

UNIVERSIDADE DE LISBOA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA E BIOQUÍMICA



**Estimativa e Otimização da Incerteza em Análises Qualitativas:  
Identificação de substâncias dopantes em matrizes biológicas**

José João Martins dos Santos Vital Narciso

**Mestrado em Química**

Especialização em Química

Dissertação orientada por:

Doutor Ricardo Jorge Neves Bettencourt da Silva

Doutora Susana Martins da Luz

2017



*“Sic parvis magna”* – “Grandeza a partir de pequenos começos”

Sir Francis Drake



## Agradecimentos

A conclusão desta dissertação é o culminar de cinco anos de grandes aventuras, de altos e baixos, de algumas derrotas e de muitas vitórias, de muito esforço e dedicação e como seria de esperar uma enorme alegria e orgulho pelo sentimento de dever cumprido.

Desta forma, não poderia de deixar de agradecer às pessoas que me ajudaram a construir e a desenvolver este projeto e que me acompanharam nestes momentos.

Ao Professor Doutor Ricardo Jorge Bettencourt da Silva um enorme obrigado por me ter aceite como seu orientando, pela confiança que depositou em mim, pelos ensinamentos que me transmitiu e pela preciosa ajuda que foi para mim ao longo deste ano.

À Doutora Susana Luz, Coordenadora Científica do Laboratório de Análises de Dopagem agradeço a oportunidade que me deu de poder ter tido o privilégio para a realização desta dissertação neste laboratório em excelentes condições de trabalho. Agradeço também pelo apoio e orientação prestados ao longo deste ano.

Um agradecimento especial a toda a equipa do LAD, Ana Mata, Andreia Lourenço, Bárbara Santana, Catarina Mota, Cecília Rocha, Cláudia Antunes, Cláudia Santos, Daniel Luís, David Pereira, Liliana Pereira, João Ferreira, Mário Heitor, Sandra Ramos, Susana Sequeira, Sara Santos, Soraia Gomes, Telmo Gomes e Tiffany Casimiro por toda a simpatia, disponibilidade, preocupação e paciência demonstrada ao longo deste período.

À Soraia Gomes e Telmo Gomes por terem sido meus “tutores” quando não tinham qualquer obrigação de o fazer, pela vossa preocupação, por todo o conhecimento que me transmitiram e pela paciência para responder a todas as minhas dúvidas.

Ao David Pereira uma palavra especial de gratidão, por todo o apoio, pela tua disponibilidade e paciência para responder às minhas dúvidas, pelo que me ensinaste, por todas as trocas de ideias que levaram ao melhoramento do meu trabalho, por todos os momentos de descontração, por me aturares e em especial pela tua amizade.

À Ana Mata um grande obrigado não só pela tua amizade e companheirismo que se tornou evidente nos tempos livres, mas também por todas as trocas de ideias e sessões de brainstorming que tivemos e que tornaram a discussão dos resultados muito mais simples.

À Cecília Rocha e Andreia Lourenço um agradecimento especial pela preocupação e pela vossa amizade e companheirismos que certamente não irei perder.

Aos professores que sempre acreditaram no meu potencial e me incentivaram a ir mais longe e a atingir os meus objetivos porque o céu é o limite.

À Joana Andrade, por todas as vezes em que me tiveste de “puxar as orelhas”, por me teres aturado, por teres ouvido todos os meus desabafos quando as coisas corriam menos bem e por teres estado lá sempre para mim, tu sabes a preciosa ajuda que foste e o quanto a valorizo.

Aos meus amigos por estarem presentes mesmo estando longe.

Por último, à minha mãe, ao meu pai, à minha irmã, à minha avó e ao meu Majerico um grande obrigado porque sem vocês nada disto teria acontecido e não teria chegado onde cheguei. Um grande obrigado também por todo o apoio e crença que tiveram em mim e por me incentivarem a ser melhor e a ter a ambição de chegar sempre mais longe.



## Resumo

A dopagem é tão antiga como o próprio desporto e constitui um perigo para a saúde dos atletas que a ela recorrem, assim como viola o espírito desportivo. A avaliação da utilização indevida de substâncias dopantes pelos atletas pode envolver a pesquisa direta da substância ativa ou dos seus metabolitos nos fluídos biológicos do atleta, sendo que maioria dos casos a simples presença da substância proibida é considerada uma infração. A fiabilidade deste tipo de análises é crucial para a luta contra a dopagem e pode ser quantificada na forma da incerteza do resultado do “exame” / “análise qualitativa”.

A incerteza da identificação da presença de uma substância numa amostra de fluído biológico de um atleta pode ser apresentada como as probabilidades do resultado “positivo” ser verdadeiro ou falso (i.e., taxas de verdadeiros, TP, ou falsos, FP, positivos) ou combinando estes dois parâmetros numa métrica designada razão de verosimilhança, LR, ( $LR=TP/FP$ ) deduzida a partir do Teorema de Bayes. Caso exista um conhecimento sólido prévio sobre a probabilidade do analito estar presente no fluído biológico analisado, pode também ser reportada a probabilidade *a posteriori* do resultado positivo estar correto ( $P(X/e)$ ).

Uma das técnicas analíticas mais populares para a identificação de substâncias dopantes em amostras biológicas, após pré-tratamento adequado, é a GC-MS/MS. A identificação de analitos por esta técnica é baseada na concordância dos tempos de retenção, TR, e razões de abundâncias iónicas, RA, entre um pico da amostra e o pico do analito observado num material de referência (i.e., no controlo positivo). A Agência Mundial Antidopagem (WADA), define critérios para a concordância dos parâmetros usados na identificação dos analitos baseada num conhecimento geral do desempenho desta instrumentação. No entanto, estes critérios podem produzir taxas elevadas de falsos negativos, FN, sempre que os analitos têm de ser pesquisados próximos do Limite de Detecção.

No presente trabalho foi desenvolvida uma ferramenta computacional implementada numa folha de cálculo de MS-Excel que define critérios estatísticos para os parâmetros usados na identificação de analitos e tem em conta o desempenho experimental observado, a distribuição não normal e a correlação das variáveis de entrada dos parâmetros estudados. Esta folha de cálculo recorre a simulações Monte Carlo de tempos de retenção e abundâncias iónicas correlacionadas. A ferramenta desenvolvida permite também avaliar a adequação dos critérios de identificação de analitos definidos pela WADA, nomeadamente as taxas de TP e FN produzidas. Foram igualmente desenvolvidos modelos do ruído do sinal instrumental do espectrómetro de massa que permitem determinar as taxas de FP, impossíveis de determinar experimentalmente, quando se usam critérios estatísticos ou da WADA para a identificação dos compostos. As estimativas de FP e TP associadas aos diferentes parâmetros de identificação foram combinadas e apresentadas como a incerteza do exame na forma de LR ou  $P(X/e)$

No contexto das análises de dopagem foram analisadas dez substâncias de várias classes e avaliado o desempenho do exame tendo em conta três critérios de identificação diferentes: o critério estatístico desenvolvido, o critério aplicado no Laboratório de Análises de Dopagem ao procedimento de triagem e o critério de identificação definido pela WADA. As incertezas associadas aos respetivos exames foram calculadas na forma LR e  $P(X/e)$ , e foi estimada a probabilidade de critérios de identificação estudados não identificarem a presença do analito (taxa de FN).

Os resultados obtidos permitem afirmar que a análise instrumental de todas as substâncias, aplicando os critérios definidos e estudados, produz resultados positivos com elevada probabilidade de estarem corretos. No entanto, nalguns dos casos, os critérios de identificação propostos pela WADA

produzem taxas elevadas de FN. Desta forma, a ferramenta computacional desenvolvida pode ser muito útil para auxiliar a utilização dos critérios de identificação regulamentados pela WADA, nomeadamente estimando a probabilidade do resultado negativo ser falso, o que pode indicar a necessidade da realização de exames replicados ou complementares.

**Palavras chave:** Dopagem, Análises Qualitativas, Identificação, GC-MS/MS, Incerteza do Exame, Razão de Verosimilhança, Verdadeiros Positivos, Falsos Positivos, Falsos Negativos

## Abstract

Doping is as old as sports itself and its growth represents a major problem since it harms athletes' health and violates fair play. The assessment of the misuse of doping substances by athletes may involve the direct search of the active substance or its metabolites in the athlete's biological fluids, and in most cases the mere presence of the prohibited substance is considered an infringement. The reliability of this type of analysis is crucial for the fight against doping and can be quantified in the form of uncertainty of the "examination" / "qualitative analysis" result.

The identification uncertainty of the presence of a substance in an athlete biological fluid sample can be presented as the probabilities of the "positive" result being true or false (ie, true, TP, or false, FP, positive) or as the combination of these two parameters in a metric called the likelihood ratio, LR, ( $LR = TP / FP$ ) deduced from the Bayes' Theorem. If there is a prior solid knowledge about the probability of the analyte being present in the biological fluid analyzed, the *a posteriori* probability of the positive result may also be reported ( $P(X|e)$ ).

One of the most popular instrumentations for the identifications of doping agents in athletes' biological samples, after adequate pre-treatment, is GC-MS/MS. Analytes are identified by the agreement between retention times, RT, and ion abundance ratios, AR, of their mass spectrum observed in samples and calibrators. The World Anti-Doping Agency (WADA) defined criteria for the agreement of identification parameters based on a general knowledge of instrumental performance. However, these criteria may produce high false negative rates, FN, whenever the analytes have to be screened near the Detection Limit.

In the present work, a computational tool implemented in a MS-Excel spreadsheet was developed that allows the definition of statistical criteria for the parameters used in analytes identification and that takes into account the observed experimental performance, the non-normal distribution and the correlation of the input variables of the studied parameters. This worksheet uses Monte Carlo simulations of retention times and correlated ion abundances. The developed tool also allows the evaluation of the adequacy of analytes identification criteria defined by WADA, namely the TP and FN rates produced. It was also developed models of the instrumental signal noise of the mass spectrometer to determine the FP positive rates, which can not be experimentally determined, when using statistical or WADA criteria for compounds determination. The FP and TP estimates associated to different identification parameters were combined and presented as the uncertainty of the examination in the form of LR or  $P(x|e)$ .

In the context of the doping analyzes, ten substances of various classes were analyzed and the performance of the examination was evaluated taking into account three different identification criteria, the developed statistical criterion, the criterion applied in the Laboratório de Análises de Dopagem to the screening procedure and the identification criterion defined by WADA. The uncertainties associated with the respective examinations were also calculated in the form of an LR and  $P(X|e)$ , and the probability of the studied identification criteria not detecting the analyte presence (FN rate).

The obtained results allow us to affirm that the instrumental analysis of all the substances, applying the defined and studied criteria, produces positive results with a high probability of being correct. However, in some cases, the identification criteria proposed by WADA produce high FN rates. The developed computational tool can then be very useful to support the use of WADA regulated identification criteria, namely estimating the probability of the negative result being false, which may indicate the need to perform replicated or complementary exams.

**Keywords:** Doping, Qualitative Analysis, Identification, GC-MS/MS, Examination Uncertainty, Likelihood Ratio, True Positives, False Positives, False Negatives.

## Comunicação Oral

O presente trabalho foi alvo de divulgação na comunidade científica através de uma comunicação oral no *Workshop* anual da *Eurachem* realizado no Chipre entre os dias 29 e 30 de maio de 2017 e subordinado ao tema “*Uncertainty in Qualitative and Quantitative Analysis*”, tendo o tema da comunicação sido o seguinte “*Validation and uncertainty evaluation of the identification of doping agents in sport by GC-MS/MS*”.



# Índice

Resumo.....	V
Palavras chave:.....	VI
Abstract .....	VII
Keywords: .....	VIII
Comunicação Oral.....	IX
Índice de Figuras .....	XIII
Índice de Tabelas.....	XV
Lista de abreviaturas e símbolos .....	XIX
Capítulo 1 – Introdução.....	1
1.1. Dopagem: origens e desenvolvimentos .....	3
1.2. Entidade de acolhimento .....	5
1.3. Lista de Substâncias e Métodos Proibidos .....	6
1.3.1. Classes de Substâncias e Métodos Proibidos .....	6
1.3.2. Agentes Anabolisantes .....	8
1.3.3. Diuréticos e agentes mascarantes .....	10
1.3.4. Estimulantes .....	11
1.3.5. Canabinóides .....	12
1.4. Amostras biológicas em análises de dopagem .....	14
1.4.1. Recolha de amostras biológicas.....	14
1.4.2. Tipos de amostras biológicas.....	14
1.4.3. Receção e armazenamento de amostras.....	15
1.5. Abordagem Analítica .....	16
1.6. Técnicas cromatográficas acopladas a espectrometria de massa.....	18
1.6.1. Técnicas cromatográficas .....	18
1.6.2. Tipos de detetores acoplados em cromatografia.....	19
1.6.3. Critérios de identificação.....	19
1.7. Controlo da qualidade de análises qualitativas.....	21
1.7.1. Análises qualitativas.....	21
1.7.2. Avaliação da Incerteza em análises qualitativas.....	21
1.8. Teorema de Bayes .....	23
1.9. Incerteza do Exame .....	25
1.10. Método de Monte Carlo.....	25
Capítulo 2 – Materiais e Métodos .....	27
2.1. Reagentes.....	29
2.2. Soluções.....	29

2.3. Equipamentos .....	31
2.4. Condições Cromatográficas.....	31
2.5. Amostras biológicas em estudo .....	31
2.6. Substâncias pesquisadas .....	32
2.7. Critérios de identificação de compostos.....	35
2.8. Procedimento Analítico .....	36
2.8.1. Preparação das amostras.....	36
2.8.2. Extração líquido-líquido.....	37
2.8.3. Derivatização.....	37
2.9. Metodologia de Tratamento de Resultados .....	37
Capítulo 3 – Resultados e Discussão.....	39
3.1. Folha de MS-Excel para Simulações Monte Carlo .....	41
3.2. Definição de limites estatísticos de aceitação de resultados.....	43
3.3. Estimativa de taxas de Falsos Positivos e Verdadeiros Positivos.....	45
3.4. Razões de verosimilhança e classificação de evidências.....	52
3.5. Probabilidade a posteriori.....	54
3.6. Comparação dos critérios de identificação estudados .....	58
Capítulo 4 – Conclusão .....	61
4.1. Perspetivas futuras.....	65
Capítulo 5 – Bibliografia.....	67
Capítulo 6 – Anexos.....	73
Anexo 1: Limites de aceitação .....	75
Anexo 2: Diferenças de razões de abundâncias e tempos de retenção relativos entre controlo e amostras analisadas .....	76
Anexo 3: Taxas de Falsos Positivos e Verdadeiros Positivos para os critérios de aceitação definidos no presente trabalho.....	79
Anexo 4: Taxas de Falsos Positivos e Verdadeiros Positivos aplicando os critérios utilizados pelo laboratório no procedimento de triagem.....	80
Anexo 5: Taxas de Falsos Positivos e Verdadeiros Positivos aplicando os critérios definidos pela WADA para a confirmação de analitos.....	81
Anexo 6: Razões de verosimilhança para os diferentes critérios de identificação estudados .....	83

## Índice de Figuras

<b>Figura 1.1:</b> Esquema de biossíntese de esteroides endógenos [1] DHEA; [2] 4-Androstene-3,17-diona; [3] Testosterona; [4] DHT; [5] 5 $\alpha$ -DHT; [6] 5 $\alpha$ Adiol; [7] 5 $\beta$ Adiol; [8] Androsterona; [9] Etiocolanolona; [10] Pregnanediol; [11] 11 $\beta$ -Hidroxiandrosterona; [12] 11 $\beta$ -Hidroxietiocolanolona. Adaptado de (Mareck et al. 2008).....	9
<b>Figura 1.2:</b> Cromatógrafo de fase Gasosa e os seus diversos componentes. Adaptado de (Agilent Technologies 2010).....	18
<b>Figura 1.3:</b> Esquema do modo de aquisição MRM no qual em primeiro lugar é isolado o ião precursor definido (a azul escuro) e seguidamente após a fragmentação é monitorizado um único ião “filho” (a vermelho) (Domon & Aebersold 2006). .....	19
<b>Figura 2.1:</b> Estruturas químicas das substâncias em análise e seus respetivos metabolitos. (Estruturas obtidas com o software Marvin Sketch 6.1.3).....	33
<b>Figura 2.2:</b> Exemplo de macro gerada pelo software informático Agilent MassHunter Qualitative Analysis B.05.00 na qual é possível observar os sinais dos analitos pesquisados, nomeadamente as abundâncias e tempos de retenção das transições pesquisadas. ....	37
<b>Figura 3.1:</b> Distribuição aproximadamente normal das diferenças de razões de abundância simuladas para o analito Triantereno ao nível de concentração de MRPL. Na figura, os traços contínuos vermelhos indicam os percentis que definem um nível de confiança de 99%, a tracejado os percentis que definem um nível de confiança de 95% e a traço contínuo preto, o percentil 50 que corresponde à média da distribuição. ....	42
<b>Figura 3.2:</b> Taxas de Falsos Positivos e Verdadeiros Positivos, referentes às diferenças de razões de abundância, das substâncias em análise, aos quatro níveis de concentração estudados, de acordo com os critérios de aceitação estatísticos definidos no presente trabalho.....	45
<b>Figura 3.3:</b> Gráfico da distribuição das diferenças de razões de abundância simuladas para o analito 5 $\beta$ THMT ao nível de concentração de $\frac{1}{4} \times$ MRPL. Na figura, a traço contínuo vermelho encontram-se os percentis que definem um nível de confiança de 99 %, a tracejado os percentis que definem um nível de confiança de 95 % e a traço contínuo preto, o percentil 50. ....	46
<b>Figura 3.4:</b> Gráfico da distribuição das diferenças de razões de abundância simuladas para o analito 5 $\beta$ THMT ao nível de concentração de $\frac{1}{2} \times$ MRPL. Na figura, a traço contínuo vermelho encontram-se os percentis que definem um nível de confiança de 99 %, a tracejado os percentis que definem um nível de confiança de 95 % e a traço contínuo preto, o percentil 50. ....	47
<b>Figura 3.5:</b> Taxas de Verdadeiros Positivos, referentes às diferenças de tempos de retenção relativos, das substâncias em análise, aos quatro níveis de concentração estudados. O critério de identificação utilizado na estimativa dos valores foi o critério aplicado no LAD no procedimento de triagem. ....	47
<b>Figura 3.6:</b> Variação das Taxas de Verdadeiros Positivos, referentes às diferenças de razões de abundância, das substâncias em análise com a concentração. O critério de identificação utilizado na estimativa dos valores foi o critério aplicado no LAD ao procedimento de triagem. ....	48
<b>Figura 3.7:</b> Variação das Taxas de Falsos Positivos, referentes às diferenças de razões de abundância, das substâncias em análise com a concentração. O critério de identificação utilizado na estimativa dos valores foi o critério aplicado no LAD ao procedimento de triagem. ....	49
<b>Figura 3.8:</b> Taxas de Verdadeiros Positivos, referentes a d(TRR), das substâncias em análise, aos quatro níveis de concentração estudados. O critério de identificação utilizado foi o definido pela WADA para a confirmação da presença de analitos. ....	50
<b>Figura 3.9:</b> Variação das Taxas de Verdadeiros Positivos, referentes às diferenças de razões de abundância, das substâncias em análise com a concentração. O critério de identificação aplicado na	

estimativa dos valores foi o critério definido pela WADA para a confirmação da presença de analitos. ....	51
<b>Figura 3.10:</b> Taxas de Falsos Positivos, referentes às diferenças de razões de abundância, das substâncias em análise com a concentração. O critério de identificação aplicado na estimativa dos valores foi o critério definido pela WADA para a confirmação de analitos. ....	51
<b>Figura 3.11:</b> Representação gráfica do logaritmo das razões de verossimilhança associado aos níveis de concentração estudados com base em $d(\text{TRR})$ e $d(\text{RA})$ considerando os critérios estatísticos de aceitação dos valores de $d(\text{TRR})$ e $d(\text{RA})$ . ....	53
<b>Figura 3.12:</b> Representação gráfica do logaritmo das razões de verossimilhança associado aos níveis de concentração estudados com base em $d(\text{TRR})$ e $d(\text{RA})$ considerando o critério de identificação aplicado no LAD ao procedimento de triagem. ....	53
<b>Figura 3.13:</b> Representação gráfica das razões de verossimilhança sob a forma $\text{Log}(\text{LR})$ para os vários analitos às diversas gamas de concentração estudadas, obtidas para critério de identificação definido pela WADA para a confirmação de analitos. ....	54

