%)
Temperatura da fonte iônica	280 °C
Temperatura dos Quadrupolos (Q1 e Q2)	150 °C
Temperatura da interface	300 °C
Corrente de emissão	35 μ A (pelo tune ou calibração)
Modo de aquisição	MRM
Retardo de solvente	1,5 min
Método	ANAB_MRM_20150219_VF.M

MRM							
Tempo de retenção (min)	Substância	Íon Precursor	MS1 res	Íon Produto	MS2 res	Dwell (ms)	CE (V)
5,00-7,50	Letrozol M	291	amplo	217	amplo	20	20
		291	amplo	160	amplo	20	15
9,70-12,10	Androsterona/ Etiocolanolona	434	amplo	329	amplo	5	20
		434	amplo	239	amplo	5	20
9,70-12,10	Etiocolanolona-D5	424	amplo	334	amplo	5	20
		424	amplo	244	amplo	5	20
9,70-12,10	5 α -diol/5 β -diol	256	amplo	185	amplo	5	35
		256	amplo	157	amplo	5	35
9,70-12,10	5 α -diol-D3	244	amplo	202	amplo	5	35
		244	amplo	188	amplo	5	35
12,10-13,00	Epitestosterona	432	amplo	327	amplo	5	20
		432	amplo	209	amplo	5	20
12,10-13,00	Epitestosterona-D3	435	amplo	330	amplo	5	5
		435	amplo	209	amplo	5	20
13,00-14,00	Testosterona	432	amplo	327	amplo	5	10
		432	amplo	209	amplo	5	10
13,00-14,00	Testosterona-D3	435	amplo	330	amplo	5	20
		435	amplo	209	amplo	5	20
15,00-16,00	Metiltestosterona	446	amplo	301	amplo	5	15
		446	amplo	198	amplo	5	25

Pelo fato desse método de análise ser um método multi-resíduo, e conseqüentemente monitorar muitos analitos, ele deve ser segmentado em função da velocidade de aquisição. O carbinol pertence ao segmento 3 que corresponde de 5 ao 7,5 minutos.

4.8. PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL - EXTRAÇÃO

Foi feito um planejamento experimental para avaliar a extração do metabólito principal do letrozol, o carbinol, variando tanto o solvente, quanto o uso ou não do NaCl para fazer o *salting out*. Como solventes foram escolhidos o MTBE, a mistura MTBE:AcEt (1:1) e o AcEt.

O procedimento de preparo da amostra foi similar ao descrito no item 4.6, com as alterações do solvente de extração e a adição de 2 g de NaCl nas amostras em que foi feito o *salting out*. Nesses casos, após a adição de 5 mL do respectivo solvente, foram adicionados 2g de NaCl no tubo. Posteriormente, os tubos foram tampados e o procedimento foi continuado como o descrito. Além disso, para cada situação, foi feito um branco de urina e um branco de reagente, além das amostras terem sido feitas em triplicata.

Como amostra, foi utilizado um branco de urina fortificado com o metabólito do letrozol, carbinol, em 50 ng/mL. A metiltestosterona foi utilizada em todos os tubos como padrão interno em 100 ng/mL.

A Tabela 15 demonstra todas as análises realizadas para avaliação da extração do Carbinol:

Tabela 15: Esquema das análises feitas no planejamento experimental.

Tubo	Solvente de Extração	Adição de NaCl
BR MTBE	MTBE	Não
BU MTBE		
Let MTBE R1		
Let MTBE R2		
Let MTBE R3		
BR MTBE NaCl		
BU MTBE NaCl		
Let MTBE NaCl R1		
Let MTBE NaCl R2		
Let MTBE NaCl R3		
BR MTBE : AcEt		MTBE : AcEt (1:1)
BU MTBE : AcEt		
Let MTBE : AcEt R1		
Let MTBE : AcEt R2		
Let MTBE : AcEt R3		
BR MTBE : AcEt NaCl	Sim	
BU MTBE : AcEt NaCl		
Let MTBE : AcEt NaCl R1		
Let MTBE : AcEt NaCl R2		
Let MTBE : AcEt NaCl R3		
BR AcEt	AcEt	
BU AcEt		
Let AcEt R1		
Let AcEt R2		
Let AcEt R3		
BR AcEt NaCl		Sim
BU AcEt NaCl		
Let AcEt NaCl R1		
Let AcEt NaCl R2		
Let AcEt NaCl R3		

Todas essas análises foram realizadas de acordo com o preparo de amostras e condições cromatográficas descritas nos itens 4.6 e 4,7, respectivamente.

4.9. FIGURAS DE MÉRITO DE VALIDAÇÃO QUALITATIVA

4.9.1. Seletividade

A seletividade do método foi verificada comparando a matriz isenta do analito alvo, denominada branco de urina e a matriz adicionada com o carbinol. Para isso, cinco brancos de

urina dos cinco voluntários que fizeram os estudos de excreção foram analisados de acordo com o item 4.6.

4.9.2. Repetibilidade

Para esse teste, dez replicatas de uma amostra de controle foram preparadas simultaneamente, de acordo com o método citado no item 4.6. A média e o desvio padrão relativo percentual das razões área analito / área padrão interno foram calculados.

Foi avaliada a repetibilidade em amostras controle fortificadas com o carbinol em 50 ng/mL, 20 ng/mL, 10 ng/mL e 5 ng/mL.

4.9.3. Limite de detecção

Para o estudo do limite de detecção, foram analisadas amostras com concentrações baixas do analito, certificando-se que o mesmo pode ser identificado com confiança.

Foi usado um BU fortificado com o analito carbinol em 0,5 ng/mL e 1 ng/mL (3 replicatas cada).

A avaliação do limite de detecção foi feita usando os valores de sinal ruído dessas replicatas.

4.9.4. Rendimento da extração

O rendimento da extração do carbinol foi avaliado em diferentes concentrações: em 50 ng/mL, 20 ng/mL, 10 ng/mL, 5 ng/mL e 2,5 ng/mL. O padrão interno metiltestosterona foi adicionado em todas as amostras no início do procedimento na concentração igual à 100 ng/mL.

Para cada concentração, foram usados 20 tubos contendo 2 mL de branco de urina, previamente avaliados quanto a presença do carbinol. Desses 20 tubos, 10 são replicatas que foram fortificadas com o carbinol no início do procedimento (denominadas Let Ext). As outras 10 são replicatas fortificadas com o carbinol no final do procedimento.

Primeiramente, foi feita a fortificação do padrão interno metiltestosterona no início do procedimento em todos os tubos e numa concentração igual à 100 ng/mL. Posteriormente, adicionou-se o analito carbinol nas 10 replicatas denominadas Let Ext. O procedimento 4.6

foi realizado em todos os 10 tubos e após a evaporação do solvente orgânico, as outras 10 replicatas denominadas Let Fort foram fortificadas com o analito carbinol.

Todas essas análises foram realizadas de acordo com o preparo de amostras e condições cromatográficas descritas nos itens 4.6 e 4,7, respectivamente.

A tabela 16 demonstra o esquema de fortificação desse teste:

Tabela 16: Esquema de análises para avaliação do rendimento de extração.

TUBO	Adição do padrão interno	Adição do Letrozol-M
Let Ext R1	No início do procedimento, conforme descrito no item 4.6.	No início do procedimento.
Let Ext R2		
Let Ext R3		
Let Ext R4		
Let Ext R5		
Let Ext R6		
Let Ext R7		
Let Ext R8		
Let Ext R9		
Let Ext R10		
Let Fort R1		No final do procedimento.
Let Fort R2		
Let Fort R3		
Let Fort R4		
Let Fort R5		
Let Fort R6		
Let Fort R7		
Let Fort R8		
Let Fort R9		
Let Fort R10		

4.10. CINÉTICA DE HIDRÓLISE

Para análise da cinética de hidrólise, uma urina positiva de letrozol foi extraída de acordo com o procedimento descrito no item 4.6, variando apenas o tempo de hidrólise. Foram testados 0, 5, 15, 30, 45, 60 e 120 minutos de hidrólise. Além desses pontos, foi feito o procedimento com a mesma urina sem a adição de enzima. Para cada tempo de análise também foi analisado um branco de urina.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Primeiramente, foi feito um extrato metanólico do comprimido para confirmar a presença do letrozol.

5.1. EXTRATO METANÓLICO DO COMPRIMIDO

O extrato metanólico do comprimido Femara foi injetado em CG-EM no modo varredura linear (*scan*) com faixa de massa entre m/z 50 e m/z 750 e o cromatograma de íons totais referente à análise está apresentado na Figura 14.

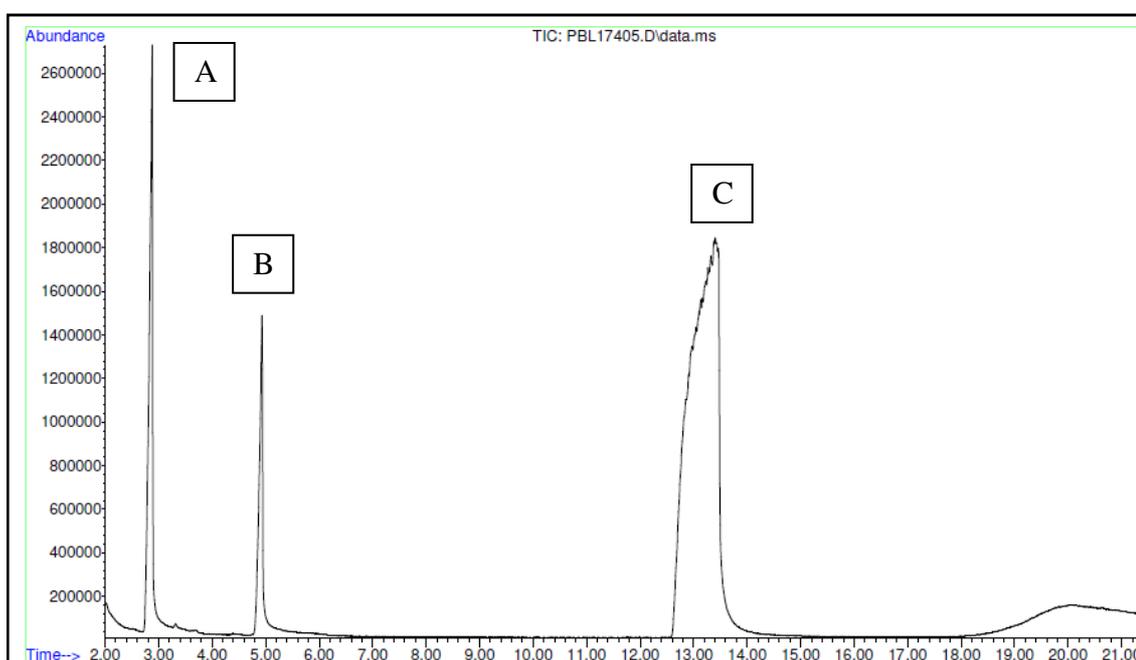


Figura 14: Cromatograma de íons totais do extrato metanólico do comprimido Femara.

O cromatograma de íons totais apresentou 3 picos intensos, denominados como A, B e C. Pode-se observar que os picos mais intensos A e C referem-se aos componentes usados na formulação do comprimido, como por exemplo, dióxido de silício, amido, lactose, celulose microcristalina, estearato de magnésio, amidoglicolato de sódio, hipromelose, macrogol, talco, dióxido de titânio e óxido férrico amarelo. O pico denominado C apresenta intensa sobrecarga, o que está relacionada a grande quantidade desse composto na amostra. O espectro de massas do pico A está apresentado a seguir.

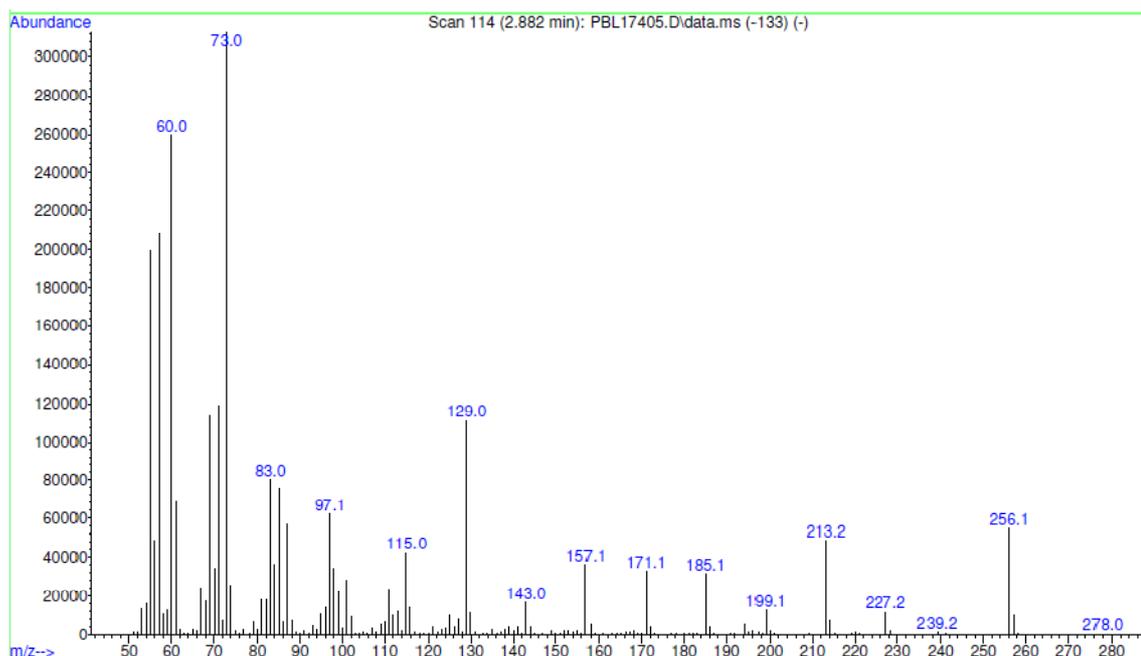


Figura 15: Espectro de massas do pico A.

Na tentativa de buscar qual substância corresponde ao respectivo pico cromatográfico, foi feita uma pesquisa na biblioteca de espectros de massas NIST. A biblioteca sugeriu que esse espectro é equivalente ao espectro de massas do ácido palmítico, com 99% de equivalência. Apesar disso, não há referência desse composto na formulação ou bula do comprimido.

Já o pico B é referente ao letrozol e o espectro de massas respectivo a esse tempo de retenção ($t_R = 4,9\text{min}$) está demonstrado na Figura 16.

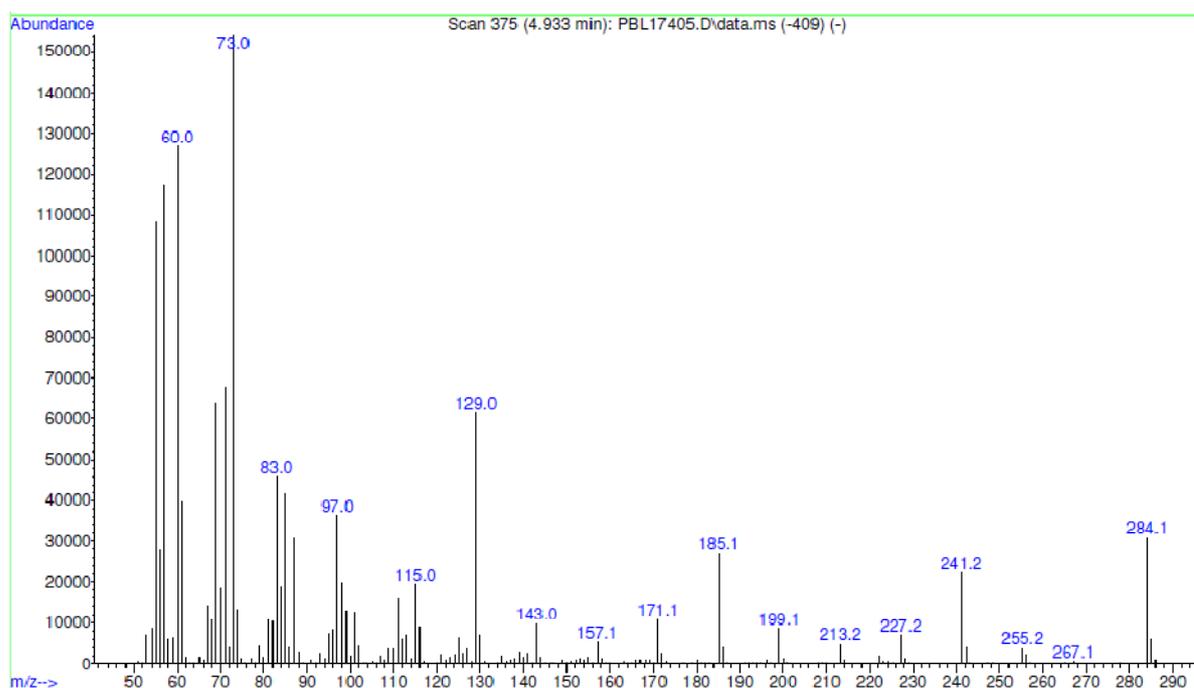


Figura 16: Espectro de massas do pico B - letrozol.

Neste espectro de massas pode-se observar que o íon molecular é o m/z 284 e o pico base, que é o mais intenso, é o m/z 73. A proposta de fragmentação do letrozol está demonstrada a seguir.

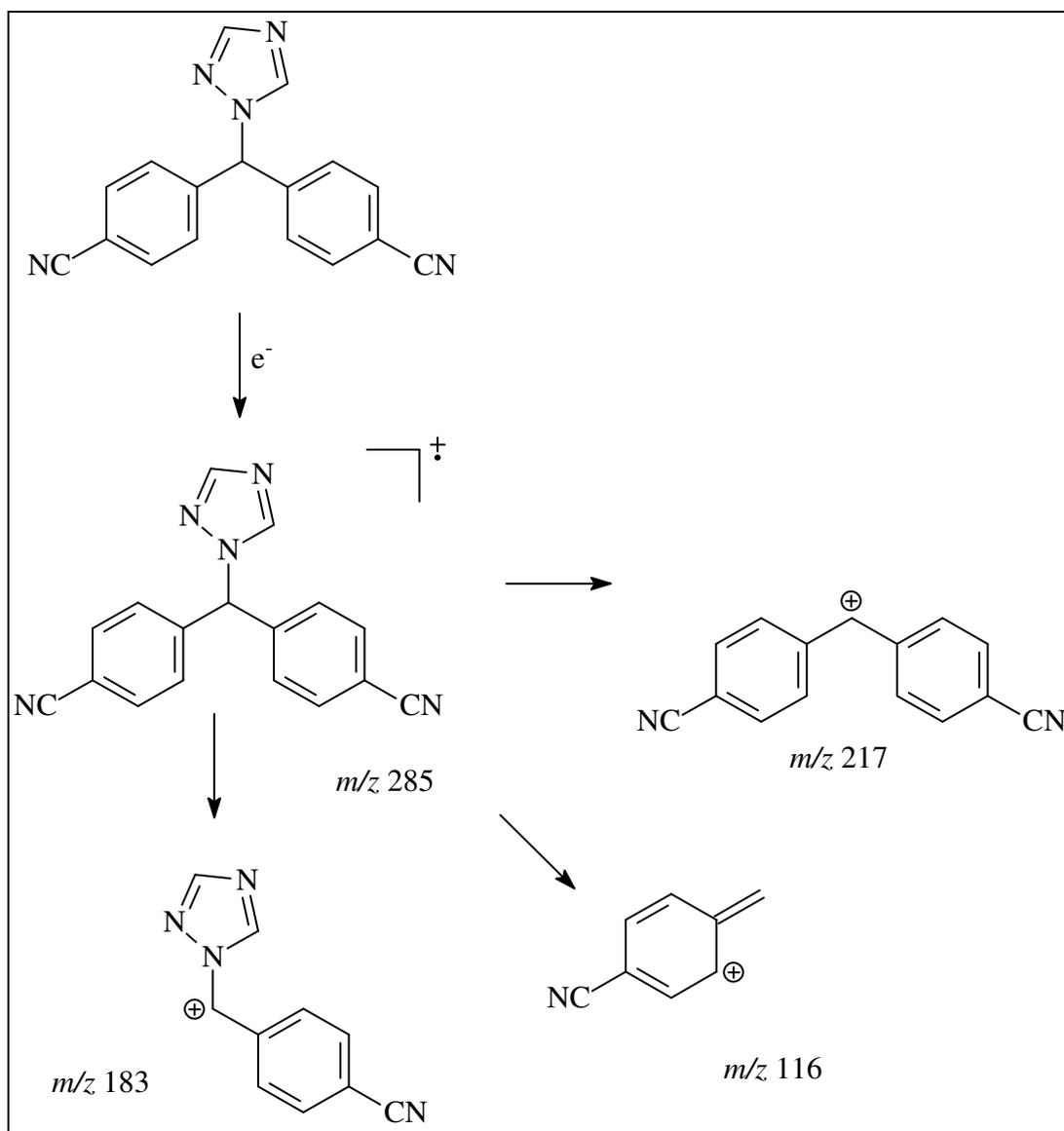


Figura 17: Proposta de fragmentação do letrozol.

Para a confirmação da identificação de determinado analito apenas a presença dos íons não é o bastante. Deve-se comparar também a razão entre os íons. Para isso, costuma-se fazer a mesma injeção de uma amostra controle que pode ser um padrão de referência por exemplo. Ou seja, se dois espectros de massas tiverem os mesmos fragmentos de razão m/z , mas a razões entre os íons forem diferentes, não se pode afirmar que as duas substâncias são iguais. Por outro lado, quando as razões são semelhantes, pode-se dizer que trata-se da mesma substância.

O pico cromatográfico C, apesar de ser um pico com barriga, não apresentou coeluição. Isso pode ser verificado porque ao longo de todo o pico, foi possível obter o mesmo espectro de massas. Esse espectro está apresentado na figura a seguir.

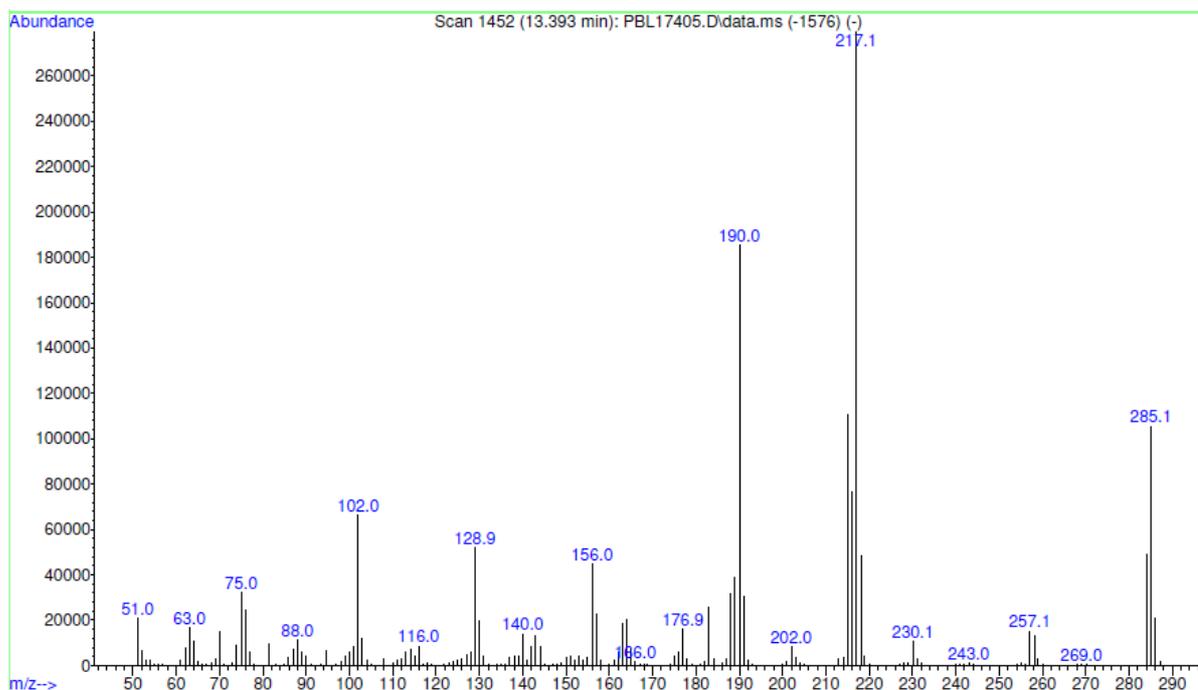


Figura 18: Espectro de massas do pico C.

A biblioteca NIST não sugeriu nenhuma substância com espectro de massas equivalente ao apresentado anteriormente.

A seguir estão apresentados como foi feita a identificação do analito carbinol, metabólito do letrozol, e do padrão interno utilizado metiltestosterona para análise dos estudos de excreção.

5.2. IDENTIFICAÇÃO DO CARBINOL (METABÓLITO DO LETROZOL) E DA METILTESTOSTERONA (PADRÃO INTERNO)

A identificação do metabólito carbinol foi feita pelo monitoramento de reações múltiplas e as duas transições monitoradas são m/z 291 \rightarrow m/z 217 e m/z 291 \rightarrow m/z 160. A proposta de fragmentação do carbinol derivatizado, o carbinol-TMS, está apresentada na figura a seguir.

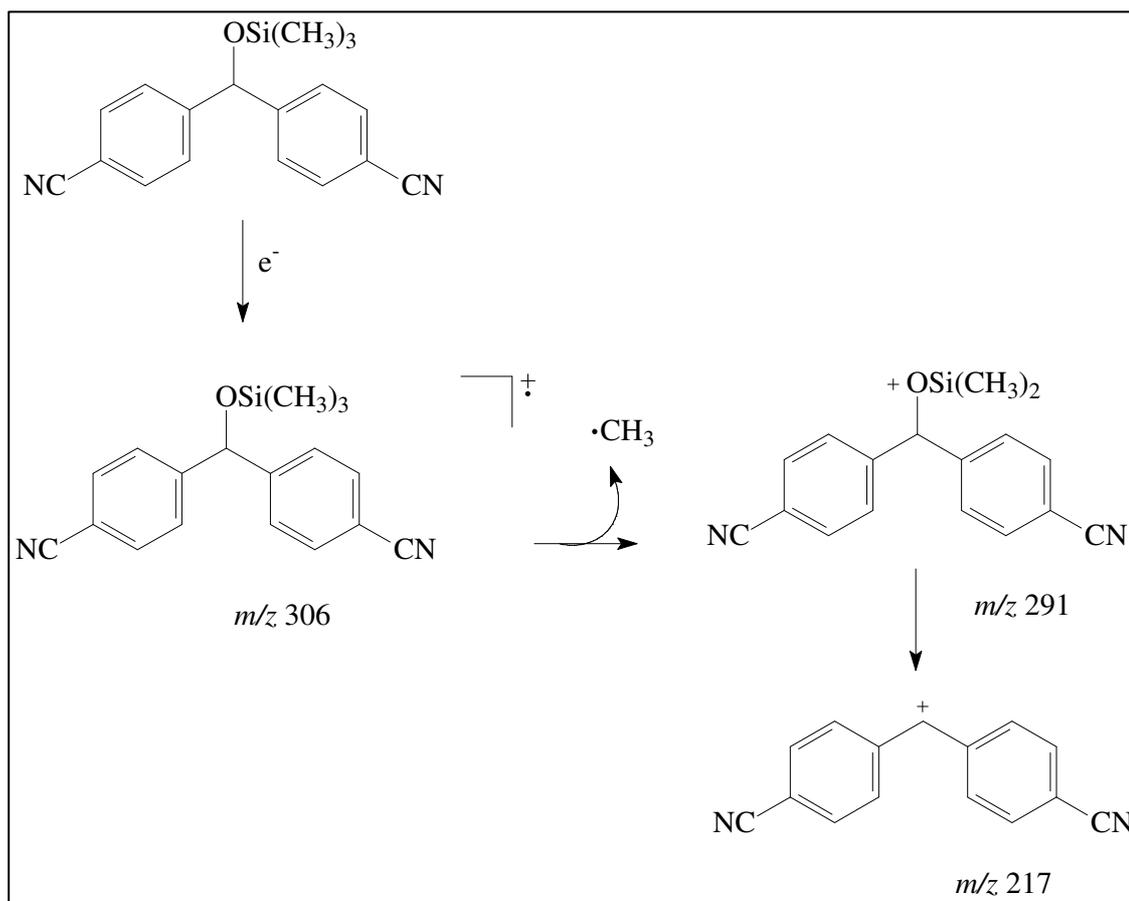


Figura 19: Esquema de fragmentação do carbinol bis-TMS.

O íon de m/z 306 é íon molecular e o de m/z 291 é referente à perda de uma metila (CH_3). Após a perda da metila, ocorre a perda do grupamento dimetilsilil resultando no íon de m/z 217.

Uma vez estando esse trabalho de dissertação inserido no contexto de um método multi-resíduo, o padrão interno utilizado foi a metiltestosterona. A metiltestosterona foi escolhida por apresentar propriedades semelhantes a 90% das substâncias monitoradas por esse método. Apesar da metiltestosterona ser um esteróide anabolizante e poder ser ingerida com a finalidade da dopagem, ela pode ser usada como padrão interno por não ser excretada na forma inalterada. Opções melhores de substâncias para serem usadas como padrão interno, no caso da análise no letrozol, seria o letrozol-D4, ou o carbinol deuteroado (este ainda não é comercializado).