# Índice de Tabelas

<b>Tabela 1.1:</b> Número de resultados analíticos positivos (AAF do inglês Adverse Analytical Finding) por classe de substâncias e métodos proibidos, encontradas em amostras analisadas no ano de 2015 pelos laboratórios acreditados pela WADA. Estes resultados positivos não devem ser confundidos com violação anti-dopagem uma vez que nestes resultados podem estar contidos casos de exceções de uso terapêutico. Adaptado de (World Anti-Doping Agency 2015a).....	7
<b>Tabela 1.2:</b> Correspondência entre o valor obtido para razão de verosimilhança e o seu equivalente verbal (UK's Association of Forensic Science Providers 2009). .....	25
<b>Tabela 2.1:</b> Conjunto de substâncias e respetivos metabolitos pesquisados e classe a que pertencem de acordo com a classificação da WADA. ....	32
<b>Tabela 2.2:</b> Transições iónicas (m/z), tempos de retenção (TR), energia de colisão (CE) e Dwell time para os vários analitos pesquisados. ....	34
<b>Tabela 2.3:</b> Níveis de concentração das substâncias pesquisadas nos quatro níveis de concentração analisados (World Anti-Doping Agency - Laboratory Expert Group 2015a). ....	34
<b>Tabela 2.4:</b> Critérios referentes à aceitação de razões de abundância iónicas definidos pela WADA no documento técnico (World Anti-Doping Agency - Laboratory Expert Group 2015b). ....	36
<b>Tabela 3.1:</b> Limites estatísticos de aceitação de diferenças de razões de abundância e de tempos de retenção relativos entre um controlo e a solução analisada, definidos para um nível de confiança de 95%, para o nível de concentração de analito correspondente MRPL. ....	43
<b>Tabela 3.2:</b> Diferenças de razões de abundância de iões entre um controlo positivo e as amostras fortificadas para um nível de concentração de analito correspondente ao MRPL. Os valores a negrito encontram-se fora dos limites de aceitação estabelecidos para um nível de confiança de 95 %. ....	44
<b>Tabela 3.3:</b> Diferenças de tempos de retenção relativos entre um controlo positivo e as amostras fortificadas para um nível de concentração de analito correspondente ao MRPL. Todos os valores se encontram dentro dos limites de aceitação estabelecidos para um nível de confiança de 95 %. ....	45
<b>Tabela 3.4:</b> Dados relativos a análises de dopagem realizadas pelos laboratórios acreditados pela WADA no ano de 2015. Cálculo da distribuição a priori com base nos valores reportados.....	55
<b>Tabela 3.5:</b> Probabilidade a posteriori $P(X e)$ dos analitos a diversos níveis de concentração, tendo em conta o critério estatístico de aceitação estabelecido e $O(X) = 0,013$ . ....	56
<b>Tabela 3.6:</b> Probabilidade a posteriori $P(X e)$ dos analitos a diversos níveis de concentração, tendo em conta o critério estatístico de aceitação estabelecido e $O(X) = 1$ . ....	56
<b>Tabela 3.7:</b> Probabilidade a posteriori $P(X e)$ dos analitos a diversos níveis de concentração, tendo em conta o critério de aceitação de $d(RA)$ definido pelo LAD para o procedimento de triagem e $O(X) = 0,013$ . ....	57
<b>Tabela 3.8:</b> Probabilidade a posteriori para os analitos e respetivos níveis de concentração estudados, tendo em conta o critério de aceitação de $d(RA)$ definido pelo LAD para o procedimento de triagem e $O(X) = 1$ . ....	57
<b>Tabela 3.9:</b> Probabilidade a posteriori $P(X e)$ dos analitos a diversos níveis de concentração, tendo em conta o critério de aceitação de $d(RA)$ definido pela WADA para a identificação de compostos e $O(X) = 0,013$ . ....	58
<b>Tabela 3.10:</b> Probabilidade a posteriori $P(X e)$ dos analitos a diversos níveis de concentração, tendo em conta o critério de aceitação de $d(RA)$ definido pela WADA para a identificação de compostos e $O(X) = 1$ . ....	58
<b>Tabela 6.1:</b> Limites estatísticos de aceitação de diferenças de razões de abundância e de tempos de retenção relativos entre um controlo e a solução analisada, definidos para um nível de confiança de 95%, para o nível de concentração de analito correspondente a $\frac{1}{4} \times MRPL$ . ....	75

<b>Tabela 6.2:</b> Limites estatísticos de aceitação de diferenças de razões de abundância e de tempos de retenção relativos entre um controlo e a solução analisada, definidos para um nível de confiança de 95%, para o nível de concentração de analito correspondente a $\frac{1}{2} \times \text{MRPL}$ .....	75
<b>Tabela 6.3:</b> Limites estatísticos de aceitação de diferenças de razões de abundância e de tempos de retenção relativos entre um controlo e a solução analisada, definidos para um nível de confiança de 95%, para o nível de concentração de analito correspondente a $2 \times \text{MRPL}$ .....	76
<b>Tabela 6.4:</b> Diferenças de razões de abundância de ião entre um controlo positivo e as amostras fortificadas para um nível de concentração de analito correspondente a $\frac{1}{4} \times \text{MRPL}$ . Os valores a negrito encontram-se fora dos limites de aceitação estabelecidos para um nível de confiança de 95%. .....	76
<b>Tabela 6.5:</b> Diferenças de tempos de retenção relativos entre um controlo positivo e as amostras fortificadas para um nível de concentração de analito correspondente a $\frac{1}{4} \times \text{MRPL}$ . Todos os valores se encontram dentro dos limites de aceitação estabelecido para um intervalo de confiança de 95%.....	77
<b>Tabela 6.6:</b> Diferenças de razões de abundância de ião entre um controlo positivo e as amostras fortificadas para um nível de concentração de analito correspondente a $\frac{1}{2} \times \text{MRPL}$ . Os valores a negrito encontram-se fora dos limites de aceitação estabelecidos para um nível de confiança de 95%. .....	77
<b>Tabela 6.7:</b> Diferenças de tempos de retenção relativos entre um controlo positivo e as amostras fortificadas para um nível de concentração correspondente a $\frac{1}{2} \times \text{MRPL}$ . Todos os valores se encontram dentro dos limites de aceitação estabelecidos para um intervalo de confiança de 95%.....	78
<b>Tabela 6.8</b> Diferenças de razões de abundância de ião entre um controlo positivo e as amostras fortificadas para um nível de concentração de analito correspondente a $2 \times \text{MRPL}$ . Os valores a negrito encontram-se fora dos limites de aceitação estabelecidos para um intervalo de confiança de 95%. ....	78
<b>Tabela 6.9:</b> Diferenças de tempos de retenção relativos entre um controlo positivo e as amostras fortificadas para um nível de concentração correspondente a $2 \times \text{MRPL}$ . Todos os valores se encontram dentro dos limites de aceitação estabelecidos para um intervalo de confiança de 95%.....	79
<b>Tabela 6.10:</b> Taxas de Falsos Positivos e Verdadeiros Positivos, referentes à identificação baseada em valores de $d(\text{RA})$ observados aos quatro níveis de concentração estudados, considerando os critérios estatísticos definidos para este parâmetro. ....	79
<b>Tabela 6.11:</b> Taxas de Falsos Positivos, FP, observada utilizando a diferença de razões de abundância máxima admissível usando o procedimento de triagem do LAD.....	80
<b>Tabela 6.12:</b> Taxas de Verdadeiros Positivos, TP, observada utilizando a diferença de razões de abundância máxima admissível usando o procedimento de triagem do LAD. São apresentados valores estimados para quatro níveis de concentração de analito. ....	80
<b>Tabela 6.13:</b> Taxas de Verdadeiros Positivos, TP, observadas utilizando a diferença de tempos de retenção relativos máxima admissível usando no procedimento de triagem do LAD. São apresentados valores estimados para quatro níveis de concentração de analito. ....	81
<b>Tabela 6.14:</b> Taxas de Falsos Positivos, FP, observadas utilizando a diferença de razões de abundância de iões máxima admissível indicada pela WADA. ....	81
<b>Tabela 6.15:</b> Taxas de Verdadeiros Positivos, TP, observadas utilizando a diferença de razões de abundância de iões máxima admissível indicada pela WADA. São apresentados valores estimados para quatro níveis de concentração de analito.....	82
<b>Tabela 6.16:</b> Taxas de Verdadeiros Positivos, TP, observadas utilizando a diferença de tempos de retenção relativos máxima admissível indicada pela WADA. São apresentados valores estimados para quatro níveis de concentração de analito.....	82
<b>Tabela 6.17:</b> Valores do logaritmo da razão de verosimilhança $\log(\text{LR})$ da identificação dos analitos estudados usando várias gamas de concentração, considerando os critérios de aceitação estudados definidos no presente trabalho.....	83

**Tabela 6.18:** Valores do logaritmo da razão de verossimilhança  $\log(LR)$  da identificação dos analitos estudados usando várias gamas de concentração, considerando o critério de identificação aplicado no LAD na etapa de triagem..... 83

**Tabela 6.19:** Valores do logaritmo da razão de verossimilhança  $\log(LR)$  da identificação dos analitos estudados usando várias gamas de concentração, considerando o critério de identificação definido pela WADA para a confirmação de analitos..... 84



## Lista de abreviaturas e símbolos

5 $\alpha$ Adiol – 5 $\alpha$ -androstandio-3 $\alpha$ , 17 $\beta$ -diol

5 $\beta$ Adiol – 5 $\beta$ -androstandio-3 $\alpha$ , 17 $\beta$ -diol

5 $\alpha$ THMT – 5 $\alpha$ -Tetrahidrometiltestosterona

5 $\beta$ THMT – 5 $\beta$ -Tetrahidrometiltestosterona

19NorA – 19-Norandrosterona

19NorE – 19-Noreticolanolona

A – Androsterona

AAF – resultados analíticos positivos (do inglês *Adverse Analytical Finding*)

DHEA – Di-hidroepiandrosterona

DHT – Di-hidrottestosterona

*e* – Evidência da característica

E – Epiandrosterona

Etio – Etiocolanolona

d(RA) – diferenças de razões de abundância iónicas

d(TRR) – diferenças de tempos de retenção relativos

FID – Detetor de ionização de chama (do inglês *Flame Ionization Detector*)

FP – Falsos positivos (do inglês *False Positive*)

FN – Falsos negativos (do inglês *False Negative*)

GC – Cromatografia de fase Gasosa (do inglês *Gas Chromatography*)

GC-C-IRMS – Cromatografia de fase Gasosa acoplada a Combustão seguida de Espectrómetro de Massa de Razões Isotópica (do inglês *Gas Chromatography-Combustion-Isotope Ratio Mass Spectrometry*)

GC-MS – Cromatografia de fase Gasosa acoplada a Espectrómetro de Massa (do inglês *Gas Chromatography-Mass Spectrometry*)

GC-MS/MS – Cromatografia de fase Gasosa acoplada a Espectrómetro de Massa em tandem (do inglês *Gas Chromatography-Mass Spectrometry/Mass Spectrometry*)

IPDJ,I.P. – Instituto Português do Desporto e da Juventude, I.P.

IRMS – Espectrómetro de Massa de Razões Isotópicas (do inglês *Isotope Ratio Mass Spectrometry*)

ISL – Norma Internacional para Laboratórios (do inglês *International Standard for Laboratories*)

ISPPPI – Norma Internacional para Proteção de Privacidade e Informação Pessoal (do inglês *International Standard for the Protection of Privacy and Personal Information*)

ISTI – Norma Internacional para Ensaios e Investigações (do inglês *International Standard for Testing and Investigations*)

ISTUE – Norma Internacional para Exceções de Uso Terapêutico (do inglês *International Standard for Therapeutic Use Exemptions*)

LAD – Laboratório de Análises de Dopagem

LC – Cromatografia de fase Líquida (do inglês *Liquid Chromatography*)

LR – Razão de verosimilhança (do inglês *Likelihood Ratio*)

MRM – Monitorização de Múltiplas Reações (do inglês *Multiple Reaction Monitoring*)

MRPL – Nível de desempenho mínimo requerido (do inglês *Minimum Required Performance Level*)

MS – Espectrómetro de Massa (do inglês *Mass Spectrometry*)

MS-MS – Espectrómetro de Massa em tandem

MSTFA – N-Metil-Trimetilsililtrifluoro Acetamida

NPD – Detetor de Azoto e Fósforo (do inglês *Nitrogen-Phosphorus Detector*)

O(X) – Distribuição *a priori*

O(X|e) – Distribuição *a posteriori*

p.a. – *pro analysis*

P(e|x) – Probabilidade condicional da ocorrência da evidência na presença da característica

P(X) – Probabilidade da ocorrência da característica ou probabilidade *a priori*

P(X|e) – Probabilidade condicional da ocorrência da característica perante a evidência da mesma

SIM – Monitorização de um único ião (do inglês *Single Ion Monitoring*)

SNC – Sistema Nervoso Central

T – Testosterona

TP – Verdadeiros Positivos (do inglês *True Positive*)

THC –  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol

TR – Tempo de retenção

TRR – Tempo de retenção relativo

RA- Razão de abundâncias iónicas

VIM – Vocabulário Internacional de Metrologia

-X – Ausência da característica em estudo

X – Ocorrência da característica em estudo

WADA – Agência Mundial Antidopagem (do inglês *World Anti-Doping Agency*)

# **Capítulo 1 – Introdução**

---



## 1.1. Dopagem: origens e desenvolvimentos

A utilização de substâncias ou métodos ilícitos no mundo do desporto é conhecida como dopagem. O termo dopagem pode ser definido como a utilização de substâncias ou métodos cuja ação possa ser perigosa para a saúde dos atletas, ou que permita melhorar artificialmente o seu desempenho em competições desportivas. O uso de substâncias por parte dos atletas está relacionado com diversas motivações como os benefícios financeiros e sociais de vencer, ou então como uma forma de lidar com as várias fontes de *stress* na vida desportiva, tais como as lesões, a dor, a pressão competitiva, doenças do foro psicológico ou a reforma precoce relativamente a outras carreiras (Reardon & Creado 2014; Cowan 2011; Thevis 2010a).

A determinação do efeito de substâncias dopantes no desempenho dos atletas é difícil, não sendo ainda totalmente conhecidos os efeitos tóxicos e secundários da sua utilização, sendo esta uma das razões que justificam a proibição da sua utilização em competições desportivas (Cowan 2011).

A utilização de substâncias estimulantes que permitem a melhoria na performance dos atletas é bastante antiga. São vários os relatos que evidenciam tais práticas, como por exemplo a utilização por parte dos atletas gregos, no terceiro século antes de Cristo, de dietas especiais com sementes de sésamo ou cogumelos alucinógenos, ou poções com base em bebidas alcoólicas, de forma a obter uma vantagem competitiva. Nessa época, a dopagem era já considerada uma prática não-ética e contra as regras, sendo que as sanções aplicadas aos indivíduos que recorriam a estas práticas eram muito mais severas que atualmente. Nos tempos modernos e com o desenvolvimento do conhecimento médico e farmacológico juntamente com o desenvolvimento da prática desportiva, tornaram-se mais frequentes e diversificadas as tentativas de melhorar artificialmente o desempenho, surgindo assim a necessidade de controlar a utilização deste tipo de substâncias. Esta regulação começou a ser efetuada através da simples proibição da utilização de determinadas substâncias, mesmo sem existirem formas de controlar se estas eram utilizadas pelos atletas (World Anti-Doping Agency 2014; Cowan 2011; Reardon & Creado 2014; Müller 2010; Thevis 2010a).

As federações de futebol e de ciclismo foram as primeiras a dar início à pesquisa de substâncias dopantes nos fluídos biológicos dos atletas que competiam nos respetivos campeonatos mundiais. As primeiras análises antidopagem a nível olímpico foram realizadas nos jogos Olímpicos de 1968. Com o passar dos anos, e de forma a evitar a deteção das substâncias dopantes por procedimentos analíticos mais avançados, foram sendo desenvolvidas formas de doping mais sofisticadas e complexas (World Anti-Doping Agency 2011; Reardon & Creado 2014).

Uma destas novas formas de dopagem, a chamada dopagem de sangue (do inglês *blood doping*), é um método que consiste no uso de técnicas ou substâncias ilegais de forma a alterar a composição sanguínea do atleta, neste caso, aumentando o número de glóbulos vermelhos que por sua vez permitem um aumento do transporte de oxigénio para os músculos e, assim, levando a uma melhoria do desempenho do atleta. A prática desta forma de dopagem é recorrente desde a década de 70 do século XX, em particular através da recolha de sangue do atleta, com valores elevados de teor em glóbulos vermelhos, e a sua injeção antes da competição. Apesar da sua proibição por parte do Comité Olímpico Internacional, a não existência de uma forma de deteção fiável desta forma de dopagem impossibilitou o seu controlo (World Anti-Doping Agency 2016b; Reardon & Creado 2014).

O combate à dopagem surge assim como uma importante tarefa das sociedades de forma a preservar o “espírito” desportivo e a assegurar a igualdade, honestidade e a saúde dos atletas. Este combate começou com um trabalho conjunto por parte da comunidade científica e do governo de diversos países, que produziu regulamentações antidopagem não harmonizadas. De forma a estabelecer

um conjunto de normas uniformes aplicadas a todos os desportos e países, foi criada em 1999 a Agência Mundial Antidopagem (WADA, do inglês *World Anti-Doping Agency*), uma agência internacional, independente e não judicial. A WADA tem assim como missão promover, coordenar e monitorizar a luta contra a dopagem no desporto a nível mundial (World Anti-Doping Agency 2014; Reardon & Creado 2014; Thevis 2010a).

De forma a harmonizar e coordenar as regras no mundo desportivo a nível internacional, no que diz respeito ao combate à dopagem, assim como promover a saúde, justiça e igualdade entre os atletas de todo o mundo, foi criado o Código Mundial Antidopagem: o primeiro documento regulador antidopagem com aceitação a nível global (World Anti-Doping Agency 2011; Reardon & Creado 2014; World Anti-Doping Agency 2015c; Müller 2010).

O Código Mundial Antidopagem é o documento de suporte ao combate à dopagem, que se baseia num conjunto de cinco Normas Internacionais que permitem a harmonização de aspetos técnicos relevantes desta regulação. As cinco Normas Internacionais são:

- **Lista de Substâncias e Métodos Proibidos:** listagem de substâncias ou métodos cuja utilização é proibida dentro e fora de competição em desportos específicos (World Anti-Doping Agency 2017c).
- **Norma Internacional para Ensaio e Investigações (ISTI do inglês *International Standard for Testing and Investigations*):** documento cujo objetivo é o estabelecimento de diretrizes para a elaboração de planos de controlo antidopagem inteligentes e eficazes, dentro e fora de competição, bem como a manutenção da identidade e integridade das amostras desde o momento da recolha até ao momento em que chegam ao laboratório (World Anti-Doping Agency 2017b).
- **Norma Internacional para Exceções de Uso Terapêutico (ISTUE do inglês *International Standard for Therapeutic Use Exemptions*):** documento onde se encontram descritas as regras para autorização de exceções de uso terapêutico, permitindo desta forma a presença de substâncias proibidas nas amostras biológicas do atleta em questão, a sua utilização ou pose para fins terapêuticos (World Anti-Doping Agency 2016d).
- **Norma Internacional para Laboratórios (ISL do inglês *International Standard for Laboratories*):** documento cujo objetivo é a garantia da produção e emissão de resultados de ensaio válidos e harmonizados aplicável a todos os laboratórios acreditados pela WADA. Fazem também parte da ISL Documentos Técnicos específicos referentes a diversas partes dos procedimentos analíticos publicados pela WADA (World Anti-Doping Agency 2016c).
- **Norma Internacional para Proteção de Privacidade e Informação Pessoal (ISPPPI do inglês *International Standard for the Protection of Privacy and Personal Information*):** documento cujo objetivo é a garantia da proteção de dados e da privacidade de todas as partes envolvidas nas análises antidopagem (World Anti-Doping Agency 2016e; World Anti-Doping Agency 2015b).

Tanto o Código Mundial Antidopagem como as Normas Internacionais são de aplicação obrigatória por todos os signatários do Código que têm competência reconhecida para a monitorização de fluídos biológicos dos atletas. Os laboratórios envolvidos neste controlo têm também de ser acreditados segunda a Norma ISO/IEC 17025 que implica a implementação e avaliação externa e independente de um sistema de garantia da qualidade dos ensaios. Estes documentos têm como objetivo

a harmonização de políticas, regulamentações e procedimentos de monitorização dos atletas para o combate à dopagem no desporto, realizado nos países signatários (Simposium Digital Healthcare 2016).

## **1.2. Entidade de acolhimento**

O Laboratório de Análises de Dopagem (LAD), localizado em Lisboa que faz parte do Instituto Português do Desporto e da Juventude, I.P. (IPDJ, I.P.) segue as metodologias indicadas pela WADA para a monitorização de fluídos biológicos dos atletas com vista à deteção de dopagem. O laboratório encontra-se neste momento a realizar trabalho com vista a ser reconhecido pela WADA para fazer esta monitorização (Instituto Português do Desporto e da Juventude 2012).

Ao LAD compete em primeiro lugar a realização de análises de amostras de urina ou hematológicas no âmbito do Programa Nacional Antidopagem, sendo a Autoridade Antidopagem de Portugal (ADoP) responsável pelo mesmo e o principal cliente do LAD. A realização destas análises requer o desenvolvimento, implementação e validação de metodologias analíticas seguindo requisitos e metodologias da WADA. O LAD pode também realizar análises clínicas e outras que podem ser solicitadas externamente. São também competência do LAD a execução de protocolos celebrados entre o IPDJ e outras instituições e a colaboração em ações de formação e investigação que permitam contribuir para o avanço técnico-científico no âmbito do combate antidopagem (Instituto Português do Desporto e da Juventude 2012).