A identificação da metiltestosterona foi feita a partir do monitoramento de reações múltiplas. As duas transições monitoradas da metiltestosterona são m/z 446 \rightarrow m/z 301 e m/z

446 \rightarrow m/z 198. A proposta de fragmentação para o derivado bis-TMS da metiltestosterona está apresentada na figura a seguir.

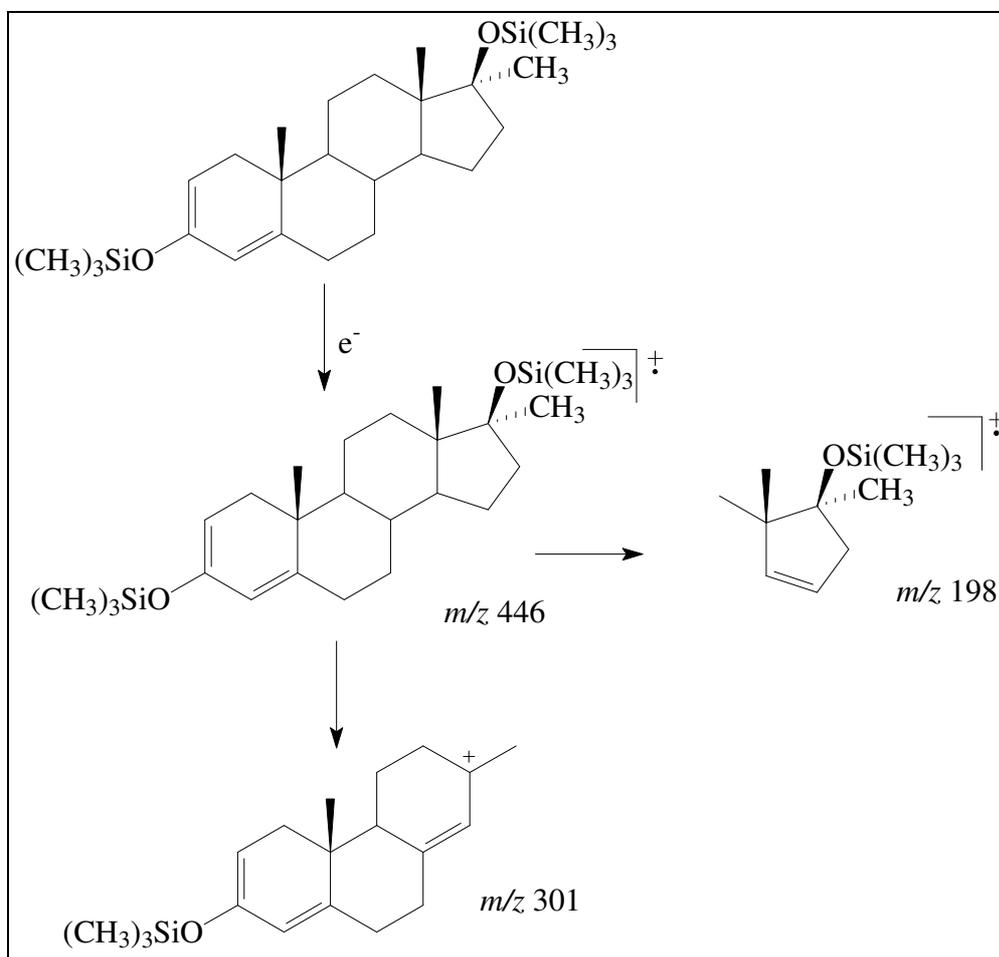


Figura 20: Esquema de fragmentação da metiltestosterona bis-TMS.

5.3. PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL - EXTRAÇÃO

O planejamento experimental foi realizado com a finalidade de definir a melhor condição experimental para se obter o maior rendimento de extração.

O planejamento experimental desse trabalho foi realizado usando dois fatores, o solvente e o uso ou não de NaCl para fazer o *salting out*. Como solventes foram escolhidos o MTBE, a mistura MTBE:AcEt (1:1) e o AcEt. A escolha dos mesmos pode ser atribuída ao uso do solvente MTBE como solvente de extração de métodos de triagem de vários laboratórios de controle de dopagem do mundo, inclusive do LBCD. Outro solvente também utilizado em alguns trabalhos como mostrado na revisão bibliográfica é o éter dietílico. Porém, pelo fato

desse solvente ser muito tóxico, optou-se por usar um solvente mais polar, o acetato de etila. Optou-se ainda por usar uma mistura dos dois solventes em iguais proporções para alcançar um grau de polaridade intermediária. Já o uso ou não do cloreto de sódio foi escolhido porque segundo a literatura, com o aumento da força iônica da fase aquosa há uma tendência das moléculas orgânicas irem para a fase orgânica mais facilmente.

No caso desse planejamento experimental, não é possível obter uma superfície de resposta porque um dos dois fatores, o uso ou não uso do NaCl, é qualitativo. Já o outro fator, o solvente de extração, é quantitativo e com 3 níveis. Desta forma, esse planejamento pode ser definido como um planejamento fatorial do tipo 3x2. Nesse caso, para se ter um planejamento fatorial completo são necessários no mínimo seis experimentos. O teste foi realizado em triplicata, logo, foram feitos 18 experimentos.

Na Tabela 17 estão apresentadas as razões entre as áreas do analito e do padrão interno.

Tabela 17: Áreas do analito (Carbinol) e do padrão interno (Metiltestosterona) das análises realizadas com MTBE, MTBE:AcEt e AcEt usando e não usando NaCl.

MTBE					MTBE com NaCl				
	Área Analito	Área P. I.	Razão	Média das Razões		Área Analito	Área P. I.	Razão	Média das Razões
Let R1	45016923	17113727	2,63	2,71	Let R1	47089561	17284293	2,72	2,73
Let R2	42855804	16134448	2,66		Let R2	45481497	16794730	2,71	
Let R3	50066450	17580838	2,85		Let R3	47983734	17437326	2,75	
MTBE: AcEt					MTBE: AcEt com NaCl				
	Área Analito	Área P. I.	Razão	Média das Razões		Área Analito	Área P. I.	Razão	Média das Razões
Let R1	46539183	17377954	2,68	2,67	Let R1	49558248	16435000	3,02	2,66
Let R2	46763526	16680091	2,80		Let R2	45634419	17955115	2,54	
Let R3	47575994	18894174	2,52		Let R3	47540798	19620278	2,42	
AcEt					AcEt com NaCl				
	Área Analito	Área P. I.	Razão	Média das Razões		Área Analito	Área P. I.	Razão	Média das Razões
Let R1	46554130	16764977	2,78	2,81	Let R1	46982261	17752898	2,65	2,74
Let R2	48807488	16696147	2,92		Let R2	45411406	16046261	2,83	
Let R3	48306357	17790981	2,72		Let R3	47176719	17286401	2,73	

Pode-se concluir que os três níveis dos solventes apresentaram desempenhos similares com relação à extração do carbinol. Além disso, a adição do cloreto de sódio não influenciou na melhora da extração, em nenhuma situação. Possivelmente, essa não alteração da eficiência de extração, mesmo com o aumento da força iônica da fase aquosa, indica que a extração realizada tanto com MTBE, MTBE:AcEt e só acetato de etila já são de elevado rendimento. Para confirmar essa hipótese, foi realizado o teste de rendimento da extração.

5.4. ESTUDOS DE EXCREÇÃO

Nem todos os voluntários coletaram todas as urinas solicitadas, até o 30º dia após a ingestão do comprimido Femara. De qualquer forma, todas as urinas coletadas foram analisadas de acordo com o procedimento descrito no item 4.6 e injetadas no CG-QqQ utilizando o método descrito no item 4.7.

Além do metabólito carbinol, os seis analitos que compõem o perfil esteroidal endógeno foram monitorados em todas as urinas dos estudos de excreção para avaliar o efeito do uso de uma dose de letrozol sobre o mesmo.

Nas tabelas em anexo (Anexo 8.1 até 8.5) encontram-se as áreas de todos os analitos (carbinol, testosterona, epitestosterona, androsterona, etiocolanolona, 5alfa-diol e 5beta-diol) e dos padrões internos monitorados, relacionadas com o tempo de ingestão do letrozol para todos os voluntários.

Os gráficos foram montados usando uma linha entre os pontos apenas para facilitar a visualização. Não se pode afirmar que o comportamento da excreção de cada analito seja da forma em que a linha demonstra.

5.4.1. Avaliação das urinas de excreção - Carbinol

No gráfico a seguir, encontram-se as concentrações estimadas de carbinol em ng/mL, relacionadas com o tempo de ingestão do comprimido para os cinco voluntários.

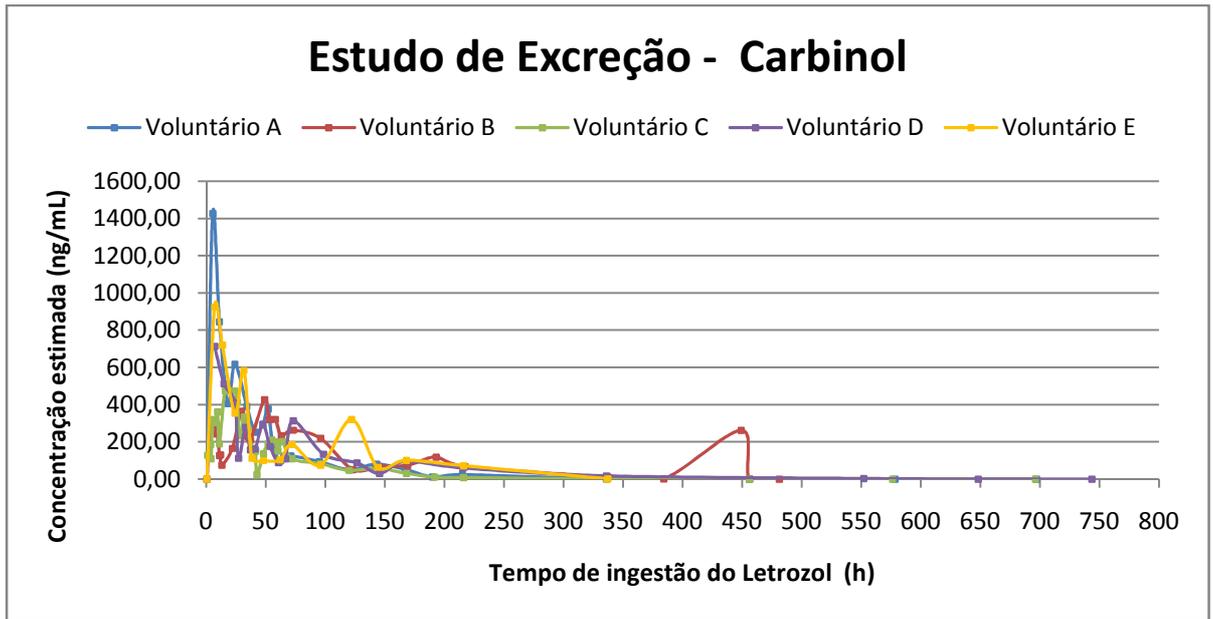


Figura 21: Estudo de excreção total do carbinol dos cinco voluntários.

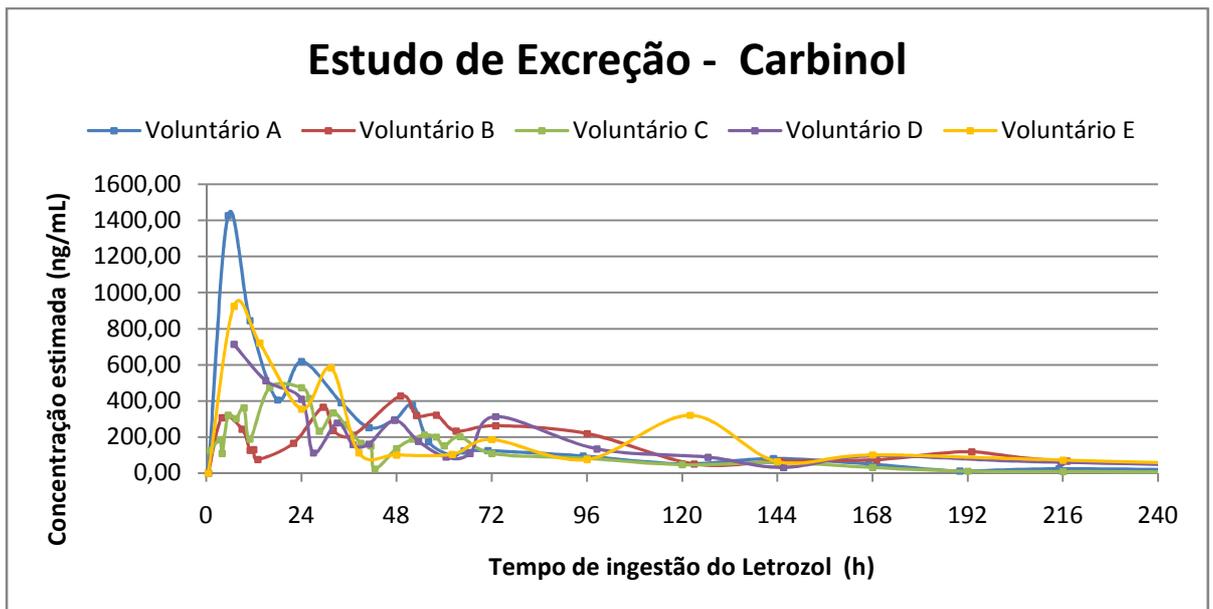


Figura 22: Estudo de excreção dos cinco voluntários até 240 h após à ingestão do comprimido.

Observando o estudo do voluntário A, gráfico em azul, pode-se notar que na primeira urina coletada, após 0,5h à ingestão de um comprimido de letrozol, ainda não é possível identificar o metabólito carbinol. Já na segunda urina, coletada após 5,5 horas após à ingestão, esse metabólito é identificado em quantidade superior em relação às demais, inclusive em relação à todas as urinas dos outros voluntários.

Para se fazer uma estimativa da concentração de carbinol nessa urina do voluntário A, coletada 5,5 horas após à ingestão do comprimido, comparou-se a razão do carbinol/metiltestosterona da amostra com a mesma razão referente a um controle positivo em 20 ng/mL preparado em urina. Cabe ressaltar que a concentração de padrão interno nesse controle foi a mesma utilizada nas amostras o que possibilita o cálculo da estimativa.

Razão do carbinol/ metiltestosterona (Controle positivo) ----- 20 ng/mL

Razão do carbinol/ metiltestosterona (Urina coletada após 5,5 h) ----- x

Desta forma, a urina de maior concentração do estudo de excreção do voluntário A apresentou uma concentração estimada em 1428 ng/mL. Foi possível identificar o carbinol até a urina coletada após 336h (14 dias) à ingestão do comprimido, e a concentração estimada na mesma foi de 1 ng/mL.

Com relação ao estudo do voluntário B, foi possível identificar o metabólito na segunda urina coletada, após 4,0 h à ingestão do comprimido. A urina com maior quantidade do analito foi coletada após 49 horas à ingestão do comprimido e teve a sua concentração estimada em 427 ng/mL.

Após um decréscimo nos níveis de carbinol foi observado um novo aumento na urina coletada após 449h à ingestão. Esse “novo” aumento não foi observado nos outros estudos de excreção dos demais voluntários e por isso resolveu-se investigar essa amostra.

Esse estudo de excreção foi todo refeito com a suspeita de ter ocorrido alguma troca de amostras, mas os resultados foram similares ao apresentado. Foi feita uma análise em varredura linear da amostra Let Vol B 24, coletada após 449 horas à ingestão. O cromatograma de íons totais e o espectro de massas do pico referente ao letrozol estão, respectivamente nas Figuras 23 e 24.

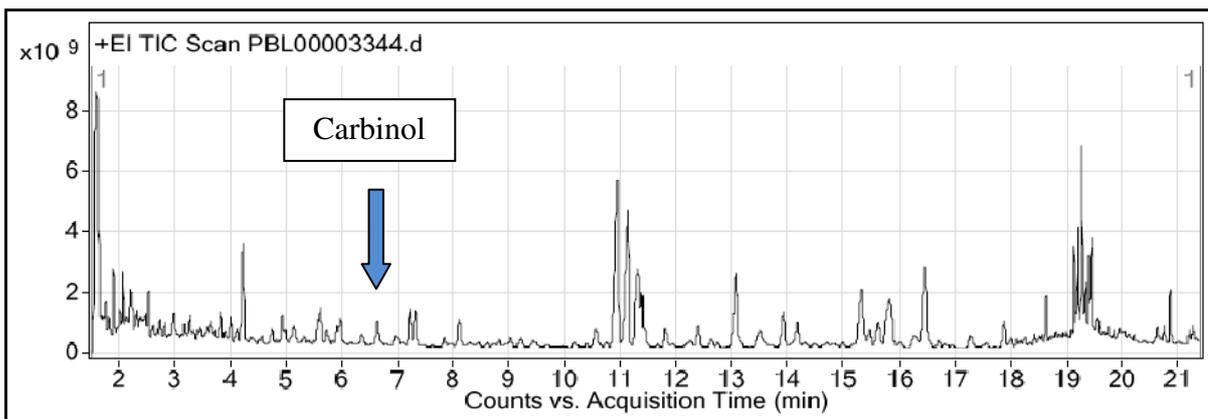


Figura 23: Cromatograma de íons totais da amostra Let Vol B 24, coletada após 449 horas à ingestão do comprimido.

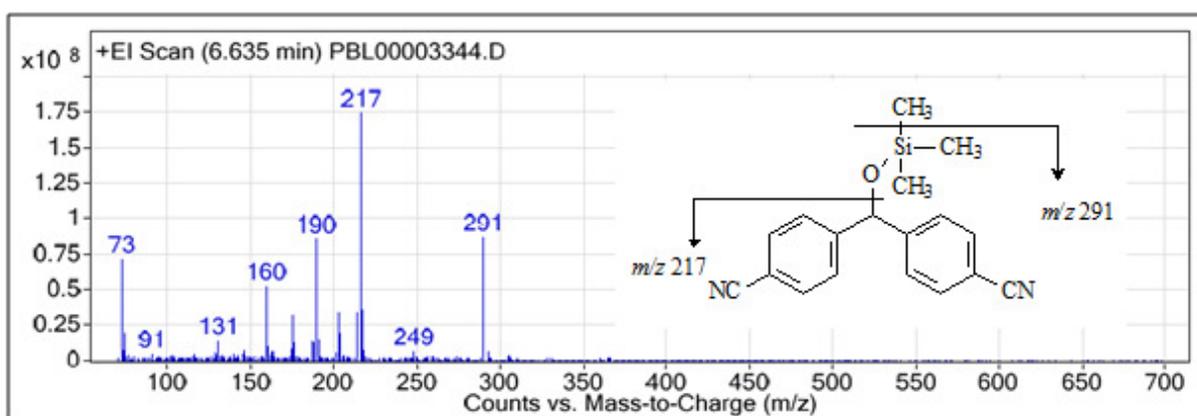


Figura 24: Espectro de massas do pico referente ao metabólito carbinol na amostra LetVolB24.

Pelo espectro de massas, pode-se confirmar que o analito carbinol estava presente nessa urina. Infelizmente, esse voluntário não coletou as urinas do 25^o e 30^o dia. Foi possível identificar o carbinol até a urina coletada após 456h (19 dias) após à ingestão do comprimido, e a concentração estimada na mesma foi de 1 ng/mL.

Observando o estudo de excreção do voluntário C, foi possível identificar o carbinol já na primeira urina coletada, após 1 hora à ingestão do comprimido. A urina com maior quantidade de carbinol foi a coletada 16 horas após a ingestão do comprimido e teve sua concentração estimada em 474 ng/mL. Além disso, foi possível identificar o carbinol até a urina coletada após 336h (14 dias) à ingestão do comprimido, e a concentração estimada na mesma foi de 1 ng/mL. Cabe ressaltar que tanto o tempo de excreção quanto a concentração foram iguais para o voluntário A.

Com relação ao estudo do voluntário D, a primeira urina coletada, após 7 horas à ingestão do comprimido, apresentou maior quantidade de carbinol e teve sua concentração estimada em 714 ng/mL. Foi possível identificar o carbinol até a urina coletada após 648h (27 dias) à ingestão do comprimido, e a concentração estimada na mesma foi de 0,5 ng/mL. Pode-se observar que no caso desse voluntário o tempo de excreção foi maior do que os outros mostrados anteriormente.

Observando o estudo de excreção do voluntário E, pode-se notar que na primeira urina coletada, após 30 minutos à ingestão do comprimido de Femara, ainda não foi possível a detecção do carbinol. Já na segunda urina, coletada após 7,0h à ingestão do comprimido, a quantidade de carbinol foi maior e a sua concentração foi estimada em 925 ng/mL. A última urina coletada por esse voluntário, 336h (14 dias) após à ingestão da dose de letrozol, ainda apresentou o metabólito carbinol, numa concentração estimada em 2 ng/mL. Após o 14º dia, esse voluntário não coletou mais nenhuma urina.

Segundo a bula do Femara, o fármaco é rápida e completamente absorvido no trato gastrointestinal. A alimentação diminui levemente a taxa de absorção, sendo uma hora se o comprimido for administrado em jejum e duas horas se o comprimido for administrado após a alimentação. Apesar disso, a extensão da absorção não é alterada, o que possibilita que o remédio seja tomado independente das refeições (NOVARTIS - Bula do Femara, 2015).

De uma maneira geral, em todos os estudos de excreção, com exceção do estudo do voluntário B, a urina mais concentrada de cada estudo foi coletada em menos de 20 horas após a ingestão do comprimido.

Com relação às estimativas das concentrações das urinas mais concentradas de cada estudo, pode-se observar que nos casos em que o comprimido é metabolizado mais rapidamente, as concentrações são mais elevadas. Por exemplo, a urina mais concentrada do voluntário A foi a coletada após 5,5 horas à ingestão e apresentou uma concentração estimada em 1428 ng/mL. Já no caso do voluntário B, a urina mais concentrada foi a coletada após 49 horas à ingestão e apresentou uma concentração estimada em 428 ng/mL.

De acordo com a bula do Femara, em um período de duas semanas, após a administração de 2,5 mg de FEMARA marcado com ^{14}C em voluntárias sadias na pós-menopausa, aproximadamente 88% da radioatividade foram recuperados na urina, sendo 75% da radioatividade recuperados na urina em até 216 horas foi na forma de glicuronídeo do metabólito carbinol (NOVARTIS - Bula do Femara, 2015).

Pode-se observar com relação ao tempo após a ingestão do comprimido que o carbinol continuou sendo identificado, que nos estudos dos voluntários A e C isso ocorreu até

336 horas ou 14 dias. Já no estudo de excreção dos voluntários B, isso ocorreu até 456 horas ou 19 dias, enquanto no estudo do voluntário D, esse tempo foi maior, 648 horas ou 27 dias. Com relação ao voluntário E, como a última urina coletada pelo mesmo ainda apresentou o carbinol, não se pode afirmar o tempo de excreção (total) para o mesmo.

As diferenças da cinética de excreção de diferentes voluntários podem ser atribuídas a diversos fatores como alimentação, quantidade de líquido ingerido, diferença de massa corpórea e da idade além do próprio metabolismo de cada pessoa e da utilização de medicamentos. Os voluntários afirmaram não ter usado outro medicamento durante o estudo de excreção.

5.4.2. Análise do Perfil Endógeno

Nos gráficos a seguir, encontram-se a excreção dos esteróides endógenos testosterona, epitestosterona, androsterona, etiolanolona, 5alfa-diol e 5beta-diol. No eixo y estão as concentrações, relacionadas com o tempo de ingestão do comprimido. Os gráficos foram montados usando uma linha entre os pontos apenas para facilitar a visualização. Não se pode afirmar que o comportamento da excreção do analito seja da forma em que a linha demonstra. Os valores das áreas e das concentrações dos seis endógenos analisados para os cinco voluntários estão descritas nas tabelas em anexo (Anexo 8.1 até 8.10). As concentrações corrigidas, em função da densidade de cada amostra, além dos valores de densidade e pH estão em anexo (Anexo 8.11 até 8.15). O cálculo da correção foi realizado como descrito no item 1.6.

A quantificação dos endógenos foi feita usando um “calibrante” chamado CAL Endo. Desta forma, o equipamento calcula a razão Área analito / Área P.I. e associa essa razão à concentração teórica do analito. Por comparação, o software do equipamento calcula a mesma razão (Área analito / Área P.I.) da amostra e informa a concentração do analito. Os valores das áreas e concentração do calibrante CAL Endo estão apresentados na tabela a seguir.

Tabela 18: Valores das áreas e concentração do calibrante CAL Endo.

CAL Endo		
	Área	Concentração (ng/mL)
Testosterona	3245912	40
Testosterona-D3	4847535	60
Epitestosterona	3438911	40
Epitestosterona-D3	970912	15
Androsterona	94501653	2000
Etiocolanolona	127752133	2000
Etiocolanolona-D5	22906940	500
5alfa-diol	1417629	80
5beta-diol	7188195	180
5alfa-diol-D3	359040	80

A concentração dos endógenos foi determinada nos brancos de urina de cada voluntário, ou seja, antes da administração do medicamento, e esses valores estão representados nos gráficos com um quadrado vermelho em cima do eixo $x=0$.

Pode-se observar que uma dose de 2,5 mg de letrozol provoca um distúrbio significativo nos níveis dos endógenos avaliados e estes serão apresentados de forma individual para cada voluntário.

5.4.2.1. Voluntário A

A Figura 25 apresenta os gráficos da concentração dos seis endógenos ao longo do estudo de excreção do voluntário A. As concentrações encontradas no branco de urina e na urina mais concentrada estão descritas nos gráficos para facilitar a análise dos mesmos.

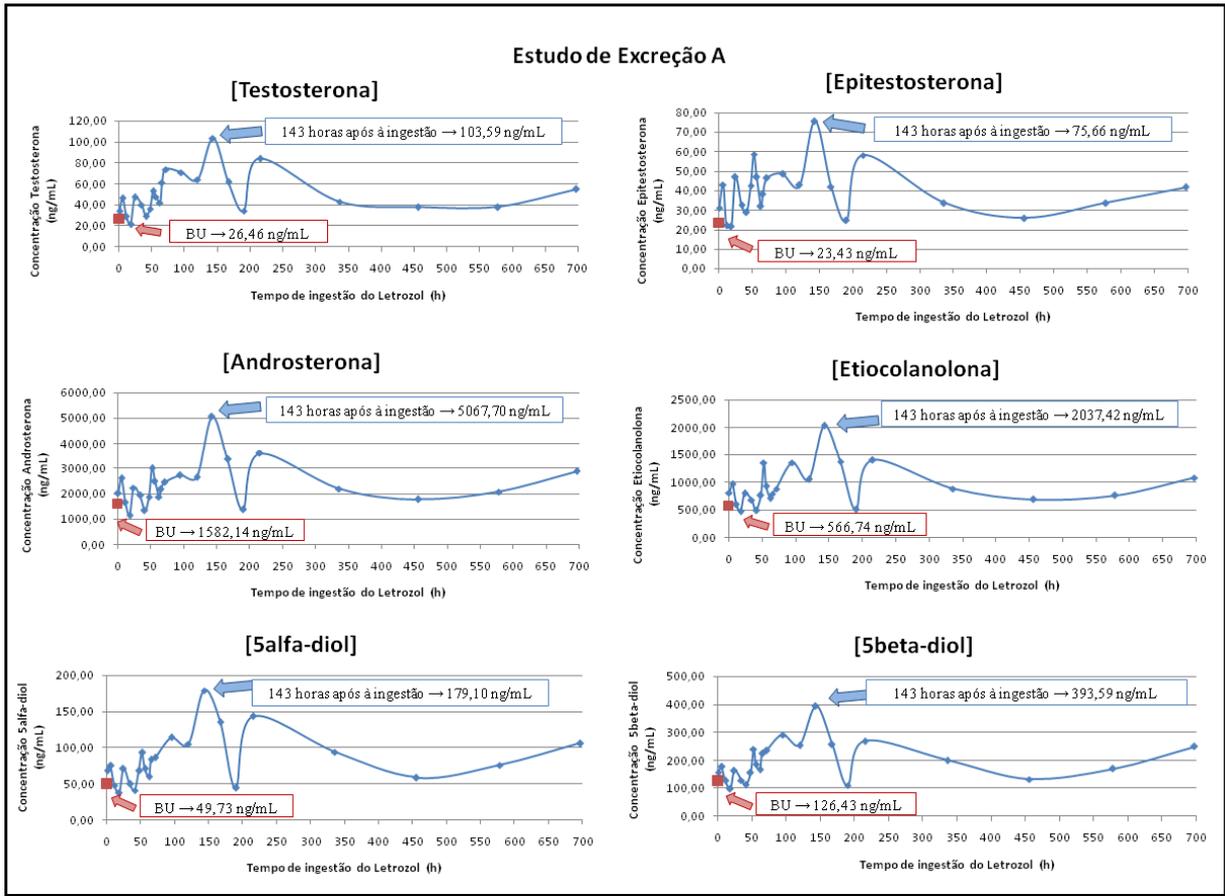


Figura 25: Concentração dos endógenos no estudo de excreção do voluntário A.