## 1.3. Lista de Substâncias e Métodos Proibidos

### 1.3.1. Classes de Substâncias e Métodos Proibidos

A Lista de Substâncias e Métodos Proibidos é uma das cinco Normas Internacionais e está sujeita a alterações constantes por forma a que sejam nela incluídas quaisquer novas formas de dopagem e a permitir o seu controlo por parte das autoridades responsáveis. Segundo o Código, a atualização da Lista deve ser efetuada consoante o necessário e não menos do que uma vez por ano. No que toca à inclusão de substâncias ou métodos na Lista, estes devem cumprir dois dos seguintes três critérios: ter potencial para melhorar a performance desportiva; constituir um potencial risco para a saúde do atleta ou envolver a violação do espírito desportivo (Botrè 2008; World Anti-Doping Agency 2015c).

São várias as substâncias e os métodos pertencentes à Lista de Substâncias e Métodos Proibidos, sendo que estas podem ser dadas em dez classes de acordo com a sua ação farmacológica:

- S0 – Substâncias não aprovadas para uso terapêutico;
- S1 – Agentes Anabolizantes;
- S2 – Beta-2 Agonistas;
- S3 – Hormonas Peptídicas, fatores de crescimento, substâncias relacionadas e miméticos;
- S4 – Hormonas e moduladores metabólicos;
- S5 – Diuréticos e Agentes mascarantes;
- S6 – Estimulantes;
- S7 – Narcóticos;
- S8 – Canabinóides;
- S9 – Glucocorticoides;
- M1 – Manipulação do sangue e dos seus componentes;
- M2 – Manipulação Química e Física;
- M3 – Dopagem Genética;
- P1 – Álcool;
- P2 – Beta bloqueantes.

A utilização das substâncias pertencentes às classes S0 a S5, assim como dos métodos M1 a M3 é proibida dentro e fora de competição. A utilização das substâncias pertencentes às classes S6 a S9 é apenas proibida em competição. No que diz respeito às substâncias pertencentes às classes P1 e P2, a sua utilização é apenas proibida em alguns desportos em particular (Symposium Digital Healthcare 2016; World Anti-Doping Agency 2017c).

No presente trabalho e devido ao grande número de substâncias e métodos proibidos serão apenas abordadas substâncias pertencentes às três classes com o maior número de resultados analíticos positivos (AAF do inglês *Adverse Analytical Finding*) de acordo com o relatório anual da WADA publicado em 2015 que se encontra resumido na **Tabela 1.1**, assim como a classe dos Canabinóides (World Anti-Doping Agency 2015a).

**Tabela 1.1:** Número de resultados analíticos positivos (AAF do inglês *Adverse Analytical Finding*) por classe de substâncias e métodos proibidos, encontradas em amostras analisadas no ano de 2015 pelos laboratórios acreditados pela WADA. Estes resultados positivos não devem ser confundidos com violação anti-dopagem uma vez que nestes resultados podem estar contidos casos de exceções de uso terapêutico. Adaptado de (World Anti-Doping Agency 2015a).

Classe de Substâncias	Número total de AAF	Fração de AAF correspondendo ao total de AAF (%)	Fração de AAF correspondendo ao total de amostras analisadas (%)
<b>S1 - Agentes Anabolisantes</b>	1728	50%	0,57%
<b>S6 - Estimulantes</b>	528	15%	0,17%
<b>S5 - Diuréticos e Agentes Mascarantes</b>	428	12%	0,14%
<b>S9 - Glucocorticoesteroides</b>	215	6%	0,07%
<b>S4 - Hormonas e moduladores metabólicos</b>	152	4%	0,05%
<b>S8 - Canabinóides</b>	127	4%	0,04%
<b>S3 - Beta-2 Agonistas</b>	115	3%	0,04%
<b>S2 - Hormonas Peptídicas, fatores de crescimento, substâncias relacionadas e miméticos</b>	98	3%	0,03%
<b>S7 - Narcóticos</b>	21	1%	0,01%
<b>P2 – Beta-bloqueantes</b>	19	1%	0,01%
<b>M2 – Manipulação Química e Física</b>	1	0,03%	0,0003%
<b>P1 – Álcool</b>	0	0%	0%
<b>M1 - Manipulação do sangue e dos seus componentes</b>	0	0%	0%

### 1.3.2. Agentes Anabolisantes

Os agentes anabolisantes são uma classe de compostos químicos que incluem os esteroides anabolisantes exógenos (não produzidos pelo organismo) e endógenos, bem como outros agentes anabolisantes que não pertençam à família dos esteroides. De acordo com o relatório da WADA de 2015, a sua utilização é bastante frequente entre atletas, representando a grande maioria das substâncias proibidas encontradas nas amostras desse ano (Simposium Digital Healthcare 2016; World Anti-Doping Agency 2015a).

A utilização de esteroides anabolisantes exógenos no mundo desportivo surgiu como uma forma de recuperação após *stress* e exaustão massivas. O seu desenvolvimento teve como ponto de partida o isolamento, caracterização estrutural e posterior síntese da hormona sexual masculina testosterona, naturalmente produzida por conversão do colesterol, e a partir da qual foram sintetizados vários derivados (precursores e metabolitos). Uma grande variedade destes compostos pode ser encontrada na Lista de Substâncias e Métodos Proibidos e a sua presença em amostras biológicas é estritamente proibida (Müller 2010; World Anti-Doping Agency 2017c; Polet 2015).

O uso de esteroides anabolisantes é acompanhado por dois tipos de efeitos: os efeitos anabólicos e os efeitos androgénicos. Na sua utilização para fins de dopagem, o efeito androgénico é considerado um efeito indesejável uma vez que conduz ao desenvolvimento e acentuação de caracteres sexuais secundários masculinos, podendo também originar efeitos feminizantes no homem, uma vez que o excesso de androgénios em circulação conduz à sua aromatização em estrogénios (hormona sexual feminina). Relativamente ao efeito pretendido, efeito anabólico, este é responsável pelo aumento do anabolismo (crescimento celular) e diminuição do catabolismo proteico, o aumento no número de glóbulos vermelhos como consequência da estimulação da eritropoietina, aumento da deposição de cálcio nos ossos, aumento da curva de crescimento e aumento da força muscular. Em jovens, conduz também ao encerramento precoce das cartilagens o que leva a que estes possam não atingir a estatura determinada geneticamente (Simposium Digital Healthcare 2016; Polet 2015).

Outro dos motivos pelo qual são utilizados esteroides anabolisantes prende-se com a melhoria da capacidade de recuperação muscular uma vez que permitem o aumento da síntese proteica a nível muscular, reparando as células destruídas no decorrer da fase catabólica (Simposium Digital Healthcare 2016).

Em relação aos efeitos adversos é de salientar ainda que a sua severidade é dependente da dose e duração do período de administração bem como do sexo do utilizador. Para além dos efeitos androgénicos descritos anteriormente, são também efeitos adversos o aumento do risco de doenças cardiovasculares, danos a nível hepático, alterações no sistema reprodutor e efeitos neuropsiquiátricos como o aumento da agressividade, alterações de humor, depressão ou psicose. Podem ainda surgir sintomas de dependência e abstinência a longo termo (Simposium Digital Healthcare 2016; Polet 2015).

Relativamente aos esteroides naturalmente produzidos pelos humanos, esteroides endógenos, estes estão sempre presentes nas amostras de urina ou sangue, sendo a sua concentração variável entre indivíduos como é o caso da testosterona, que apresenta geralmente valores mais elevados em indivíduos do sexo masculino. Contrariamente aos esteroides exógenos, cuja presença em amostras biológicas é prova suficiente para justificar uma violação de dopagem, no caso dos esteroides endógenos a situação é mais complexa e requer a utilização de diferentes metodologias que permitam distinguir entre abuso de substâncias farmacológicas e produção natural das hormonas (Renterghem et al. 2010; Polet 2015).

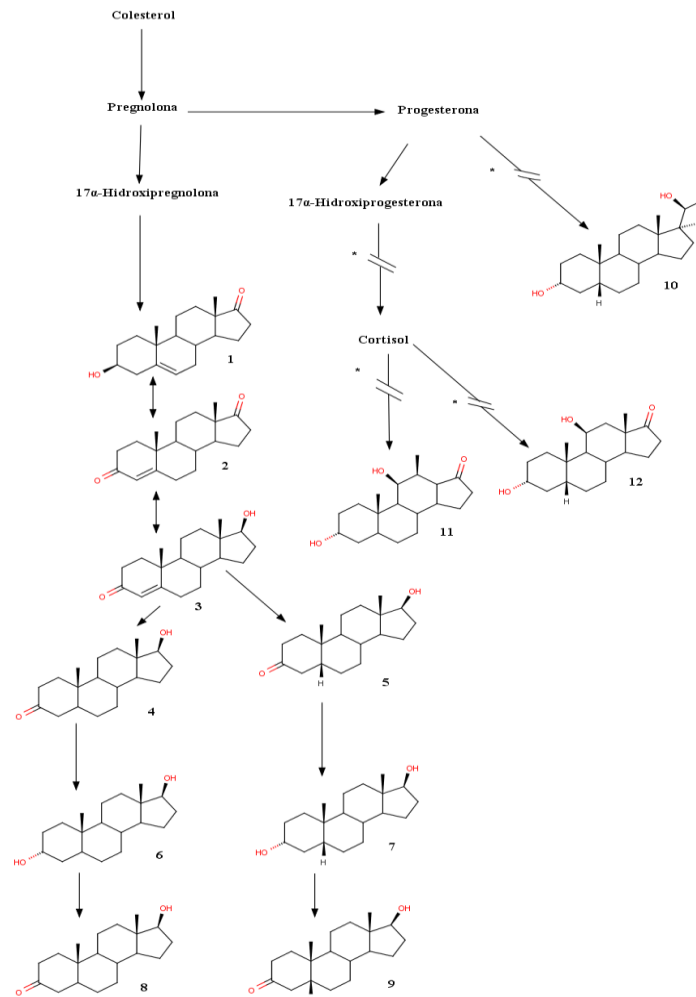
Uma das metodologias usadas para distinguir a origem dos esteroides, que envolve o conceito de “Perfil esteroideal urinário”, consiste na avaliação das concentrações e rácios de várias hormonas

esteroidais endógenas, bem como dos seus metabolitos e precursores. A avaliação do perfil esteroidal, envolve a medição dos seguintes esteroides endógenos, cujo esquema de biossíntese se encontra apresentado na **Figura 1.1**:

- Testosterona (T);
- O epímero inativo da testosterona, epitestosterona (E);
- Cinco metabolitos da testosterona, di-hidrotestosterona (DHT), androsterona (A), etiocolanolona (Etio), 5 $\alpha$ -androstano-3 $\alpha$ , 17 $\beta$ -diol (5 $\alpha$ Adiol) e 5 $\beta$ -androstano-3 $\alpha$ , 17 $\beta$ -diol (5 $\beta$ Adiol);
- O precursor da testosterona, di-hidroepiandrosterona (DHEA).

São também avaliados os rácios de concentrações dos seguintes compostos:

- Testosterona/Epitestosterona
- Androsterona/Testosterona;
- Androsterona/Etiocolanolona;
- 5 $\alpha$ Adiol/5 $\beta$ Adiol;
- 5 $\alpha$ Adiol/Epitestosterona.



**Figura 1.1:** Esquema de biossíntese de esteroides endógenos [1] DHEA; [2] 4-Androstene-3,17-diona; [3] Testosterona; [4] DHT; [5] 5 $\alpha$ -DHT; [6] 5 $\alpha$ Adiol; [7] 5 $\beta$ Adiol; [8] Androsterona; [9] Etiocolanolona; [10] Pregnanediol; [11] 11 $\beta$ -Hidroxiandrosterona; [12] 11 $\beta$ -Hidroxi-etio-colanolona. Adaptado de (Mareck et al. 2008)

A avaliação destes rácios é utilizada como um método de triagem seguindo-se uma análise confirmatória por cromatografia de fase gasosa acoplada a espectrometria de massa de razões isotópicas

de átomos (GC-C-IRMS). Esta técnica permite a discriminação entre a testosterona endógena e exógena uma vez que a proporção em  $^{13}\text{C}$  é diferente entre a forma sintética e a naturalmente produzida por metabolismo do colesterol (Mareck et al. 2008; Renterghem et al. 2010; Sottas et al. 2010; Polet 2015).

Na avaliação de dopagem recorrendo a esteroides, há ainda que ter em conta um conjunto de fatores que quando presentes influenciam o perfil esteroidal, quer por supressão como por estimulação da produção endógena, e que como tal devem ser tidos em conta e monitorizados (World Anti-Doping Agency - Laboratory Expert Group 2016).

### 1.3.3. Diuréticos e agentes mascarantes

Os diuréticos são uma classe de agentes terapêuticos cuja utilização promove um aumento da excreção renal de água e eletrólitos como consequência da sua ação interferente nos transportadores iónicos dos nefrónios. Esta interferência ao nível da reabsorção renal de sódio, de outros catiões e também de ácido úrico, conduz a um aumento da sua excreção que é acompanhada por um aumento da eliminação de água (Ventura & Segura 2010; Ventura & Segura 1996; Cadwallader et al. 2010).

Quanto à sua classificação, esta pode ser relativa à sua estrutura química, ao seu mecanismo de ação, ao local de atuação no nefrónio, à sua eficácia diurética, efeitos na excreção de potássio e semelhança com outros diuréticos. (Ventura & Segura 2010; Cadwallader et al. 2010).

A nível clínico, os diuréticos são utilizados como forma de ajustar o volume e concentração dos fluidos corporais ou para eliminar o excesso de fluidos nos tecidos, sendo administrados em casos como o controlo da hipertensão arterial, diminuição de edemas ou no combate à doença cardíaca congestiva (Simposium Digital Healthcare 2016; Cadwallader et al. 2010).

No mundo do desporto a utilização de diuréticos é ilegal, tanto dentro como fora de competição, uma vez que estes podem ser utilizados para fins de dopagem. A administração de diuréticos nestes casos está normalmente relacionada com dois motivos: a redução de peso corporal em desportos onde existam categorias de peso ou então mascarar a toma de agentes dopantes através da redução da sua concentração na urina. Este efeito mascarante pode ser atingido quer através da diluição das substâncias na urina por aumento do volume de água excretado, quer através da alteração do pH urinário que inibe a excreção passiva de xenobióticos ácidos ou básicos (Cadwallader et al. 2010; Simposium Digital Healthcare 2016; Technische Universität München 2016a).

A administração de diuréticos pode ser tanto aguda como crónica, sendo as doses administradas muito superiores aos limites terapêuticos. Assim, os atletas podem utilizar diuréticos numa dose única algumas horas antes de uma competição para fins mascarantes ou então abusar cronicamente destes durante meses. As substâncias desta classe mais frequentemente utilizadas por atletas (furosemida, hidroclorotiazida, triantereno) têm um curto tempo de semivida sendo de difícil deteção caso as amostras de urina não sejam colhidas cerca de 24-48 horas após a última administração (Cadwallader et al. 2010).

Relativamente aos efeitos adversos e secundários do abuso destas substâncias, podem ser destacadas a ocorrência de perturbações do ritmo cardíaco devidas a alterações no metabolismo do potássio que podem conduzir à morte, perturbações do equilíbrio hídrico por perda excessiva de água que podem levar à desidratação, alterações no metabolismo glucídico com tendência para a hiperglicemia, câibras musculares e ainda conduzir a um aumento da concentração de ácido úrico no sangue (Simposium Digital Healthcare 2016; Technische Universität München 2016a).

Quanto ao metabolismo desta classe de substâncias, a grande maioria é excretada na urina na sua forma original, sendo a metabolização bastante reduzida e permitindo a deteção da substância-mãe em

muitos dos compostos. Existem também substâncias como a Espironolactona que é quase completamente metabolizada, dando origem a metabolitos com atividade diurética como a Canrenona (Ventura & Segura 2010)

Os compostos pertencentes à presente classe não são considerados como melhoradores da performance desportiva, mas são proibidos por serem utilizados com o intuito de mascarar a administração de outros compostos ilegais. O seu efeito mascarante passa, tal como descrito anteriormente, por uma redução da concentração de outras substâncias proibidas ou seus respetivos metabolitos na urina, através da sua diluição ou redução da sua excreção. Existem também casos em que o efeito mascarante pretendido se baseia na interferência das análises laboratoriais realizadas. Desta forma, esta classe é bastante diversa, não incluindo apenas os diuréticos, mas também outras substâncias como por exemplo a Probenecida, a Epitestosterona ou ainda expansores plasmáticos (Ventura & Segura 2010; World Anti-Doping Agency 2017c).

#### 1.3.4. Estimulantes

Um estimulante é qualquer agente cuja administração permita a melhoria de uma função fisiológica, mimetizando a ação de um neurotransmissor excitatório ou atuando como antagonista relativamente a um neurotransmissor inibitório (Docherty 2008).

No contexto de dopagem, os estimulantes representam um conjunto vasto de substâncias que atuam a nível do sistema nervoso central (SNC) e que incluem tanto substâncias utilizadas para fins terapêuticos, como substâncias ilegais, extratos de algumas plantas ou bebidas e cuja utilização é proibida apenas em competição. São uma das classes de agentes de dopagem mais antigas, cuja utilização data desde o período pré-Inca onde eram consumidas folhas de coca (planta de onde é extraída a cocaína) pelo seu potencial de redução de dor e fadiga (Thevis et al. 2010; Deventer 2006; Docherty 2008).

Os estimulantes, incluindo todos os seus isómeros óticos, encontram-se divididos em estimulantes específicos e não específicos. São exceções os derivados tópicos/oftálmicos da Imidazole ou os estimulantes incluídos no programa de monitorização de 2016 como o Bupropion, a cafeína ou a nicotina entre outros (World Anti-Doping Agency 2017c).

A administração de estimulantes resulta numa grande variedade de efeitos como a inibição da perceção de fadiga, o aumento da estimulação do sistema cardíaco e metabólico, o aumento do estado de alerta, da competitividade e da agressividade (Verroken 2000; Simposium Digital Healthcare 2016; Deventer 2006).

A nível clínico, os estimulantes começaram por ser utilizados há mais de 5000 anos no tratamento de constipações, tosse, asma, dores de cabeça e mais recentemente em casos de depressão ou como redutores de apetite. A sua utilização era, no entanto, acompanhada por efeitos secundários severos como paranoia ou a dependência. Atualmente, e com todos os avanços na área da farmacologia e da química orgânica, foram sintetizados estimulantes cujo potencial de incremento dos efeitos desejados foi aumentado, enquanto o efeito de dependência foi eliminado (Deventer 2006).

Relativamente ao mecanismo de ação dos estimulantes que atuam a nível do SNC, a grande maioria destes atua no sistema monoaminérgico, sendo conhecidos pelo menos três diferentes modos pelos quais o processo de neurotransmissão é influenciado:

- Aumento da libertação de neurotransmissores (dopamina, noradrenalina ou serotonina) na fenda sináptica;

- Estimulação direta do neurónio pós-sináptico;
- Inibição da recaptura de neurotransmissores pelo neurónio pós-sináptico.

O modo de ação descrito do estimulante depende da sua estrutura química e afinidade para com os recetores, sendo que por exemplo as anfetaminas atuam pelo primeiro mecanismo promovendo a libertação de neurotransmissores, enquanto a cocaína atua através da inibição da recaptura destes (Thevis et al. 2010; Docherty 2008).

A utilização de estimulantes para fins de dopagem é feita com o intuito de conseguir efeitos semelhantes ao do neurotransmissor adrenalina, como o aumento da excitação, melhoria dos reflexos, aumento da capacidade de tolerância ao esforço físico e diminuição do limiar da dor, sendo maioritariamente utilizados como melhoradores da performance por praticantes de desportos onde é necessária força explosiva ou em provas de resistência. A sua utilização é mais provável no próprio dia da competição, no entanto podem também ser utilizados durante o treino permitindo uma maior intensidade de esforço (Verroken 2000; Simposium Digital Healthcare 2016; Avois et al. 2006).

Os estimulantes podem ainda ser utilizados com o intuito de melhorar a concentração ou aumentar a agressividade e ainda como forma de perder peso por parte de atletas que participem em desportos com categorias de peso, devido ao seu efeito supressor do apetite. Para além da sua utilização para fins de dopagem, alguns estimulantes são ainda bastante utilizados como drogas recreativas pelas suas propriedades excitatórias e euforizantes (Deventer 2006).

É de salientar que os efeitos dos estimulantes que permitem uma melhoria da performance desportiva são moderados caso não sejam utilizadas grandes doses destas substâncias. Desta forma o seu consumo moderado é visto mais como um condicionante psicológico. Os estimulantes mais utilizados para fins de dopagem são o Metilfenidato, a Anfetamina e a Cocaína. São ainda utilizados como estimulantes a nicotina e a cafeína apesar de não fazerem parte da Lista de Substâncias e Métodos Proibidos da WADA (Technische Universität München 2016b; World Anti-Doping Agency 2015a; World Anti-Doping Agency 2017c)

Os efeitos secundários do uso de estimulantes, quer seja para fins de dopagem, para uso recreativo ou para fins medicinais, são bastante severos e estão relacionados em parte com a estrutura química e com o tipo de substância (Docherty 2008; Technische Universität München 2016b). Para algumas substâncias como as anfetaminas e seus derivados ou a cocaína existem não só os problemas de dependência física e psicológica, mas existem também relatos de mortes súbitas por problemas cardiovasculares ou termorregulatórios, uma vez que os sinais anunciadores de golpe de calor e de desidratação se encontram inibidos. São também efeitos secundários a confusão mental, alucinações, delírio, crises hipertensivas, colapsos circulatórios e hemorragias cerebrais como consequência do aumento da tensão arterial e da frequência cardíaca entre outros (Docherty 2008; Simposium Digital Healthcare 2016).