Primeiramente, analisando os seis gráficos de forma ampla, pode-se observar que o perfil de excreção (formato dos gráficos) dos seis endógenos no estudo do voluntário A é muito semelhante. Os seis endógenos apresentaram a maior concentração na urina coletada após 143 horas à ingestão do comprimido e os aumentos serão posteriormente detalhados. Além disso, foi possível observar que após 300 horas à ingestão os níveis começam a ficar mais estáveis e se aproximam das concentrações encontradas no branco de urina.

Analisando a Figura 22, do estudo de excreção do carbinol do voluntário A, pode-se observar que após 143 horas à ingestão, quando foi coletada a urina que apresentou alteração mais drástica dos níveis dos endógenos, a excreção do carbinol é pequena. É possível observar que à medida que o letrozol é metabolizado, ocorre um aumento nos níveis dos endógenos e que o pico de máxima concentração dos endógenos ocorre em um momento onde os níveis de carbinol já são menores em relação às demais.

Na tabela a seguir, estão apresentados os valores de concentração dos seis endógenos monitorados tanto no BU quanto na urina coletada após 143 horas à ingestão do comprimido.

Tabela 19: Comparação da concentração dos endógenos no BU e na urina coletada após 143 horas à ingestão do comprimido do voluntário A e a porcentagem de aumento.

Endógeno	Concentração no BU (ng/mL)	Concentração na urina coletada após 143 horas à ingestão do comprimido (ng/mL)	Porcentagem de aumento da concentração (%)
Testosterona	26,46	103,59	291
Epitestosterona	23,43	75,66	222
Androsterona	1582,14	5067,70	220
Etiocolanolona	566,74	2037,70	260
5alfa-diol	49,73	179,10	260
5beta-diol	126,49	393,59	211

Comparando a porcentagem de aumento da concentração entre o branco de urina e a urina coletada após 143 horas à ingestão da dose de letrozol, é possível observar que, no caso do voluntário A, os seis endógenos sofreram aproximadamente aumentos de 210 à 290%, sendo o maior aumento, apresentado pela testosterona.

O aumento do nível de testosterona pode ser atribuído ao fato do letrozol inibir a enzima aromatase, que é responsável pela aromatização da testosterona e androstenediona em estradiol e estrona, respectivamente. Ou seja, com a inibição dessa enzima, essa reação de aromatização é "prejudicada", e a concentração de testosterona se torna maior. Comparando a concentração dos isômeros testosterona e epitestosterona, pode-se observar no branco de urina do voluntário A, que a concentração dos dois é muito próxima, sendo a testosterona 1,1 vezes mais abundante que a epitestosterona. Fazendo essa mesma comparação na urina coletada após 143h à ingestão do comprimido, essa diferença sofre um aumento, de modo que a testosterona é 1,4 vezes mais concentrada que a epitestosterona.

Comparando a concentração dos isômeros androsterona e etiocolanolona, é possível observar que no branco de urina do voluntário A, a androsterona é 2,8 vezes mais abundante que a etiocolanolona. Já na urina coletada após 143 horas após à ingestão da dose de Femara, essa diferença diminuiu para 2,5 vezes.

Comparando a concentração dos isômeros 5alfa-diol e 5-beta diol no branco de urina do voluntário A, pode-se verificar que o 5beta-diol é 2,5 vezes mais abundante que o 5alfa-

diol. Já na urina coletada após 143 horas após a ingestão do comprimido, essa diferença reduziu um pouco, passando o 5beta-diol a ser 2,2 vezes maior do que o 5alfa-diol.

Para avaliação do perfil endógeno, além da concentração dos seis endógenos monitorados anteriormente, é necessário também fazer a avaliação da razão testosterona / epitestosterona. Conforme demonstrado na tabela em anexo (8.11), pode-se observar que nenhuma urina apresentou concentração corrigida de testosterona, epitestosterona, androsterona e eticolanolona maior que os limites estipulados pelo documento técnico da AMA (TD2014EAAS), que são 200 ng/mL para testosterona e epitestosterona e 10000 ng/mL para androsterona e eticolanolona para urinas masculinas. Na Figura 26 está o gráfico da Razão testosterona / epitestosterona versus o tempo de ingestão do comprimido.

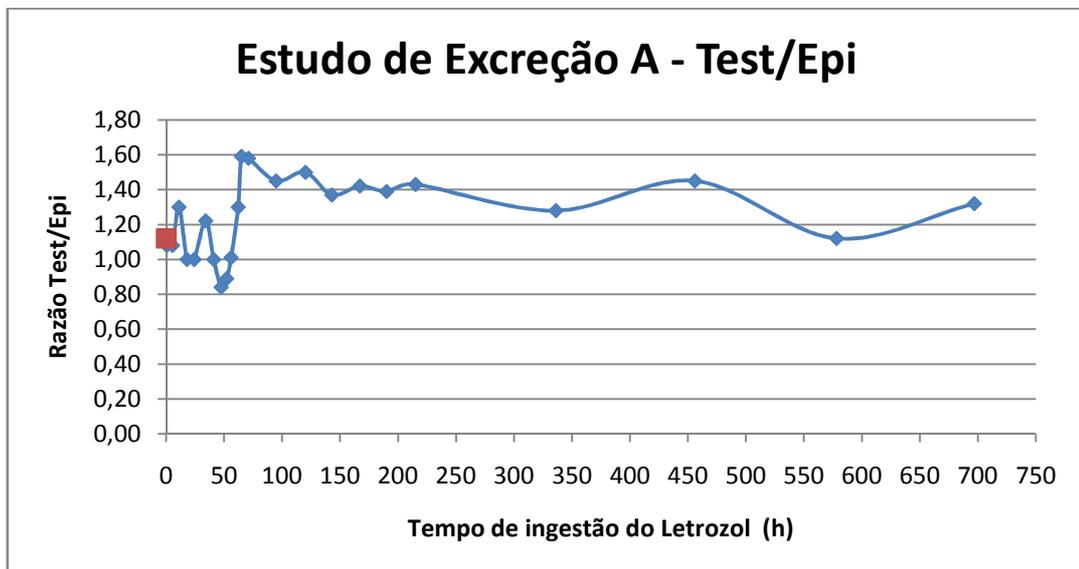


Figura 26: Razão da Testosterona / Epitestosterona do voluntário A.

Pode-se observar que em nenhuma urina coletada pelo voluntário A, a razão ultrapassou o valor limite de 4. Isso pode ser relacionado ao fato da concentração de testosterona e de epitestosterona serem aumentadas aproximadamente na mesma proporção, de modo que a razão não sofra muita variação.

5.4.2.2. Voluntário B

A Figura 27 apresenta os gráficos da concentração dos seis endógenos ao longo do estudo de excreção do voluntário B. As concentrações encontradas no branco de urina e na urina mais concentrada estão descritas nos gráficos para facilitar a análise dos mesmos.

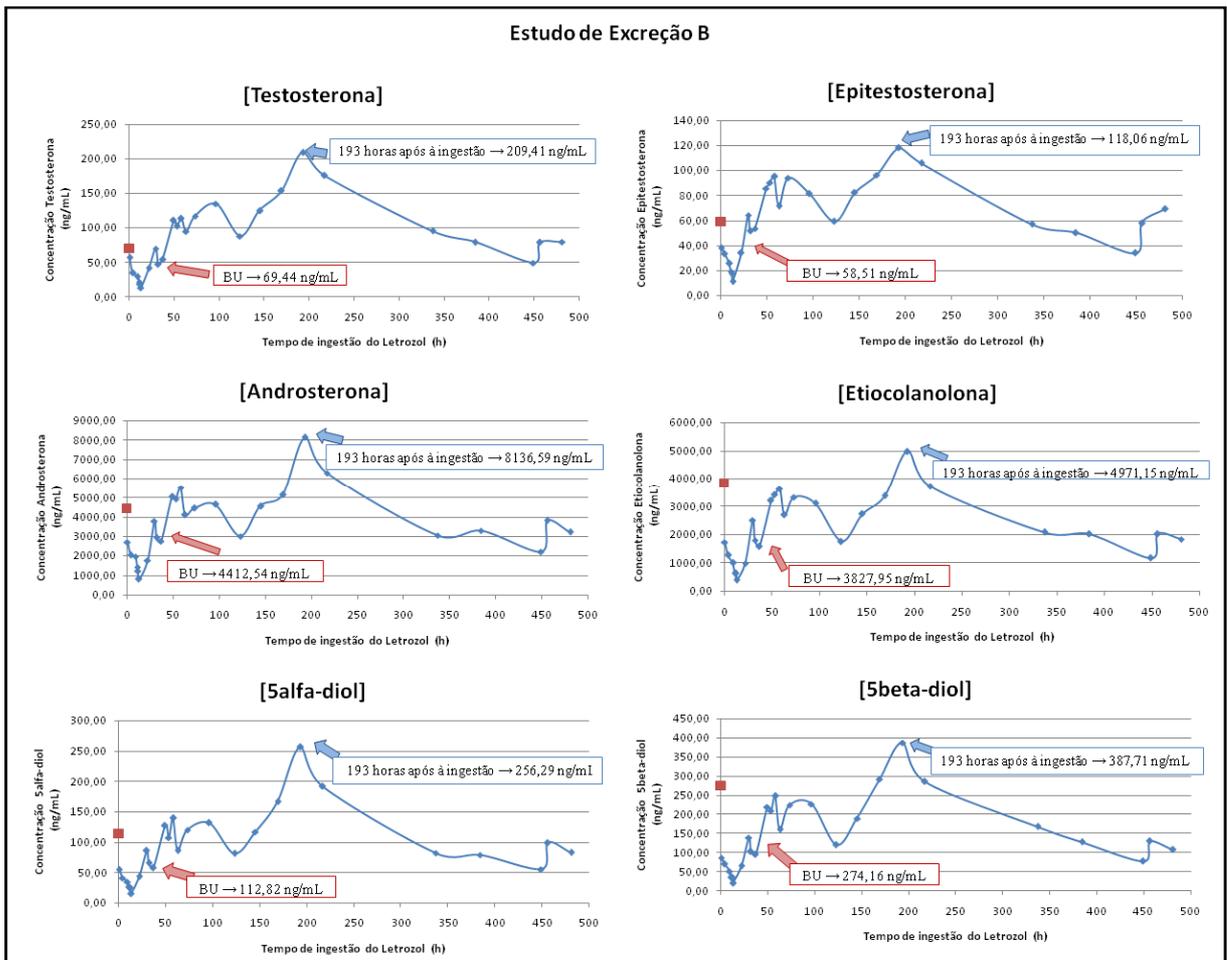


Figura 27: Concentração dos endógenos no estudo de excreção do voluntário B.

Primeiramente, assim como o demonstrado no estudo do voluntário A, pode-se observar que o perfil de excreção dos seis endógenos no estudo do voluntário B é muito semelhante. Já se compararmos o perfil de excreção entre os voluntários, podemos observar que o formato dos gráficos é bastante diferente. Os seis endógenos apresentaram a maior concentração na urina coletada após 193 horas à ingestão do comprimido e os aumentos serão posteriormente detalhados.

Analisando a Figura 22, do estudo de excreção do carbinol do voluntário A, pode-se observar que após 193 horas à ingestão, quando foi coletada a urina que apresentou alteração mais drástica dos níveis dos endógenos, a excreção do carbinol é pequena.

Comparando esse estudo com o anterior, pode-se notar que nesse, os níveis máximos de concentração dos endógenos são alcançados 50 horas a mais do que no caso do voluntário A. A excreção do carbinol também é mais lenta no voluntário B, se comparado com o voluntário A. No estudo A, a urina mais concentrada do carbinol foi coletada após 5,5 horas à ingestão do comprimido, enquanto no estudo B foi na urina coletada após 53 horas.

Na tabela a seguir, estão apresentados os valores de concentração dos seis endógenos monitorados tanto no BU quanto na urina coletada após 193 horas à ingestão do comprimido.

Tabela 20: Comparação da concentração dos endógenos no BU e na urina coletada após 143 horas à ingestão do comprimido do voluntário B e a porcentagem de aumento.

Endógeno	Concentração no BU (ng/mL)	Concentração na urina coletada após 193 horas à ingestão do comprimido (ng/mL)	Porcentagem de aumento da concentração (%)
Testosterona	69,44	209,41	201
Epitestosterona	58,51	118,06	101
Androsterona	4412,54	8136,59	84
Etiocolanolona	3827,95	4971,15	29
5alfa-diol	112,82	256,29	127
5beta-diol	274,16	387,11	41

De acordo com a porcentagem de aumento da concentração entre o branco de urina e a urina coletada após 193 horas à ingestão da dose de letrozol, é possível observar que, no caso do voluntário B, os seis endógenos sofreram aumentos menores do que os apresentados pelo voluntário A, que variaram de 29 à 201%, sendo novamente a testosterona a que apresentou o maior aumento.

Comparando a concentração dos dois isômeros testosterona e epitestosterona, pode-se observar no branco de urina, que a concentração dos dois é muito próxima, sendo a testosterona 1,2 vezes mais abundante que a epitestosterona. Fazendo essa mesma comparação na urina coletada após 193h à ingestão do comprimido, essa diferença sofre um

aumento, de modo que a testosterona passa a ser 1,8 vezes mais concentrada que a epitestosterona.

Em relação aos isômeros androsterona e etiocolanolona, pode-se observar que no branco de urina do voluntário B, eles têm concentrações próximas sendo a androsterona apenas 1,2 vezes mais abundante que a etiocolanolona. Já na urina coletada após 193 horas à ingestão do letrozol, essa proporção sofreu um aumento, de modo que a androsterona ficou 1,6 vezes maior do que a concentração da etiocolanolona.

Comparando a concentração entre os isômeros 5alfa-diol e 5beta-diol, pode-se perceber que o 5beta-diol é aproximadamente 2,5 vezes mais abundante que o 5alfa-diol no BU. Fazendo essa mesma comparação na urina coletada após 193 horas à ingestão do comprimido, pode-se ver que a diferença se torna menor, passando o 5beta-diol a ser 1,5 vezes maior do que o 5alfa-diol.

Apesar da concentração da urina coletada após 193 horas ser igual a 209,41 ng/mL, a concentração corrigida (considerando que a sua densidade foi 1,029) é 144,42 ng/mL, permanecendo abaixo do limite que sugeriria um perfil endógeno atípico. Conforme demonstrado na tabela em anexo (8.12), pode-se observar que nenhuma urina apresentou concentração corrigida de testosterona, epitestosterona, androsterona e etiocolanolona maior que os limites estipulados pelo documento técnico da AMA (TD2014EAAS), que são 200 ng/mL para testosterona e epitestosterona e 10000 ng/mL para androsterona e etiocolanolona para urinas masculinas. Na Figura 28 está o gráfico da Razão testosterona / epitestosterona versus o tempo de ingestão do comprimido para o voluntário B.

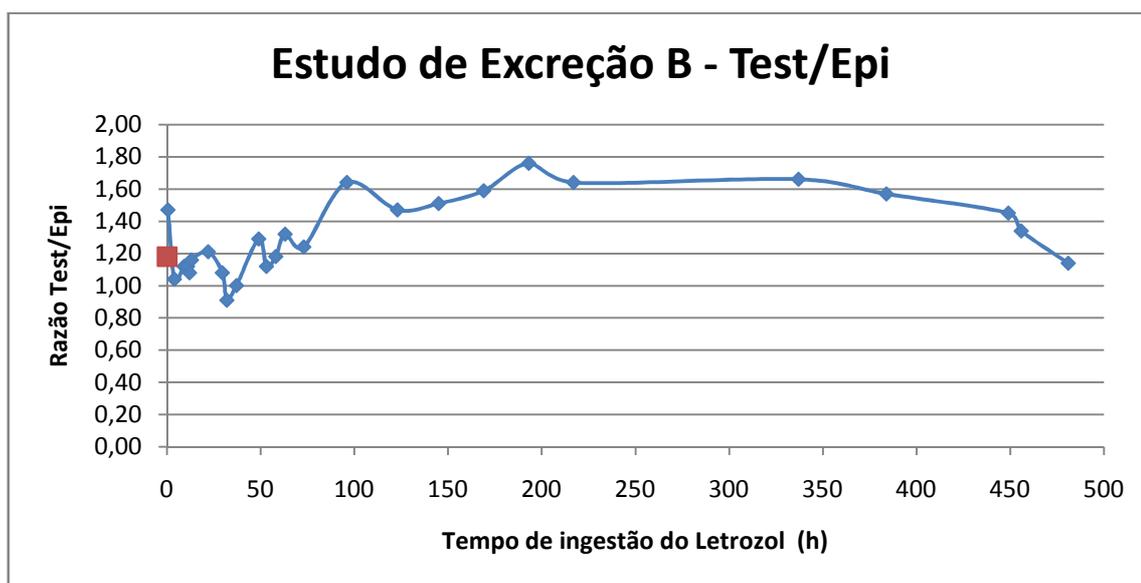


Figura 28: Razão da testosterona / Epitestosterona do voluntário B.

Assim como observado no estudo do voluntário A, nenhuma das urinas coletadas pelo voluntário B apresentou a razão testosterona / epitestosterona superior a 4. Mais uma vez, isso pode ser atribuído ao aumento dos níveis dos dois isômeros, testosterona e epitestosterona, fazendo com que a razão entre eles não varie tanto. Ainda assim, é possível ver um aumento da razão que pode ser atribuído ao fato do aumento da testosterona ter sido maior que o da epitestosterona, conforme demonstrado na tabela anterior para a urina coletada em 193 horas.

5.4.2.3. Voluntário C

A Figura 29 apresenta os gráficos da concentração dos seis endógenos ao longo do estudo de excreção do voluntário C. As concentrações encontradas no branco de urina e na urina mais concentrada estão descritas nos gráficos para facilitar a análise dos mesmos.

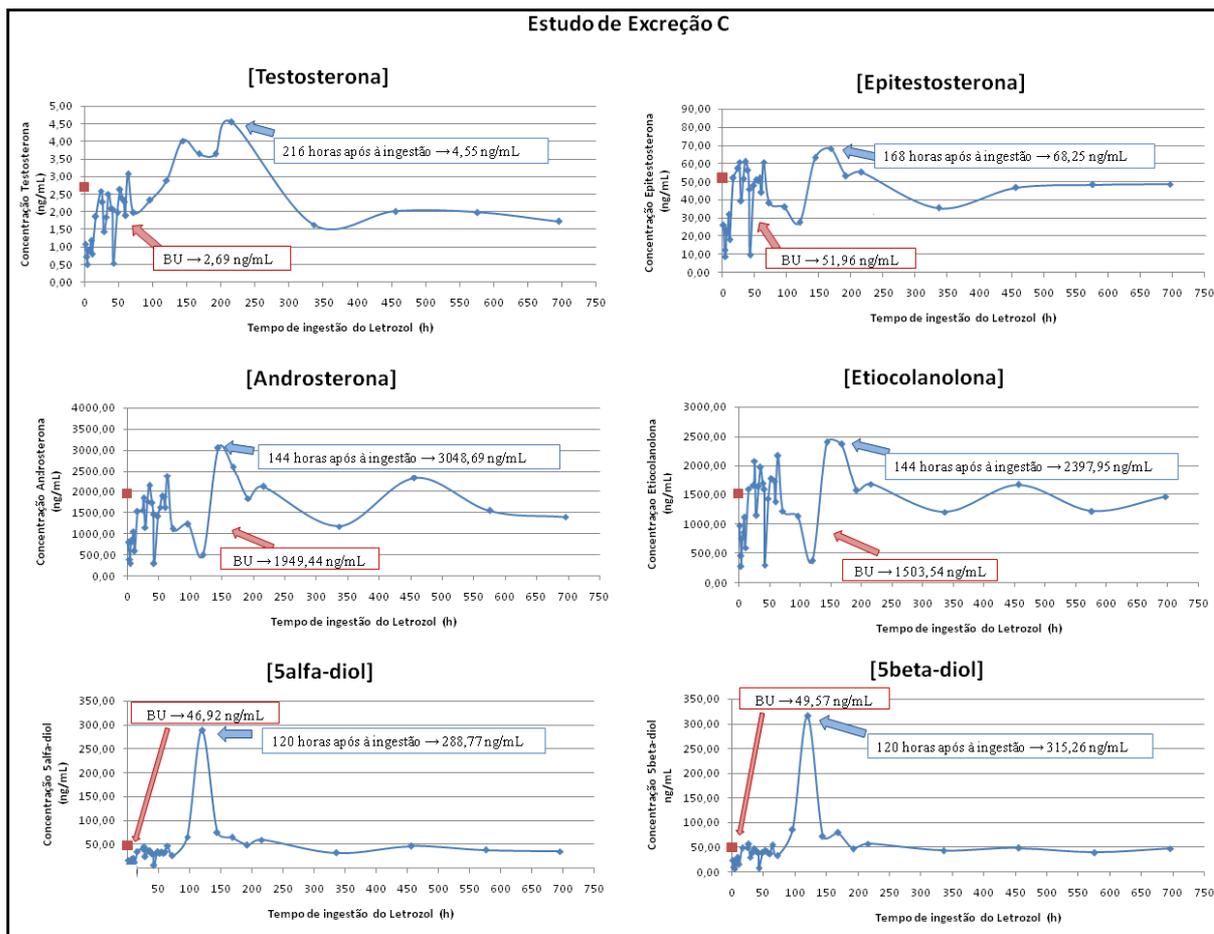


Figura 29: Concentração dos endógenos no estudo de excreção do voluntário C.

Primeiramente, ao contrário dos estudos anteriores apresentados, é possível observar que no estudo do voluntário C, os seis endógenos não são excretados de forma similar, ou seja eles não têm o mesmo perfil de excreção ou formato do gráfico. Apesar disso, observa-se uma similaridade entre os gráficos dos isômeros, principalmente no caso da androsterona e eticolanona e do 5alfa-diol e 5beta-diol. Além de terem perfis de excreção diferentes, nesse estudo também foi possível observar que os endógenos apresentaram os seus máximos de concentração em urinas coletadas em diferentes horários. A testosterona apresentou a maior concentração na urina coletada após 216h enquanto a epitesterona foi na urina coletada após 168h à ingestão do comprimido. Já os isômeros androsterona e eticolanona apresentaram os máximos de concentração na urina coletada após 144h enquanto os 5alfa-diol e 5beta-diol foi na urina coletada após 120h.

Na tabela a seguir, estão apresentadas as concentrações dos seis endógenos determinadas no branco de urina e na respectiva urina mais concentrada do estudo de excreção do voluntário C.

Tabela 21: Comparação da concentração dos endógenos no BU e na urina mais concentrada do voluntário C e a porcentagem de aumento.

Endógeno	Concentração no BU (ng/mL)	Maior concentração (ng/mL) - tempo de ingestão	Porcentagem de aumento da concentração (%)
Testosterona	2,69	4,55 - 216h	69
Epitestosterona	51,96	68,25 - 168h	31
Androsterona	1949,44	3048,69 - 144h	56
Etiocolanolona	1503,54	2397,95 - 144h	59
5alfa-diol	46,92	288,77 - 120h	515
5beta-diol	49,57	315,26 - 120h	535

É possível observar que no caso do voluntário C, o 5alfa-diol e o 5beta-diol tiveram os maiores aumentos, inclusive quando comparados com os todos os outros aumentos dos outros voluntários.

É interessante observar que a ordem de grandeza da concentração de testosterona nesse voluntário é muito menor que a demonstrada anteriormente pelos outros.

Comparando a testosterona e a epitestosterona, pode-se observar que nesse estudo a epitestosterona é muito mais abundante que a testosterona. No branco de urina, a epitestosterona é 19 vezes mais concentrada que a testosterona. Fazendo essa mesma comparação na urina coletada após 216 horas, a epitestosterona se apresentou 12 vezes mais concentrada que a testosterona. Essa diferença pode ser atribuída ao aumento do nível de testosterona provocado pela inibição da enzima aromatase.

Comparando a concentração dos dois isômeros androsterona e eticolanolona, pode-se observar no branco de urina, que a concentração dos dois é próxima, sendo a androsterona 1,3 vezes mais abundante que a eticolanolona. Fazendo essa mesma comparação na urina coletada após 144h à ingestão do comprimido, pode-se observar que essa diferença se manteve, continuando a androsterona 1,3 vezes mais concentrada que a eticolanolona.

Comparando a concentração entre os isômeros 5alfa-diol e o 5beta-diol no branco de urina, nota-se que o 5beta-diol e o 5 alfa-diol têm concentrações bem próximas, sendo o 5beta-diol 1,1 vezes mais concentrado que o 5alfa-diol. Essa relação se manteve na urina coletada após 120 horas à ingestão do comprimido.

Conforme demonstrado na tabela em anexo (8.13), pode-se observar que nenhuma urina apresentou concentração corrigida de testosterona, epitestosterona, androsterona e etiolanolona maior que os limites estipulados pelo documento técnico da AMA (TD2014EAAS), que são 200 ng/mL para testosterona e epitestosterona e 10000 ng/mL para androsterona e etiolanolona para urinas masculinas. Na Figura 30 está o gráfico da Razão testosterona / epitestosterona versus o tempo de ingestão do comprimido do estudo de excreção do voluntário C.

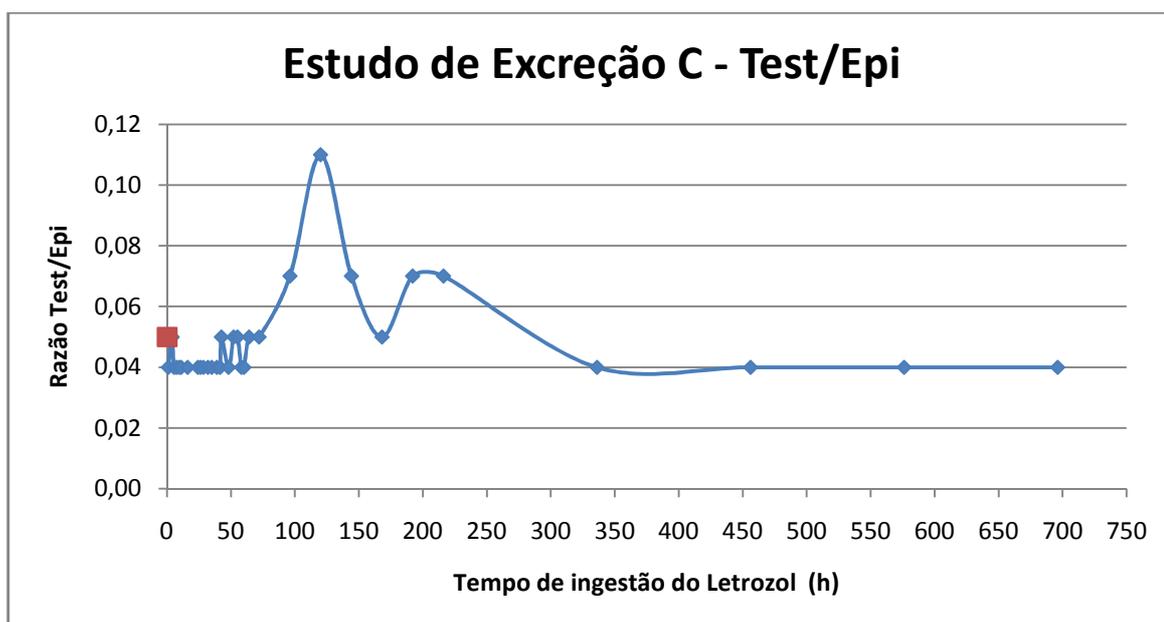


Figura 30: Razão da testosterona / Epitestosterona do voluntário C.

Pode-se observar um aumento da razão Test /Epi na urina coletada após 120 horas à ingestão do comprimido. Apesar disso, nenhuma das urinas desse estudo apresentou a razão superior à 4, que indicaria perfil endógeno alterado. Observando a Figura 29, nota-se que na urina coletada após 120 horas de ingestão do comprimido, há uma queda no nível de epitestosterona, o que justifica a alteração apresentada pela razão Test/Epi.

5.4.2.4. Voluntário D

A Figura 31 apresenta os gráficos da concentração dos seis endógenos ao longo do estudo de excreção do voluntário D. As concentrações encontradas no branco de urina e na urina mais concentrada estão descritas nos gráficos para facilitar a análise dos mesmos.

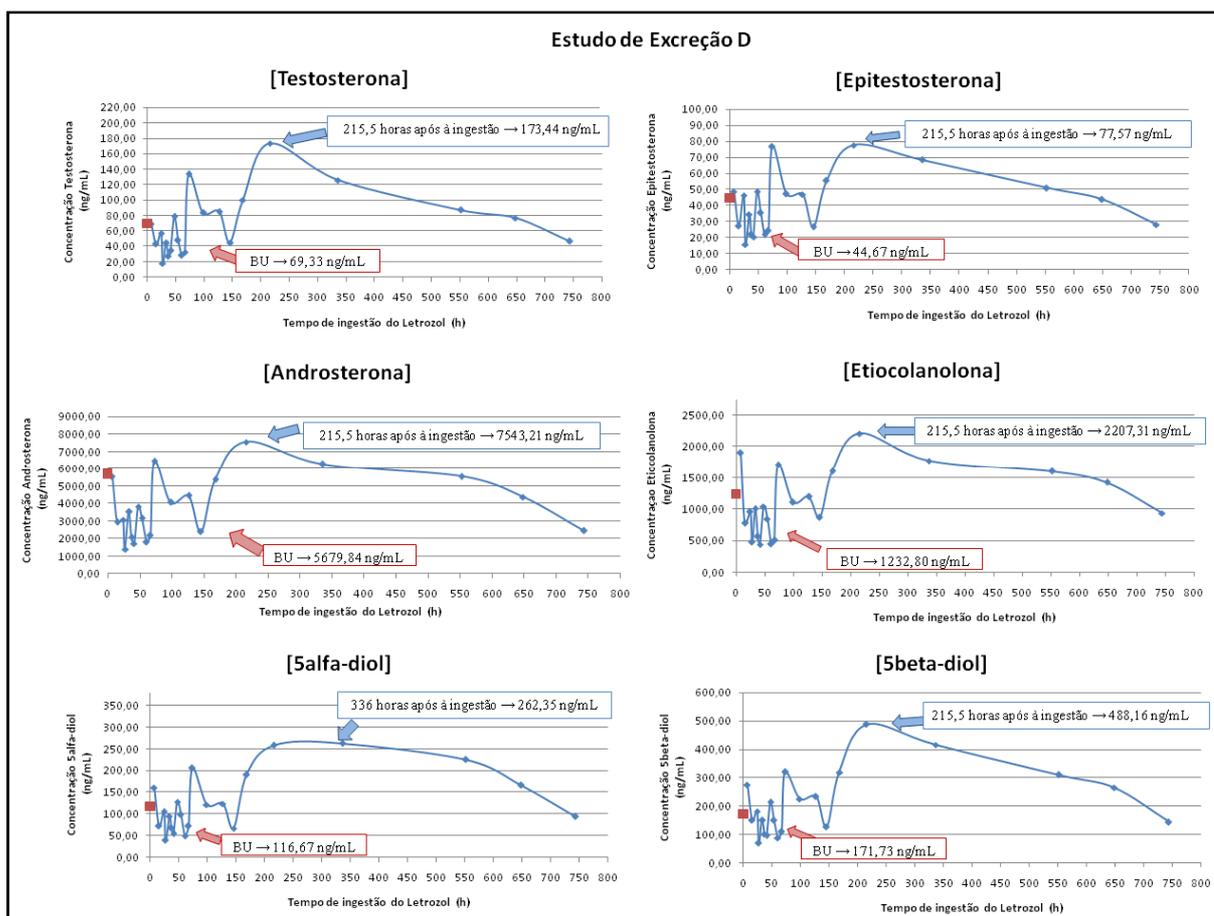


Figura 31: Concentração dos endógenos no estudo de excreção do voluntário D.

Pode-se observar que, assim como nos estudos de excreção do voluntário A e B, no estudo do voluntário D os seis endógenos analisados apresentaram perfis de excreção parecidos. Além disso, eles apresentaram a maior concentração na urina coletada após 215,5 horas à ingestão do comprimido, com exceção do 5alfa-diol que teve o máximo de concentração na urina coletada após 336h (pouca diferença da concentração apresentada na urina coletada após 215,5h).

Na tabela a seguir, estão apresentados os valores de concentração dos seis endógenos monitorados tanto no BU quanto na urina coletada após 215,5 horas à ingestão do comprimido.

Tabela 22: Comparação da concentração dos endógenos no BU e na urina coletada após 215,5 horas à ingestão do comprimido do voluntário D e a porcentagem de aumento.

Endógeno	Concentração no BU (ng/mL)	Concentração na urina coletada após 215,5 horas à ingestão do comprimido (ng/mL)	Porcentagem de aumento da concentração (%)
Testosterona	69,33	173,44	150
Epitestosterona	44,67	77,57	74
Androsterona	5679,84	7543,21	33
Etiocolanolona	1232,80	2207,31	79
5alfa-diol	116,67	262,35	125
5beta-diol	171,73	488,16	184

Comparando a porcentagem de aumento da concentração entre o branco de urina e a urina coletada após 215,5 horas à ingestão da dose de letrozol, é possível observar que, no caso do voluntário D, os seis endógenos sofreram aproximadamente aumentos de 33 à 184%, sendo o maior aumento, apresentado pelo 5beta-diol.

Comparando a concentração dos isômeros testosterona e epitestosterona, pode-se observar que no branco de urina do voluntário B, a concentração de testosterona era 1,5 vezes maior do que a concentração de epitestosterona. Já na urina coletada após 215,5 horas à ingestão do comprimido, a testosterona passou a ser 2,5 vezes mais concentrada do que a epitestosterona. Novamente, esse aumento do nível de testosterona se deve ao fato do letrozol inibir a enzima aromatase impedindo a conversão de testosterona em estradiol.

Comparando a concentração dos dois isômeros androsterona e etiocolanolona, pode-se observar no branco de urina, que a concentração de androsterona é 4,6 vezes maior que a de etiocolanolona. Fazendo essa mesma comparação na urina coletada após 215,5h à ingestão do comprimido, pode-se observar que essa diferença diminuiu para 3,4 vezes.

Comparando a concentração entre os isômeros 5alfa-diol e 5beta-diol no branco de urina, pode-se notar que o 5beta-diol é 1,5 vezes mais concentrado que o 5alfa-diol. Fazendo essa comparação com relação às maiores concentrações encontradas, que foi em urinas coletadas em diferentes horários, essa diferença aumentou para 1,9 vezes.

Conforme demonstrado na tabela em anexo (8.14), pode-se observar que nenhuma urina apresentou concentração corrigida de testosterona, epitestosterona, androsterona e etiolanolona maior que os limites estipulados pelo documento técnico da AMA (TD2014EAAS), que são 200 ng/mL para testosterona e epitestosterona e 10000 ng/mL para androsterona e etiolanolona para urinas masculinas. Na Figura 32 está o gráfico da Razão testosterona / epitestosterona versus o tempo de ingestão do comprimido para o voluntário D.

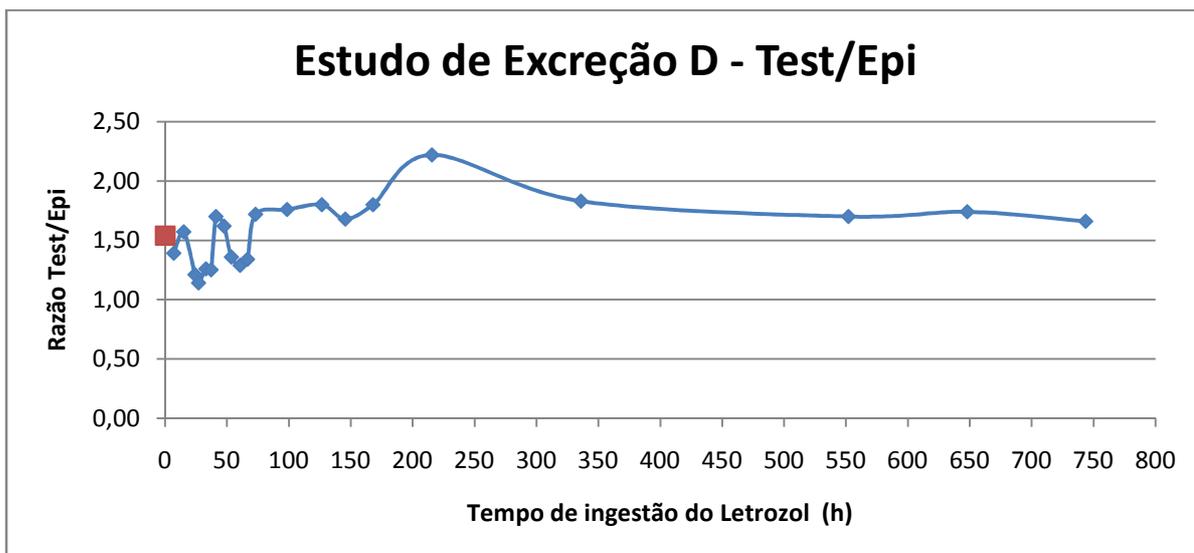


Figura 32: Razão da testosterona / Epitestosterona do voluntário D.

Assim como observado nos estudos dos outros voluntários, nenhuma urina do estudo do voluntário D apresentou razão Test/Epi superior a 4. Apesar disso, é possível observar na Figura 32 um ligeiro aumento dessa razão, principalmente na urina coletada após 215,5 horas à ingestão do comprimido. Esse acréscimo se deve ao fato do nível de testosterona ter aumentado mais que o nível de epitestosterona.

5.4.2.5. Voluntário E

A Figura 33 apresenta os gráficos da concentração dos seis endógenos ao longo do estudo de excreção do voluntário E. As concentrações encontradas no branco de urina e na urina mais concentrada estão descritas nos gráficos para facilitar a análise dos mesmos.

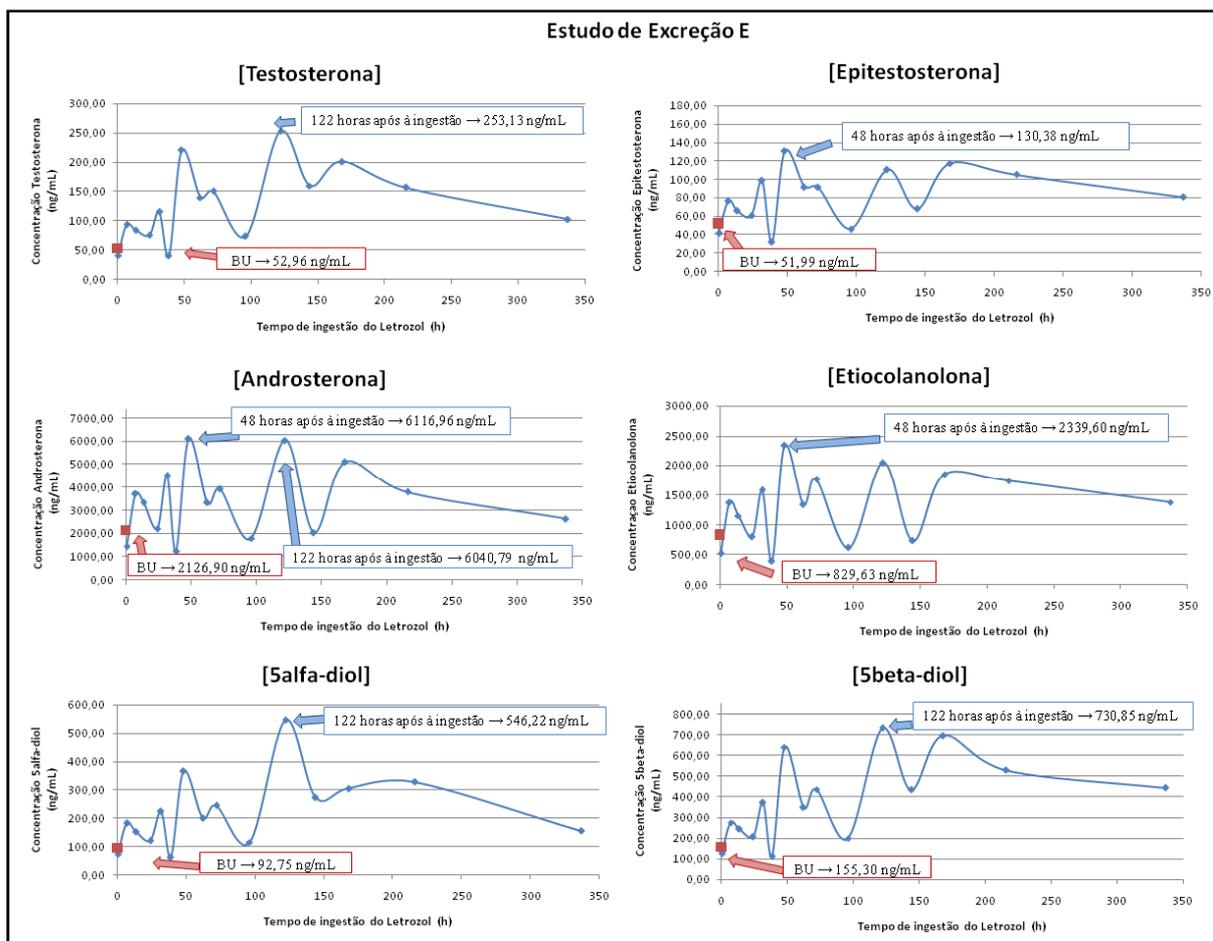


Figura 33: Concentração dos endógenos no estudo de excreção do voluntário E.

Primeiramente, pode-se observar que no estudo de excreção do voluntário E, os seis endógenos monitorados apresentaram perfis de excreção ligeiramente similares. Apesar disso, eles apresentaram os seus máximos de concentração em urinas coletada em horários diferentes. A testosterona apresentou a maior concentração na urina coletada após 122h enquanto a epitestosterona foi na urina coletada após 48h à ingestão do comprimido, assim como os isômeros androsterona e eticolanolona. Já os isômeros 5alfa-diol e 5beta-diol apresentaram maior concentração na urina coletada após 122h.

Na tabela a seguir, estão apresentadas as concentrações dos seis endógenos determinadas no branco de urina e na respectiva urina mais concentrada do estudo de excreção do voluntário E.

Tabela 23: Comparação da concentração dos endógenos no BU e na urina mais concentrada do voluntário E e a porcentagem de aumento.

Endógeno	Concentração no BU (ng/mL)	Maior concentração (ng/mL) - tempo de ingestão	Porcentagem de aumento da concentração (%)
Testosterona	52,96	253,13 - 122h	377
Epitestosterona	51,99	130,38 - 48h	150
Androsterona	2126,90	6116,96 - 48h	188
Etiocolanolona	829,63	2339,60 - 48h	182
5alfa-diol	92,75	546,22 - 122h	489
5beta-diol	155,30	730,85 - 122h	371

É possível observar no caso do voluntário E que o 5alfa-diol apresentou o maior aumento de concentração (489%) em relação ao branco de urina.

Comparando a concentração dos dois isômeros testosterona e epitestosterona, pode-se observar no branco de urina, que a concentração dos dois é muito próxima. Fazendo essa mesma comparação na urina coletada após à ingestão do comprimido, essa diferença sofre um aumento. Por exemplo, na urina coletada após 122 horas à ingestão do comprimido, a concentração de testosterona passa a ser 2,3 vezes maior do que a da epitestosterona.

Comparando a concentração dos dois isômeros androsterona e eticolanolona, pode-se observar no branco de urina, que a concentração de androsterona é 2,6 vezes maior que a de eticolanolona. Não houve alteração nessa proporção na urina coletada após 48h à ingestão do comprimido.

Comparando a concentração entre os isômeros 5alfa-diol e 5beta-diol no branco de urina, pode-se notar que o 5beta-diol é 1,7 vezes mais concentrado que o 5alfa-diol. Fazendo essa comparação na urina coletada após 122 horas à ingestão do comprimido, essa diferença diminuiu para 1,3 vezes.

Apesar da concentração da testosterona na urina coletada após 122 horas ser igual a 253,13 ng/mL, a concentração corrigida (considerando que a sua densidade foi 1,033) é 153,41 ng/mL, permanecendo abaixo do limite que sugeriria um perfil endógeno atípico. Conforme demonstrado na tabela em anexo (8.15), pode-se observar que nenhuma urina apresentou concentração corrigida de testosterona, epitestosterona, androsterona e etiolanolona maior que os limites estipulados pelo documento técnico da AMA (TD2014EAAS), que são 200 ng/mL para testosterona e epitestosterona e 10000 ng/mL para androsterona e etiolanolona para urinas masculinas. Na Figura 34 está o gráfico da Razão testosterona / epitestosterona versus o tempo de ingestão do comprimido do estudo de excreção do voluntário E.

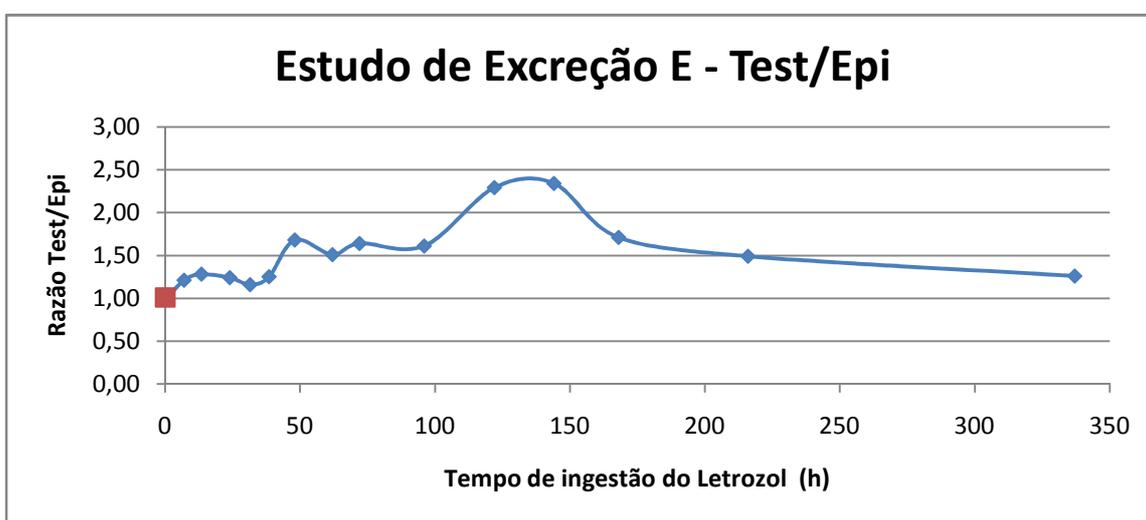


Figura 34: Razão da testosterona / Epitestosterona do voluntário E.

Pode-se observar que nenhuma urina do estudo do voluntário E apresentou razão Test/Epi superior a 4. Apesar disso, é possível visualizar um ligeiro aumento dessa razão, principalmente nas urinas coletadas após 122 e 144 horas à ingestão do comprimido. Esse acréscimo se deve ao fato do nível de testosterona ter aumentado mais que o nível de epitestosterona.

Foi possível visualizar que um comprimido de Femara já é suficiente para provocar um aumento no nível dos seis endógenos monitorados. No caso da testosterona, isso já era o esperado devido ao letrozol inibir a enzima aromatase e assim não mediar a aromatização da testosterona em estradiol.

Isso é coerente também com o fato de em alguns tratamentos de epilepsia, os pacientes tomarem apenas uma dose de Femara por semana. Foi observado que, de uma forma geral, o nível de testosterona fica maior depois de aproximadamente 150-200 horas à ingestão do comprimido.

Não é possível encontrar uma regra no efeito causado por uma dose do comprimido Femara sobre os seis endógenos monitorados. Observa-se que a dose provoca um aumento nos níveis, mas esse comportamento varia muito entre os voluntários.

5.5. FIGURAS DE MÉRITO DE VALIDAÇÃO QUALITATIVA

5.5.1. Seletividade

Para avaliar a seletividade, foi necessário avaliar os cinco brancos de urina dos cinco voluntários dos estudos de excreção e verificar a ausência de interferentes no tempo de retenção do analito alvo (carbinol). A seguir estão os cromatogramas de íons totais e o cromatograma de íons para as transições m/z 291 \rightarrow m/z 160 e m/z 291 \rightarrow m/z 217, respectivamente para cada branco de urina.

Voluntário A:

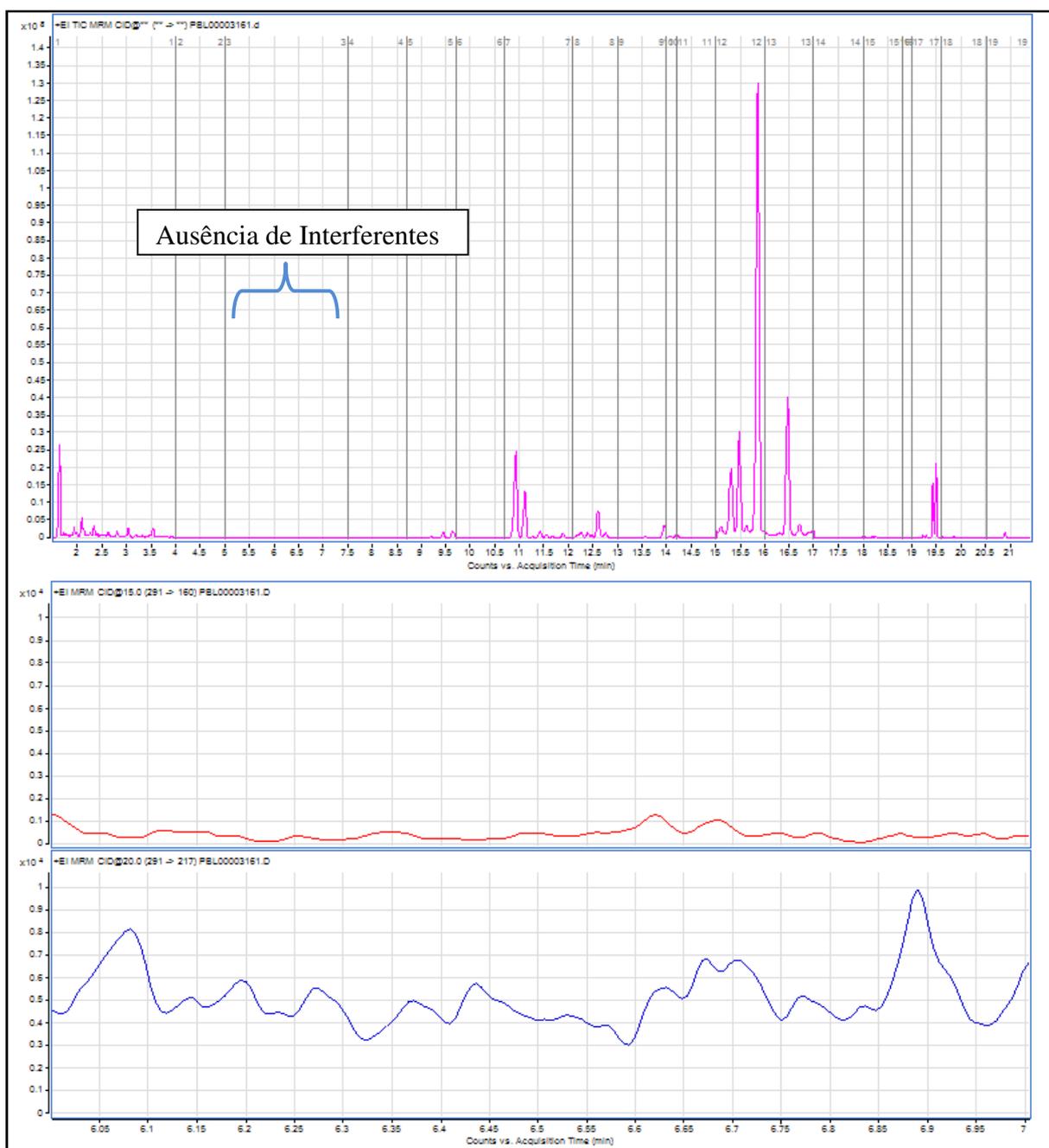


Figura 35: Cromatograma de íons totais e o cromatograma de íons extraídos para as transições m/z 291 \rightarrow m/z 160 e m/z 291 \rightarrow m/z 217, respectivamente do BU do voluntário A.

Voluntário B:

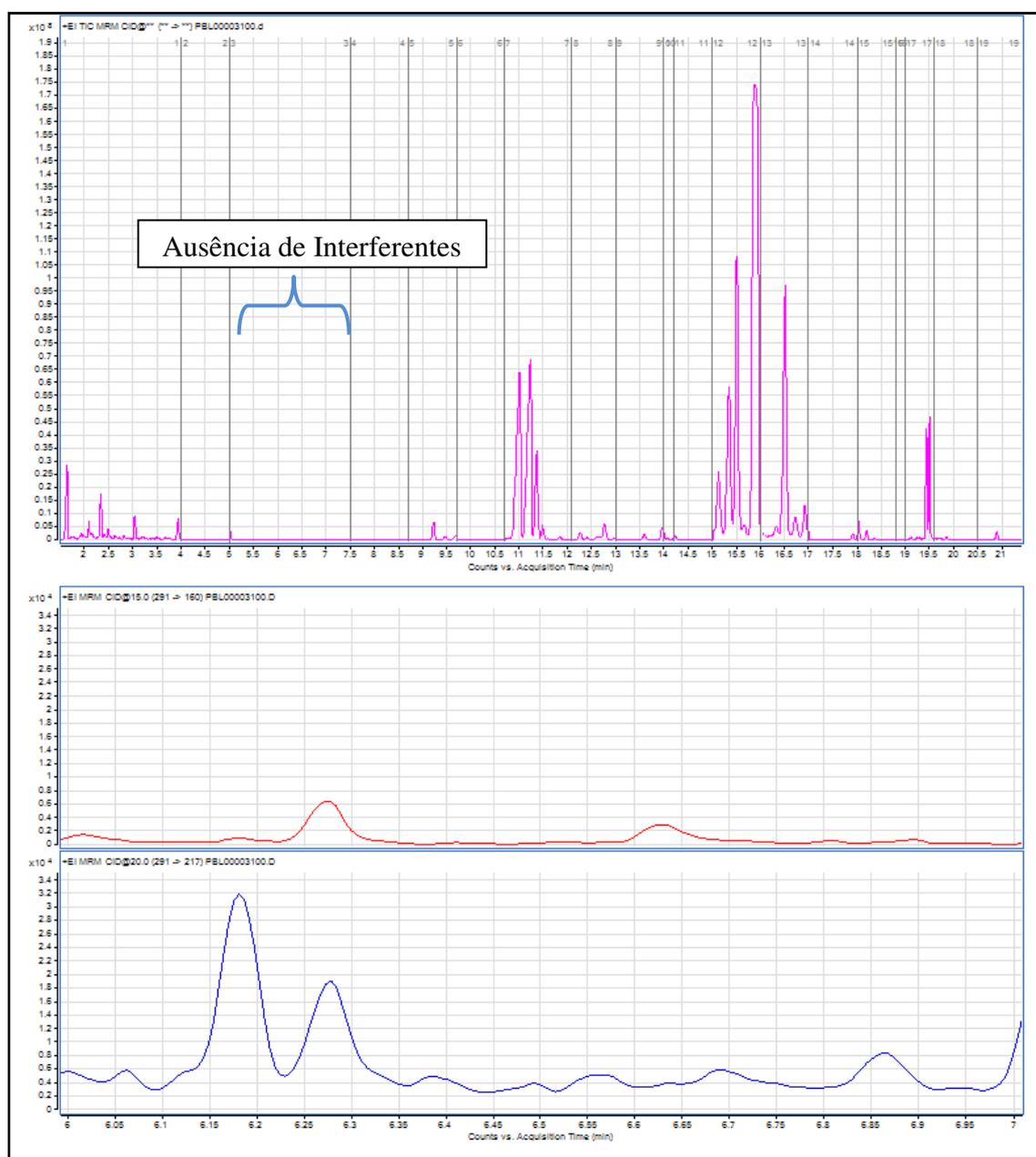


Figura 36: Cromatograma de íons totais e o cromatograma de íons extraídos para as transições m/z 291 \rightarrow m/z 160 e m/z 291 \rightarrow m/z 217, respectivamente do BU do voluntário B.

Voluntário C:

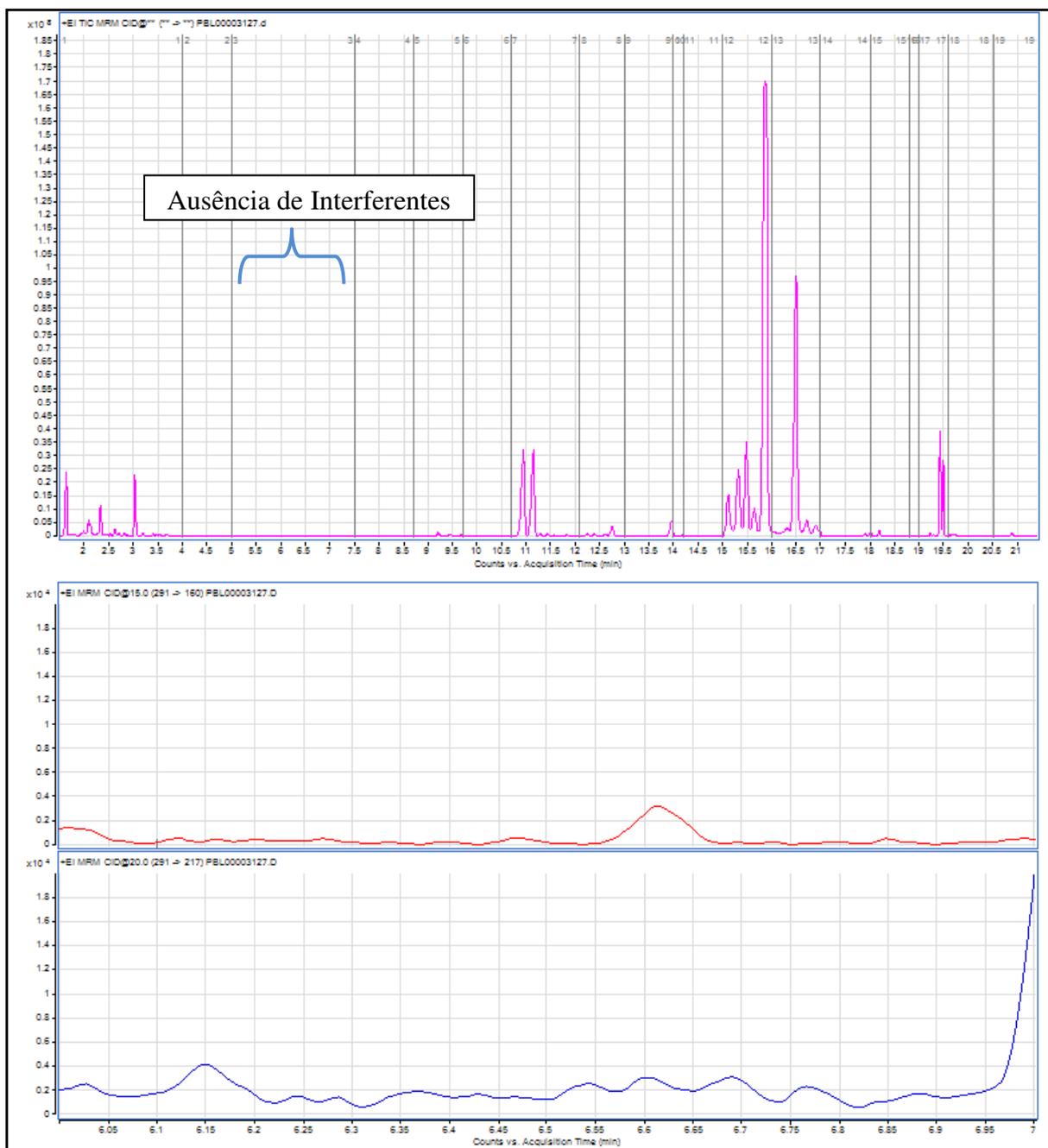


Figura 37: Cromatograma de íons totais e o cromatograma de íons extraídos para as transições m/z 291 \rightarrow m/z 160 e m/z 291 \rightarrow m/z 217, respectivamente do BU do voluntário C.