### 1.3.5. Canabinóides

Canabinóides é o nome atribuído aos princípios ativos da planta *Cannabis sativa*, um arbusto originário das regiões tropicais e temperadas onde cresce livremente (Honório et al. 2006). A Cannabis pode ser utilizada para consumo de três formas: na forma herbácea (marijuana) constituída pelas folhas e flores secas, na forma resinosa (haxixe) constituída pela resina que se encontra nos tricomas das flores e inflorescências da Cannabis que é prensada em blocos, e na forma de óleo que resulta da destilação ou extração dos princípios ativos da planta (McDermott 2011; United Nations Office on Drugs and Crimes 2012).

A Cannabis é conhecida pelo seu grande potencial terapêutico, sendo que a sua utilização data de há mais de 2000 anos, quer para fins medicinais como para alimentação ou rituais religiosos. A utilização de Cannabis está também associada a severos efeitos psicotrópicos. Atualmente o uso medicinal é apenas permitido em alguns países como forma de alívio de sintomas relacionados com doenças como o cancro, a SIDA ou a esclerose múltipla (Honório et al. 2006).

A Cannabis pode ainda ser utilizada para fins recreativos e de dopagem pelas suas propriedades euforizantes e diminuição da ansiedade, sendo uma das substâncias ilícitas mais utilizadas globalmente (United Nations Office on Drugs and Crimes 2012; Saugy et al. 2006).

No mundo do desporto, a utilização de Cannabis e seus derivados encontra-se proibida em competição para todas as modalidades, uma vez que preenche dois dos três critérios definidos no Código relativamente à proibição de substâncias: lesam ou têm potencial para lesar a saúde e violam o espírito desportivo. Em alguns desportos onde é importante um controlo da ansiedade e da prontidão desportiva, o consumo de canabinóides preenche ainda o terceiro critério, uma vez que permite uma melhoria do rendimento desportivo (Simposium Digital Healthcare 2016; Bergamaschi & Crippa 2013).

As melhorias na performance associadas ao consumo de Cannabis encontram-se também relacionadas com o seu potencial sedativo e de diminuição do estado de alerta que podem ser utilizadas como forma de melhorar a qualidade e tempo de descanso e recuperação (Saugy et al. 2006; Bergamaschi & Crippa 2013).

Por outro lado, o consumo de Cannabis pode ser também prejudicial na prática desportiva aumentando o risco de lesão uma vez que afeta grande parte das funções psicomotoras como a coordenação de movimentos, o tempo de reação, a perceção ou a acuidade visual. Estes efeitos secundários podem representar um risco de acidentes agravado ou mesmo de morte. Podem ainda ser considerados efeitos secundários a dependência física e psíquica (Simposium Digital Healthcare 2016).

A Cannabis contém mais de 400 compostos químicos diferentes, incluindo pelo menos 61 canabinóides. Destes compostos, a substância com maior atividade psicoativa e responsável pelos efeitos tóxicos após utilização é o  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol (THC), sendo que os restantes canabinóides são responsáveis por efeitos menos intensos, tal como o canabinol que possui 10 % da atividade psicoativa do THC (Huestis et al. 2011; Bergamaschi & Crippa 2013).

Nos últimos anos, o problema dos canabinóides tomou maiores proporções com o aparecimento de derivados sintéticos com maior potência e com efeitos secundários pouco conhecidos até à data, que podem apresentar diversos riscos para a saúde. Estes derivados encontram-se atualmente incluídos na Lista de Substâncias e Métodos Proibidos não apresentando, no entanto, grande número de ocorrências nas amostras analisadas em 2015 (Brabanter 2013).

## 1.4. Amostras biológicas em análises de dopagem

### 1.4.1. Recolha de amostras biológicas

O procedimento de recolha de amostras biológicas para análise deve ter em conta tanto os aspetos legais como científicos, desta forma deve ser salvaguardada tanto a saúde do indivíduo avaliado assim como a cadeia de custódia da amostra, evitando que esta seja incorretamente etiquetada, contaminada ou trocada. Para tal, devem ser seguidos procedimentos e instruções técnicas adequadas para a colheita de amostras para controlos de dopagem (Cowan 2011).

A recolha das amostras deve ser realizada de acordo com o programa de amostragem definido pela autoridade antidopagem nacional e tendo em conta as orientações do ISTI de forma a manter a integridade e identidade destas, recorrendo para tal ao desenvolvimento de um sistema de cadeia de custódia (Symposium Digital Healthcare 2016; World Anti-Doping Agency 2017b).

No processo de recolha, as colheitas são divididas em amostra **A** e amostra **B**. A primeira, é utilizada para realização de análises enquanto a segunda é armazenada. A amostra **B** apenas é utilizada quando solicitada pelo atleta, para contra-análise no caso de se obter a indicação da presença de alguma substância proibida na amostra A (World Anti-Doping Agency 2016c).

### 1.4.2. Tipos de amostras biológicas

A urina é o tipo de fluido biológico preferencial para análise uma vez que a sua recolha é não invasiva e está disponível em quantidade suficiente. É possível a deteção, em amostras de urina, de xenobióticos ou dos seus metabolitos em quantidades relativamente elevadas por um período de tempo alargado. Por outro lado, este tipo de amostras tem como desvantagens a presença da substância ativa em concentrações relativamente baixas, sendo maioritária a presença de metabolitos ou da forma conjugada desta, e difícil a estimativa da relação entre a concentração da substância ativa na urina e no sangue. É ainda uma desvantagem a sua fácil substituição pelo indivíduo avaliado uma vez que a recolha é feita pelo próprio (Cowan 2011).

O outro tipo de amostra de análise possível, é o sangue. A sua principal vantagem em relação às amostras de urina prende-se com a salvaguarda da origem, uma vez que a recolha é efetuada por um profissional de saúde. A interpretação das concentrações das substâncias presentes é mais simples e é também possível a deteção de substâncias que não são excretadas pela urina, como é o caso da hormona de crescimento humano (Cowan 2011).

O chamado controlo tradicional que se baseia na deteção de substâncias proibidas ou dos seus metabolitos numa amostra biológica de um dado atleta é uma abordagem eficaz, no entanto, esta apresenta algumas limitações, mais concretamente em casos em que são utilizadas substâncias em regime intermitente, em baixas concentrações, ou substâncias modificadas que não são facilmente detetadas por técnicas analíticas convencionais. Desta forma, a recolha de amostras de sangue é atualmente uma necessidade devido ao surgimento de novas formas de doping cujo objetivo é o aumento da concentração de hemoglobina. (Cowan 2011; World Anti-Doping Agency 2016a)

Através de alguns testes é possível determinar a utilização de substâncias e hormonas que possibilitam o aumento do teor de hemoglobina, no entanto existem formas de evitar esta deteção e obter o mesmo resultado em termos de desempenho. Desta forma, surgiu o conceito de passaporte biológico do atleta, cujo princípio passa pela recolha periódica de amostras de sangue e monitorização de variáveis

selecionadas (biomarcadores) ao longo do tempo, permitindo assim avaliar os efeitos do doping em casos onde as análises tradicionais falham (Cowan 2011; World Anti-Doping Agency 2016a).

A utilização do passaporte biológico não substitui o controlo tradicional antidopagem, mas funciona, no entanto, como um complemento que permite um combate mais eficaz contra a dopagem. (World Anti-Doping Agency 2016a)

O passaporte biológico incide em dois níveis de identificação:

- identificação na melhoria do transporte de oxigénio através do recurso a agentes estimulantes de eritropoiese ou a qualquer forma de manipulação ou transfusão de sangue;
- identificação da utilização de esteroides anabolisantes androgénicos e de outros agentes anabólicos como os moduladores seletivos do recetor de androgénio. (World Anti-Doping Agency 2016a).

Existem ainda outras matrizes biológicas que podem ser recolhidas para análises de dopagem como por exemplo cabelo ou saliva. O cabelo pode ser usado para deteção de substâncias dopantes, uma vez que estas são nele incorporadas durante o crescimento, permanecendo estáveis durante largos períodos de tempo, o que permite ter uma perceção da forma de utilização de substâncias ao longo do tempo. Por outro lado, neste tipo de amostras a deteção de substâncias de administração única e em doses baixas é difícil estando sujeita a algum atraso devido ao lento crescimento do cabelo. Atualmente, a WADA não reconhece a utilização deste tipo de amostras para o controlo de dopagem (Cowan 2011; Thevis 2010b).

### 1.4.3. Receção e armazenamento de amostras

No LAD a receção das amostras biológicas pelo laboratório é feita pelo Responsável pela Cadeia de Custódia ou pelo seu adjunto. É efetuada a verificação da informação associada à amostra, e se esta se encontra de acordo com os procedimentos em vigor. É também verificada a integridade das amostras e dos contentores de transporte, que devem estar intactos e devidamente selados, isto é, não devem apresentar sinais de possível violação. Em caso da existência de alguma não conformidade que ponha em causa a validade dos resultados, esta deve ser documentada e é iniciado o procedimento de gestão de trabalho não conforme, que envolve a comunicação da ocorrência ao cliente (World Anti-Doping Agency 2016c; Simposium Digital Healthcare 2016).

Depois de efetuada a avaliação inicial, as amostras conformes são etiquetadas com um código interno de forma a preservar o anonimato do atleta e a minimizar o risco de troca de identidade destas (World Anti-Doping Agency 2016c; Simposium Digital Healthcare 2016).

O armazenamento das amostras é efetuado de forma diferente para a amostra **A** e **B**. As amostras **B** são armazenadas dentro dos respetivos contentores a -20 °C até ser requerida uma contra-análise ou até à sua destruição física ou eliminação de qualquer forma de identificação que permita o reconhecimento da proveniência. Estas amostras devem ser armazenadas entre 120 dias a 8 anos após emissão do relatório de ensaio (World Anti-Doping Agency 2016c; Simposium Digital Healthcare 2016).

Os frascos das amostras A são abertos e pipetadas alíquotas que são armazenadas a 4 °C durante o período de realização das análises, sendo o remanescente do volume de amostra conservado a -20 °C.

## 1.5. Abordagem Analítica

O desenvolvimento de metodologias analíticas só por si não é suficiente para garantir a qualidade das análises de controlo de dopagem. É necessário conhecimento relativamente à aplicabilidade da metodologia assim como o conhecimento da farmacocinética da substância a ser analisada, isto é, as alterações a que esta é sujeita desde que é administrada até ao momento em que é excretada (Beckett & Cowan 1979).

O controlo de dopagem efetuado durante os períodos de competição é da responsabilidade das associações desportivas organizadoras nacionais ou internacionais que se encarregam da recolha de amostras que são posteriormente enviadas para análise. Nestas análises é esperado que sejam pesquisadas, pelos vários procedimentos de triagem, a presença de todas as substâncias e respetivos metabolitos da Lista de Substâncias e Métodos Proibidos. Nas amostras a analisar no período fora de competição, as substâncias que devem ser pesquisadas são prioritariamente os esteroides anabolisantes, uma vez que estes possuem efeitos que se manifestam a longo termo sendo por isso utilizados durante o período de treino (Müller et al. 1995).

Apesar do aumento constante do número de substâncias e métodos da Lista de Substâncias e Métodos Proibidos, o desafio em termos analíticos para os especialistas mantém-se o mesmo: a melhoria da eficiência das análises antidopagem de forma a reduzir ao máximo a percentagem de resultados falsos negativos assim como de falsos positivos (Botrè 2008).

A grande maioria das substâncias utilizadas para fins de dopagem, à exceção dos esteroides anabolisantes, são administradas em concentrações próximas ou iguais das respetivas doses terapêuticas, tendo como resultado a sua ocorrência nos fluidos biológicos em concentrações bastante reduzidas, as amostras podem ser acompanhadas por um formulário no qual são declaradas, pelo atleta, as substâncias para as quais foi autorizado o uso terapêutico mas na maioria dos casos não existe nenhuma informação relativa à presença ou ausência de substâncias ou classes de compostos. Desta forma, são necessários procedimentos de triagem que sejam ao mesmo tempo sensíveis e abrangentes nas substâncias que detetam (Cowan 2011).

Outro fator crítico a ter em conta na análise de amostras e interpretação de resultados prende-se com a estabilidade dos xenobióticos na matriz em questão. A perda de analito por degradação térmica, química ou enzimática, metabolismo, hidrólise ou a presença de interferentes que degradem a matriz, são possibilidades que advêm das condições de transporte, armazenamento ou manuseamento da amostra e que devem ser tidas em conta (Jiménez et al. 2006)

Apesar de na maioria dos casos serem as “substâncias-mãe” a estarem presentes na lista de substâncias proibidas, os procedimentos de triagem devem abranger a deteção tanto destas como dos seus metabolitos relevantes. Uma vez que a “substância-mãe” não é excretada na sua forma ativa, isto é, a sua excreção é efetuada após metabolização ou conjugação, o conhecimento da via metabólica desta é fulcral. Assim, um resultado positivo baseia-se na presença e identificação da “substância-mãe” em questão e / ou dos seus respetivos metabolitos (Cowan 2011).

De uma forma geral, as análises de dopagem envolvem a deteção, identificação e, em alguns casos, a demonstração da presença de substâncias acima de um limite de decisão definido (World Anti-Doping Agency 2016c; World Anti-Doping Agency 2017a).

Assim, os laboratórios envolvidos nas análises de dopagem têm de conseguir confirmar a presença de cada uma das substâncias pesquisadas acima de um nível de desempenho mínimo exigido definido pela WADA (do inglês *Minimum Required Performance Level – MRLP*. Cada substância, metabolito,

marcador ou método pertencente à Lista de Substâncias e Métodos Proibidos tem um valor de MRLP definido (World Anti-Doping Agency 2016c; Cowan 2011; World Anti-Doping Agency - Laboratory Expert Group 2015a).

As técnicas analíticas mais utilizadas para identificação e quantificação da presença de substâncias proibidas, seus metabolitos, marcadores ou de métodos proibidos são as técnicas separativas cromatográficas, cromatografia de fase gasosa (GC) ou cromatografia de fase líquida (LC), acopladas a espectrómetros de massa (MS), espectrómetros de massa em tandem (MS-MS) ou a espectrómetros de massa de razões isotópicas (IRMS). A utilização destas técnicas analíticas prende-se com o elevado poder de separação da cromatografia, associado à elevada sensibilidade do espectrómetro de massa. (Müller 2010; World Anti-Doping Agency 2016c; Müller et al. 1995).

A WADA define (World Anti-Doping Agency - Laboratory Expert Group 2015b) procedimentos e critérios para as análises de controlo de dopagem realizadas por técnicas cromatográficas associadas a espectrometria de massa. Estas diretrizes incluem critérios para a identificação dos compostos com base nos tempos de retenção e as abundâncias dos vários fragmentos iónicos do seu espectro de massa (Thevis 2010c).

## 1.6. Técnicas cromatográficas acopladas a espectrometria de massa

### 1.6.1. Técnicas cromatográficas

As técnicas cromatográficas incluem uma série de processos que têm como objetivo comum a separação dos componentes de uma mistura através de um conjunto de operações de equilíbrio. Esta separação é resultante da diferente partição dos componentes da mistura entre duas fases diferentes, uma estacionária de grande superfície e a outra móvel e contínua, em contacto com a primeira. A mistura a ser analisada pode ser cromatografada na fase gasosa ou líquida. Os componentes da mistura devem ser estáveis nas condições de análise e ao mesmo tempo atingir uma partição adequada entre o material da coluna de separação (fase estacionária) e a fase móvel. Os processos cromatográficos podem ser classificados de acordo com: a fase móvel e a fase estacionária; a natureza do processo de distribuição entre a fase móvel e estacionária e a natureza de introdução da amostra. A fase móvel normalmente é gasosa ou líquida enquanto a fase estacionária pode ser sólida ou então um filme líquido que reveste um suporte sólido. De acordo com as diferentes classificações, podem ser definidas diversas variações da técnica como a cromatografia de fase gasosa (GC) ou a cromatografia de fase líquida (LC) (Harvey 2000; Grob 2004).

A cromatografia de fase gasosa é uma técnica analítica bastante versátil, sendo uma das mais utilizadas nos diversos tipos de laboratórios. É aplicável a uma vasta gama de compostos de interesse que abrangem áreas como a toxicologia, farmacologia, indústria química, análises ambientais e clínicas. Quanto à natureza dos compostos a ser analisados por esta técnica, estes devem ser voláteis o suficiente para que as suas moléculas fiquem na fase gasosa a temperaturas iguais ou inferiores a 400 °C e não devem ser termolábeis, isto é, não se devem degradar facilmente após a volatilização (Dawling 2011b).

A separação de misturas por GC é feita com recurso a uma coluna, de enchimento ou capilar, através da qual os componentes da mistura são arrastados por um fluxo contínuo de uma fase móvel (gás inerte ou fluído supercrítico) desde o injetor, através da coluna, até ao detetor (**Figura 1.2**).



**Figura 1.2:** Cromatógrafo de fase Gasosa e os seus diversos componentes. Adaptado de (Agilent Technologies 2010)

De uma forma concisa, uma análise por GC segue os seguintes passos: a amostra é injetada no injetor, normalmente com recurso a uma micro-seringa, aí, esta é aquecida, vaporizada e arrastada para a coluna. Os componentes da amostra são separados com base nas suas pressões de vapor relativas e as diferentes afinidades para com a fase móvel. Posteriormente, os componentes separados são arrastados até ao detetor que gera um sinal elétrico proporcional à sua quantidade, permitindo a quantificação do analito. O detetor vai também gerar o cromatograma da análise, isto é, o gráfico do sinal dado pelo

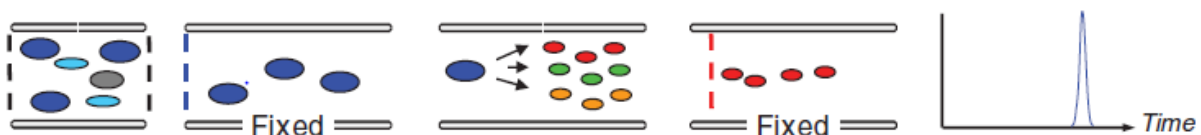
detetor em função do tempo decorrido desde a injeção (Harvey 2000; Dawling 2011b; McNair & Miller 1997).

### 1.6.2. Tipos de detetores acoplados em cromatografia

Existe uma grande variedade de detetores que podem ser acoplados ao cromatógrafo, sendo que a sua escolha depende da aplicação, do custo, sensibilidade, seletividade e linearidade da gama de trabalho. Alguns detetores permitem a obtenção de uma resposta para uma vasta gama de compostos como é o caso do FID (*Flame Ionization Detector*), enquanto outros são seletivos para compostos que possuam determinados grupos funcionais ou tipos de átomos como os detetores NPD (*Nitrogen,-Phosphorus Detector*) (Dawling 2011b).

O tipo de detetor mais utilizado no âmbito das análises de dopagem é o espectrómetro de massa. As análises em GC-MS têm por base a ionização e fragmentação das moléculas à medida que estas vão sendo separadas cromatograficamente. Os fragmentos iônicos resultantes são depois separados de acordo com a sua razão massa/carga ( $m/z$ ) à medida que entram no detetor, sendo gerado um espectro de massa de acordo com a abundância relativa de cada fragmento iónico. Habitualmente, os espectros de massa estão normalizados à abundância do pico mais abundante designado “ião base” ao qual é atribuído um valor de 100 %. Relativamente à carga, a maioria dos iões formados apresentam uma única carga, pelo que a razão  $m/z$  é equivalente à massa do próprio ião. O ião com valor de massa equivalente a massa molecular do analito designa-se por ião molecular, sendo que os iões com massas menores que esta são fragmentos do ião molecular (Dawling 2011a; Reusch 2013).

Relativamente aos métodos de aquisição, o detetor de massa pode funcionar em modo SCAN, adquirindo o espectro de massa total do composto, ou em modo SIM (do inglês *Single Ion Monitoring*), pesquisando apenas um conjunto de iões com uma razão massa/carga pré-definida, sendo os restantes ignorados. Em análises com detetores de massa em tandem, existe um terceiro modo de aquisição, o método de monitorização de múltiplas reações (MRM do inglês *Multiple Reaction Monitoring*) no qual é especificada a massa de um ião precursor que irá ser fragmentado sendo em seguida monitorizado especificamente um ião “filho”. Na **Figura 1.3**, encontra-se esquematizado o modo de aquisição por MRM. Este modo de aquisição pode ser entendido como um modo SIM de um ião fragmento. Este modo é comumente utilizado para a deteção de analitos específicos, com propriedades de fragmentação conhecidas e em amostras complexas, sendo o par ião precursor e ião fragmento chamado de transição. (Dawling 2011b; Domon & Aebersold 2006; IonSource 2016).