Voluntário D:

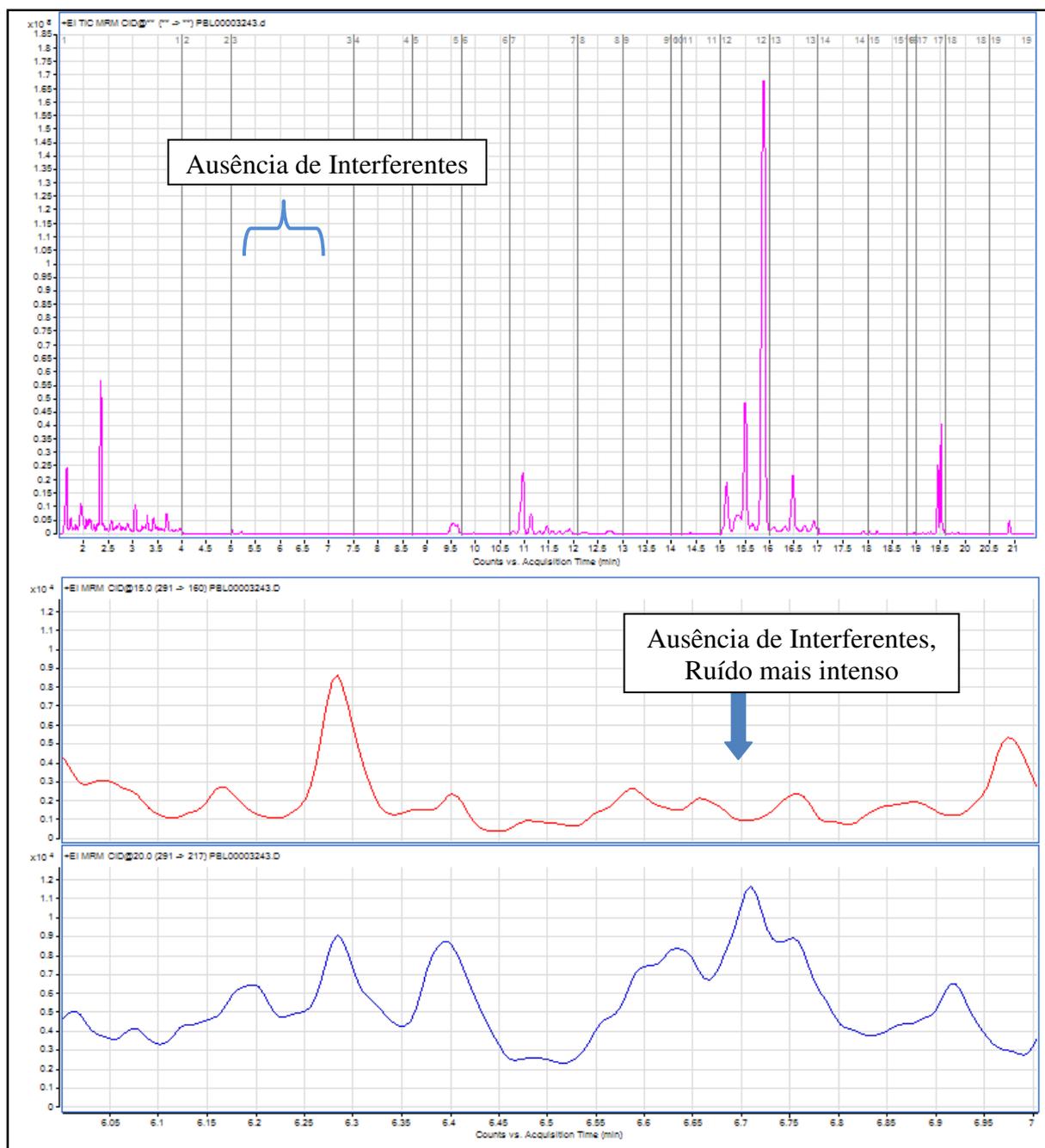


Figura 38: Cromatograma de íons totais e o cromatograma de íons extraídos para as transições m/z 291 \rightarrow m/z 160 e m/z 291 \rightarrow m/z 217, respectivamente do BU do voluntário D.

Voluntário E:

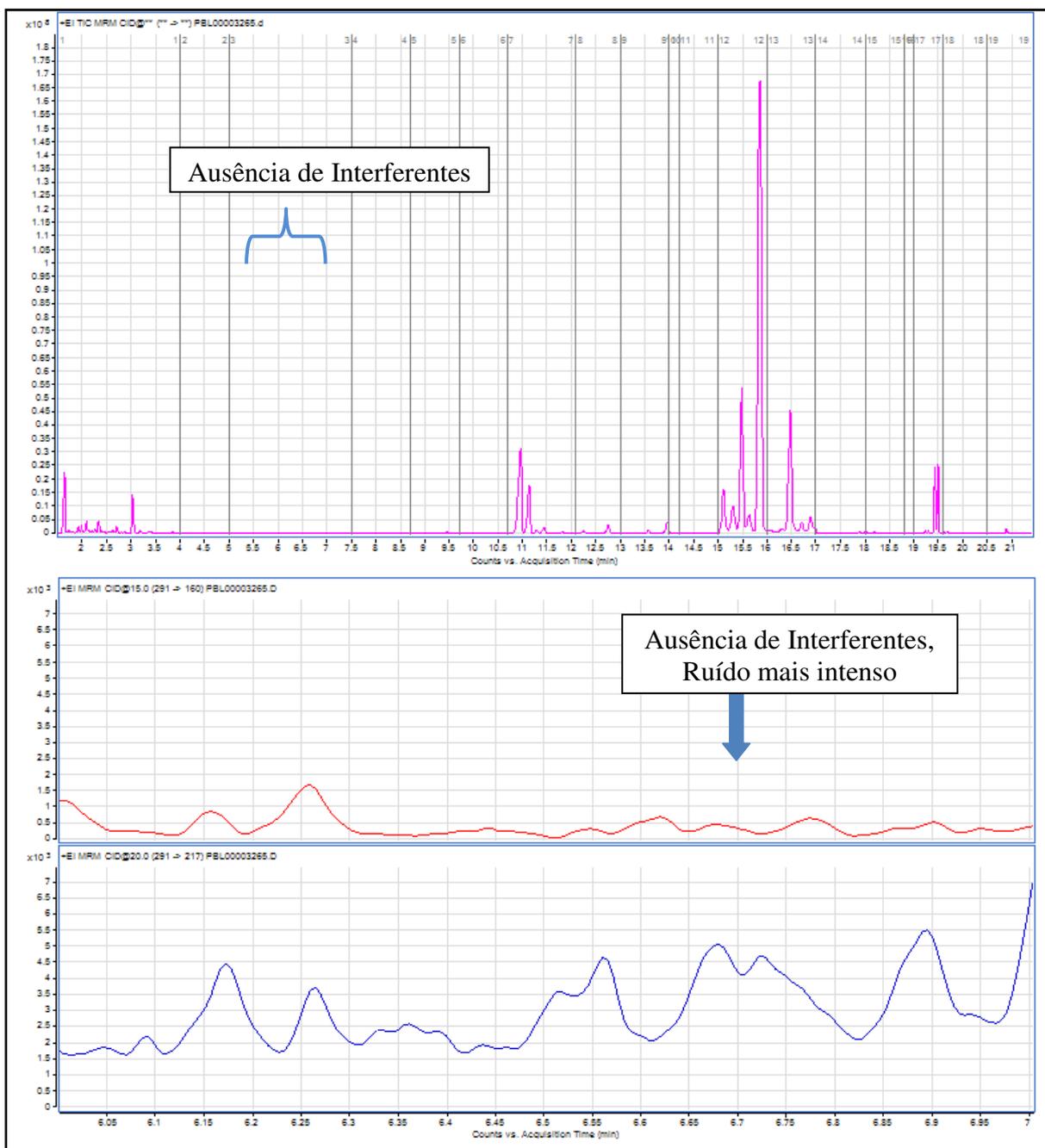


Figura 39: Cromatograma de íons totais e o cromatograma de íons extraídos para as transições m/z 291 \rightarrow m/z 160 e m/z 291 \rightarrow m/z 217, respectivamente do BU do voluntário E.

Os cromatogramas de íons totais dos cinco voluntários não apresentam picos cromatográficos na faixa de tempo de retenção entre 5 e 7,5 minutos, que corresponde a faixa do segmento 3. Observando os cromatogramas das transições dos voluntários A, B e C também não foi detectado nenhum analito com essas transições. Já no branco de urina dos

voluntários D e E é possível ver um ruído mais intenso que os demais, mas que não pode ser confundido com o analito alvo, carbinol, que elui em aproximadamente 6,6-6,7 minutos.

Os cromatogramas dos cinco voluntários demonstrados anteriormente podem ser comparados com o cromatograma de uma urina positiva de letrozol, ou até mesmo com o cromatograma de um branco de urina fortificado com o metabólito carbinol. Estes dois últimos estão apresentados a seguir, respectivamente:

Urina positiva de letrozol (estudo de excreção):

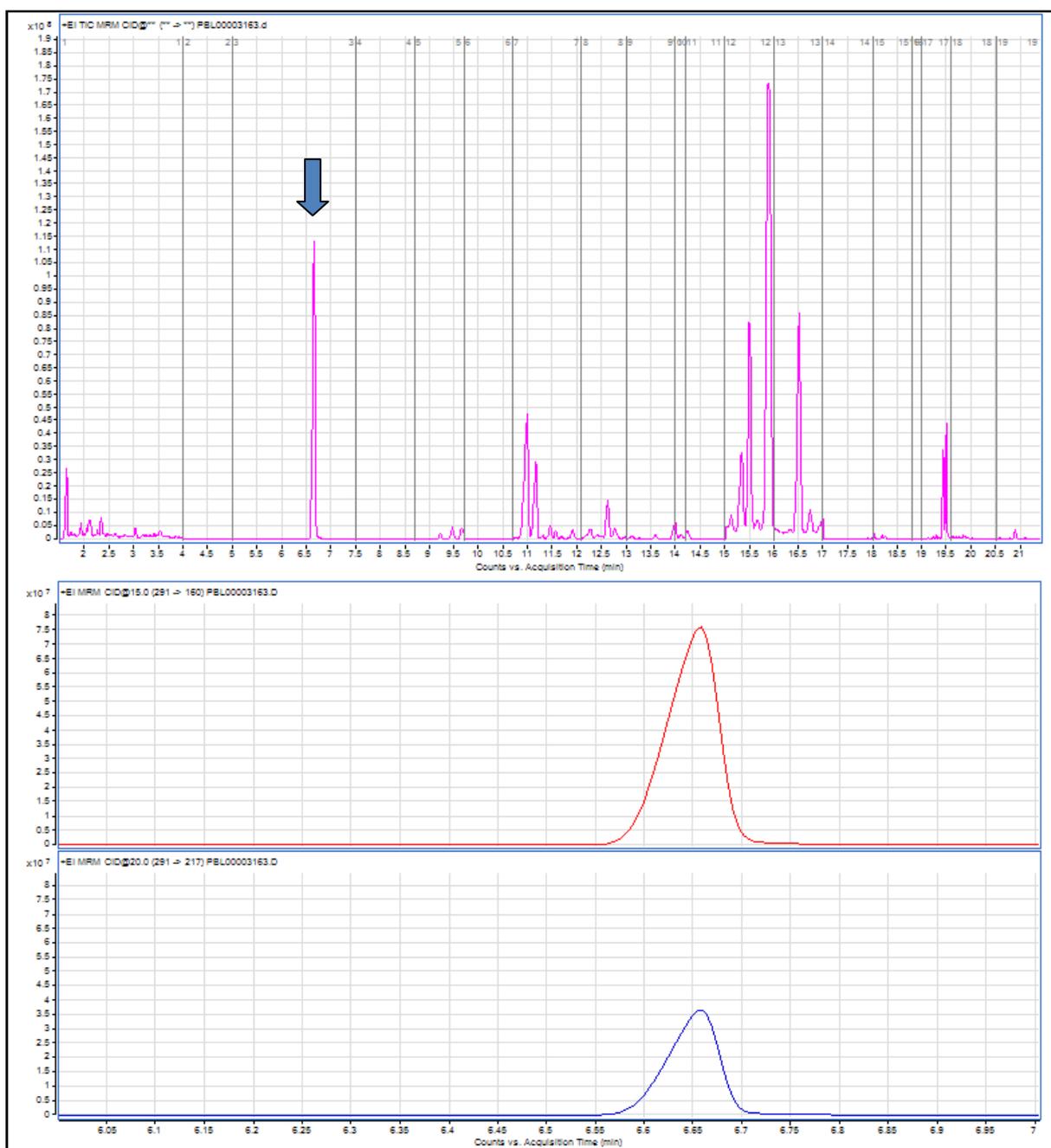


Figura 40: Cromatograma de íons totais e o cromatograma de íons extraídos para as transições m/z 291 \rightarrow m/z 160 e m/z 291 \rightarrow m/z 217, respectivamente de uma urina positiva de letrozol (Estudo de excreção)

Branco de urina fortificado com o metabólito carbinol em 100 ng/mL:

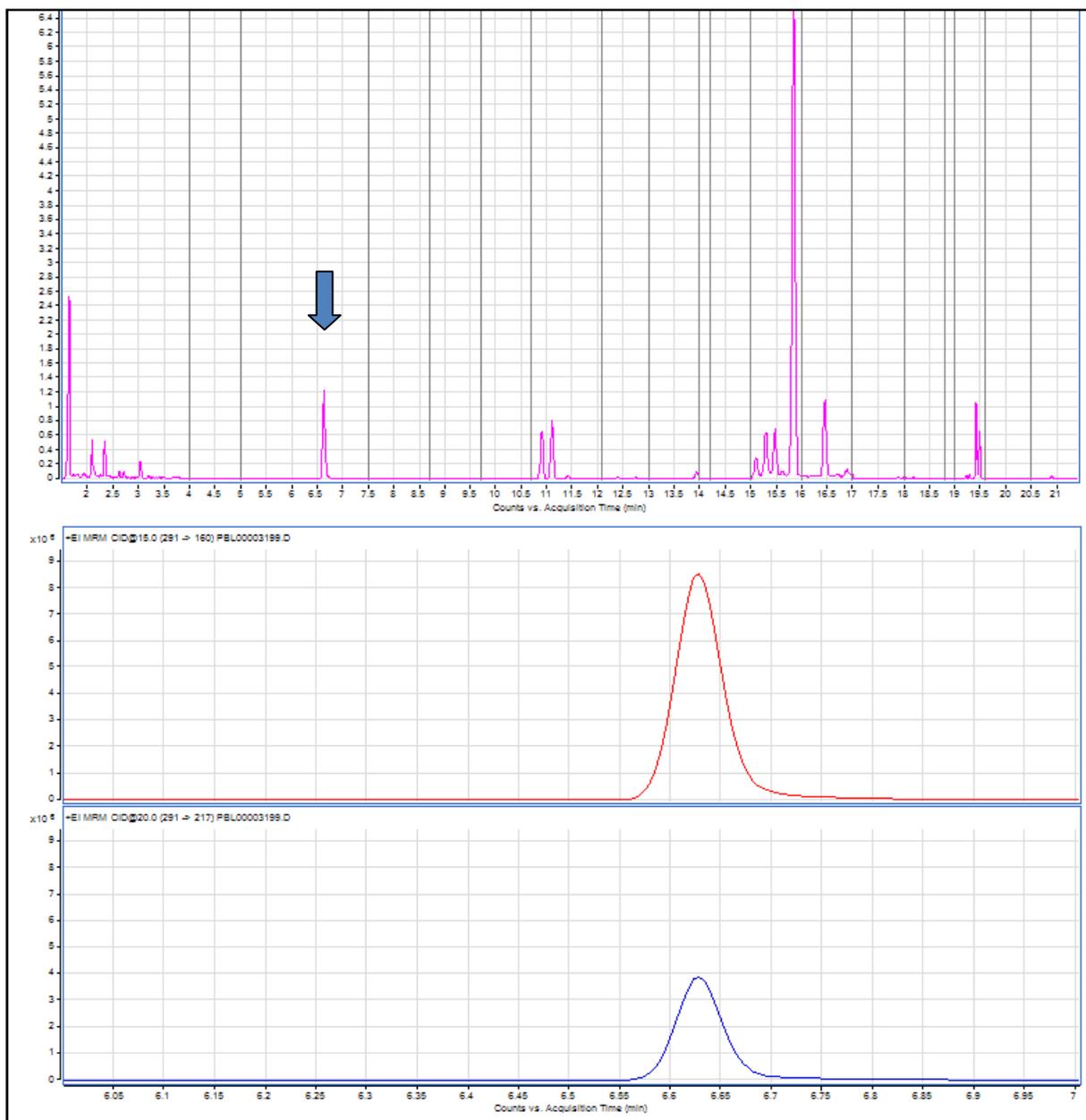


Figura 41: Cromatograma de íons totais e o cromatograma de íons para as transições m/z 291 \rightarrow m/z 160 e m/z 291 \rightarrow m/z 217, respectivamente de um branco de urina fortificado com 100 ng/mL do carbinol.

Pode-se observar que tanto nos cromatogramas da urina proveniente de estudo de excreção do letrozol, quanto nos cromatogramas da urina fortificada com o carbinol, existe um pico intenso bem resolvido referente à fragmentação do carbinol.

Uma amostra controle contendo todos os analitos (aproximadamente 215) monitorados por CG-QqQ foi analisada para demonstrar quais analitos eluem na faixa de tempo de retenção (5.1 até 7.4min), segmento que contém o carbinol.

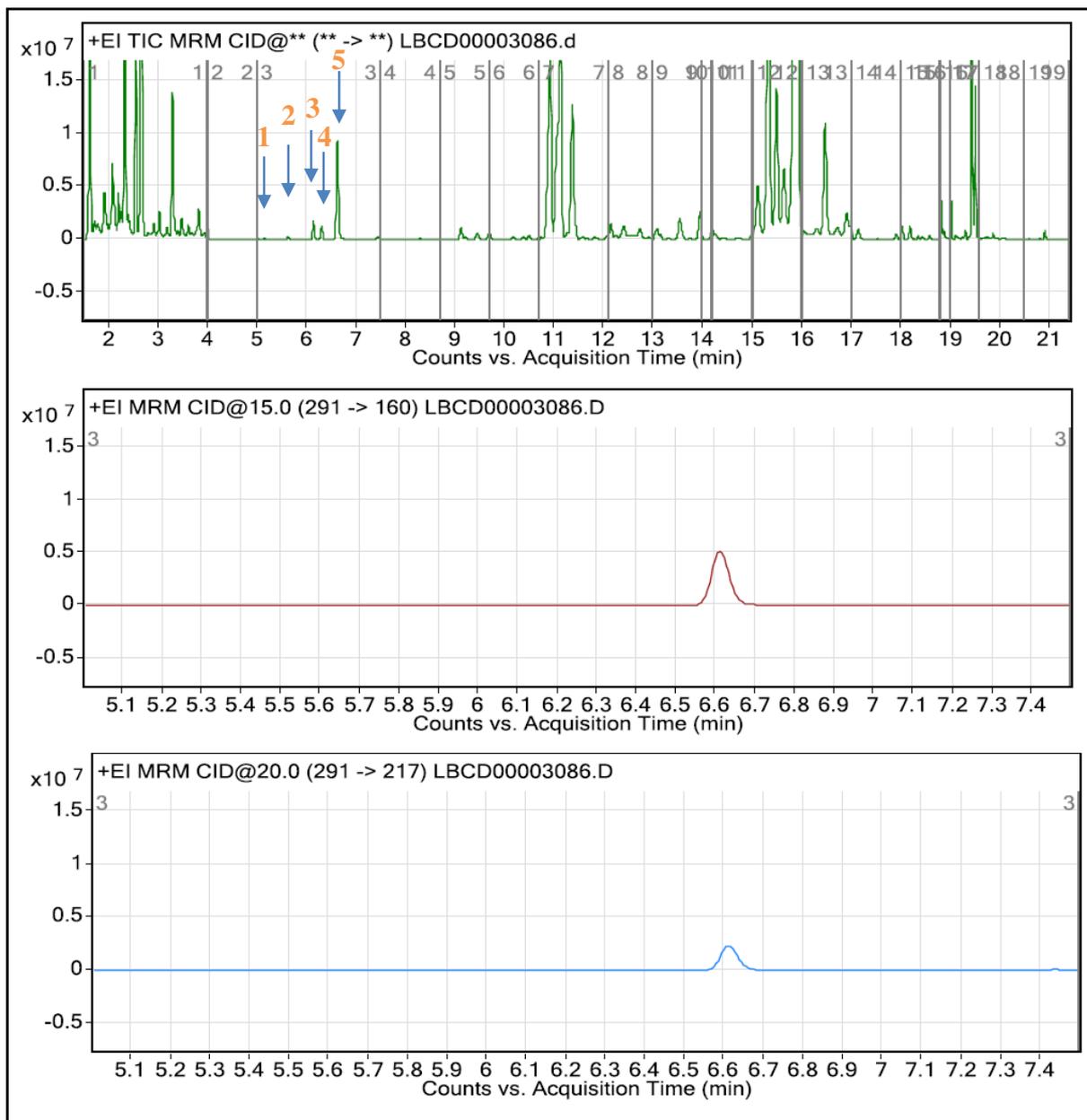


Figura 42: Cromatograma de íons totais e o cromatograma de íons para as transições m/z 291 \rightarrow m/z 160 e m/z 291 \rightarrow m/z 217, respectivamente de uma amostra controle contendo todos os analitos monitorados por CG-QqQ.

Pode-se verificar a presença de cinco substâncias na respectiva faixa de tempo de retenção, que são, respectivamente: Metadona, Brombuterol, Carbinol, Probenecida e Zilpaterol.

Mesmo os picos estando bem resolvidos, o que não dá possibilidade de dúvida de coeluição de algum deles, quando se analisa o cromatograma de íons das transições referente ao carbinol, aparece apenas um pico. Desta forma, avaliando-se todas as observações dos

brancos de urinas, da urina positiva e da urina fortificada com o analito carbinol, pode-se afirmar que a análise desse analito é bem seletiva.

5.5.2. Repetibilidade

Para avaliar a repetibilidade, foi necessário comparar os dez valores de área analito/área padrão interno obtidos das dez replicatas das amostras controles.

Essa avaliação foi feita em diferentes concentrações:

5.5.2.1. Controle em 50 ng/mL

Foi calculada a média e o desvio padrão dos valores obtidos de Razão área do analito /área do padrão interno e estes estão apresentados na tabela a seguir:

Tabela 24: Valores das áreas do carbinol e da metiltestosterona e a razão entre elas, média e desvio padrão dos valores para repetibilidade (50 ng/mL).

Repetibilidade (50 ng/mL)					
	A Analito	A Metiltestosterona	Razão A analito/ A P.I.	Média	Desvio padrão
Let Extr R1	29055787	11481484	2,53	2,61	0,15
Let Extr R2	26452967	10693434	2,47		
Let Extr R3	26436607	10849942	2,44		
Let Extr R4	25305064	9028590	2,80		
Let Extr R5	25632454	9317829	2,75		
Let Extr R6	25016900	9076876	2,76		
Let Extr R7	25672878	9584329	2,68		
Let Extr R8	23018546	9214983	2,50		
Let Extr R9	26428950	10425977	2,53		
Let Extr R10	26987036	9425459	2,86		

Pode-se observar que as dez replicatas apresentaram uma variação pequena, com o desvio padrão de apenas 0,15. O desvio padrão relativo percentual é 5,7% e está dentro do valor recomendado pelo Protocolo de Validação Qualitativa do LBCD, que é inferior à 20%. Desta forma pode-se considerar a análise reprodutível nessa concentração.

5.5.2.2. Controle em 20 ng/mL (LMDR)

Foi calculada a média e o desvio padrão dos valores obtidos da razão área do analito pela área do padrão interno e os resultados obtidos estão apresentados na tabela a seguir.

Tabela 25: Valores das áreas do carbinol e da metiltestosterona e a razão entre elas, média e desvio padrão dos valores para repetibilidade (20 ng/mL).

Repetibilidade em 20 ng/mL					
	A Analito	A Metiltestosterona	Razão A analito/ A P.I.	Média	Desvio padrão
Let 20 Extr R1	10743487	11663288	0,92	0,90	0,04
Let 20 Extr R2	10865900	12094944	0,90		
Let 20 Extr R3	10418505	11610700	0,90		
Let 20 Extr R4	11281651	12447980	0,91		
Let 20 Extr R5	10409395	12895581	0,81		
Let 20 Extr R6	10609273	12374595	0,86		
Let 20 Extr R7	11147019	13019135	0,86		
Let 20 Extr R8	10410912	12812393	0,81		
Let 20 Extr R9	11095086	12366138	0,90		
Let 20 Extr R10	11251437	12031913	0,94		

O desvio padrão relativo percentual foi 4,5% e está de acordo com o limite recomendado que é 20%, o que indica que a análise é reprodutível nessa concentração.

5.5.2.3. Controle em 10 ng/mL

Foi calculada a média e o desvio padrão dos valores obtidos da razão área do analito pela área do padrão interno e os resultados obtidos estão apresentados na tabela a seguir.

Tabela 26: Valores das áreas do carbinol e da metiltestosterona e a razão entre elas, média e desvio padrão dos valores para repetibilidade (10 ng/mL).

Repetibilidade em 10 ng/mL					
	A Analito	A Metiltestosterona	Razão A analito/ A P.I.	Média	Desvio padrão
Let 10 Extr R1	4295151	10160041	0,423	0,44	0,02
Let 10 Extr R2	4460140	10474464	0,426		
Let 10 Extr R3	4370457	10028688	0,436		
Let 10 Extr R4	4362919	9652871	0,452		
Let 10 Extr R5	4647346	9886641	0,470		
Let 10 Extr R6	4653903	10951982	0,425		
Let 10 Extr R7	4478319	10104834	0,443		
Let 10 Extr R8	4256109	9782557	0,435		
Let 10 Extr R9	4584254	10105566	0,454		
Let 10 Extr R10	4842187	10254565	0,472		

O desvio padrão relativo percentual é 4,5% e está dentro do valor recomendado, que é inferior à 20%, podendo análise ser considerada reprodutível nessa concentração.

5.5.2.4. Controle em 5 ng/mL

Foi calculada a média e o desvio padrão dos valores obtidos da razão área analito pela área padrão interno e os resultados obtidos estão apresentados na tabela a seguir.

Tabela 27: Valores das áreas do carbinol e da metiltestosterona e a razão entre elas, média e desvio padrão dos valores para repetibilidade (5 ng/mL).

Repetibilidade em 5 ng/mL					
	A Analito	A Metiltestosterona	Razão A analito/ A P.I.	Média	Desvio padrão
Let 5 Extr R1	2185043	10347926	0,211	0,20	0,01
Let 5 Extr R2	2083238	10880450	0,191		
Let 5 Extr R3	2213394	10304221	0,215		
Let 5 Extr R4	1895156	10133290	0,187		
Let 5 Extr R5	2066083	10241415	0,202		
Let 5 Extr R6	1948118	10301514	0,189		
Let 5 Extr R7	2014616	9870547	0,204		
Let 5 Extr R8	1894330	9607265	0,197		
Let 5 Extr R9	1980371	9815801	0,202		
Let 5 Extr R10	1932971	9378878	0,206		

O desvio padrão relativo percentual é 5% e está dentro do valor recomendado, que é inferior à 20%, o que indica que a análise é reprodutível nessa concentração.

Pode-se observar que esse método, que inclui extração mais equipamento, é reprodutível em uma ampla faixa de concentração, incluindo valores acima e abaixo do LMDR (20 ng/mL).

5.5.3. Limite de Detecção

As replicatas do BU fortificado com o carbinol em 0,5 ng/mL e 1,0 ng/mL foram analisadas no CG-QqQ e a relação sinal / ruído foi calculada usando o pico da transição do carbinol de menor intensidade, que é a m/z 291 \rightarrow m/z 217. O sinal / ruído foi calculado automaticamente pelo software do instrumento e esses valores estão apresentados na tabela a seguir:

Tabela 28: Valores de sinal/ruído no LD.

Limite de Detecção			
Concentração (ng/mL)		Sinal/Ruído	Média
0,5	R1	15,5	13,4
	R2	14,8	
	R3	9,8	
1,0	R1	26,4	26,9
	R2	32,7	
	R3	21,5	

Apesar do cálculo da razão sinal / ruído ser realizado pelo software, são necessários alguns ajustes de configuração para que a região delimitada como ruído não contenha nenhum pico cromatográfico, o que aumentaria o ruído. Foi programado para todas as replicatas que a região entre 6,85-7,15 min seria representativa do ruído, como por exemplo, o mostrado na figura a seguir.

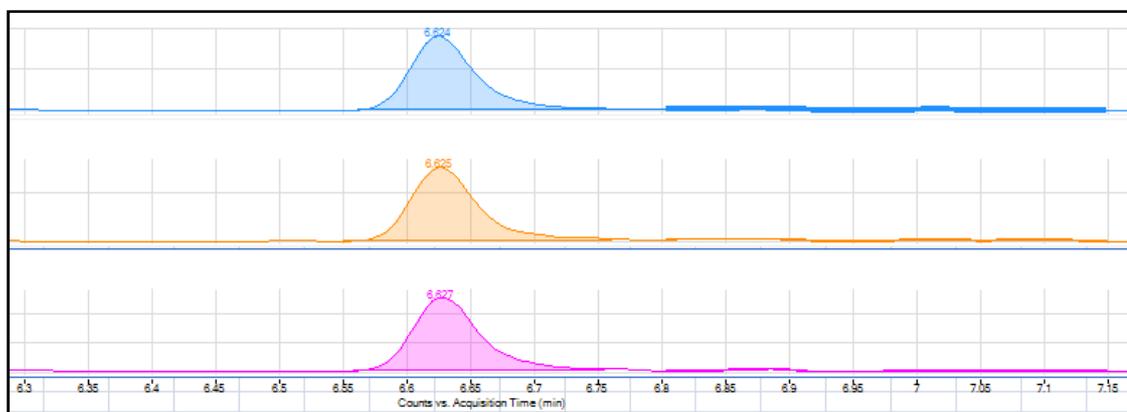


Figura 43: Região considerada representativa do ruído para cálculo da razão sinal / ruído

Foi considerado como limite de detecção o 0,5 ng/mL de carbinol. A razão sinal / ruído está acima da mínima indicada pelo protocolo de validação que é 3. Esse valor de concentração é muito menor que o LMDR da AMA para essa classe, que é igual a 20 ng/mL, o que demonstra sensibilidade do método de análise.

5.5.4. Rendimento de extração

Para avaliar o rendimento de extração, é necessário comparar as amostras fortificadas com o analito alvo no início do procedimento e as amostras fortificadas após a evaporação da fase orgânica.

Essa avaliação foi feita em diferentes concentrações:

5.5.4.1. Controle em 50 ng/mL

Na tabela a seguir encontram-se os valores das áreas do analito carbinol e do padrão interno metiltestosterona e a respectiva razão. Foi calculada a média dos valores das razões das dez replicatas tanto para o caso em que o analito foi extraído quanto para o caso em que o analito foi fortificado após a evaporação.

Tabela 29: Valores das áreas do carbinol e da metiltestosterona e a razão entre elas no rendimento de extração (50 ng/mL).

Rendimento de extração (50 ng/mL)				
	A Analito	A Metiltestosterona	Razão A analito/ A P.I.	Média
Let 50 Extr R1	29055787	11481484	2,531	2,607
Let 50 Extr R2	26452967	10693434	2,474	
Let 50 Extr R3	26436607	10849942	2,437	
Let 50 Extr R4	25305064	9028590	2,803	
Let 50 Extr R5	25632454	9317829	2,751	
Let 50 Extr R6	25016900	9076876	2,756	
Let 50 Extr R7	25672878	9584329	2,679	
Let 50 Extr R8	23018546	9214983	2,498	
Let 50 Extr R9	26428950	10425977	2,535	
Let 50 Extr R10	26987036	9425459	2,863	
Let 50 Fort R1	28738995	10130065	2,837	2,942
Let 50 Fort R2	28022601	8956939	3,129	
Let 50 Fort R3	28287344	9765156	2,897	
Let 50 Fort R4	25271806	8662669	2,917	
Let 50 Fort R5	25781765	9898058	2,605	
Let 50 Fort R6	27082305	7543539	3,590	
Let 50 Fort R7	24429074	8529868	2,864	
Let 50 Fort R8	25778822	8688125	2,967	
Let 50 Fort R9	25907977	7706745	3,362	
Let 50 Fort R10	26259775	7959784	3,299	

Quando o carbinol é adicionado após a evaporação da fase orgânica, considera-se que o mesmo não sofre nenhuma perda: Após essa adição, o solvente da solução usada para a fortificação é evaporado e o tubo é colocado no dessecador. A solução derivatizante é adicionada diretamente nesse tubo, reagindo com o as moléculas passíveis de derivatização e depois a amostra é transferida para o conjunto *insert + vial*. Por não ter perda, considera-se o valor da média dessas replicatas o 100% de recuperação. Já quando o carbinol é adicionado na urina no início do procedimento, há uma perda do mesmo devido à extração líquido- líquido.

Desta forma, considerando o valor de 2,942 o 100%, o valor de 2,607 representa aproximadamente 89% de recuperação de extração.

5.5.4.2. Controle em 20 ng/mL (LMDR)

Tabela 30: Valores das áreas do carbinol e da metiltestosterona e a razão entre elas no rendimento de extração (20 ng/mL).

Rendimento de extração (20 ng/mL)				
	A Analito	A Metiltestosterona	Razão A analito/ A P.I.	Média
Let 20 Extr R1	10743487	11663288	0,92	0,90
Let 20 Extr R2	10865900	12094944	0,90	
Let 20 Extr R3	10418505	11610700	0,90	
Let 20 Extr R4	11281651	12447980	0,91	
Let 20 Extr R5	10409395	12895581	0,81	
Let 20 Extr R6	10609273	12374595	0,86	
Let 20 Extr R7	11147019	13019135	0,86	
Let 20 Extr R8	10410912	12812393	0,81	
Let 20 Extr R9	11095086	12366138	0,90	
Let 20 Extr R10	11251437	12031913	0,94	
Let 20 Fort R1	12136572	13994612	0,87	0,93
Let 20 Fort R2	12386010	12535292	0,99	
Let 20 Fort R3	12003063	13286282	0,90	
Let 20 Fort R4	11693470	12537016	0,93	
Let 20 Fort R5	11661417	12570758	0,93	
Let 20 Fort R6	11959591	12478072	0,96	
Let 20 Fort R7	11754884	12842763	0,92	
Let 20 Fort R8	12416505	12864965	0,97	
Let 20 Fort R9	11616007	12871779	0,90	
Let 20 Fort R10	12190473	12627573	0,97	

Considerando o valor de 0,93 o 100%, o valor de 0,90 representa 97% de rendimento de extração do carbinol. Esse valor de rendimento de extração é muito importante por se tratar da extração na concentração referente ao limite mínimo de desempenho adquirido pela AMA.

5.5.4.3. Controle em 10 ng/mL

Tabela 31: Valores das áreas do carbinol e da metiltestosterona e a razão entre elas no rendimento de extração (10 ng/mL).

Rendimento de extração 10 ng/mL				
	A Analito	A Metiltestosterona	Razão A analito/ A P.I.	Média
Let 10 Extr R1	4295151	10160041	0,423	0,444
Let 10 Extr R2	4460140	10474464	0,426	
Let 10 Extr R3	4370457	10028688	0,436	
Let 10 Extr R4	4362919	9652871	0,452	
Let 10 Extr R5	4647346	9886641	0,470	
Let 10 Extr R6	4653903	10951982	0,425	
Let 10 Extr R7	4478319	10104834	0,443	
Let 10 Extr R8	4256109	9782557	0,435	
Let 10 Extr R9	4584254	10105566	0,454	
Let 10 Extr R10	4842187	10254565	0,472	
Let 10 Fort R1	4318870	10039242	0,430	0,441
Let 10 Fort R2	4311419	10174375	0,424	
Let 10 Fort R3	4470152	9647715	0,463	
Let 10 Fort R4	4555028	10002309	0,455	
Let 10 Fort R5	4180716	9979029	0,419	
Let 10 Fort R6	4832740	10833386	0,446	
Let 10 Fort R7	4599181	10410799	0,442	
Let 10 Fort R8	4441054	10013085	0,444	
Let 10 Fort R9	4580990	10161951	0,451	
Let 10 Fort R10	4592574	10430605	0,440	

Os valores da média apresentados na tabela anterior foram deixados com 3 algarismos significativos apenas para não ficarem iguais. Considerando o valor de 0,441 o 100%, o valor de 0,444 representa 101% de recuperação da extração do carbinol.

5.5.4.4. Controle em 5 ng/mL

Tabela 32: Valores das áreas do carbinol e da metiltestosterona e a razão entre elas no rendimento de extração (5 ng/mL).

Rendimento de extração 5 ng/mL				
	A Analito	A Metiltestosterona-P	Razão A analito/ A P.I.	Média
Let 5 Extr R1	2185043	10347926	0,211	0,200
Let 5 Extr R2	2083238	10880450	0,191	
Let 5 Extr R3	2213394	10304221	0,215	
Let 5 Extr R4	1895156	10133290	0,187	
Let 5 Extr R5	2066083	10241415	0,202	
Let 5 Extr R6	1948118	10301514	0,189	
Let 5 Extr R7	2014616	9870547	0,204	
Let 5 Extr R8	1894330	9607265	0,197	
Let 5 Extr R9	1980371	9815801	0,202	
Let 5 Extr R10	1932971	9378878	0,206	
Let 5 Fort R1	2266510	9669994	0,234	0,213
Let 5 Fort R2	2160133	9430611	0,229	
Let 5 Fort R3	1865667	9046276	0,206	
Let 5 Fort R4	2146957	9768234	0,220	
Let 5 Fort R5	2200837	9871171	0,223	
Let 5 Fort R6	2057549	10726507	0,192	
Let 5 Fort R7	2063933	9994127	0,207	
Let 5 Fort R8	2137706	10343181	0,207	
Let 5 Fort R9	2264419	10143099	0,223	
Let 5 Fort R10	1941391	10224186	0,190	

Considerando o valor de 0,213 o 100%, o valor de 0,200 representa 95% de recuperação da extração do carbinol.

5.5.4.5. Controle em 2,5 ng/mL

Tabela 33: Valores das áreas do carbinol e da metiltestosterona e a razão entre elas no rendimento de extração (2,5 ng/mL).

Rendimento de extração 2,5 ng/mL				
	A Analito	A Metiltestosterona	Razão A analito/ A P.I.	Média
Let 2,5 Extr R1	1675260	14866037	0,113	0,094
Let 2,5 Extr R2	1369114	14735721	0,093	
Let 2,5 Extr R3	1558650	14811396	0,105	
Let 2,5 Extr R4	1375173	14352785	0,096	
Let 2,5 Extr R5	1142267	15223019	0,075	
Let 2,5 Extr R6	1314489	15306249	0,086	
Let 2,5 Extr R7	1642613	166322417	0,010	
Let 2,5 Extr R8	1578012	14897354	0,106	
Let 2,5 Extr R9	1422327	15900995	0,089	
Let 2,5 Extr R10	1613414	14675919	0,110	
Let 2,5 Fort R1	2208135	14586907	0,151	0,098
Let 2,5 Fort R2	1289652	14135956	0,091	
Let 2,5 Fort R3	1614733	14189485	0,114	
Let 2,5 Fort R4	2979227	27217837	0,109	
Let 2,5 Fort R5	1710006	16686698	0,102	
Let 2,5 Fort R6	1117739	12491353	0,089	
Let 2,5 Fort R7	1375738	15106795	0,091	
Let 2,5 Fort R8	6199003	41299467	0,150	
Let 2,5 Fort R9	1290783	13671200	0,094	
Let 2,5 Fort R10	1090687	14404941	0,076	

Considerando o valor de 0,098 o 100%, o valor de 0,094 representa 90% de recuperação da extração do carbinol.

Na maioria dos casos, a dispersão dos resultados aumenta com a diminuição da concentração e a recuperação pode ser diferente frente a altas e baixas concentrações. Por isso, foi feita a análise do rendimento de extração em diferentes concentrações. Todas as concentrações avaliadas obtiveram rendimentos satisfatórios.

5.6. CINÉTICA DE HIDRÓLISE

O procedimento descrito no item 4.6 foi realizado em 7 alíquotas de uma mesma urina positiva de letrozol (excretada), variando os tempos de hidrólise. O mesmo procedimento foi realizado em outra alíquota, porém sem adição da enzima e, portanto, sem hidrólise. Na tabela a seguir, encontram-se as razões da área do analito carbinol/área do padrão interno metiltestosterona. Esses mesmos valores também estão apresentados no gráfico da Figura 44.

Tabela 34: Razão da área do Carbinol / área da Metiltestosterona para diferentes tempos de hidrólise.

Código	Tempo de Hidrólise (min)	Área Carbinol	Área Metiltestosterona	Razão
Let sem enzima	0	108781	8976132	0,01
Let 0	0	137635517	9378522	14,68
Let 5	5	134251984	8284872	16,20
Let 15	15	138023813	8405361	16,42
Let 30	30	137175159	8557761	16,03
Let 45	45	138018035	8098878	17,04
Let 60	60	134593724	9255474	14,54
Let 120	120	146510316	9493012	15,43

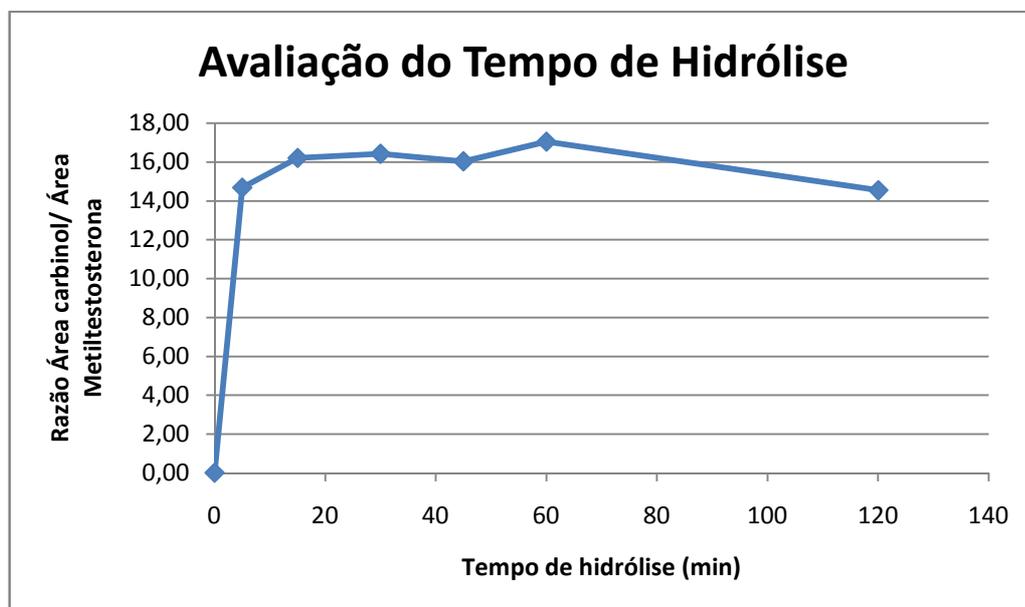


Figura 44: Razão da área do Carbinol / área da Metiltestosterona em diferentes tempos de hidrólise.

Primeiramente, pode-se observar que sem adição da enzima e, portanto, sem hidrólise não é possível identificar a presença do carbinol. Isso pode ser atribuído devido ao fato desse analito ser eliminado na forma glicuconjugada. Com o grupamento glicuronídeo, a molécula carbinol é mais polar do que a forma livre e na extração líquido-líquido ao invés de ser extraída pela fase orgânica, ela permanece na fase aquosa.

Analisando as amostras que sofreram hidrólise é possível observar que apenas 20 minutos de hidrólise são suficientes para completar a reação. Desta forma, essa análise pode se tornar mais rápida diminuindo o tempo de hidrólise de 1 hora para 20 minutos.

6 CONCLUSÕES

O metabólito carbinol foi identificado nas urinas dos estudos de excreção dos cinco voluntários e foi possível verificar que após a ingestão de uma dose de Femara, esse analito continuou sendo identificado, em concentração muito menor que o limite mínimo de desempenho requerido pela AMA, até 14 - 27 dias dependendo do voluntário.

Foi observado também que uma dose de Femara provoca aumentos nos níveis dos seis endógenos monitorados (testosterona, epitestosterona, androsterona, eticolanolona, 5 α -diol e 5 β -diol), mas esses aumentos variam muito em cada voluntário. Nenhuma das urinas testadas apresentou concentração corrigida pela densidade de testosterona, epitestosterona, androsterona e eticolanolona acima do limite estipulado pela AMA que sugere perfil endógeno atípico, nem razão T/E superior a 4.

A avaliação feita do método de extração com diferentes solventes e com o uso ou não de NaCl para promover o *salting out*, utilizando planejamento de experimentos, não apresentou diferenças significativas no rendimento de extração demonstrando uma boa robustez do método. Desta forma, preferiu-se manter o uso no MTBE para essa análise e não usar o NaCl.

Com relação a avaliação do tempo de hidrólise, foi observado que 20 minutos de reação de hidrólise são suficientes para a total desconjugação do metabólito carbinol.

Por fim, pode-se concluir, com as figuras de mérito de validação qualitativa avaliadas, que o método de análise é seletivo, reprodutível e com rendimentos de extração satisfatórios numa ampla faixa de concentração.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, V. L.; LEITÃO, A.; REINA, L. C.B.; MONTANARI, C. A.; DONNICI, C. L.; Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. Química Nova, v. 28, n. 1, p. 118-129, 2005.

ALVES, L. F. J; Desenvolvimento e Validação de método Analítico Quantitativo de Perfil Esteroidal Endógeno em Urina Humana. Dissertação em Química, UFRJ, 2012.

AMA - TD2014EAAS; Endogenous Anabolic Androgenic Steroids Measurement and Reporting. Disponível em:

https://wada-main-prod.s3.amazonaws.com/resources/files/wada-td2014eaas-v2-endogenous-anabolic-androgenic-steroids-measurement-and-reporting-en_0.pdf

Acesso em 28 de junho de 2015.

AMA - TD2014MRPL; Minimum-Required-Performance-Levels. Disponível em:

<https://wada-main-prod.s3.amazonaws.com/resources/files/WADA-TD2014MRPL-v1-Minimum-Required-Performance-Levels-EN.pdf>

Acesso em 01 de junho de 2015.

AMA - ADAMS; 2013 Anti-Doping Testing Figures Samples Analysed and Reported by Accredited Laboratories in ADAMS; Disponível em:

<https://wada-main-prod.s3.amazonaws.com/resources/files/WADA-2013-Anti-Doping-Testing-Figures-LABORATORY-REPORT.pdf>

Acesso em 23 de junho de 2015.

AMA - Prohibited list; The 2015 prohibited list- International Standard. Disponível em:

<https://wada-main-prod.s3.amazonaws.com/resources/files/wada-2015-prohibited-list-en.pdf>

Acesso em 01 de junho de 2015.

ANNAPURNA, M. M.; MOHAPATRO, C.; NARENDRA, A.; Stability-indicating liquid chromatographic method for the determination of Letrozole in pharmaceutical formulations. Journal of Pharmaceutical Analysis, v. 2,n. 4, p. 298–305, 2012.

AQUINO NETO, F. R.; NUNES, D. S. S.; Cromatografia: Princípios Básicos e Técnicas Afins. Editora Interciência, 2003.

AQUINO NETO, F. R.; Uma Abordagem Simples e Abrangente para Dominar as Variáveis que Afetam a Injeção em Cromatografia Gasosa de Alta Resolução. *Scientia Chromatographica*, v. 2, n. 4, p. 51-67, 2010.

BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M.; Química Medicinal: As Bases Moleculares da Ação dos Fármacos, Editora Artmed, Edição 1, 2001.

BARREIRO, E. J.; SILVA, J. F. M.; FRAGA, C. A. M.; Noções Básicas do Metabolismo de Fármacos, *Química Nova*, v. 19, n. 6, 1996.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E.; Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria. Editora ARTMED, Edição 4, 2010.

BERNARDI A.; ZAMAGNI C.; DI FABIO F.; Randomized comparative study on estrogen suppression induced by 3 different aromatase inhibitors in postmenopausal patients with advanced breast cancer. Presented at: the American Society of Clinical Oncology 38th Annual Meeting; May 18-21, 2002; Orlando, Florida. Abstract 217.

BORRÀS, S.; KAUFMANN, A.; COMPANYÓ, R.; Correlation of precursor and product ion in single-stage high resolution mass spectrometry. A tool for detecting diagnostic ions and improving the precursor elemental composition elucidation. *Analytica Chimica Acta*, v.772, p. 47-58, 2013.

BREITKREITZ, M. C.; SOUZA, A. M.; POPPI, R. J.; Experimento didático de Quimiometria para Planejamento de Experimentos: Avaliação das Condições Experimentais na Determinação Espectrofotométrica de Ferro II como o-Fenantrolina. Um tutorial, Parte III. *Química Nova*, v. 37, n. 3, p. 564-573, 2014.

BRODIE, A. M. H.; NJAR, V. C. O.; Aromatase inhibitors and their application in breast cancer treatment. *Steroids*, v. 65, p. 171–179, 2000.

CALADO, V.; MONTGOMERY, D.; Planejamento de Experimentos usando Statistica. Editora E-Papers, 2003.

CASSOL, L. B.; GARICOCHEA, B.; Uso de inibidores da aromatase no tratamento do câncer de mama e osteoporose. *Scientia Medica*, Porto Alegre: PUCRS, v. 15, n. 4, p. 279-286, 2005.

CAVALCANTI, G. A.; Aplicação da espectrometria de massas na investigação do metabolismo dos esteróides. Tese de Doutorado, UFRJ, 2012.

CHIARADIA, M. C.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; O Estado da Arte da Cromatografia Associada à Espectrometria de Massas Acoplada à Espectrometria de Massas na Análise de Compostos Tóxicos em Alimentos. *Química Nova*, v. 31, n. 3, p. 623-636, 2008.

CHUMSRI, S.; HOWESB, T.; BAOA, T.; SABNISC, G.; BRODIEC, A.; Review: Aromatase, aromatase inhibitors, and breast cancer. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*, v. 125, p. 13–22, 2011.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P. S.; Fundamentos de Cromatografia. Editora da UNICAMP, Edição 1, 2006.

CUNHA, T. S.; CUNHA, N. S.; MOURA, M. J. C. S.; MARCONDES, F. K.; Esteróides anabólicos androgênicos e sua relação com a prática desportiva. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 40, n. 2, 2004.

DIXON JM; RENSHAW, L.; LANGRIDGE,C.; YOUNG O. E.; MCHUGH,, M.; WILLIAMS, L.; MURRAY, J.; MACASKILL, E. J.; MCCAIG, F.; DIXON, O. M.; Anastrozole and letrozole an investigation and comparison of quality of life, tolerability and morbidity. *Breast Cancer Res Treat* 2006; 100 (suppl 1):s24 (Abstract 105).

DONIKE, M.; RAUTH, S.; WOLANSKY, A.; Reference ranges of urinary endogenous steroids determined by GC-MS. *Proceedings of the 10th Cologne Workshop on Dope Analysis*, Köln: Sport und Buch Strauß; 69-86. 1993

EENOO, P. V.; GANSBEKE, W. V.; BRABANTER, N.; DEVENTER, K.; DELBEKE, F. T.; A fast, comprehensive screening method for doping agents in urine by gas chromatography–triple quadrupole mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, v. 1218, p. 3306–3316, 2011.

FLEMING, F. F.; YAO, L.; RAVIKUMAR, P. C.; FUNK, L.; SHOOK, B. C.; Nitrile-Containing Pharmaceuticals: Efficacious Roles of the Nitrile Pharmacophore; *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 53 n. 22, p. 7902–7917, 2010.

FLORES, J. R.; SALCEDO, A. M. C.; LLERENA, M. J. V.; FERNÁNDEZ, L. M.; Micellar electrokinetic chromatographic method for the determination of letrozole, citalopram and their metabolites in human urine. *Journal of Chromatography A*, v. 1185, p. 281–290, 2008.

GEISLER J.; EKSE D.; HELLE H.; Letrozole suppresses tissue and plasma estradiol, estrone and estrone sulfate more effectively compared to anastrozole. *Breast Cancer Res Treat* 2006; 100(suppl 1): s23-4 (Abstract 103).

GERACE, E.; SALOMONE, A.; ABBADESSA, G.; RACCA, S.; VINCENTI, M.; Rapid determination of anti-estrogens by gas chromatography/mass spectrometry in urine: Method validation and application to real samples. *Journal of Pharmaceutical Analysis*; v. 2, n.1, p.1–11, 2012.

GEYER, H.; MARECK-ENGELKE, U.; SCHANZER, W.; DONIKE, M.; The Cologne protocol to follow up high testosterone/epitestosterone ratios. *Recent advances in doping analysis*, v. 4 p. 107-125, 1997.

GOMES, H.; MEREDITH, W.; SNAPE, C. E.; SEPHTON, M. A.; Analysis of conjugates steroid androgens: Deconjugation, derivatisation and associated issues. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 49, n. 5, p. 1133-1140, 2009.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E.; Reproductive and hormonal functions of the male. *Textbook of medical Physiology*. Elsevier, v. 80, p. 996-1010, 2006.

HARDEN, C.; MACLUSKY, N.J.; Aromatase inhibition, testosterone, and seizures. *Epilepsy Behavior*. v. 5, p. 260–263, 2004.

HAYNES, B. P.; DOWSETT, M.; MILLER, W. R.; DIXON, J. M.; BHATNAGAR, A.S.; Mini review: The pharmacology of letrozole. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*, v. 87, p. 35–45, 2003.

HAYNES JR. R. C.; MURAD F.; Hormônios adrenocorticotrópicos; Esteróides adrenocorticais e seus análogos sintéticos; inibidores da biossíntese adrenocortical de esteróides. In: Goodman LS, Gilman AG, editors. *As bases farmacológicas da terapêutica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 943-55, 1987.

HEROLD, C. I; BLACKWELL, K. L.; Aromatase Inhibitors for Breast Cancer: Proven Efficacy Across the Spectrum of Disease. *Clinical Breast Cancer*, v. 8, n. 1, p.50-64, 2008.

HERZOG, A.G.; KLEIN, P.; JACOBS, A.R.; Testosterone versus testosterone and testolactone in treating reproductive and sexual dysfunction in men with epilepsy and hypogonadism. *Neurology* v. 50, p. 782–784, 1998.

HISCOX, S.; DAVIESB, E. L.; LEEC, P. B.; Review: Aromatase inhibitors in breast cancer. *Maturitas*, v. 63, p. 275–279, 2009.

INCA (Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva), 2014. Disponível em: http://www1.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=322. Acesso em 07 de abril de 2014.

INCA (Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva), 2015. Disponível em: http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/acoes_programas/site/home/nobrasil/programa_controle_cancer_mama/conceito_magnitude. Acesso em 22 de junho de 2015.

INCA (Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva), ATLAS DA MORTALIDADE, 2013. Disponível em: <http://mortalidade.inca.gov.br/Mortalidade/>. Acesso em 01 de outubro de 2013.

JOSHI, C.; VISHNUBHATLA, S.; CHAKKIRALA, S.; MANNAM, S.; Validation and Application of a High Performance Liquid Chromatography - Tandem Mass Spectrometry Assay for Letrozole in Human Plasma. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, v. 4, n. 2, 2011.

KITTERINGHAM, N. R.; JENKINS, R. E.; LANE, C. S.; ELLIOTT, V. L.; PARK, B. K.; Review: Multiple reaction monitoring for quantitative biomarker analysis in proteomic and metabolomics. *Journal of Chromatography B*, n. 877, p. 1229-1239, 2009.

KOLMONEN, M.; LEINONEN, A.; PELANDER, A.; OJANPERÄ, I.; A general screening method for doping agents in human urine by solid phase extraction and liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, v. 585, p. 94–102, 2007.

LANÇAS, F. M.; *Cromatografia em Fase Gasosa*. Suprema Gráfica e Editora, Edição 1, 1993.

LANÇAS, F. M.; *Cromatografia Líquida moderna: HPLC/CLAE*. Editora Átomo, Edição 1, 2009.

LBCD, Método 5.423/2015v.1. Análise de Agentes Dopantes por CG-QqQ (Compostos Exógenos) - Triagem IVQ.

LBCD, 2011 - Protocolo de Validação de Métodos de Análise Qualitativa do LBCD.

LEHNINGER. *Hormônios: Estruturas Diferentes para Funções Diferentes*. Princípios de Bioquímica. Editora Sarvier, 4ed. São Paulo, 2006.