**Figura 1.3:** Esquema do modo de aquisição MRM no qual em primeiro lugar é isolado o ião precursor definido (a azul escuro) e seguidamente após a fragmentação é monitorizado um único ião “filho” (a vermelho) (Domon & Aebersold 2006).

### 1.6.3. Critérios de identificação

A identificação de compostos por GC-MS<sup>n</sup> é normalmente baseada na concordância dos tempos de retenção (TR) ou tempos de retenção relativos (TRR) e da razão de abundâncias dos fragmentos iónicos do espectro de massa característicos do analito (RA) entre picos da amostra e picos dos calibradores. (Bettencourt da Silva 2016).

A adequação destes parâmetros para identificação depende da sua seletividade e precisão. No caso do TR, a precisão pode ser melhorada pela determinação do TRR com base na retenção de um padrão interno adicionado aos calibradores e amostras desconhecidas (Bettencourt da Silva 2016).

Os critérios de identificação de compostos por espectrometria de massa baseiam-se na presença e abundância relativa de um dado número de iões definidos pelo laboratório como sendo iões de diagnóstico para o analito em causa (World Anti-Doping Agency - Laboratory Expert Group 2015b).

A presença do ião molecular, quando em abundância detetável, é bastante útil na identificação de substâncias, sendo, em detetores de massa em tandem, utilizados fragmentos deste que devem ser seleccionados pela singularidade da sua razão  $m/z$ . Uma vez que a presença de um dado ião a um dado TR ou TRR pode não ser suficiente seletiva, são normalmente avaliadas razões de abundâncias entre dois fragmentos iónicos. Assim, mesmo que duas substâncias fragmentem nos mesmos iões, as suas proporções tendem a ser diferentes (Bettencourt da Silva 2016).

## 1.7. Controlo da qualidade de análises qualitativas

### 1.7.1. Análises qualitativas

Uma análise qualitativa ou exame de uma propriedade nominal ou qualitativa é um processo de classificação de objetos ou materiais que é caracterizada pela natureza binária dos resultados obtidos (sim/não, presente/ausente ou positivo/negativo). Nalguns casos, a análise qualitativa está associada a uma escala ordinal como na determinação da dureza de minerais usando a escala de Mohs. A cada amostra analisada é atribuída uma classe com base em critérios previamente definidos (Bettencourt da Silva 2016; Pulido et al. 2003; Ellison 2000).

As análises qualitativas podem ser divididas em dois tipos, o primeiro tipo está associado à identificação de examinandas ou grupos de examinandas com base em sinais instrumentais quantitativos, obtidos com recurso a técnicas analíticas de grande poder como a espectrometria de massa, a cromatografia ou ambas as técnicas hifenadas. Este tipo requer o tratamento dos sinais instrumentais, normalmente o seu processamento através de programas informáticos, para que possam ser convertidos numa resposta binária. O segundo tipo envolve a classificação de amostras de forma rápida e fiável com base em critérios previamente definidos, utilizando para tal kits de testes rápidos obtendo-se uma resposta binária de forma direta (Ríos et al. 2003).

Independentemente do método de análise qualitativa que é utilizado, um exame é sempre um processo de classificação com base em uma ou mais evidências. Desta forma, e tal como para os restantes procedimentos analíticos, os procedimentos de análise qualitativa devem ser validados antes de serem utilizados, sendo para tal necessário ter em conta algumas características de desempenho de forma a garantir que o procedimento seja adequado ao fim em vista, tais como a precisão, robustez, limite de deteção e incerteza do exame (Pulido et al. 2003; Ellison et al. 1998).

Qualquer tipo de análise, seja ela química ou biológica, quantitativa ou qualitativa, não é isenta de erro, mesmo quando são seguidas todas as boas práticas de análise. Em cada análise realizada, os efeitos aleatórios e sistemáticos dão azo a erros que podem ser provenientes de várias fontes do processo e que afetam o resultado final apresentado (Singapore Accreditation Council 2008; Ellison et al. 1998).

Em análises qualitativas, pode-se encontrar dois tipos de erros relacionados com a classificação incorreta, o primeiro, denominado falso positivo (FP), ocorre quando são observadas evidências de um dado item pertencer a uma classe quando na realidade não pertence. O segundo tipo de erro é denominado falso negativo (FN) e ocorre quando não são observadas as evidências características da classe a que o item pertence. A qualidade do desempenho das análises qualitativas pode ser avaliada pelas taxas de verdadeiros positivos (TP) e verdadeiros negativos (TN) que se relacionam com as taxas de FN e FP ( $1 = TP + FN$ ;  $1 = TN + FP$ ) (Ellison et al. 1998; Salgueiro 2016).

### 1.7.2. Avaliação da Incerteza em análises qualitativas

O termo incerteza é um termo ambíguo cujo significado pode sugerir tanto dúvida como erro. Quando o termo incerteza surge associado a uma medição ou exame, expressa o nível de certeza ou confiança atribuído a esta (LeBeau 2011). A incerteza pode então ser entendida como uma medida da qualidade do resultado qualitativo ou quantitativo relevante para a interpretação objetiva deste. A expressão do nível de incerteza de resultados de itens conhecidos permite ainda evidenciar a competência dos analistas e do laboratório em questão (Pulido et al. 2003).

Em análises quantitativas, a incerteza da medição está relacionada com a confiabilidade da estimativa do valor da grandeza estudada (e.g. concentração de analito ou pH), sendo definida no Vocabulário Internacional de Metrologia (VIM) como sendo um “parâmetro não negativo que caracteriza a dispersão dos valores atribuídos a uma mensuranda, com base nas informações utilizadas” (Ríos et al. 2003; Instituto Português da Qualidade 2012).

No caso de análises qualitativas, a incerteza não pode ser expressa da mesma forma que em análises quantitativas, ou seja, como uma caracterização da dispersão de resultados. Assim, em análises qualitativas a incerteza assume uma forma probabilística e pode ser expressa como a probabilidade de o resultado estar correto (Pulido et al. 2003; Ellison 2000).

A precisão e veracidade das análises qualitativas são mais importante do que a de análises quantitativas, uma vez que qualquer quantificação parte sempre do pressuposto que o analito que se pretende quantificar está presente (Ellison et al. 1998).

A necessidade da existência de estimativas de qualidade do resultado qualitativo é então de extrema importância. O papel desempenhado pela incerteza do resultado na tomada de decisão sobre o item analisado é fulcral na medida em que permite controlar o risco da ocorrência de classificações incorretas que podem acarretar consequências para as partes envolvidas e afetadas pela decisão. Alguns exemplos de parâmetros de desempenho usados na interpretação de resultados qualitativos são a seletividade, a especificidade, o limite de detecção e as taxas de falsos positivos e de falsos negativos (Ellison 2000; Ellison et al. 1998).

Atualmente, existem na literatura vários métodos baseados no cálculo de probabilidades que estimam a incerteza associada a resultados qualitativos, no entanto, não existe consenso quanto à melhor abordagem a seguir. São exemplos destas abordagens Tabelas de Contingência, as métricas do Teorema de Bayes, curvas de desempenho ou intervalos estatísticos, apresentando todas elas vantagens e desvantagens na sua aplicação (Pulido et al. 2003; Ellison et al. 1998).

Apesar da falta de consenso relativamente à metodologia a adotar na avaliação da incerteza em análises qualitativas, esta deve refletir, de forma clara, a qualidade do resultado analítico, permitir a atualização com base em informação adicional e considerar a probabilidade dos tipos de erros relevantes para o ensaio. São ainda características desejáveis a clareza na forma de apresentação dos resultados obtidos, a facilidade de cálculo e a ampla aceitação (Ellison et al. 1998; Salgueiro 2016).

Com base nas características anteriormente descritas, o Teorema de Bayes é o suporte teórico mais adequado para a avaliação da qualidade dos resultados de exames, uma vez que permite a atualização da incerteza com base em novas evidências e combina a informação referente aos dois tipos de erros em análises qualitativas (taxas de falsos positivos e de falsos negativos) num único parâmetro (Bettencourt da Silva 2016; Ellison et al. 1998; Salgueiro 2016). É de referir ainda o uso corrente do Teorema de Bayes na estimativa de incertezas de exames no domínio da análise forense (UK's Association of Forensic Science Providers 2009; Aitken & Taroni 2004).

## 1.8. Teorema de Bayes

O Teorema de Bayes é o suporte estatístico mais antigo para expressar e atualizar probabilidades de respostas dicotômicas. A sua utilização permite estimar a probabilidade associada a resultados de análises do mesmo tipo de itens e em circunstâncias semelhantes às de um historial prévio conhecido. A sua aplicação envolve a determinação de probabilidades condicionais que permitem estimar uma incerteza mais robusta do que a utilização de probabilidades simples (Pulido et al. 2003; Ellison et al. 1998).

A fórmula canónica do Teorema de Bayes é dada pela **Equação 1.1**:

**Equação 1.1**

$$P(X|e) = \frac{P(e|X) \times P(X)}{P(e|X) \times P(X) + P(e|\neg X) \times P(\neg X)}$$

Em que  $X$  representa a ocorrência da característica em estudo (e.g. presença de um composto);  $\neg X$  a ausência da característica em estudo;  $e$  representa a evidência da presença da característica ou o resultado positivo na realização da análise (e.g. parâmetros do GC-MS/MS que sugerem a presença do analito);  $P(X)$  é a probabilidade da ocorrência da característica em estudo antes da realização da análise, também denominada por probabilidade *a priori* (e.g. frequência relativa da ocorrência do composto na matriz estudada);  $P(\neg X)$  é a probabilidade da ausência da característica em estudo antes da realização da análise ( $P(\neg X) = 1 - P(X)$ );  $P(X|e)$  é a probabilidade condicional da ocorrência da característica perante a obtenção de um resultado positivo na realização da análise (e.g. probabilidade do resultado da positivo correto);  $P(e|X)$  é a probabilidade de se obter um resultado positivo sabendo que a característica está presente (e.g. probabilidade do GC-MS/MS indicar corretamente a presença do composto) (Bettencourt da Silva 2016; Salgueiro 2016; Ellison et al. 1998). A  $P(X|e)$  representa a incerteza do resultado do exame e  $P(e|X)$  o nível de confiança associado ao método de classificação. Os termos da equação podem ser definidos para identificação de compostos por GC-MS/MS ou para outro tipo de análises qualitativas.

De todas as probabilidades descritas na **Equação 1.1**, a de mais difícil quantificação é a probabilidade *a priori*  $P(X)$ . Embora a presença de um historial de resultados possa reduzir esta dificuldade, frequentemente os dados disponíveis não têm a dimensão nem o âmbito que permita a produção de estimativas fiáveis de  $P(X)$ . Nos casos onde não é possível produzir estimativas fiáveis de  $P(X)$ , o Teorema de Bayes apresenta uma forma alternativa de expressão da incerteza do exame que se baseia apenas na ponderação das evidências analíticas e que envolve o cálculo de uma razão de verosimilhança (Ellison et al. 1998; Salgueiro 2016).

Para a dedução da razão de verosimilhança, é necessário primeiro reescrever a **Equação 1.1** em termos da ausência da característica  $X$ , obtendo-se a **Equação 1.2**:

**Equação 1.2**

$$P(\neg X|e) = \frac{P(e|\neg X) \times P(\neg X)}{P(e|X) \times P(X) + P(e|\neg X) \times P(\neg X)}$$

Dividindo os termos da **Equação 1.1** pelos termos da **Equação 1.2**, obtém-se a **Equação 1.3** que constitui a representação do Teorema de Bayes na forma de distribuições:

**Equação 1.3**

$$\frac{P(X|e)}{P(\neg X|e)} = \frac{P(e|X)}{P(e|\neg X)} \times \frac{P(X)}{P(\neg X)}$$

Nesta equação, o primeiro quociente (i.e.,  $P(X|e) / P(\neg X|e)$ ) é conhecido como a distribuição condicional de  $X$  dada a evidência  $e$ , ou distribuição *a posteriori*, que pode também ser representada pela notação  $O(X|e)$ . De forma equivalente, o quociente  $P(X) / P(\neg X)$  representa a distribuição *a priori*, representada pela notação  $O(X)$ . Por último, o quociente  $P(e|X) / P(e|\neg X)$  é frequentemente designado por razão de verosimilhança e apresentado pela notação  $LR$  ou  $O(e|X)$  (do inglês *Likelihood Ratio*) (Ellison et al. 1998; Salgueiro 2016).

A **Equação 1.3** pode assim ser apresentada da seguinte forma:

**Equação 1.4**

$$O(X|e) = O(X) \times LR(e)$$

Analisando a **Equação 1.4**, pode-se afirmar que a distribuição *a posteriori* é dada pelo produto entre a razão de verosimilhança e a distribuição *a priori*. O termo  $O(X|e)$  pode ser usado para expressar a incerteza do resultado do exame de um item se se tiver um conhecimento prévio da população do item analisado quantificada pela  $O(X)$  (Ellison et al. 1998).

A  $LR$  representa a razão entre a taxa de verdadeiros positivos ( $TP = P(e|X)$ ) e a taxa de falsos positivos ( $FP = P(e|\neg X)$ ), ou seja, a razão da probabilidade de se observar uma evidência na presença de analito e a probabilidade de se observar a evidência na ausência deste. A razão de verosimilhança associada a um resultado positivo quantifica assim quantas mais vezes é provável que o resultado positivo esteja correto do que seja errado (Bettencourt da Silva 2016).

Ambas as formas de apresentar o Teorema de Bayes (i.e., na forma de probabilidades ou distribuição) podem ser relacionadas através da **Equação 1.5**.

**Equação 1.5**

$$P(X|e) = \frac{O(X|e)}{O(X|e) + 1}$$

Nos casos em que a identificação da característica  $X$  está dependente da presença de  $n$  múltiplas evidências ( $e_1 + e_2 + \dots + e_n$ ) independentes, a distribuição *a posteriori* da primeira é utilizada como distribuição *a priori* da seguinte e assim sucessivamente, obtendo-se a **Equação 1.6**. Nestes casos a distribuição de  $X$  dadas múltiplas evidências é maior do que a distribuição associada a cada evidência se todas as  $LR$  associadas forem superior a 1 (Salgueiro 2016; Bettencourt da Silva 2016; Ellison et al. 1998)

**Equação 1.6**

$$O(X|e_1 + e_2 + \dots + e_n) = O(X) \times \prod (LR)_i$$

Nesta expressão,  $(LR)_i = P(e_i|X) / P(e_i|\neg X)$  representa a razão de verosimilhança associada à evidência  $e_i$ . A multiplicação das várias  $LR$  tem como objetivo combinar as múltiplas evidências independentes de forma a estimar a  $LR$  de resultados produzidos pela convergência de diversas evidências (Ellison et al. 1998; Bettencourt da Silva 2016).

## 1.9. Incerteza do Exame

Tendo em conta os princípios do Teorema de Bayes descritos na secção anterior, a incerteza de um exame pode ser quantificada de duas formas: como uma probabilidade  $P(X|e)$  ou distribuição  $O(X|e)$ , ou como uma razão de verosimilhança (LR) (Bettencourt da Silva 2016).

Segundo alguns autores, a forma mais correta de estimar a qualidade de um exame é através da razão de verosimilhança, uma vez que o cálculo deste parâmetro é independente do conhecimento da probabilidade *a priori* da ocorrência da característica. A LR poderá ter como desvantagem não informar sobre a probabilidade de os critérios de identificação produzirem falsos negativos. À medida que a qualidade da evidência  $e$  aumenta, a razão de verosimilhança aumenta também (Salgueiro 2016; Ellison et al. 1998; Bettencourt da Silva 2016).

A razão de verosimilhança tem vindo a ser utilizada com sucesso na área forense para reportar a incerteza do exame. A *UK's Association of Forensic Science Providers* propôs a classificação de evidências de “fraca” a “extremamente forte” com base no valor obtido de LR para o exame em questão. Na **Tabela 1.2** é apresentada a correspondência entre valores de LR a seis equivalentes verbais a serem utilizados aquando apresentação de resultados forenses em tribunal (UK's Association of Forensic Science Providers 2009; Bettencourt da Silva 2016).

**Tabela 1.2:** Correspondência entre o valor obtido para razão de verosimilhança e o seu equivalente verbal (UK's Association of Forensic Science Providers 2009).

Razão de verosimilhança (LR)	Log (LR)	Equivalente verbal de classificação da evidência
> 1 – 10	> 0 – 1	Fraca
10 – 100	1 – 2	Moderada
100 – 1 000	2 – 3	Moderadamente forte
1 000 – 10 000	3 – 4	Forte
10 000 – 1 000 000	4 – 6	Muito forte
> 1 000 000	> 6	Extremamente forte

Na avaliação da qualidade de um exame utilizando o Teorema de Bayes, uma das tarefas mais difíceis é a quantificação das taxas de resultados falso positivos. Na maioria dos casos esta taxa é extremamente pequena, sendo por isso necessário um elevado número de análises experimentais para que possa ser estimada de forma direta. Dado que, na grande generalidade dos casos, é impossível a realização de tal número de análises experimentais, devido à sua morosidade e custo, no presente trabalho a taxa de falsos positivos será estimada, de forma indireta, com recurso a simulações dos sinais instrumentais com base em modelos obtidos a partir de dados experimentais (Bettencourt da Silva 2016).

## 1.10. Método de Monte Carlo

O Método de Monte Carlo ou simulação de probabilidades é uma classe alargada de métodos computacionais que permitem, através da modelação de sistemas probabilísticos (ou estocásticos), estabelecer a distribuição para uma variedade de hipóteses. A base deste método passa pela utilização da aleatorização das variáveis utilizadas, dentro de limites realistas, para modelar um dado sistema com o objetivo de resolver problemas que podem ser considerados determinísticos, ou seja, não regidos por fenómenos aleatórios. Assim, dado um conjunto de valores para cada variável, uma simulação de Monte Carlo vai selecionar aleatoriamente um valor de cada conjunto. Este processo é repetido dezenas de

milhares ou até milhões de vezes construindo uma “imagem” real e alargada do problema em estudo (Kroese et al. 2014; Harrison 2010; Dizikes 2010).

O Método de Monte Carlo tem vindo a ganhar importância como uma ferramenta que permite resolver problemas que são analiticamente difíceis de tratar e para os quais a experimentação não é uma solução válida devido à sua morosidade e elevado custo. Enquanto numa simulação determinística é sempre obtido o mesmo resultado, numa simulação estocástica a resposta vai ser diferente para cada série de simulações dado a existência do elemento aleatoriedade (Kroese et al. 2014; Dizikes 2010).

A simulação é assim utilizada com o intuito de confirmar uma dada teoria ou analisar um conjunto de dados. As aplicações deste método podem ser dadas em três classes:

- Otimização de funções complexas;
- Integração numérica: estimativa de grandezas numéricas recorrendo a um modelo de medição;
- Distribuições de probabilidades: determinação da frequência de um objeto aleatório (Kroese et al. 2014; Harrison 2010).

As simulações Monte Carlo requerem a definição de um modelo descritivo do problema em estudo no que diz respeito ao conjunto de fatores individuais que possam afetar o resultado. Este modelo pode ser construído sob a forma de uma equação, de um programa computacional ou função que produza o resultado pretendido. Adicionalmente, são necessárias funções densidade das variáveis de entrada. Os resultados obtidos são tanto melhores quanto maior for o número de simulações porque produzem um resultado final menos afetado pelo processo de aleatorização (EURACHEM/CITAC Working Group 2012).

Quanto às desvantagens, o maior problema da utilização do Método de Monte Carlo prende-se com a grande complexidade computacional e tempo de computação necessários à realização de simulações, especialmente quando são realizadas muitas simulações. Pode também ser considerada uma desvantagem a variação do resultado pretendido entre análises devido à natureza aleatória do método numérico (Harrison 2010; EURACHEM/CITAC Working Group 2012).

Devido às necessidades computacionais do método Monte Carlo as simulações são frequentemente implementadas em *softwares* especificamente desenhados para este propósito, no entanto, é possível a utilização do MS-Excel para efetuar simulações se estas forem em número moderado (EURACHEM/CITAC Working Group 2012).

## **Capítulo 2 – Materiais e Métodos**

---



## 2.1. Reagentes

Os padrões referência de 19-Noreticolanolona (19-NorE), 5 $\beta$ -Tetrahidrometiltestosterona (5 $\beta$ THMT), 6 $\beta$ -hidroximetandienona, Drostanolona, Epimetendiol, Amiloride, Canrenona, d3-Testosterona e d3-Epitesosterona, foram adquiridos à *LGC Standards*; o de 19-Norandrosterona (19-NorA) adquirido à *Steraloids*; os padrões de referência Triantereno e Octopamina foram produzidos pela *Sigma-Aldrich Corporation*; o padrão de referência de  $\Delta$ 9-tetrahydrocannabinol foi adquirido à *Lipomed*; os padrões de referência de Carfedon, d<sub>4</sub>-Androsterona Glucorónido, d<sub>5</sub>-Etiocolanolna, d<sub>3</sub>-5 $\alpha$ diol e d<sub>5</sub>-5 $\beta$ diol foram produzidos pela *NMIA* e o padrão de referência de Modafinil adquirido à *USP*.