MARECK, U.; SIGMUND, G.; OPFERMANN, G.; GEYER, H.; THEVIS, M.; SCHANZER, W.; Identification of the aromatase inhibitor letrozole in urine by gas chromatography/mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, v. 19, p. 3689–3693, 2005.

MARQUES, M. A. S.; BIZARRI, C. H. B.; CARDOSO, J. N.; AQUINO NETO, F. R.; Effect of finasteride on the urinary steroid profile: a case study. *Proceedings of the 17th Cologne Workshop on Dope Analysis*. Köln: Sport und Buch Strauß, 317-22, 1999.

MARQUES, A. S.; PEREIRA, H. M. G.; AQUINO NETO, F. R.; Controle de dopagem de anabolizantes: o perfil esteroidal e suas regulações. *Revista Brasileira de Medicina do Esporte*, v. 9, n.1, p. 15-24, 2003.

MARTINI, L.; Androgen metabolism in the brain. *Neuroendocrinology. Letters*, v. 14, p. 315–318, 1992.

MARTINS, C. A.; GUIMARÃES, R. M.; SILVA, R. L. P. D.; FERREIRA, A. P. S.; GOMES, F. L.; SAMPAIO, J. R. C.; SOUZA, M. D. S.; SOUZA, T. S.; SILVA, M. F. R.; Evolução da Mortalidade por Câncer de Mama em Mulheres Jovens: Desafios para uma Política de Atenção Oncológica. *Revista Brasileira de Cancerologia*, v. 59, n.3, p. 341-349, 2013.

MILLER, W. R.; LARIONOV, A.; RENSHAW, L.; ANDERSON, T. J.; WHITE, S.; HAMPTON, G.; WALKER, J. R.; HO, S.; KRAUSE, A.; EVANS, D. B.; DIXON, M.; Aromatase Inhibitors - Gene Discovery. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*, v. 106, p. 130–142, 2007.

MINISTÉRIO DA SAÚDE; Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Informática do SUS (Datasus). Sistema de Informações sobre Mortalidade - SIM. Disponível em: <http://www2.datasus.gov.br/DATASUS/index.php?area=0205> . Acesso em: 01 de outubro de 2013.

MUSENGA, A.; COWAN, D. A.; Use of ultra-high pressure liquid chromatography coupled to high resolution mass spectrometry for fast screening in high throughput doping control. *Journal of Chromatography A*, v. 1288, p. 82– 95, 2013.

NOVARTIS - Bula do Femara, Letrozol; Disponível em: <http://www.portal.novartis.com.br/UPLOAD/ImgConteudos/1796.pdf> . Acesso em 01 de junho de 2015.

ONCOGUIA, Instituto de Oncoguia. Disponível em: <http://www.oncoguia.org.br/conteudo/principais-dados-estatisticos-sobre-o-cancer-de-mama/6562/34/>. Acesso em 28 de junho de 2015.

PADILHA, M. C.; Cromatografia Gasosa de Alta Resolução Acoplada a Eséctrometria de Massas Aplicada ao Estudo de Agentes Anabólicos e Candidatos a Fármacos Moduladores de Receptores Dopaminérgicos em Fluidos Biológicos. Tese de Doutorado, UFRJ, 2007.

PARR, M. K.; SCHÄNZER, W.; Detection of the misuse of steroids in doping control. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*, v. 121, p. 528–537, 2010.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S.; VYVYAN, J. R.; Introdução à Espectroscopia. Editora Cengage Learning, Edição 4, 2010.

PEREIRA, D. G.; Importância do Metabolismo no Planejamento de Fármacos. *Química Nova*, v. 30, n. 1, p.171-177, 2007.

PEREIRA, A. S.; AQUINO NETO, F. R.; Estado da arte da Cromatografia Gasosa de Alta Resolução e Alta temperatura, *Química nova*, v. 23, n. 3, 2000.

PFISTER, C.U.; MARTONI, A.; ZAMAGNI, C.; LELLI, G.; BRAUD, F. D.; SOUPPART, C.; DUVAL, M.; HORNBERGER, U.; Effect of age and single versus multiple dose pharmacokinetics of letrozole (Femara) in breast cancer patients. *Biopharm. Drug. Dispos*, v. 22, p. 191–197, 2001.

PRECHT, J. C.; GANCHEV, B.; HEINKELE, G.; BRAUCH, H.; SCHWAB, M.; MÜRDTER, T. E.; Simultaneous quantitative analysis of letrozole, its carbinol metabolite, and carbinol glucuronide in human plasma by LC-MS/MS. *Anal Bioanal Chem*, v. 403, p. 301–308, 2012.

REDDY, D.S.; Testosterone modulation of seizure susceptibility is mediated by neurosteroids 17b-estradiol and 3a-androstanediol. *Neuroscience*, v. 129, p.195–207, 2004.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C.; Validação em métodos Cromatográficos e Eletroforéticos. *Química Nova*, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

RODRÍGUEZ, J.; CASTAÑEDA, G.; MUÑOZ, L.; Rapid determination of letrozole, citalopram and their metabolites by high performance liquid chromatography-fluorescence detection in urine: Method validation and application to real samples. *Journal of Chromatography B*, 913– 914, p. 12– 18, 2013.

SAAD, E. D.; BROMBERG, S.; KATZ, A.; SIMON, S. D.; Inibidores da aromatase no câncer de mama: da doença metastática ao tratamento adjuvante. *Revista Brasileira de Cancerologia*, v. 48, n. 4, p. 555-567, 2002.

SANTEN, R. J.; Inhibition of aromatase: insights from recent studies. *Steroids*, v.68, p. 559-567, 2003.

SANTEN, R. J., DEMERS, L.; OHORODNIK, S.; SETTLAGE, J.; LANGECKER, P.; BLANCHETT, D.; GOSS, P. E.; WANG, S.; Superiority of gas chromatography/tandem mass spectrometry assay (GC/MS/MS) for estradiol for monitoring of aromatase inhibitor therapy. *Steroids*, n. 72, p. 666-671, 2007.

SHARMA, P.; KUMAR, P.; SHARMA, R.; DIKSHIT, D. K.; Selective estrogen receptor modulators; role of side chain in activity modulation. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, v.7, n. 5, p. 272-274, 2014.

SILVA, P. R. P.; DANIELSKI, R.; CZEPIELEWSKI, M. A.; Esteróides anabolizantes no esporte. *Revista Brasileira Medicina no Esporte*, v. 8, n. 6, p.235-243, 2002.

TAO, X.; PIAO, H.; CANNEY, D. J.; BORENSTEIN, M. R.; NNANE, I. P.; Biotransformation of letrozole in rat liver microsomes: Effects of gender and tamoxifen. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 43, p. 1078- 1085, 2007.

THUYNE, W. V.; EENOO, P. V.; DELBEKE, F.T.; Comprehensive screening method for the qualitative detection of narcotics and stimulants using single step derivatisation. *Journal of Chromatography B*, v. 857, p. 259–265, 2007.

THUYNE, W. V.; EENOO, P. V.; DELBEKE, F.T.; Implementation of gas chromatography combined with simultaneously selected ion monitoring and full scan mass spectrometry in doping analysis. *Journal of Chromatography A*, v. 1210, p. 193–202, 2008.

VAN DE KERKOHOF, D. H.; Steroid Profiling in Doping Analysis. Proefschrift (Doctoraat in de Farmacie), Universiteit Utrecht, Nederlands, Faculteit Farmacie, 2001.

VENTURELLI, E.; CAVALLERI, A.; SECRETO, G. Methods for urinary testosterone analysis. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, v.671, n. 1-2, p. 363-380, 1995.

ZHI, W.; WANG, M.; SHE, J. X.; Selected reaction monitoring (SRM) mass spectrometry without isotope labeling can be used for rapid protein quantification. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, n.25, p. 1583-1588, 2011.

8 ANEXOS

8.1. VALORES DAS ÁREAS DO ESTUDO DE EXCREÇÃO DO VOLUNTÁRIO A:

Úrina	Tempo de ingestão (h)	Voluntário A																		
		Áreas																		
		Carbinoil	Metiltestosterona	Carbinoil/ Metiltestosterona	Testosterona	Testosterona-D3	Testosterona/ Testosterona-D3	Epitesterona	Epitesterona-D3	Epitesterona/ Epitesterona-D3	Androsterona	Etiocolanona	Etiocolanona-D5	Androsterona/ Etiocolanona-D5	Etiocolanona/ Etiocolanona-D5	Salfa-diol	5beta-diol	Salfa-diol-D3	Salfa-diol/ Salfa-diol-D3	5beta-diol/ Salfa-diol-D3
Let Vol 0 (BU)	0	0	70281571	0	2275899	5138772	0.443	2156986	1039656	2.075	75332320	36479437	23083064	3.264	1.580	1249424	7161936	590042	2.454	14.069
Let Vol A 1	0,5	1580	62899356	0.000	2518893	4473954	0.563	2648007	961542	2.754	80765119	43658277	19381693	4.167	2.253	1468751	7062674	434766	3.378	17.487
Let Vol A 2	5,5	47724593	57111520	8.356	3652164	4686602	0.779	3361323	881862	3.812	102781101	51178277	19099445	5.381	2.680	1718824	9144738	465254	3.694	19.655
Let Vol A 3	11	287197981	58036210	4.949	2092094	4345091	0.481	1812521	927662	1.954	61679441	30170994	18142499	3.400	1.663	1050328	6277130	442534	2.373	14.185
Let Vol A 4	18	156870879	66054204	2.375	1596583	4408080	0.363	1632036	856617	1.905	45150948	25139905	19020759	2.374	1.322	854795	4952721	453237	1.886	10.927
Let Vol A 5	24	236018340	65190967	3.620	3695830	4673650	0.791	4154918	999631	4.156	94154632	45771594	20529218	4.588	2.230	1639546	8533907	468330	3.501	18.222
Let Vol A 6	34	149563338	65312621	2.287	3100156	4611992	0.672	2878042	999626	2.879	76422774	36199573	19142428	3.992	1.891	1186102	6867053	477735	2.483	14.374
Let Vol A 7	44	99207186	61167740	1.477	2191470	4509254	0.486	2379624	930214	2.558	55139965	27222497	19862278	2.776	1.371	936795	5734595	460280	2.035	12.459
Let Vol A 8	47,5	122822227	70856066	1.733	2823936	4653359	0.607	3735985	990084	3.773	76895848	42378462	19923174	3.860	2.127	1598307	8159347	472627	3.382	17.264
Let Vol A 9	52	136381794	61776152	2.208	3833545	4332982	0.885	5176230	995370	5.200	114279320	69278032	18395364	6.212	3.766	2084414	12116847	453966	4.592	26.691
Let Vol A 10	56	60504805	59048172	1.025	3487654	4364888	0.799	3885909	933447	4.163	93526432	47108355	18160482	5.150	2.594	1677455	9725190	477426	3.514	20.427
Let Vol A 11	62	38508700	67326484	0.572	3076989	4363968	0.705	2807078	988933	2.838	73953363	37817410	19075035	3.877	1.983	1318797	8306877	449567	2.933	14.878
Let Vol A 12	65	46431339	64186982	0.723	4701390	4594093	1.023	3301809	975984	3.383	92471854	45180073	20547932	4.500	2.199	1831020	11144885	446313	4.103	24.971
Let Vol A 13	71	47291269	64711798	0.731	5961416	4825309	1.235	4628302	1123392	4.120	108667368	52760395	21470607	5.061	2.457	1989319	12264798	469206	4.240	26.139
Let Vol A 14	95	40099965	71947148	0.557	5968017	5035495	1.185	4694097	1091488	4.301	117216394	78732211	20903075	5.608	3.767	2676317	15420481	475805	5.625	32.409
Let Vol A 15	120	20989243	69508694	0.302	5356114	4986106	1.074	3948255	1044881	3.779	116617272	62642941	21441454	5.439	2.922	2409904	13144837	464984	5.182	28.269
Let Vol A 16	143	31593340	66453027	0.475	9192746	5301007	1.734	7736455	1157766	6.700	222079401	120700029	21244908	10.453	5.681	4423176	21965778	500390	8.839	43.777
Let Vol A 17	167	19803356	65928234	0.300	5127447	4965483	1.033	4181598	1095246	3.818	147251178	81327040	21267150	6.924	3.824	3112381	13356306	465784	6.682	28.675
Let Vol A 18	190	4737658	68361484	0.069	2691791	4662167	0.577	2089964	951665	2.175	58401891	28763190	20631540	2.831	1.394	1028680	8817967	471623	2.181	12.336
Let Vol A 19	215	9381675	64990470	0.144	6440421	4578103	1.407	5136586	997588	5.149	148866321	77009867	19724769	7.396	3.904	3101655	13061509	437634	7.087	29.846
Let Vol A 20	336	524842	62579859	0.008	3112996	4331727	0.719	2639292	887591	2.974	82834507	44897614	18291304	4.529	2.455	1938605	9277765	417483	4.644	22.223
Let Vol A 21	456	40797	65965148	0.001	3008385	4760417	0.632	2136133	933623	2.288	70952694	36999949	19432932	3.651	1.904	1198233	6097610	412382	2.906	14.786
Let Vol A 22	578	3664	67956127	0.000	2969179	4673859	0.635	2895366	971844	2.979	86240497	42683546	20134034	4.283	2.120	1728723	8711185	460741	3.752	18.907
Let Vol A 23	697	1203	60891328	0.000	4038810	4385576	0.921	3800410	1028232	3.696	114946065	58032066	19295762	5.957	3.008	2264101	12001855	432237	5.238	27.767

8.2. VALORES DAS ÁREAS DO ESTUDO DE EXCREÇÃO DO VOLUNTÁRIO B:

Úrina	Tempo de ingestão (h)	Voluntário B																		
		Áreas																		
		Carbinoil	Metiltestosterona	Carbinoil/ Metiltestosterona	Testosterona	Testosterona-D3	Testosterona/ Testosterona-D3	Epitesterona	Epitesterona-D3	Epitesterona/ Epitesterona-D3	Androsterona	Etiocolanona	Etiocolanona-D5	Androsterona/ Etiocolanona-D5	Etiocolanona/ Etiocolanona-D5	Salfa-diol	5beta-diol	Salfa-diol-D3	Salfa-diol/ Salfa-diol-D3	5beta-diol/ Salfa-diol-D3
Let Vol B 0 (BU)	0	0	61987196	0.000	5497085	4729217	1.162	5645689	1089732	5.181	177235204	207853197	19472387	9.102	10.674	2338589	12806826	419987	5.568	30.493
Let Vol B 1	0,5	1441	66295483	0.000	4889656	5189405	0.942	3466323	1029798	3.366	114440983	99152224	20578751	5.561	4.818	1288266	4573734	476797	2.702	9.949
Let Vol B 2	4	125827372	69780240	1.803	2928683	5054223	0.579	2826769	973909	2.944	84919545	71037777	20087684	4.227	3.536	900864	3470710	447886	2.011	7.749
Let Vol B 3	9	91696090	64156947	1.429	2081332	4277343	0.487	1995073	875493	2.279	77218087	53032495	19131261	4.036	2.772	724963	2410180	423035	1.714	5.697
Let Vol B 4	11	50354731	67540161	0.746	1573779	4388477	0.359	1470955	870917	1.689	57806542	35447051	19824510	2.916	1.788	565240	1712782	434397	1.301	3.943
Let Vol B 5	12	49720639	64774302	0.768	1327315	4263837	0.311	1225960	803811	1.525	48956967	34294231	19443837	2.518	1.764	519361	1702115	428795	1.211	3.970
Let Vol B 6	13	31195693	70582951	0.442	961948	4433206	0.217	820240	830057	0.988	34105354	22948383	20901718	1.632	1.098	353533	1096320	481504	0.734	2.277
Let Vol B 7	22	68041338	70169868	0.970	3212606	4649241	0.691	2862751	955947	2.995	71773876	54083017	19687232	3.646	2.747	920930	3095861	431138	2.136	7.181
Let Vol B 8	29,5	142179767	66307415	2.144	5947587	5014885	1.186	6624746	1167275	5.675	159427848	143414386	20457226	7.793	7.010	1895858	6921417	448285	4.229	15.440
Let Vol B 9	32	97214511	70199320	1.385	3679510	4695705	0.784	4675341	1024285	4.564	121497416	101613812	20276072	5.992	5.012	1450987	5114675	449169	3.230	11.387
Let Vol B 10	37	80296505	65268201	1.230	4206048	4695153	0.896	4558771	965136	4.723	114093248	89244963	20136073	5.666	4.432	1323837	4867851	462720	2.861	10.520
Let Vol B 11	49	161152690	64394787	2.503	9209981	4976160	1.851	8842578	1167930	7.571	201843031	173058981	19425173	10.391	8.909	2772154	10804321	442325	6.267	24.426
Let Vol B 12	53	87064028	46410854	1.876	5924257	3466540	1.709	6814882	852162	7.997	144605334	135936308	14299984	10.119	9.512	1746463	7695458	330698	5.281	23.270
Let Vol B 13	58	122459433	65050372	1.883	9332281	4810357	1.901	9973297	1823857	8.432	23292375	199703724	19740723	10.116	10.116	2983328	11942721	434106	6.872	27.511
Let Vol B 14	63	79975376	83473585	1.368	7075003	4457666	1.587	6455561	1017795	6.343	155206159	17803217	18333278	8.466	7.517	1857560	7743313	436153	4.259	17.544
Let Vol B 15	73	95020576	61699600	1.542	9688258	4949688	1.257	9470409	1136631	8.332	180783252	183209394	19759006	9.153	9.276	2513304	10580415	424108	5.926	24.947
Let Vol B 16	96	77860472	60712302	1.282	10797829	4779357	1.959	8740891	1213855	7.201	188609310	169979438	19708401	9.570	8.625	2766899	10755006	425823	6.498	25.257
Let Vol B 17	123	20186609	67363925	0.300	6818866	4640201	1.470	5409209	1049720	5.232	119121475	94521034	19259609	6.185	4.908	1771226	5885032	442577	4.002	13.297
Let Vol B 18	145	24825169	6826487	0.395	9903023	4742434	0.691	2882751	771772	2.985	71773876	54083017	19687232	3.646	2.747	920930	3095861	431138	2.136	7.181
Let Vol B 19	169	26622849	61350454	0.434	12745284	4959149	2.570	9994280												

8.3.VALORES DAS ÁREAS DO ESTUDO DE EXCREÇÃO DO VOLUNTÁRIO C:

Voluntário C																				
Úrina	Tempo de ingestão (h)	Áreas																		
		Carbinol	Metiltestosterona	Carbinol/ Metiltestosterona	Testosterona	Testosterona-D3	Testosterona/ Testosterona-D3	Epitesterona	Epitesterona-D3	Epitesterona/ Epitesterona-D3	Androsterona	Etiocolanona	Etiocolanona-D5	Androsterona/ Etiocolanona-D5	Etiocolanona/ Etiocolanona-D5	Salfa-diol	βeta-diol	Salfa-diol-D3	Salfa-diol/ Salfa-diol-D3	βeta-diol/ Salfa-diol-D3
Let Vol C 0 (BU)	0	5941434	0,000	180081	3999673	0,045	4384594	953013	4,601	75519254	78739220	18780419	4,021	4,193	913698	2175027	394524	2,316	5,513	
Let Vol C 1	1	48674235	64893848	0,750	70063	3928749	0,018	1889519	820577	2,303	30737551	50110692	18649455	1,648	2,687	394161	1176049	452262	0,872	2,600
Let Vol C 2	3,5	69388003	63722409	1,089	46794	3836400	0,012	867271	797936	1,087	14747856	2264276	17837457	0,827	1,269	169549	467604	405225	0,418	1,176
Let Vol C 3	4	39724232	61805483	0,643	30460	3614434	0,008	529063	676679	0,782	10157468	12843766	16906444	0,601	0,760	119229	314887	431481	0,276	0,730
Let Vol C 4	5,5	111465600	59236255	1,882	54721	3641918	0,015	1657100	798502	2,075	30420421	37019396	17482404	1,740	2,118	365160	958873	407552	0,896	2,353
Let Vol C 5	7,5	109034446	61513546	1,773	56333	3775512	0,015	1638045	855303	1,915	29719539	41288133	17512003	1,697	2,358	306991	862321	393691	0,780	2,190
Let Vol C 6	9,5	131150378	61851647	2,120	76481	3854951	0,020	2344898	832381	2,817	40483821	57208697	18508265	1,287	3,091	413631	1290312	402817	1,027	3,203
Let Vol C 7	11	65700254	59267510	1,109	49693	3703894	0,013	1168259	727450	1,606	20738363	27985807	16855713	1,230	1,660	227991	680364	386544	0,590	1,783
Let Vol C 8	16	156429808	56292933	2,779	114546	3659392	0,031	4006582	869282	4,609	55436074	78179082	17594013	3,151	4,444	668664	2087240	389164	1,718	5,363
Let Vol C 9	24	157463269	58736436	2,775	161862	3729619	0,043	4898755	963230	5,084	55880419	80079556	17379349	3,215	4,608	859102	2334596	424403	2,024	5,501
Let Vol C 10	26	143578777	59315467	2,421	144910	3787289	0,038	4847065	901584	5,376	69025750	105145233	18090850	3,816	5,812	885166	2495429	398238	2,223	6,266
Let Vol C 11	28,5	84798517	61985279	1,368	98648	4092505	0,024	3037754	870789	3,489	41818136	59969521	17560293	2,382	3,187	497616	1382619	411416	1,210	3,361
Let Vol C 12	32	114962199	58676697	1,959	119199	3857964	0,031	4441056	975980	4,550	65434719	81857302	17960685	3,643	4,558	770186	1843895	421531	1,827	4,374
Let Vol C 13	35	90181649	57239179	1,576	169641	4046611	0,021	9021862	1046648	5,396	10162609	101173959	18335962	4,419	5,518	741872	2166259	416241	1,782	5,204
Let Vol C 14	39	55704886	56941474	0,978	140329	4000073	0,035	4295165	859761	4,996	63941928	84055719	17931982	3,566	4,687	648463	1974599	429443	1,522	4,636
Let Vol C 15	41,5	54126191	61171687	0,885	139477	4063995	0,034	3482583	79650197	4,064	54459423	79650197	18054888	3,016	4,412	651233	1941156	444513	1,465	4,367
Let Vol C 16	42,5	8731315	62272767	0,140	32848	3614427	0,009	626763	743812	0,843	10202002	14043706	16637756	0,613	0,844	128352	330601	412958	0,311	0,801
Let Vol C 17	48	49239411	61461440	0,801	144018	4350705	0,033	4158979	979353	4,247	53368916	72560155	18216889	2,930	3,983	743933	1943685	445640	1,669	4,362
Let Vol C 18	52	51867527	46905267	1,106	136564	3107011	0,044	3154328	700868	4,501	48569074	70808176	14425070	3,367	4,909	561259	1726282	362101	1,550	4,767
Let Vol C 19	55	73739712	59423273	1,241	156743	3910534	0,040	4321537	967182	4,468	71028022	88907661	18136668	3,916	4,402	774726	1980851	440100	1,760	4,501
Let Vol C 20	58	72345518	61603730	1,174	159317	4175794	0,038	4390951	951266	4,616	70903470	87674049	18272229	3,880	4,798	712122	1933077	454853	1,566	4,250
Let Vol C 21	60	52303383	59012772	0,886	123372	3896222	0,032	3410869	876581	3,891	57151402	6577408	17181507	3,326	3,828	644087	1561567	382017	1,686	4,088
Let Vol C 22	64	72487966	61166685	1,185	204662	4011567	0,051	5351985	994046	5,384	87462546	108356338	17918811	4,881	6,047	733674	1892354	314080	2,336	6,025
Let Vol C 23	72	37490994	58324112	0,641	123811	3757317	0,023	2740855	807245	3,400	49058857	19183300	17407804	2,301	3,400	513013	143223	395392	1,298	3,622
Let Vol C 24	96	30588619	63442740	0,482	164297	4215797	0,039	3008410	942253	3,193	47315738	58714630	18624392	2,541	3,153	1420007	4205291	438704	3,237	9,586
Let Vol C 25	120	17111280	62175905	0,275	199415	4124595	0,048	2118359	864403	2,451	18197185	18538153	1669395	1,030	1,049	4813278	1494798	426290	11,291	35,065
Let Vol C 26	144	19086221	56984721	0,340	253391	3762728	0,067	4934674	883512	5,585	104098525	110687795	16553458	6,289	6,687	1513915	3275107	460782	3,722	8,051
Let Vol C 27	168	10503341	57166740	0,184	228768	3748411	0,061	5196161	859758	6,044	89751576	110717891	16737996	5,362	6,615	121899	3414864	384249	3,172	8,887
Let Vol C 28	192	3625883	55579700	0,065	221014	3632042	0,061	3812667	809080	4,712	62516710	72495756	16538140	3,780	4,384	1026368	2228732	423737	2,422	5,260
Let Vol C 29	216	2935005	55534169	0,053	269472	3541335	0,076	4254988	869910	4,891	70771359	75939160	16169112	4,377	4,675	1178976	2536553	398824	2,956	6,360
Let Vol C 30	336	256013	58689772	0,004	108497	3965739	0,027	2702106	3,138	42578571	58725578	17259814	2,429	3,350	666343	2027466	420222	1,586	4,825	
Let Vol C 31	456	62438	55721445	0,001	130498	3875230	0,034	3550670	858464	4,136	84251203	81663066	17939106	4,790	4,639	989486	2324402	428104	2,312	5,430
Let Vol C 32	576	8411	59575863	0,000	137451	4149434	0,033	3735954	872274	4,283	55382724	58867089	17396906	3,184	3,384	791448	1859198	422637	1,873	4,399
Let Vol C 33	696	584	56498879	0,000	108224	3748479	0,029	3934914	913059	4,310	49863469	70243930	17228867	2,894	4,077	757544	2316839	434808	1,742	5,328

8.4.VALORES DAS ÁREAS DO ESTUDO DE EXCREÇÃO DO VOLUNTÁRIO D:

Voluntário D																				
Úrina	Tempo de ingestão (h)	Áreas																		
		Carbinol	Metiltestosterona	Carbinol/ Metiltestosterona	Testosterona	Testosterona-D3	Testosterona/ Testosterona-D3	Epitesterona	Epitesterona-D3	Epitesterona/ Epitesterona-D3	Androsterona	Etiocolanona	Etiocolanona-D5	Androsterona/ Etiocolanona-D5	Etiocolanona/ Etiocolanona-D5	Salfa-diol	βeta-diol	Salfa-diol-D3	Salfa-diol/ Salfa-diol-D3	βeta-diol/ Salfa-diol-D3
Let Vol D 0 (BU)	0	6945269	0,000	520369	448364	1,161	559714	141490	3,956	28922663	8486384	2468653	11,716	3,438	2338418	7756599	406087	5,758	19,101	
Let Vol D 1	7	185199606	44311404	4,180	3222384	2803004	1,150	2517912	582757	4,321	52060879	24250725	4561673	11,413	5,316	3081066	11871741	387884	7,943	30,606
Let Vol D 2	15	107657713	35830462	3,005	1744498	2433003	0,717	1237305	512276	2,415	31433229	11352879	5209515	6,034	2,179	1620455	7551160	451110	3,592	16,739
Let Vol D 3	24	125363878	52154443	2,404	3545798	3758289	0,946	3244549	790279	4,106	74482737	31915527	11979911	6,306	2,666	2140267	8280880	410160	5,218	20,189
Let Vol D 4	27	40336852	61297513	0,658	1166242	3852486	0,303	1102611	792623	1,391	48464349	22513645	16957869	2,869	1,328	735021	2077252	378805	1,940	7,860
Let Vol D 5	33	95804137	58830043	1,630	2904471	3935485	0,738	2672610	869425	3,074	118723596	45869671	16405267	7,237	2,796	1973416	7002452	118266	4,718	16,742
Let Vol D 6	37	60776526	65679019	0,925	1916051	4157784	0,461	1704543	878601	1,940	73763280	27661773	17456493	4,226	1,585	1441745	4875559	431938	3,338	11,288
Let Vol D 7	41	36439440	59549147	0,948	2411006	4118941	0,585	1511796	834470	1,812	582923571	20373245	16495604	3,534	1,235	1123722	4477635	413663	2,717	10,824
Let Vol D 8	47,5	10107896	58806761	1,718	5683803	4296498	1,323	4638369	6718048	4,289	131391381	48531368	16718048	7,859	2,903	2818696	10638020	445975	6,320	23,853
Let Vol D 9	53,5	66163099	64163170	1,031	3348319	4130471	0,811	2942013	931575	3,158	116520718	42562359	18026748	6,465	2,361	2047698	6989446	418338	4,895	16,708
Let Vol D 10	60,5																			

8.5.VALORES DAS ÁREAS DO ESTUDO DE EXCREÇÃO DO VOLUNTÁRIO E:

Urina	Tempo de ingestão (h)	Voluntário E																		
		Áreas																		
		Carbinol	Metiltestosterona	Carbinol/ Metiltestosterona	Testosterona	Testosterona-D3	Testosterona/ Testosterona-D3	Epitestosterona	Epitestosterona-D3	Epitestosterona/ Epitestosterona-D3	Androsterona	Etiocolanona	Etiocolanona-D5	Androsterona/ Etiocolanona-D5	Etiocolanona/ Etiocolanona-D5	Salfa-diol	Sbeta-diol	Salfa-diol-D3	Salfa-diol/ Salfa-diol-D3	Sbeta-diol/ Salfa-diol-D3
Let Vol E 0 (BU)	0	56679952	0,000	3454115	3896348	0,887	4023869	874093	4,603	79174462	41749452	18046591	4,387	2,313	1759265	6638166	384295	4,578	17,274	
Let Vol E 1	0,5	871	62806499	0,000	2824041	4059309	0,696	3388276	915693	3,700	57010792	28212203	19321315	2,951	1,460	1488535	5775662	408396	3,645	14,142
Let Vol E 2	7	300451717	55467330	5,417	6301278	4027003	1,565	6783326	997198	6,802	137741632	69051905	17984947	7,659	3,839	3514373	11976684	392198	8,961	30,537
Let Vol E 3	13,5	238926317	56614615	4,220	5659001	4015782	1,409	5364283	920778	5,826	116587337	54397789	16906365	6,896	3,218	3088500	11190679	412513	7,487	27,128
Let Vol E 4	24	133379161	64122256	2,080	5301384	4185900	1,266	5188518	961971	5,394	84285460	41743351	18631637	4,524	2,240	2557706	9889994	428052	5,975	23,105
Let Vol E 5	31,5	186054010	54420098	3,419	7684700	3981690	1,930	9319378	1067527	8,730	160548528	76148875	17280743	9,291	4,407	4147352	15541974	374762	11,067	41,472
Let Vol E 6	38,5	38618251	58671713	0,658	2553644	3807362	0,671	2396965	850420	2,819	43944321	18668377	17116528	2,567	1,091	1147371	4592473	372183	3,083	12,339
Let Vol E 7	48	31228423	53050173	0,589	15488550	4193110	3,694	12967831	1123243	11,545	209913962	108535409	16636556	12,618	6,524	7008087	27559837	387298	18,095	71,159
Let Vol E 8	62	32552808	53558654	0,608	9984281	4262257	2,342	7707935	949421	8,119	123053484	66955097	17903526	6,873	3,740	3900160	15325546	394230	9,893	38,875
Let Vol E 9	72	61700342	56581014	1,090	10524887	4177501	2,519	8548813	1056400	8,092	142326885	86541541	17572736	8,099	4,925	4951455	19985554	411299	12,039	48,591
Let Vol E 10	96	27049577	61163648	0,442	5150916	4152425	1,240	3511434	860395	4,081	66501047	30917663	17965074	3,702	1,721	2283601	8924059	403689	5,657	22,106
Let Vol E 11	122	107617107	57323135	1,877	19543666	4612195	4,237	10190787	1043916	9,762	210066048	96253174	16858521	12,461	5,709	10675036	3218895	395980	26,959	81,289
Let Vol E 12	144	19926434	53071118	0,375	10853926	4057773	2,675	5510884	917846	6,004	70025030	34239349	16673311	4,200	2,054	5345242	19162731	398221	13,423	48,121
Let Vol E 13	168	34482760	58136844	0,593	14931109	4435630	3,366	11533746	1109298	10,397	174810739	85897378	16633143	10,510	5,164	6319658	32502690	420040	15,045	77,380
Let Vol E 14	216	15643905	37194145	0,421	6901029	2624883	2,629	5746691	618284	9,295	20239079	12524361	2580962	7,842	4,853	6460109	23453900	399441	16,173	58,717
Let Vol E 15	337	627792	59664371	0,011	7816492	4544074	1,720	7912226	1109288	7,133	103064970	72940011	18985681	5,429	3,842	3348122	21547013	437267	7,657	49,277

8.6. CONCENTRAÇÕES DOS ENDÓGENOS E RAZÃO TEST/EPI DO ESTUDO DE EXCREÇÃO DO VOLUNTÁRIO A:

Voluntário A								
Urina	Tempo de ingestão (h)	Concentração (ng/mL)						Razão Área
		Testosterona	Epitestosterona	Androsterona	Etiocolanolona	5alfa-diol	5beta-diol	Test/Epi
Let Vol 0 (BU)	0	26,46	23,43	1582,14	566,74	49,73	126,49	1,12
Let Vol A 1	0,5	33,63	31,10	2020,18	807,80	68,45	157,22	1,08
Let Vol A 2	5,5	46,56	43,05	2608,86	960,93	74,85	176,72	1,08
Let Vol A 3	11	28,76	22,07	1648,17	596,38	48,09	127,53	1,30
Let Vol A 4	18	21,67	21,52	1150,79	473,99	38,21	98,25	1,00
Let Vol A 5	24	47,24	46,94	2224,13	799,81	70,93	163,83	1,00
Let Vol A 6	34	40,15	32,51	1935,46	678,16	50,30	129,23	1,22
Let Vol A 7	41	29,03	28,89	1345,63	491,50	41,24	112,01	1,00
Let Vol A 8	47,5	36,25	42,61	1871,12	762,81	68,52	155,21	0,84
Let Vol A 9	52	52,85	58,73	3011,74	1350,57	93,03	239,97	0,89
Let Vol A 10	56	47,73	47,01	2496,69	930,25	71,19	183,66	1,01
Let Vol A 11	62	42,12	32,06	1879,53	710,98	59,44	166,13	1,30
Let Vol A 12	65	61,13	38,21	2181,72	788,51	83,12	224,51	1,59
Let Vol A 13	71	73,80	46,53	2453,65	881,24	85,90	235,01	1,58
Let Vol A 14	95	70,80	48,57	2718,54	1350,74	113,97	291,38	1,45
Let Vol A 15	120	64,17	42,67	2636,73	1047,72	104,99	254,16	1,50
Let Vol A 16	143	103,59	75,66	5067,70	2037,42	179,10	393,59	1,37
Let Vol A 17	167	61,69	42,12	3356,66	1371,37	135,39	257,81	1,42
Let Vol A 18	190	34,49	24,56	1372,31	499,96	44,19	110,91	1,39
Let Vol A 19	215	84,04	58,15	3585,59	1400,11	143,60	268,33	1,43
Let Vol A 20	336	42,93	33,58	2195,45	880,25	94,09	199,80	1,28
Let Vol A 21	456	37,75	25,84	1770,06	682,80	58,87	132,94	1,45
Let Vol A 22	578	37,95	33,65	2076,53	760,25	76,02	169,99	1,12
Let Vol A 23	697	55,01	41,74	2887,95	1078,54	106,13	249,64	1,32

8.7.CONCENTRAÇÕES DOS ENDÓGENOS E RAZÃO TEST/EPI DO ESTUDO DE EXCREÇÃO DO VOLUNTÁRIO B:

Voluntário B								
Urina	Tempo de ingestão (h)	Concentração (ng/mL)						Razão Área
		Testosterona	Epitestosterona	Androsterona	Etiocolanolona	5alfa-diol	5beta-diol	Test/Epi
Let Vol B 0 (BU)	0	69,44	58,51	4412,54	3827,95	112,82	274,16	1,18
Let Vol B 1	0,5	56,29	38,01	2696,00	1727,88	54,74	86,24	1,47
Let Vol B 2	4	34,61	33,24	2049,44	1268,20	40,75	69,67	1,04
Let Vol B 3	9	29,07	25,74	1956,74	994,09	34,72	51,22	1,12
Let Vol B 4	11	21,42	19,07	1413,62	641,22	26,36	35,45	1,12
Let Vol B 5	12	18,60	17,22	1220,65	632,51	24,54	35,69	1,08
Let Vol B 6	13	12,96	11,16	791,04	393,73	14,88	20,47	1,16
Let Vol B 7	22	41,28	33,82	1767,42	985,16	43,28	64,56	1,21
Let Vol B 8	29,5	69,66	64,09	3778,02	2513,99	85,69	138,81	1,08
Let Vol B 9	32	46,81	51,55	2904,96	1797,21	65,45	102,38	0,91
Let Vol B 10	37	53,51	53,34	2746,90	1589,42	57,97	94,58	1,00
Let Vol B 11	49	110,56	85,50	5037,40	3194,91	126,98	219,61	1,29
Let Vol B 12	53	102,09	90,31	4905,46	3411,16	107,00	209,22	1,12
Let Vol B 13	58	113,53	95,22	5499,26	3627,87	139,24	247,34	1,18
Let Vol B 14	63	94,81	71,63	4104,18	2695,55	86,29	159,62	1,32
Let Vol B 15	73	116,93	94,10	4437,40	3326,52	120,07	224,30	1,24
Let Vol B 16	96	134,96	81,32	4639,48	3092,96	131,65	227,08	1,64
Let Vol B 17	123	87,78	59,08	2998,56	1760,04	81,09	119,55	1,47
Let Vol B 18	145	124,74	82,18	4553,68	2730,87	116,81	188,73	1,51
Let Vol B 19	169	153,53	96,24	5136,25	3365,15	166,75	291,85	1,59
Let Vol B 20	193	209,41	118,06	8136,59	4971,15	256,29	387,11	1,76
Let Vol B 21	217	175,57	105,81	6295,83	3713,72	191,43	285,29	1,64
Let Vol B 22	337	95,10	57,01	3035,00	2077,10	81,72	167,57	1,66
Let Vol B 23	384	79,16	50,21	3294,20	2025,47	78,63	127,63	1,57
Let Vol B 24	449	48,86	33,71	2209,88	1166,44	55,08	77,58	1,45
Let Vol B 25	456	78,34	57,89	3815,56	2030,38	99,01	129,40	1,34
Let Vol B 26	481	79,32	68,91	3219,42	1836,86	82,71	107,01	1,14

8.8.CONCENTRAÇÕES DOS ENDÓGENOS E RAZÃO TEST/EPI DO ESTUDO DE EXCREÇÃO DO VOLUNTÁRIO C:

Voluntário C								
Urina	Tempo de ingestão (h)	Concentração (ng/mL)						Razão Área
		Testosterona	Epitestosterona	Androsterona	Etiocolanolona	5alfa-diol	5beta-diol	Test/Epi
Let Vol C 0 (BU)	0	2,69	51,96	1949,44	1503,54	46,92	49,57	0,05
Let Vol C 1	1	1,07	26,00	799,03	963,59	17,66	23,38	0,04
Let Vol C 2	3,5	0,73	12,27	400,82	455,05	8,48	10,58	0,05
Let Vol C 3	4	0,50	8,83	291,27	272,44	5,60	6,56	0,05
Let Vol C 4	5,5	0,90	23,44	843,57	759,38	18,15	21,15	0,04
Let Vol C 5	7,5	0,89	21,63	822,74	845,51	15,80	19,69	0,04
Let Vol C 6	9,5	1,19	31,81	1060,41	1108,47	20,81	28,80	0,04
Let Vol C 7	11	0,80	18,14	596,47	595,41	11,95	16,03	0,04
Let Vol C 8	16	1,87	52,05	1527,51	1593,51	34,81	48,22	0,04
Let Vol C 9	24	2,59	57,41	1558,78	1652,41	41,01	49,46	0,04
Let Vol C 10	26	2,28	60,71	1849,74	2084,30	45,04	56,34	0,04
Let Vol C 11	28,5	1,44	39,40	1154,87	1143,01	24,51	30,21	0,04
Let Vol C 12	32	1,85	51,39	1766,21	1634,42	37,02	39,33	0,04
Let Vol C 13	35	2,51	60,94	2142,29	1978,76	36,11	46,79	0,04
Let Vol C 14	39	2,10	56,42	1728,68	1681,00	30,85	41,68	0,04
Let Vol C 15	41,5	2,05	45,90	1462,30	1582,05	29,68	39,26	0,04
Let Vol C 16	42,5	0,54	9,52	297,22	302,70	6,31	7,20	0,05
Let Vol C 17	48	1,98	47,96	1420,27	1428,41	33,82	39,21	0,04
Let Vol C 18	52	2,63	50,83	1632,30	1760,33	31,41	42,86	0,05
Let Vol C 19	55	2,39	50,46	1898,58	1757,97	35,67	40,47	0,05
Let Vol C 20	58	2,28	52,12	1881,19	1720,64	31,73	38,21	0,04
Let Vol C 21	60	1,89	43,94	1612,59	1372,85	34,16	36,75	0,04
Let Vol C 22	64	3,07	60,80	2366,30	2168,57	47,33	54,17	0,05
Let Vol C 23	72	1,97	38,40	1115,39	1219,21	26,24	32,56	0,05

Let Vol C 24	96	2,33	36,06	1231,69	1130,61	65,58	86,18	0,07
Let Vol C 25	120	2,89	27,68	499,28	376,25	288,77	315,26	0,11
Let Vol C 26	144	4,02	63,08	3048,69	2397,95	75,41	72,39	0,07
Let Vol C 27	168	3,65	68,25	2599,54	2372,16	64,27	79,90	0,05
Let Vol C 28	192	3,64	53,22	1832,60	1572,01	49,08	47,29	0,07
Let Vol C 29	216	4,55	55,24	2121,92	1676,58	59,90	57,18	0,07
Let Vol C 30	336	1,63	35,44	1177,53	1201,38	32,13	43,38	0,04
Let Vol C 31	456	2,01	46,71	2322,15	1663,76	46,85	48,82	0,04
Let Vol C 32	576	1,98	48,37	1543,46	1213,47	37,94	39,55	0,04
Let Vol C 33	696	1,72	48,67	1403,08	1462,11	35,30	47,91	0,04

8.9.CONCENTRAÇÕES DOS ENDÓGENOS E RAZÃO TEST/EPI DO ESTUDO DE EXCREÇÃO DO VOLUNTÁRIO D:

Voluntário D								
Urina	Tempo de ingestão (h)	Concentração (ng/mL)						Razão Área
		Testosterona	Epitestosterona	Androsterona	Etiocolanolona	5alfa-diol	5beta-diol	Test/Epi
Let Vol D 0 (BU)	0	69,33	44,67	5679,84	1232,80	116,67	171,73	1,54
Let Vol D 1	7	68,67	48,79	5532,80	1906,47	160,94	275,17	1,39
Let Vol D 2	15	42,83	27,28	2925,16	781,52	72,78	150,50	1,57
Let Vol D 3	24	56,50	46,37	3056,88	956,10	105,73	181,52	1,21
Let Vol D 4	27	18,08	15,71	1390,68	476,11	39,31	70,66	1,14
Let Vol D 5	33	44,09	34,72	3508,42	1002,70	95,59	150,52	1,26
Let Vol D 6	37	27,53	21,91	2048,52	568,27	67,63	101,48	1,25
Let Vol D 7	41	34,97	20,46	1713,18	442,92	55,04	97,32	1,70
Let Vol D 8	47,5	79,03	48,43	3810,12	1041,04	128,06	214,46	1,62
Let Vol D 9	53,5	48,43	35,67	3133,96	846,81	99,18	150,21	1,36
Let Vol D 10	60,5	28,47	21,88	1806,75	447,72	49,78	88,52	1,29
Let Vol D 11	66,5	32,84	24,40	2168,63	511,01	71,87	111,20	1,34
Let Vol D 12	73	133,61	76,84	6453,59	1704,50	205,76	319,66	1,72
Let Vol D 13	98,5	83,29	47,11	4049,42	1108,54	121,83	225,29	1,76
Let Vol D 14	126,5	84,96	46,93	4424,63	1199,54	124,08	234,44	1,80
Let Vol D 15	145,5	44,99	26,50	2369,14	872,36	67,28	126,81	1,68
Let Vol D 16	168	100,16	55,38	5372,28	1607,31	191,10	318,65	1,80
Let Vol D 17	215,5	173,44	77,57	7543,21	2207,31	257,96	488,16	2,22
Let Vol D 18	336	125,92	68,54	6267,77	1773,01	262,35	415,80	1,83
Let Vol D 19	552	87,15	51,00	5532,04	1601,49	225,33	309,88	1,70
Let Vol D 20	648	76,74	43,94	4362,18	1420,29	166,83	266,07	1,74
Let Vol D 21	743,5	46,99	28,09	2434,10	934,63	94,58	144,20	1,66

8.10. CONCENTRAÇÕES DOS ENDÓGENOS E RAZÃO TEST/EPI DO ESTUDO DE EXCREÇÃO DO VOLUNTÁRIO E:

Voluntário E								
Urina	Tempo de ingestão (h)	Concentração (ng/mL)						Razão Área
		Testosterona	Epitestosterona	Androsterona	Etiocolanolona	5alfa-diol	5beta-diol	Test/Epi
Let Vol E 0 (BU)	0	52,96	51,99	2126,90	829,63	92,75	155,30	1,01
Let Vol E 1	0,5	41,56	41,79	1430,47	523,64	73,85	127,15	0,99
Let Vol E 2	7	93,47	76,82	3712,90	1376,88	181,56	274,55	1,21
Let Vol E 3	13,5	84,18	65,79	3343,17	1153,88	151,70	243,90	1,28
Let Vol E 4	24	75,66	60,91	2193,10	803,46	121,07	207,73	1,24
Let Vol E 5	31,5	115,29	98,59	4504,03	1580,29	224,23	372,86	1,16
Let Vol E 6	38,5	40,07	31,83	1244,64	391,13	62,46	110,94	1,25
Let Vol E 7	48	220,66	130,38	6116,96	2339,60	366,63	639,77	1,68
Let Vol E 8	62	139,93	91,68	3332,06	1341,14	200,45	349,51	1,51
Let Vol E 9	72	150,50	91,39	3926,50	1766,10	243,92	436,87	1,64
Let Vol E 10	96	74,10	46,09	1794,56	617,17	114,62	198,75	1,61
Let Vol E 11	122	253,13	110,25	6040,79	2047,50	546,22	730,85	2,29
Let Vol E 12	144	159,79	67,81	2036,05	736,43	271,97	432,64	2,34
Let Vol E 13	168	201,09	117,42	5095,09	1851,97	304,84	695,70	1,71
Let Vol E 14	216	157,05	104,97	3801,60	1740,21	327,68	527,91	1,49
Let Vol E 15	337	102,76	80,55	2631,74	1377,74	155,14	443,03	1,26

8.11. CONCENTRAÇÕES CORRIGIDAS DOS ENDÓGENOS E DENSIDADE E pH DAS URINAS DO ESTUDO DE EXCREÇÃO DO VOLUNTÁRIO A

Voluntário A						
Urina	pH	Densidade	Concentração ng/mL			
			Testosterona corr	Epitestosterona corr	Androsterona corr	Etiocolanolona corr
Vol A 0 (BU)	6,5	1,019	27,85	24,66	1665,41	596,57
Vol A 1	5,0	1,024	28,03	25,92	1683,48	673,17
Vol A 2	6,1	1,024	38,80	35,88	2174,05	800,77
Vol A 3	6,1	1,024	23,97	18,39	1373,48	496,98
Vol A 4	5,5	1,021	20,64	20,50	1095,99	451,42
Vol A 5	5,0	1,020	47,24	46,94	2224,13	799,81
Vol A 6	6,8	1,022	36,50	29,55	1759,51	616,51
Vol A 7	5,3	1,018	32,26	32,10	1495,14	546,11
Vol A 8	5,3	1,015	48,33	56,81	2494,83	1017,08
Vol A 9	6,8	1,020	52,85	58,73	3011,74	1350,57
Vol A 10	6,1	1,021	45,46	44,77	2377,80	885,95
Vol A 11	6,5	1,015	56,16	42,75	2506,04	947,97
Vol A 12	6,8	1,022	55,57	34,74	1983,38	716,83
Vol A 13	5,0	1,023	64,17	40,46	2133,61	766,30
Vol A 14	5,0	1,021	67,43	46,26	2589,09	1286,42
Vol A 15	5,0	1,022	58,34	38,79	2397,03	952,47
Vol A 16	5,0	1,025	82,87	60,53	4054,16	1629,94
Vol A 17	5,3	1,025	49,35	33,70	2685,33	1097,10
Vol A 18	5,0	1,012	57,48	40,93	2287,18	833,27
Vol A 19	5,0	1,024	70,03	48,46	2987,99	1166,76
Vol A 20	5,3	1,023	37,33	29,20	1909,09	765,43
Vol A 21	5,0	1,022	34,32	23,49	1609,15	620,73
Vol A 22	5,5	1,022	34,50	30,59	1887,75	691,14
Vol A 23	5,3	1,025	44,01	33,39	2310,36	862,83

8.12. CONCENTRAÇÕES CORRIGIDAS DOS ENDÓGENOS E DENSIDADE E pH DAS URINAS DO ESTUDO DE EXCREÇÃO DO VOLUNTÁRIO B

Voluntário B						
Urina	pH	Densidade	Concentração ng/mL			
			Testosterona corr	Epitestosterona corr	Androsterona corr	Etiocolanolona corr
Vol B 0 (BU)	6,8	1,025	55,55	46,81	3530,03	3062,36
Vol B 1	5,3	1,023	48,95	33,05	2344,35	1502,50
Vol B 2	6,5	1,015	46,15	44,32	2732,59	1690,93
Vol B 3	7,1	1,014	41,53	36,77	2795,34	1420,13
Vol B 4	7,1	1,013	32,95	29,34	2174,80	986,49
Vol B 5	6,8	1,011	33,82	31,31	2219,36	1150,02
Vol B 6	7,1	1,006	43,20	37,20	2636,80	1312,43
Vol B 7	6,5	1,015	55,04	45,09	2356,56	1313,55
Vol B 8	7,4	1,024	58,05	53,41	3148,35	2094,99
Vol B 9	7,4	1,027	34,67	38,19	2151,82	1331,27
Vol B 10	6,8	1,019	56,33	56,15	2891,47	1673,07
Vol B 11	5,3	1,026	85,05	65,77	3874,92	2457,62
Vol B 12	6,5	1,023	88,77	78,53	4265,62	2966,23
Vol B 13	5,5	1,026	87,33	73,25	4230,20	2790,67
Vol B 14	5,5	1,026	72,93	55,10	3157,06	2073,50
Vol B 15	5,8	1,022	106,30	85,55	4034,00	3024,11
Vol B 16	6,1	1,018	149,96	90,36	5154,98	3436,62
Vol B 17	6,1	1,027	65,02	43,76	2221,16	1303,73
Vol B 18	5,5	1,026	95,95	63,22	3502,83	2100,67
Vol B 19	5,5	1,026	118,10	74,03	3950,96	2588,58
Vol B 20	5,5	1,029	144,42	81,42	5611,44	3428,38
Vol B 21	5,5	1,024	146,31	88,17	5246,53	3094,77
Vol B 22	5,8	1,023	82,70	49,57	2639,13	1806,17
Vol B 23	5,8	1,026	60,89	38,62	2534,00	1558,05
Vol B 24	6,5	1,018	54,29	37,46	2455,42	1296,04
Vol B 25	6,5	1,023	68,12	50,34	3317,88	1765,55
Vol B 26	6,1	1,022	72,11	62,65	2926,75	1669,87

8.13. CONCENTRAÇÕES CORRIGIDAS DOS ENDÓGENOS E DENSIDADE E pH DAS URINAS DO ESTUDO DE EXCREÇÃO DO VOLUNTÁRIO C

Voluntário C						
Urina	pH	Densidade	Concentração ng/mL			
			Testosterona corr	Epitesterona corr	Androsterona corr	Etiocolanona corr
Vol C 0 (BU)	5,3	1,023	2,34	45,18	1695,17	1307,43
Vol C 1	5,8	1,012	1,78	43,33	1331,72	1605,98
Vol C 2	6,5	1,008	1,83	30,68	1002,05	1137,63
Vol C 3	6,5	1,006	1,67	29,43	970,90	908,13
Vol C 4	6,5	1,013	1,38	36,06	1297,80	1168,28
Vol C 5	7,1	1,015	1,19	28,84	1096,99	1127,35
Vol C 6	6,5	1,018	1,32	35,34	1178,23	1231,63
Vol C 7	5,5	1,011	1,45	32,98	1084,49	1082,56
Vol C 8	5,5	1,024	1,56	43,38	1272,93	1327,93
Vol C 9	5,3	1,019	2,73	60,43	1640,82	1739,38
Vol C 10	5,5	1,019	2,40	63,91	1947,09	2194,00
Vol C 11	6,5	1,017	1,69	46,35	1358,67	1344,72
Vol C 12	5,5	1,017	2,18	60,46	2077,89	1922,85
Vol C 13	6,5	1,027	1,86	45,14	1586,88	1465,75
Vol C 14	6,5	1,027	1,56	41,79	1280,50	1245,19
Vol C 15	5,8	1,021	1,95	43,71	1392,67	1506,71
Vol C 16	6,1	1,004	2,70	47,60	1486,10	1513,50
Vol C 17	5,3	1,016	2,48	59,95	1775,34	1785,51
Vol C 18	5,8	1,02	2,63	50,83	1632,30	1760,33
Vol C 19	6,1	1,022	2,17	45,87	1725,98	1598,15
Vol C 20	6,5	1,024	1,90	43,43	1567,66	1433,87
Vol C 21	6,5	1,022	1,72	39,95	1465,99	1248,05
Vol C 22	5,3	1,026	2,36	46,77	1820,23	1668,13
Vol C 23	5,3	1,012	3,28	64,00	1858,98	2032,02
Vol C 24	5	1,013	3,58	55,48	1894,91	1739,40
Vol C 25	4,7	1,016	3,61	34,60	624,10	470,31
Vol C 26	5,5	1,023	3,50	54,85	2651,03	2085,17
Vol C 27	6,1	1,025	2,92	54,60	2079,63	1897,73
Vol C 28	5,8	1,018	4,04	59,13	2036,22	1746,68
Vol C 29	5,3	1,015	6,07	73,65	2829,23	2235,44
Vol C 30	5,8	1,014	2,33	50,63	1682,19	1716,26
Vol C 31	5,3	1,027	1,49	34,60	1720,11	1232,41
Vol C 32	5,3	1,017	2,33	56,91	1815,84	1427,61
Vol C 33	5,3	1,017	2,02	57,26	1650,68	1720,13

8.14. CONCENTRAÇÕES CORRIGIDAS DOS ENDÓGENOS E DENSIDADE E pH DAS URINAS DO ESTUDO DE EXCREÇÃO DO VOLUNTÁRIO D

Voluntário D						
Urina	pH	Densidade	Concentração ng/mL			
			Testosterona corr	Epitestosterona corr	Androsterona corr	Etiocolanolona corr
Vol D 0 (BU)	5,3	1,027	51,36	33,09	4207,29	913,19
Vol D 1	5,8	1,026	52,82	37,53	4256,00	1466,52
Vol D 2	6,5	1,02	42,83	27,28	2925,16	781,52
Vol D 3	5,5	1,016	70,62	57,96	3821,10	1195,13
Vol D 4	6,8	1,007	51,66	44,89	3973,37	1360,31
Vol D 5	7,4	1,016	55,11	43,40	4385,53	1253,38
Vol D 6	7,4	1,014	39,33	31,30	2926,46	811,81
Vol D 7	6,8	1,015	46,63	27,28	2284,24	590,56
Vol D 8	6,1	1,022	71,85	44,03	3463,75	946,40
Vol D 9	6,8	1,019	50,98	37,55	3298,91	891,38
Vol D 10	7,1	1,016	35,59	27,35	2258,44	559,65
Vol D 11	6,5	1,016	41,05	30,50	2710,79	638,76
Vol D 12	5,5	1,026	102,78	59,11	4964,30	1311,15
Vol D 13	5,5	1,016	104,11	58,89	5061,78	1385,68
Vol D 14	6,8	1,021	80,91	44,70	4213,93	1142,42
Vol D 15	5,8	1,009	99,98	58,89	5264,76	1938,58
Vol D 16	5,3	1,019	105,43	58,29	5655,03	1691,91
Vol D 17	5,5	1,028	123,89	55,41	5388,01	1576,65
Vol D 18	5,8	1,023	109,50	59,60	5450,23	1541,75
Vol D 19	5,8	1,031	56,23	32,90	3569,06	1033,22
Vol D 20	5,5	1,029	52,92	30,30	3008,40	979,51
Vol D 21	5,3	1,028	33,56	20,06	1738,64	667,59

8.15. CONCENTRAÇÕES CORRIGIDAS DOS ENDÓGENOS E DENSIDADE E pH DAS URINAS DO ESTUDO DE EXCREÇÃO DO VOLUNTÁRIO E

Voluntário E						
Urina	pH	Densidade	Concentração ng/mL			
			Testosterona corr	Epitestosterona corr	Androsterona corr	Etiocolanolona corr
Vol E 0 (BU)	6,1	1,021	50,44	49,51	2025,62	790,12
Vol E 1	6,1	1,016	51,95	52,24	1788,09	654,55
Vol E 2	6,5	1,024	77,89	64,02	3094,08	1147,40
Vol E 3	7,1	1,026	64,75	50,61	2571,67	887,60
Vol E 4	6,5	1,022	68,78	55,37	1993,73	730,42
Vol E 5	6,5	1,028	82,35	70,42	3217,16	1128,78
Vol E 6	7,4	1,020	40,07	31,83	1244,64	391,13
Vol E 7	6,1	1,030	147,11	86,92	4077,97	1559,73
Vol E 8	5,5	1,028	99,95	65,49	2380,04	957,96
Vol E 9	6,1	1,027	111,48	67,70	2908,52	1308,22
Vol E 10	6,5	1,020	74,10	46,09	1794,56	617,17
Vol E 11	5,5	1,033	153,41	66,82	3661,08	1240,91
Vol E 12	5,3	1,024	133,16	56,51	1696,71	613,69
Vol E 13	5,3	1,024	167,58	97,85	4245,91	1543,31
Vol E 14	6,8	1,028	112,18	74,98	2715,43	1243,01
Vol E 15	5,5	1,026	79,05	61,96	2024,42	1059,80