O metanol *pro analysis* (p.a.), o acetato de etilo p.a. e a acetona p.a. foram adquiridos à *Merck*. Os reagentes iodeto de amônio (NH<sub>4</sub>I) p.a., mercaptoetanol p.a., bicarbonato de potássio (KHCO<sub>3</sub>) p.a., carbonato de potássio (K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) p.a., hidrogenofosfato de sódio monohidratado (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O) p.a. e éter-tercbutilmetílico p.a. foram adquiridos à *Merck*; o reagente dihidrogenofosfato de sódio monohidratado (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O) p.a. foi adquirido à *Sigma-Aldrich*; o reagente N-Metil-Trimetilsililtrifluoro Acetamida (MSTFA) p.a. foi adquirido à *Macherey-Nagel* e a enzima  $\beta$ -glucuronidase foi obtida à *Roche*.

## 2.2. Soluções

### Mistura Controlo Exógenos A

Para um balão volumétrico de 10 mL pipetou-se 50  $\mu$ L das soluções padrão de referência de 5 $\beta$ THMT, 6 $\beta$ -Hidroximetandienona e Epimetendiol, todas com uma concentração de 1000  $\mu$ g/mL e 125  $\mu$ L das soluções padrão de referência de Drostanolona (metabolito) e 19-Noreticolanolona ambas com uma concentração de 1000  $\mu$ g/mL. Perfez-se o restante volume com metanol, homogeneizou-se por inversão e armazenou-se a 4 °C ao abrigo da luz. Esta solução tem a seguinte concentração final de compostos: 5 $\beta$ THMT, 6 $\beta$ -Hidroximetandienona e Epimetendiol 5  $\mu$ g/mL e Drostanolona met e 19-Noreticolanolona 12.5  $\mu$ g/mL.

### Mistura Controlo Exógenos B

Para um balão volumétrico de 10 mL pipetou-se 500  $\mu$ L das soluções padrão de referência de Carfedon e Modafinil ambas com uma concentração de 1000  $\mu$ g/mL e 1000  $\mu$ L das soluções padrão de referência de Amiloride, Triantereno e Canrenona com concentrações de 1000  $\mu$ g/mL. Perfez-se o restante volume com metanol, homogeneizou-se por inversão e armazenou-se a 4 °C ao abrigo da luz. Esta solução tem a seguinte concentração final de compostos: Carfedon e Modafinil 50  $\mu$ g/mL e Amiloride, Triantereno e Canrenona 100  $\mu$ g/mL.

### Mistura Controlo Exógenos D

Para um balão volumétrico de 5 mL pipetou-se 2500  $\mu$ L da solução padrão de referência de Octopamina com uma concentração de 1000  $\mu$ g/ml. Perfez-se o restante volume com metanol, homogeneizou-se por inversão e armazenou-se a 4°C ao abrigo da luz. A concentração final de Octopamina na solução é de 500  $\mu$ g/mL.

### Mistura Padrão

Para um balão volumétrico de 10 mL pipetou-se 100 µL da solução “Mistura Controlo Exógenos A”, 500 µL das soluções “Mistura Controlo Exógenos B” e “Mistura Controlo Exógenos D”, 50 µL da solução padrão de 19-NorAndrosterona a 10 mg/L e 3750 µL da solução padrão de THC a 10 mg/L e perfez-se o restante volume com metanol. Homogeneizou-se por inversão e armazenou-se a 4 °C ao abrigo da luz. Esta solução tem a seguinte concentração final de compostos: 19-NorAndrosterona, 5βTHMT, 6β-Hidroximetandienona e Epimetendiol 0,05 µg/mL; 19-Noreticolanolona e Drostanolona 0,125 µg/mL; Carfedon e Modafinil 2.5 µg/mL; Amiloride, Triantereno e Canrenona 5 µg/mL; Octopamina 25 µg/mL e THC 3.75 µg/mL.

#### Padrão Interno

Para um balão volumétrico de 20 mL pipetou-se 40 µL da solução metanólica de d<sub>3</sub>-Testosterona, 40 µL da solução metanólica de d<sub>3</sub>-Epitestosterona, 320 µL da solução metanólica de d<sub>4</sub>-Androsterona Glucuronido, 320 µL da solução metanólica de d<sub>5</sub>-Etiocolanolona, 50 µL da solução metanólica de d<sub>3</sub>-5αDiol e 100 µL da solução metanólica de d<sub>5</sub>-βDiol tendo o restante volume sido perfeito com metanol. A concentração de todas as soluções padrão utilizadas é de 1000 µg/mL. Homogeneizou-se por inversão e armazenou-se a 4 °C ao abrigo da luz. Esta solução tem a seguinte concentração final de compostos: d<sub>3</sub>-Testosterona e d<sub>3</sub>-Epitestosterona 2 µg/mL; d<sub>4</sub>-Androsterona Glucuronido e d<sub>5</sub>-Etiocolanolona 16 µg/mL; d<sub>3</sub>-5αDiol 2.5 µg/mL e d<sub>5</sub>-βDiol 5 µg/mL.

#### Reagente de derivatização MSTFA/NH<sub>4</sub>I/Mercaptoetanol (100:0.2:0.6, v/m/v)

Em primeiro lugar, foi preparada a solução mãe de MSTFA/NH<sub>4</sub>I/Mercaptoetanol (100:2:6, v/m/v). Pesou-se 100 mg de iodeto de amónio (NH<sub>4</sub>I) para um *gobelet* e transferiu-se posteriormente para um frasco ao qual se juntou 5 mL de N-metil-trimetilsililtrifluoro acetamida (MSTFA) e 300 µL de 2-mercaptoetanol e homogeneizou-se por inversão.

Da solução mãe pipetaram-se 500 µL para um frasco tendo-se em seguida pipetado 4,5 mL de MSTFA.

#### Solução tampão Carbonato de potássio 20 % (1:1, m/m) pH 9-10

Pesou-se 200 g de bicarbonato de potássio (KHCO<sub>3</sub>) e 200 g de carbonato de potássio (K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) para dois gobelets de 1000 mL. Ao bicarbonato de potássio foram adicionados aproximadamente 400 mL de água desionizada ultrapura e uma barra de agitação eletromagnética. A solução foi aquecida de forma a facilitar a dissolução e posteriormente transferida para um balão volumétrico de 1000 mL. Procedeu-se da mesma forma para o carbonato de potássio, tendo-se em seguida adicionado esta solução à solução de bicarbonato de potássio com auxílio de um funil de vidro e em agitação constante. Aferiu-se o volume com água ultrapura e deixou-se arrefecer até à temperatura ambiente, transferiu-se para um frasco e mediu-se o pH, que se deve encontrar entre 9 e 10.

#### Solução tampão Fosfato de Sódio pH 7

Pesou-se, para dois gobelets, 55,25 g de dihidrogenofosfato de sódio monohidratado (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O) e 71,25 g de hidrogenofosfato de sódio dihidratado (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O) e dissolveram-se em água ultrapura sob aquecimento. As soluções, à temperatura ambiente, foram transferidas para um balão volumétrico de 1000 mL aferindo-se o volume com água ultrapura e transferiu-se para um frasco. A solução foi fervida durante 15 minutos de forma a prevenir a disseminação bacteriana.

### 2.3. Equipamentos

Os equipamentos utilizados na realização do trabalho foram:

- Agitador, *Heidolph* modelo ProMax 2020
- Balança Analítica, *Kern & Sohn GmbH* modelo 870
- Blocos Termostatizados, *Stuart* modelo SBH200D
- Centrífuga, *Sigma* modelo 4-15
- Cromatógrafo de fase gasosa, *Agilent Technologies* modelo 7890A, acoplado a um Espectrômetro de Massa *Triple Quad 7000* da *Agilent Technologies*, dotado de um *autosampler* modelo 7693 e de um injetor automático modelo 64513A da *Agilent Technologies*
- Dispensador, *Eppendorf* modelo *Multipette plus*
- Estufa, *Memmert* modelo 100-800
- Evaporador de solvente de soluções, *Caliper* modelo Turbovap LV
- Micropipetas automáticas de 500-5000 µL, *Eppendorf* modelo Research
- Micropipetas automáticas de 100-1000 µL, *Eppendorf* modelo Research
- Micropipetas automáticas de 20-200 µL, *Eppendorf* modelo Research
- Vórtex, *Heidolph* modelo M10
- Sistema de purificação de água *Interlab* modelo *Direct-Pute UP 10Set*

### 2.4. Condições Cromatográficas

Todas as amostras preparadas foram analisadas recorrendo a um cromatógrafo de fase gasosa da *Agilent Technologies*, modelo 7890A acoplado a um Espectrômetro de Massa *Triple Quad 7000*, também da *Agilent Technologies*, em modo de ionização de Impacto Eletrónico (70 eV) e com um Quadrupolo como analisador de massa.

As injeções foram realizadas através de um injetor automático em modo *split* com uma razão de (1:20) e um volume de injeção de 3 µL a uma temperatura de 280 °C. O gás de arraste (fase móvel) utilizado é hélio fornecido pela *AirLiquide*, com uma pressão constante de 22 psi.

A separação foi realizada com recurso a uma coluna capilar da *Agilent Technologies* de HP-Ultra 1, com uma fase estacionária de 100 % Dimetilpolisiloxano, 25 m de comprimento, 0,2 mm de diâmetro interno e 0,11 µm de espessura do filme.

O programa de temperatura usado no forno iniciou-se a 180 °C, subindo a 3 °C/min até 240 °C, onde permaneceu durante 1 minuto, subindo de seguida a 40 °C/min até aos 320 °C, onde ficou por 3 min.

O modo de aquisição do Espectrômetro de Massa é em MRM, sendo as transições monitorizadas de acordo com o respetivo tempo de retenção. A aquisição e tratamento dos dados foram obtidos com o *software Agilent MassHunter Qualitative Analysis B.05.00*.

Os *septum* e os *liners* utilizados foram substituídos por novos, a cada 120 análises, de forma a evitar a diminuição de sensibilidade.

### 2.5. Amostras biológicas em estudo

Para o desenvolvimento do presente trabalho foram recolhidas 25 amostras de urina pertencentes a diferentes indivíduos, de ambos os sexos, e correspondentes a uma gama alargada de idades, de forma

a ter a maior variabilidade possível de matrizes. Esta opção de seleção de amostras prende-se com a variabilidade das urinas entre indivíduos potenciada por variações do sexo e idade.

As alíquotas das amostras foram codificadas de forma a preservar o anonimato e armazenadas no frigorífico a 4 °C. Todas as amostras de urina utilizadas não apresentam níveis detetáveis dos analitos estudados. Vinte amostras foram utilizadas no desenvolvimento e validação do procedimento de análise qualitativa e as restantes cinco amostras de urina foram usadas para uma verificação independente da metodologia aplicada.

As amostras de urina foram fortificadas com os analitos estudados a 4 diferentes níveis de concentração (MRPL,  $\frac{1}{2} \times$  MRPL,  $\frac{1}{4} \times$  MRPL e  $2 \times$  MRPL – definidos na secção seguinte) a partir da Mistura Padrão preparada.

## 2.6. Substâncias pesquisadas

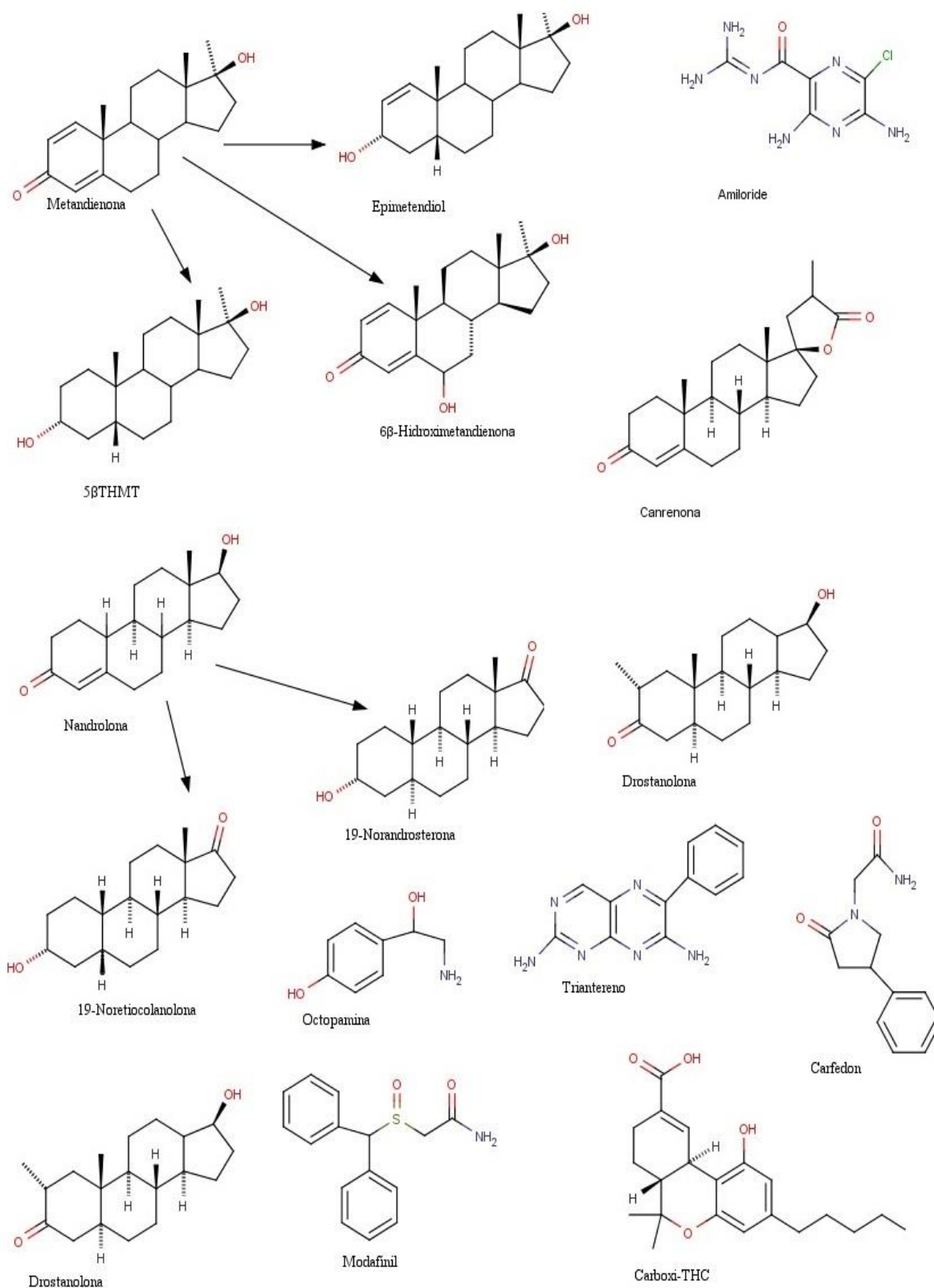
Foram pesquisadas dez substâncias dopantes cujas informações quanto à classe a que pertencem e os respetivos metabolitos pesquisados se encontram resumidos na **Tabela 2.1**.

As estruturas químicas destas encontram-se representadas na **Figura 2.1**.

**Tabela 2.1:** Conjunto de substâncias e respetivos metabolitos pesquisados e classe a que pertencem de acordo com a classificação da WADA.

Classe	Substâncias	Compostos pesquisados
<b>S1-Esteróides anabolisantes</b>	Nandrolona	19-Norandrosterona 19-Noreticolanona
	Metandienona	5 $\beta$ -Tetrahidrometiltestosterona 6 $\beta$ -Hidroximetandienona Epimetendiol
	Drostanolona	Drostanolona
<b>S5-Diuréticos e agentes mascarantes</b>	Amiloride	Amiloride
	Triantereno	Triantereno
	Canrenona	Canrenona
<b>S6-Estimulantes</b>	Carfedon	Carfedon
	Modafinil	Modafinil
	Octopamina	Octopamina
<b>S7 – Canabinóides</b>	THC	Carboxi-THC

As transições iónicas monitorizadas, assim como os respetivos tempos de retenção e energia de colisão dos vários analitos encontram-se sumarizados na **Tabela 2.2**. O tempo de retenção apresentado varia com a injeção específica realizada.



**Figura 2.1:** Estruturas químicas das substâncias em análise e seus respectivos metabolitos. (Estruturas obtidas com o *software Marvin Sketch 6.1.3*)

**Tabela 2.2:** Transições iônicas (m/z), tempos de retenção (TR), energia de colisão (CE) e *Dwell time* para os vários analitos pesquisados.

Composto pesquisado	TR (min)	Transições iônicas (m/z)	Dwell time (ms)	CE (V)
<b>19-Norandrosterona</b>	12,70	405 – 315	20	5
		405 – 225	20	15
<b>19-Noreticolanolona</b>	13,82	405 – 315	20	5
		405 – 225	20	10
<b>5β-Tetrahidrometiltestosterona</b>	16,55	435 – 255	20	20
		270 – 157	20	30
<b>6β-Hidroximetandienona</b>	22,0	517 – 337	20	15
		517 – 229	20	20
<b>Epimetendiol</b>	13,03	358 – 301	20	15
		358 – 196	20	5
<b>Drostanolona</b>	15,24	448 – 433	15	10
		448 – 253	15	25
<b>Amiloride</b>	8,56	388 – 298	20	20
		388 – 147	20	20
<b>Triantereno</b>	21,03	469 – 454	20	10
		454 – 340	20	20
<b>Canrenona</b>	23,50	412 – 397	20	15
		412 – 383	20	15
<b>Carfedon</b>	5,40	272 – 229	20	15
		272 – 104	20	25
<b>Modafinil</b>	11,14	219 – 219	20	5
		167 – 152	20	15
<b>Octopamina</b>	5,75	426 – 237	20	10
		426 – 179	20	10
		426 – 147	20	10
<b>THC</b>	19,57	371 – 289	10	15
		371 – 265	10	15
<b>D<sub>3</sub>-Testosterona</b>	17,51	435 – 209	20	10

As concentrações às quais as substâncias pesquisadas se encontram nos respectivos níveis de fortificação encontram-se descritas na **Tabela 2.3**, tendo por base o MRPL definido pela WADA nos seus documentos técnicos (World Anti-Doping Agency - Laboratory Expert Group 2015a).

**Tabela 2.3:** Níveis de concentração das substâncias pesquisadas nos quatro níveis de concentração analisados (World Anti-Doping Agency - Laboratory Expert Group 2015a).

Substância	Concentração (ng/mL)			
	$\frac{1}{4} \times \text{MRPL}$	$\frac{1}{2} \times \text{MRPL}$	MRPL	$2 \times \text{MRPL}$
<b>19-Norandrosterona</b>	0,5	1	2	4
<b>19-Noreticolanolona</b>	1,25	2,5	5	10
<b>5β-Tetrahidrometiltestosterona</b>	0,5	1	2	4
<b>6β-Hidroximetandienona</b>	0,5	1	2	4
<b>Epimetendiol</b>	0,5	1	2	4
<b>Drostanolona</b>	1,25	2,5	5	10
<b>Amiloride</b>	50	100	200	400
<b>Triantereno</b>	50	100	200	400
<b>Canrenona</b>	50	100	200	400
<b>Carfedon</b>	25	50	100	200
<b>Modafinil</b>	25	50	100	200
<b>Octopamina</b>	250	500	1000	2000
<b>THC</b>	37,5	75	150	300

## 2.7. Critérios de identificação de compostos

A confirmação qualitativa de compostos em amostras biológicas para a detecção de dopagem por GC-MS/MS requer o cumprimento de um conjunto de critérios, definidos pela WADA (World Anti-Doping Agency - Laboratory Expert Group 2015b), relativamente aos tempos de retenção e à razão de abundância de fragmentos iónicos.

No que diz respeito aos tempos de retenção, a presença de um composto é indicada se os seguintes critérios forem respeitados:

- O tempo de retenção do pico da solução analisada não pode diferir mais de 1 % ou 0,1 minutos relativamente ao tempo do analito observado na solução de referência (e.g. urina fortificada), analisada na mesma sequência de análises;
- Caso no laboratório sejam utilizados tempos de retenção relativos na identificação de compostos, este parâmetro não deve diferir mais de 1 %, se o padrão interno não for um isótopo do analito, ou 0,5 %, se o padrão interno for um isótopo do analito, comparando as retenções observadas na solução amostra e no analito da solução de referência injetadas, analisada na mesma sequência analítica. Os tempos de retenção relativos devem ser calculados de acordo com a **Equação 2.1**:

*Equação 2.1*

$$TRR (A) = \frac{TR (A)}{TR (PI)}$$

Em que TRR (A) é o tempo de retenção relativo do analito A, TR (A) é o tempo de retenção do analito A e TR (PI) é o tempo de retenção do padrão interno.

Relativamente aos parâmetros de espectrometria de massa, a presença de um composto é indicada através do cumprimento dos seguintes critérios:

- Em casos em que o detetor utilizado seja um espectrómetro de massa simples, devem ser adquiridos no mínimo 3 iões diagnóstico;
- Nos casos em que o detetor utilizado seja um espectrómetro de massa em tandem (MS/MS), devem ser monitorizadas pelo menos 2 transições ião precursor – ião produto;
- A razão Sinal-Ruído (S/N) (razão entre o sinal do ião diagnóstico de menor intensidade e o sinal correspondente ao ruído da linha de base) dos sinais cromatográficos deve ser superior a 3. Esta determinação é efetuada com recurso ao *software* do equipamento;
- As abundâncias relativas de cada um dos iões diagnóstico do pico da amostra não devem diferir mais do que os valores definidos na **Tabela 2.4** considerando o pico do analito observado na solução de referência;
- Em casos onde existam dúvidas quanto à identidade do composto, deve-se comparar, se possível, o espectro do pico da amostra com o espectro do analito no controlo em modo *scan*. A presença do analito só é confirmada após a convergência das indicações da retenção do analito e sinais do espectrómetro de massa.

No procedimento de triagem aplicado no LAD, majoram-se os critérios definidos pela WADA (World Anti-Doping Agency - Laboratory Expert Group 2015b) relativamente a razões de abundância iónicas. Um pico é considerado suspeito quando a abundância relativa para cada uma das transições iónicas do ião não diferir mais de 50 % relativamente à mesma transição iónica do ião do controlo. Quanto aos tempos de retenção, utiliza-se o critério de TRR acima mencionado. No procedimento de triagem a terminologia utilizada quando são ou não detetados compostos é de “suspeito” e “negativo”

respetivamente. No presente trabalho e por uma questão de simplificação de nomenclatura e de comparação serão usados os termos “positivo” e “negativo” associados ao procedimento de triagem.

**Tabela 2.4:** Critérios referentes à aceitação de razões de abundância iónicas definidos pela WADA no documento técnico (World Anti-Doping Agency - Laboratory Expert Group 2015b).

Abundância relativa (% relativa ao pico base)	Intervalo máximo de tolerância permitido
<b>50-100</b>	± 10 (absoluta)
<b>25-50</b>	± 20 (relativa)
<b>&lt;25</b>	± 5 (absoluta)

Para além destes critérios de aceitação, um outro aspeto a ter em conta em análises por GC-MS, é o *Tune*, cujo objetivo é a calibração da escala de massa do espectrómetro e o ajuste da sensibilidade do detetor. Esta verificação é feita de acordo com os seguintes critérios definidos internamente pelo laboratório:

- Razão entre abundâncias dos picos de N<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O <10 %
- Voltagem do electromultiplicador <2600 V
- Abundância relativa do ião da Perfluorotributilamina (gás de calibração) com valor m/z 502 > 1 %
- Abundância absoluta da massa do ião Perfluorotributilamina, com m/z 502 > 100000

A realização do *Tune* deve ser feita sempre que necessário, sendo que o ideal é a sua realização antes da injeção de cada sequência analítica. A realização do *Tune* é ainda efetuada sempre que seja realizada a troca do *liner* e do *septum*, dois componentes do injetor do aparelho, que acumulam impurezas e se degradam à medida que vão sendo introduzidas amostras no instrumento. A substituição destes deve ser realizada a cada 120 injeções e no menor tempo possível após diminuição da temperatura do injetor, do forno e de desligar a pressão do injetor de forma a evitar danos no aparelho, nomeadamente a entrada de ar e vapor de água na coluna e detetor (Agilent 2015; Agilent Technologies 2010).

## 2.8. Procedimento Analítico

As amostras foram analisadas em condições de precisão intermédia de acordo com o procedimento de triagem utilizado no laboratório.

### 2.8.1. Preparação das amostras

As amostras de urina, armazenadas a 4 °C, foram colocadas à temperatura ambiente e homogeneizadas. A partir de cada amostra foram preparadas cinco amostras (um branco de urina e quatro fortificações), tendo-se pipetado 2,00 mL de urina para tubos de vidro de rosca previamente identificados. A cada uma das alíquotas foram adicionados 40 µL da mistura de padrão interno, 750 µL da solução tampão fosfato de sódio a pH 7 e 50 µL de β-glucoronidase. Foram ainda adicionados 20, 40, 80 e 160 µL de Mistura padrão aos tubos das amostras fortificadas a ¼ × MRPL, ½ × MRPL, MRPL e 2 × MRPL de todos os analitos respetivamente. Juntamente com as amostras foi preparado um controlo positivo ao nível de concentração de MRPL que sofreu o mesmo procedimento que as restantes amostras. As alíquotas foram homogeneizadas no vortex, tapadas e colocadas a incubar na estufa a 55 °C durante uma hora, período este que é necessário para que haja hidrólise enzimática dos compostos conjugados presentes na solução.

## 2.8.2. Extração líquido-líquido

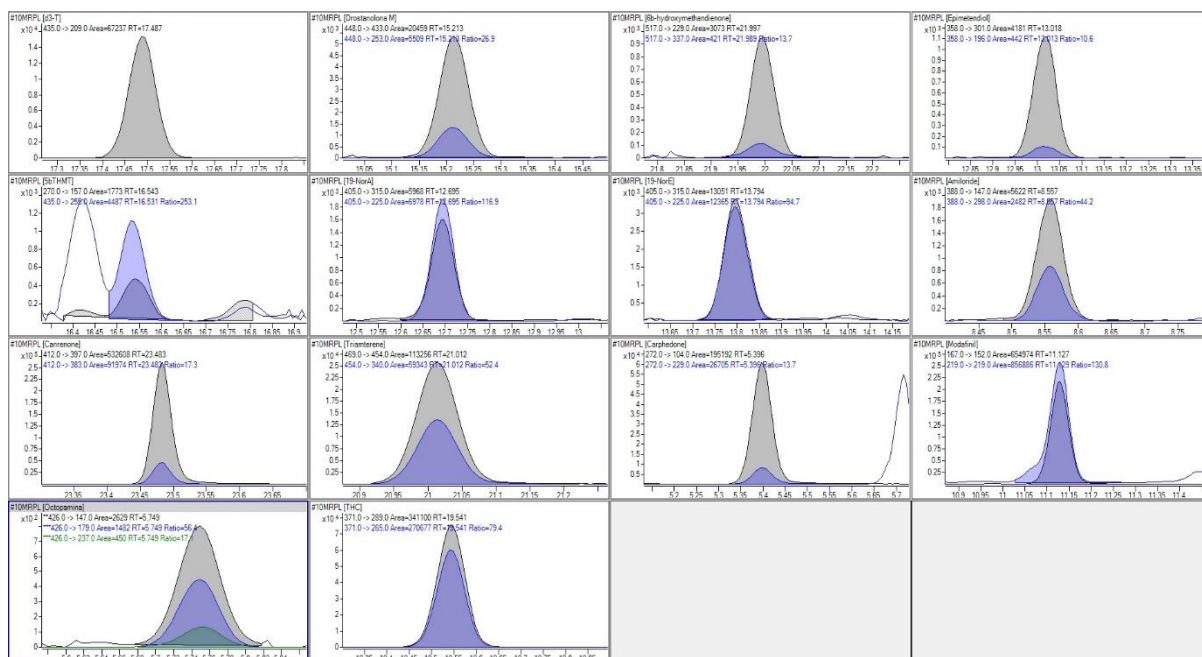
Após o período de hidrólise e arrefecimento até à temperatura ambiente, foram adicionados 500 µL da solução tampão de Carbonato pH 9-10 e 5 mL de éter terc-butilmetílico. As alíquotas foram homogeneizadas no vortex, levadas ao agitador por 20 minutos e a centrifugar a 2300 rotações, durante 10 minutos. Após este processo, a fase orgânica foi transferida para tubos de rosca, com auxílio de uma pipeta. A fase orgânica foi em seguida colocada a evaporar sob corrente de azoto num banho a 45 °C durante 20 minutos.

## 2.8.3. Derivatização

Os extratos secos das amostras foram reconstituídos em MSTFA/NH<sub>4</sub>I/Mercaptoetanol (100:0.2:0.6, v/m/v), homogeneizadas no Vortex e colocadas a incubar a 80 °C, durante 30 minutos, período no qual ocorre a derivatização. Após o período de derivatização e arrefecimento à temperatura ambiente, os extratos foram transferidos para frascos (*vials*) e encapsulados.

## 2.9. Metodologia de Tratamento de Resultados

Os sinais instrumentais obtidos para as diferentes soluções amostras foram tratados com recurso ao *software* informático *Agilent MassHunter Qualitative Analysis B.05.00*, tendo sido geradas macros como aquela presente na **Figura 2.2**. Foram recolhidas as abundâncias correspondentes a cada uma das transições iónicas dos diversos analitos, assim como os seus respetivos tempos de retenção. Juntamente com estes, foram recolhidas ainda as abundâncias e os tempos de retenção do padrão interno utilizado. Os dados foram organizados num ficheiro MS-Excel para posterior utilização.



**Figura 2.2:** Exemplo de macro gerada pelo *software* informático *Agilent MassHunter Qualitative Analysis B.05.00* na qual é possível observar os sinais dos analitos pesquisados, nomeadamente as abundâncias e tempos de retenção das transições pesquisadas.

Relativamente às amostras brancas, o tratamento de dados destas consistiu na integração de ruído instrumental / ruído de matriz para as transições e tempos de retenção correspondentes ao analitos pesquisados, com o objetivo de avaliar a variabilidade do sinal do branco nas matrizes analisadas. Esta informação é utilizada para estimar a taxa de falsos positivos das identificações.

Foram também recolhidos os sinais instrumentais e verificados os rácios das áreas dos picos das seguintes substâncias:

- D<sub>4</sub>-Androsterona
- D<sub>5</sub>-Androsterona
- Mono-O-TMS-Androsterona
- Bis-O-TMS-Androsterona
- Razões das áreas dos picos de D<sub>4</sub>-Androsterona / D<sub>5</sub>-Androsterona > 70 %
- Razões das áreas dos picos de Mono-O-TMS-Androsterona / Bis-O-TMS-Androsterona < 10%

A análise destes rácios tem como objetivo averiguar a ocorrência de falhas nas etapas de hidrólise e derivatização, sendo que estas se verificam sempre que os parâmetros acima referidos não são cumpridos.

## **Capítulo 3 – Resultados e Discussão**

---



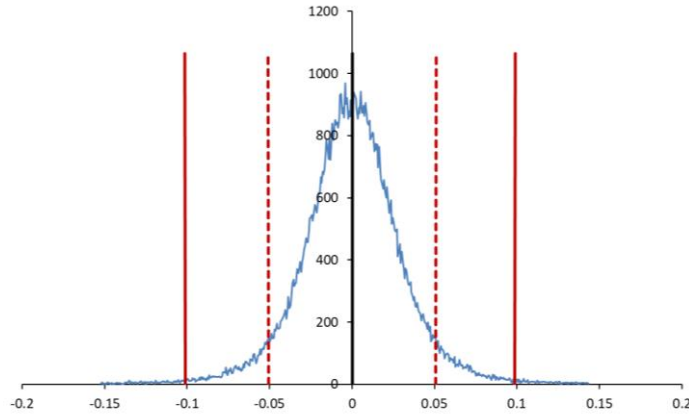
### 3.1. Folha de MS-Excel para Simulações Monte Carlo

Foram desenvolvidas duas variantes de uma folha de MS-Excel (para analitos com uma e com duas razões de abundâncias), baseada em simulações de Monte Carlo, que permite estimar a taxa de TP e FP para cada confirmação analítica, critério de identificação e concentração de analito. Estes valores foram estimados considerando três critérios distintos de identificação: usando um intervalo de confiança a 95%, os critérios utilizados pelo laboratório no procedimento de triagem e também os critérios de aceitação definidos pela WADA (World Anti-Doping Agency - Laboratory Expert Group 2015b).

O ponto de partida dos cálculos computacionais passa pela recolha dos dados relativos aos tempos de retenção e às abundâncias das transições iónicas das soluções fortificadas e calibradores. A organização e processamento dos dados é efetuada automaticamente, isto é, após a inserção dos sinais instrumentais e escolha do tipo de parâmetro a estudar (tempo de retenção relativo ou razão de abundâncias), é selecionada a transição de maior abundância, assim como o tempo de retenção correspondente e calculados os parâmetros de identificação dos compostos. Em seguida, são calculados alguns parâmetros estatísticos, tais como a média, o desvio padrão, o coeficiente de variação, o coeficiente de correlação de *Pearson* e o coeficiente de correlação de posição de *Spearman*. Com base nestes parâmetros estatísticos, são simulados 100 000 valores aleatórios de diferenças de tempos de retenção relativos ou de razões de abundâncias entre um controlo positivo e uma amostra positiva. Com base nestes valores, são tidos em conta os três critérios de identificação distintos referidos anteriormente de forma a calcular as respetivas taxas de TP e FP. No caso particular do critério de identificação baseado no intervalo de confiança de 95 % os limites de aceitação são estimados na sequência de simulações Monte Carlo.

A definição dos intervalos de confiança a 95 %, isto é, de critérios de identificação estatísticos, tem em conta que a distribuição das razões de tempos de retenção relativos e de abundâncias de iões tal como a diferença de pares destes valores não tem distribuição normal. Apesar da maioria dos parâmetros analíticos apresentar uma distribuição aproximadamente normal, existem, no entanto, algumas variáveis em que esta distribuição não se verifica, como é o caso de variáveis correlacionadas combinadas numa razão, como por exemplo, os tempos de retenção relativos e as razões de abundância iónicas (Bettencourt da Silva 2016). A diferença entre razões de variáveis correlacionadas tende para a normalidade, como é possível observar na **Figura 3.1**. No entanto, é preferível não utilizar estatística normal para gerir casos que podem não ser normais. Desta forma, os intervalos de confiança são calculados usando os percentis que delimitam um intervalo de 95 % ou 99 % (Percentis 2.5 e 97.5 para um nível de confiança de 95 % e percentis 0.05 e 99.5 para um nível de confiança de 99% respetivamente).

Neste trabalho, o critério de aceitação foi definido para o nível de confiança de 95 % em detrimento do de 99 %, uma vez que este último é sujeito a uma maior variação por se encontrar na cauda da distribuição, onde as simulações de Monte Carlo produzem resultados menos precisos. Assim, a taxa de TP é definida pelo nível de confiança utilizado, ou seja, 95 %. Nos restantes casos, a estimativa da taxa de TP tem em conta o número de casos que são corretamente identificados pelos critérios a aplicar, isto é, o número de resultados que se encontram dentro do intervalo definido pela tolerância. Esta avaliação é realizada recorrendo à Simulação Monte Carlo dos parâmetros de identificação.



**Figura 3.1:** Distribuição aproximadamente normal das diferenças de razões de abundância simuladas para o analito Triantereno ao nível de concentração de MRPL. Na figura, os traços contínuos vermelhos indicam os percentis que definem um nível de confiança de 99%, a tracejado os percentis que definem um nível de confiança de 95% e a traço contínuo preto, o percentil 50 que corresponde à média da distribuição.

Relativamente à estimativa das taxas de FP para diferenças de razões de abundância, o ponto de partida passou pela recolha de sinais instrumentais de matrizes sem analito nas transições e tempos de retenção aos quais normalmente se encontrariam os analitos a serem pesquisados. Foi feita a modelação estatística dos dados recolhidos com base no cálculo da média e desvio padrão do sinal do ruído, tendo estes sido utilizados na simulação de 100 000 pares de abundâncias iónicas, recorrendo a uma distribuição *T* truncada em zero, de forma a garantir que os sinais simulados não sejam negativos. Com os pares de abundâncias simuladas, calcularam-se as respetivas razões e diferenças de razões em relação a um controlo positivo.

A observação de um FP verifica-se cada vez que, simultaneamente as abundâncias iónicas (referentes ao sinal do ruído) simuladas sejam superiores ao limite inferior do intervalo de confiança de 99 % para o analito em questão e que o resultado da diferença de razões de abundância em relação ao controlo positivo se encontre dentro do critério de identificação para um nível de confiança de 95 %. Quando são aplicados os critérios de identificação utilizados pelo laboratório em triagem, ou os definidos pela WADA, a observação de um FP dá-se sempre que a abundância iónica dos sinais do ruído simulados seja superior ao sinal correspondente ao limite de deteção (isto é, três vezes o desvio padrão dos sinais da matriz sem analito) e que o valor da diferença entre razões de abundância, referenciados aos sinais do controlo, se encontre dentro do intervalo definido pela tolerância. A taxa de FP é calculada através da razão entre o número total de falsos positivos verificados e número total de simulações. Para os casos em que não foi verificado nenhum FP, definiu-se que a taxa de falsos positivos seria, por excesso, de 1 em 100 000. Em relação à taxa de FP de tempos de retenção relativos, definiu-se um valor de 1 % para os três critérios em estudo com base na experiência dos analistas. Assim, existe a probabilidade de 1 % de um pico que não de analito se encontre no intervalo de aceitação de TRR.

Depois de obtidas as taxas de verdadeiros e falsos positivos, foi calculada a razão de verosimilhança para RA, para TRR e combinada.

### 3.2. Definição de limites estatísticos de aceitação de resultados

Através de simulações de Monte Carlo foram caracterizadas as distribuições não normais das diferenças de razões de abundância ( $d(RA)$ ) e de tempos de retenção relativos ( $d(TRR)$ ) dos diversos analitos aos quatro níveis de concentração estudados. Para cada uma destas distribuições foram calculados os percentis que limitam os intervalos de confiança a 95 % e 99 %. Foi igualmente calculado o percentil 50 que não coincide com a média de distribuições assimétricas. A **Tabela 3.1** e as **Tabelas 6.1 a 6.3** do **Anexo 1** apresentam os limites de aceitação definidos para um intervalo de confiança de 95 % para  $d(RA)$  e  $d(TRR)$  entre um controlo e a solução analisada. Com base nestes intervalos é possível observar que ambos os parâmetros de identificação apresentam, na maioria dos casos, uma distribuição aproximadamente normal com simetria em torno do valor médio zero. No entanto nalguns casos as diferenças não têm uma distribuição normal como a  $d(RA)$  da identificação de  $5\beta$ THMT surgindo a necessidade da utilização de ferramentas capazes de gerir dados não normais. É também possível observar que os limites correspondentes aos tempos de retenção relativos se mantêm aproximadamente constantes para todos os níveis de concentração, existindo apenas pequenas variações. Quanto aos limites correspondentes às diferenças de razões de abundância, a tendência geral é de haver uma diminuição na sua amplitude com um aumento da concentração, existindo, no entanto, algumas exceções que podem ser atribuídas à dispersão dos dados recolhidos e à aleatoriedade das simulações.

**Tabela 3.1:** Limites estatísticos de aceitação de diferenças de razões de abundância e de tempos de retenção relativos entre um controlo e a solução analisada, definidos para um nível de confiança de 95%, para o nível de concentração de analito correspondente MRPL.

<i>Analito</i>	<i>d(RA)</i>		<i>d(TRR)</i>	
	<b>Min</b>	<b>Máx</b>	<b>Min</b>	<b>Máx</b>
<i>THC</i>	-0,068	0,068	-0,005	0,005
<i>19-NorA</i>	-0,327	0,329	-0,007	0,007
<i>19-NorE</i>	-0,165	0,166	-0,008	0,008
<i>Drostanolona</i>	-0,064	0,062	-0,007	0,007
<i>Canrenona</i>	-0,038	0,038	-0,007	0,007
<i>Carfedon</i>	-0,03	0,031	-0,01	0,01
<i>Modafinil</i>	-0,427	0,433	-0,007	0,007
<i>Octopamina T1</i>	-0,112	0,116	-0,012	0,012
<i>Octopamina T2</i>	-0,235	0,233	-0,012	0,012
<i>Epimetendiol</i>	-0,038	0,039	-0,006	0,006
<i>Amiloride</i>	-0,207	0,206	-0,008	0,008
<i>Triantereno</i>	-0,066	0,067	-0,005	0,005
<i>5<math>\beta</math>THMT</i>	-0,382	0,391	-0,005	0,005
<i>6<math>\beta</math>-Hidroxi metandienona</i>	-0,09	0,09	-0,007	0,007

Os limites definidos foram posteriormente testados através da análise de cinco urinas diferentes fortificadas a diversos níveis de concentração de analito, independentes das usadas na definição dos limites. Foram calculadas as diferenças para as razões de abundância e para os tempos de retenção

relativos entre o controlo positivo e a amostra fortificada, tendo-se obtido os valores apresentados nas **Tabelas 3.2 e 3.3** e nas **Tabelas 6.4 a 6.9** do **Anexo 2**. Considerando cada combinação matriz, analito e nível de concentração de analito estudadas como a análise de uma amostra individual, pode-se afirmar que foram realizadas 260 análises. Deste total apenas 8 casos, devidamente assinalados a negrito nas tabelas apresentam valores de d(RA) que não se encontram dentro dos respetivos limites, sendo que estes casos foram, na maioria, observados ao nível de concentração mais baixo. É de salientar o caso do analito 6 $\beta$ -Hidroxi metandienona na matriz #05, a todos os níveis de concentração, uma vez que os valores de d(RA) se encontram fora dos limites estatísticos estabelecidos. Este caso poderá estar relacionado com a presença de algum interferente na matriz que resulta na incorreta identificação deste.

De uma forma geral e tendo em consideração a totalidade das análises efetuadas, os resultados obtidos foram ao encontro do esperado, uma vez que os limites de aceitação de d(RA) foram definidos para um intervalo de confiança de 95 % e tendo apenas 8 em 260 casos (aproximadamente 3 %) sido incorretamente identificados. No que diz respeito aos valores correspondentes às relativos (TRR), a totalidade destes foi corretamente identificada pelos intervalos definidos.

**Tabela 3.2:** Diferenças de razões de abundância de iões entre um controlo positivo e as amostras fortificadas para um nível de concentração de analito correspondente ao MRPL. Os valores a negrito encontram-se fora dos limites de aceitação estabelecidos para um nível de confiança de 95 %.

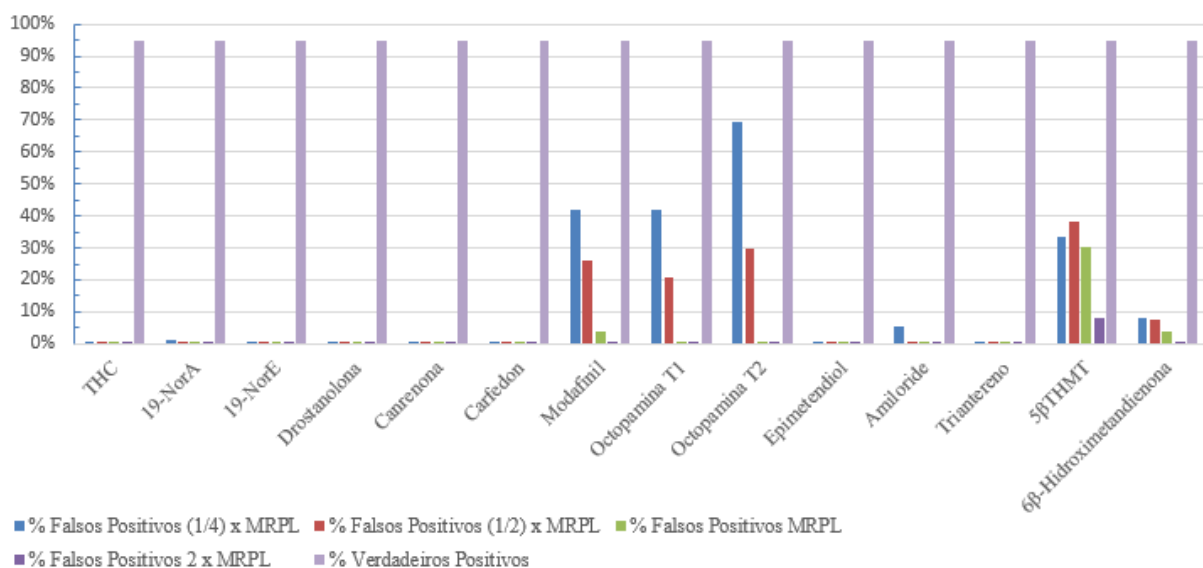
Analito	d(RA)				
	#01	#02	#03	#04	#05
<b>THC</b>	0,000	-0,046	0,003	-0,004	-0,027
<b>19-NorA</b>	0,098	0,032	-0,042	-0,025	0,099
<b>19-NorE</b>	-0,059	-0,049	-0,036	-0,056	0,013
<b>Drostanolona</b>	-0,019	0,005	-0,012	-0,014	-0,004
<b>Canrenona</b>	0,034	0,010	0,013	0,013	0,008
<b>Carfedon</b>	-0,024	-0,018	-0,015	-0,011	-0,027
<b>Modafinil</b>	-0,087	0,086	0,064	-0,041	0,012
<b>Octopamina T1</b>	-0,025	0,006	-0,002	0,004	-0,015
<b>Octopamina T2</b>	-0,073	-0,004	-0,009	-0,019	-0,045
<b>Epimetendiol</b>	0,001	0,011	-0,002	0,007	0,010
<b>Amiloride</b>	-0,029	-0,001	-0,060	0,018	0,022
<b>Triantereno</b>	-0,011	0,000	-0,020	0,008	0,001
<b>5<math>\beta</math>THMT</b>	-0,158	0,030	-0,293	0,045	0,048
<b>6<math>\beta</math>-Hidroxi metandienona</b>	-0,009	0,032	-0,040	0,042	<b>-0,381</b>

**Tabela 3.3:** Diferenças de tempos de retenção relativos entre um controlo positivo e as amostras fortificadas para um nível de concentração de analito correspondente ao MRPL. Todos os valores se encontram dentro dos limites de aceitação estabelecidos para um nível de confiança de 95 %.

Analito (TRR)	d(TRR)				
	#01	#02	#03	#04	#05
THC	-0,0004	-0,0004	-0,0011	-0,0005	-0,0008
19-NorA	0,0002	0,0002	0,0017	0,0001	0,0010
19-NorE	0,0001	-0,0003	0,0012	0,0001	0,0002
Drostanolona	0,0002	-0,0005	0,0002	-0,0002	-0,0001
Canrenona	0,0000	0,0002	0,0020	0,0003	0,0009
Carfedon	0,0010	0,0010	0,0017	0,0005	0,0014
Modafinil	0,0000	0,0000	0,0016	0,0001	0,0004
Octopamina T1	-0,0001	-0,0011	-0,0005	0,0000	-0,0007
Epimetendiol	0,0006	0,0006	0,0013	0,0005	0,0007
Amiloride	0,0006	0,0006	0,0020	0,0005	0,0006
Triantereno	0,0006	0,0006	0,0013	0,0005	0,0008
5βTHMT	0,0003	0,0003	0,0014	-0,0001	0,0008
6β-Hidroxi metandienona	0,0005	0,0005	0,0020	0,0000	0,0006

### 3.3. Estimativa de taxas de Falsos Positivos e Verdadeiros Positivos

Tendo por base a folha de cálculo MS-Excel desenvolvida, foram estimadas as taxas de sucesso dos critérios de aceitação estatísticos definidos. Uma vez que o critério de identificação mencionado na alínea 3.2 foi estabelecido para um nível de confiança de 95 %, a taxa de TP para identificação de analitos baseada em d(RA) e d(TRR) é de 95 %. A taxa da FP da identificação de analitos foi estimada em 1 % com base na experiência dos analistas nestas análises. Estima-se que existe 1 % de probabilidade de se observar um pico dentro da janela de TRR do analito, que não corresponde a este analito.

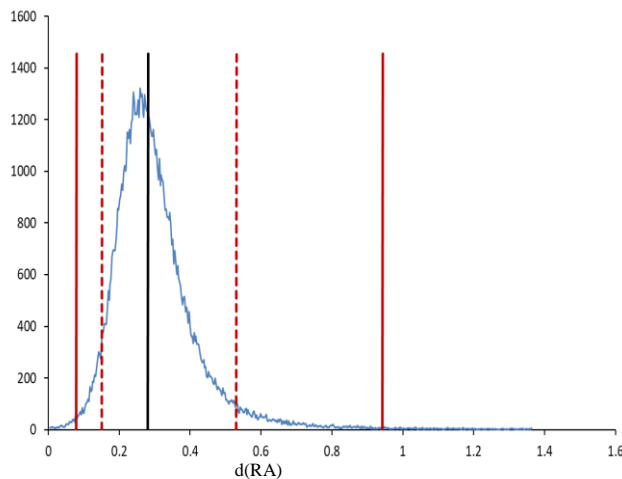


**Figura 3.2:** Taxas de Falsos Positivos e Verdadeiros Positivos, referentes às diferenças de razões de abundância, das substâncias em análise, aos quatro níveis de concentração estudados, de acordo com os critérios de aceitação estatísticos definidos no presente trabalho.

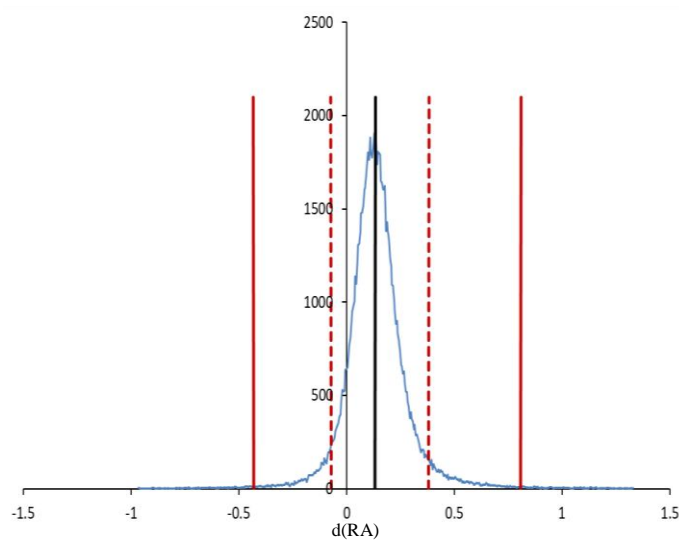
A taxa de FP de identificação de analitos recorrendo a  $d(RA)$  foi estimada para os quatro níveis de concentração com recurso à folha de cálculo desenvolvida, tendo-se obtido os resultados descritos na **Figura 3.2**, e na **Tabela 6.10** do **Anexo 3**.

Nos resultados obtidos é possível observar uma variação decrescente nas taxas de FP à medida que se passa a níveis de concentração mais elevados. Esta tendência é expectável e tem a sua explicação no facto de existirem analitos cujo nível de concentração mais baixo é inferior ao limite de deteção, assim como analitos cujo comportamento para estes níveis de concentração mais baixos é bastante variável. Uma vez que estes fatores conduzem a definição de intervalos de aceitação mais amplos, existe uma maior probabilidade da identificação de interferentes da matriz ou ruído instrumental como sendo resultados positivos conduzindo assim à estimativa de valores de taxas de FP bastante elevadas como é o caso dos analitos Modafinil, Octopamina (em ambas as suas razões de abundância representadas por T1 e T2 respetivamente) e  $5\beta$ THMT. Para a maioria dos outros analitos, a taxa de FP é bastante reduzida e constante à medida que se varia a concentração, como por exemplo analitos THC, Canrenona ou Triantereno visto que os níveis de concentração estudados estão bem acima do limite de deteção do método.

É de salientar ainda o caso do analito  $5\beta$ THMT em que a taxa de FP sofre um ligeiro aumento de um nível de concentração mais baixo para um nível de concentração superior. Este comportamento particular resulta da variabilidade dos resultados simulados pelo método numérico de Monte Carlo que não deve afetar a interpretação geral do sistema estudado. Esta variabilidade é observável maioritariamente para valores de FP elevados, que correspondem a níveis de concentração baixos onde o ruído de sinal tem maior probabilidade de produzir sinais superiores ao limite inferior de aceitação de sinal de analito, uma vez que para estes níveis de concentração os intervalos de aceitação de valores de  $d(RA)$  são mais largos. As **Figura 3.3** e **Figura 3.4** apresentam os limites estatísticos para valores de  $d(RA)$  para níveis de  $5\beta$ THMT correspondentes a  $\frac{1}{4}$  e  $\frac{1}{2}$  de MRPL. Os intervalos de aceitação de  $d(RA)$  são assimétricos sendo que a amplitude do intervalo a  $\frac{1}{4}$  de MRPL é ligeiramente menor do que a  $\frac{1}{2}$  de MRPL. Na generalidade dos outros analitos a amplitude dos intervalos de aceitação diminuí com o aumento da concentração.



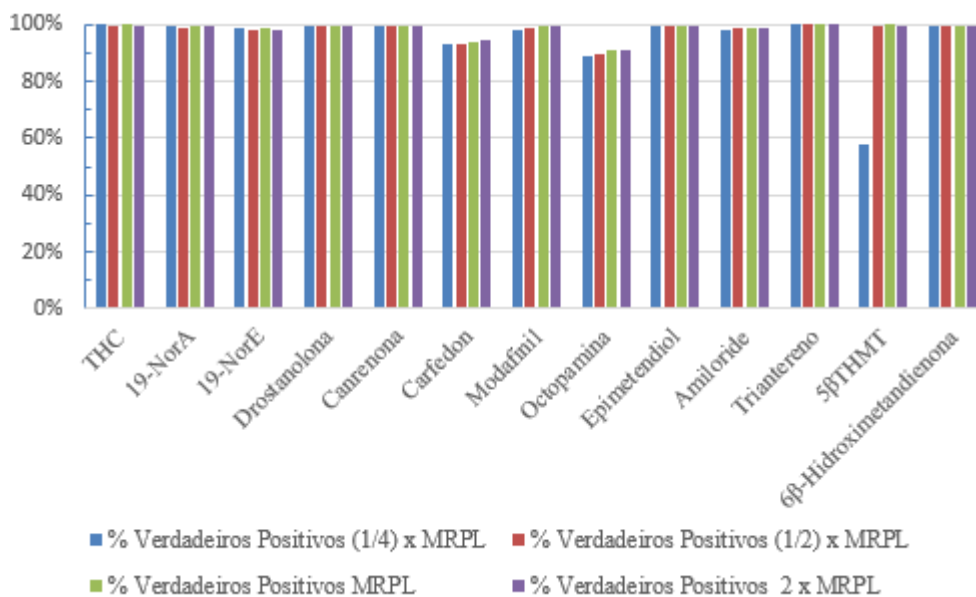
**Figura 3.3:** Gráfico da distribuição das diferenças de razões de abundância simuladas para o analito  $5\beta$ THMT ao nível de concentração de  $\frac{1}{4} \times MRPL$ . Na figura, a traço contínuo vermelho encontram-se os percentis que definem um nível de confiança de 99 %, a tracejado os percentis que definem um nível de confiança de 95 % e a traço contínuo preto, o percentil 50.



**Figura 3.4:** Gráfico da distribuição das diferenças de razões de abundância simuladas para o analito 5βTHMT ao nível de concentração de  $\frac{1}{2} \times$  MRPL. Na figura, a traço contínuo vermelho encontram-se os percentis que definem um nível de confiança de 99 %, a tracejado os percentis que definem um nível de confiança de 95 % e a traço contínuo preto, o percentil 50.

Os valores de  $d(RA)$  e  $d(TRR)$  simulados, foram igualmente utilizados para avaliar os critérios de aceitação do procedimento de triagem, que se encontram descritos na secção 2.7, no que respeita às taxas de FP e TP.

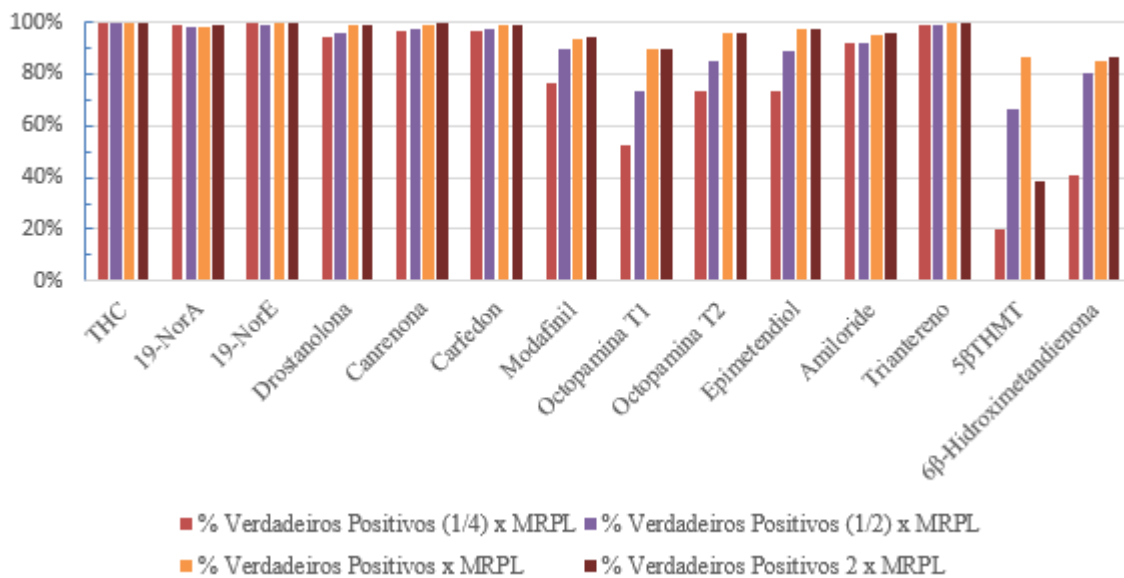
A taxa FP de identificação de analitos usando  $d(TRR)$ , tal como no caso anterior, foi estimada como sendo 1 % com base na experiência do analista. Quanto aos TP referentes a  $d(TRR)$  (**Figura 3.5** e **Tabela 6.13** do **Anexo 4**), a maioria dos resultados obtidos ronda os 99 %, havendo uma variação mínima, expectável, entre os diferentes níveis de concentração, que pode ser atribuída à aleatoriedade das simulações de Monte Carlo. Em alguns casos é também verificado um aumento na taxa de TP com o aumento da concentração, sugerindo que os TRR são mais precisos quanto maior for o nível de concentração.



**Figura 3.5:** Taxas de Verdadeiros Positivos, referentes às diferenças de tempos de retenção relativos, das substâncias em análise, aos quatro níveis de concentração estudados. O critério de identificação utilizado na estimativa dos valores foi o critério aplicado no LAD no procedimento de triagem.

Nas **Figuras 3.6 e 3.7** e **Tabelas 6.11 e 6.12** do **Anexo 4** são apresentados os valores das taxas de TP e FP, relativas a  $d(RA)$ , obtidas através da aplicação dos critérios de identificação utilizados pelo laboratório no procedimento de triagem. Estes valores foram estimados pelos modelos desenvolvidos da variabilidade de  $d(RA)$  recorrendo a simulações Monte Carlo. Por comparação de ambos os gráficos de barras é possível destacar em primeiro lugar o quão reduzidas são as taxas de FP relativamente às taxas de TP, sendo isto um indicador de que os critérios utilizados são apertados o suficiente para que um mínimo de resultados negativos seja reportado incorretamente.

Tal como descrito anteriormente, a tendência geral é a de se verificar um aumento nas taxas de TP à medida que são analisados níveis de concentração mais elevados, uma vez que os sinais instrumentais são menos dispersos em termos relativos e a identificação de analito menos influenciada pela presença de ruído instrumental e interferentes de matriz. É, no entanto, possível identificar algumas exceções em que existe uma diminuição das taxas de TP com o aumento da concentração, que pode ser justificado pela dispersão dos resultados simulados. Uma destas exceções é o analito 5 $\beta$ THMT, cuja taxa de TP diminui drasticamente entre os níveis de concentração de MRPL e 2 x MRPL, motivo este que se prende, tal como referido anteriormente, com a baixa sensibilidade que demonstra nas análises de GC e pela má resolução cromatográfica, que levam a que as diferenças de razões de abundância para este caso se encontrem mais dispersas e sejam consequentemente mais suscetíveis à variabilidade de estimativas do desempenho da identificação.

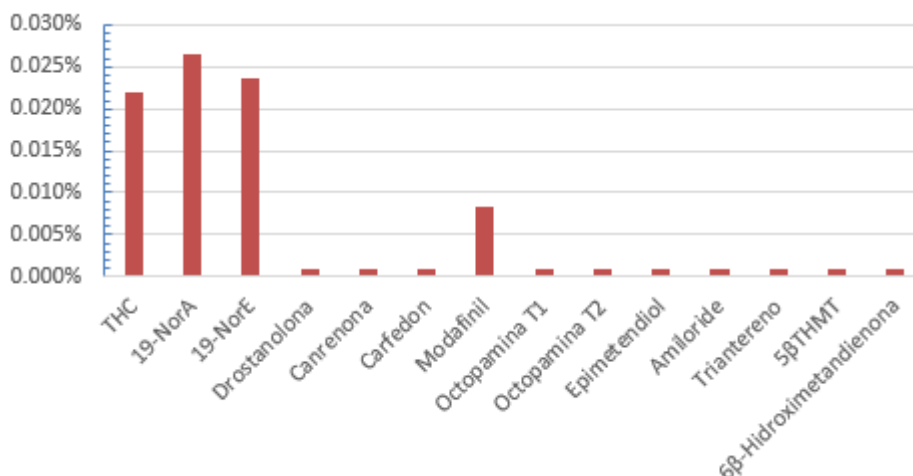


**Figura 3.6:** Variação das Taxas de Verdadeiros Positivos, referentes às diferenças de razões de abundância, das substâncias em análise com a concentração. O critério de identificação utilizado na estimativa dos valores foi o critério aplicado no LAD ao procedimento de triagem.

Contrariamente às taxas de TP, e devido à forma como os positivos são definidos no procedimento de triagem, as taxas de FP são independentes do nível de concentração de analito. Aplicando os critérios do laboratório na etapa de triagem verifica-se que um FP ocorre sempre que simultaneamente as abundâncias iónicas dos sinais de branco simulados, correspondentes às transições do analito em questão, sejam superiores a três vezes o desvio padrão dos sinais de branco recolhidos e quando a diferença entre a razão de abundâncias destas transições iónicas e a razão de abundância do controlo positivo se encontre no intervalo de aceitação definido. Como a tolerância é definida relativamente à razão de abundância do controlo positivo, e sendo que a concentração deste é fixa, a taxa de FP pode apenas ser estimada no geral para cada analito. Devido à aleatoriedade das simulações de Monte Carlo,

as taxas de FP foram calculadas como a média de quatro simulações consecutivas de forma a apresentarem um valor mais estabilizado e próximo do real.

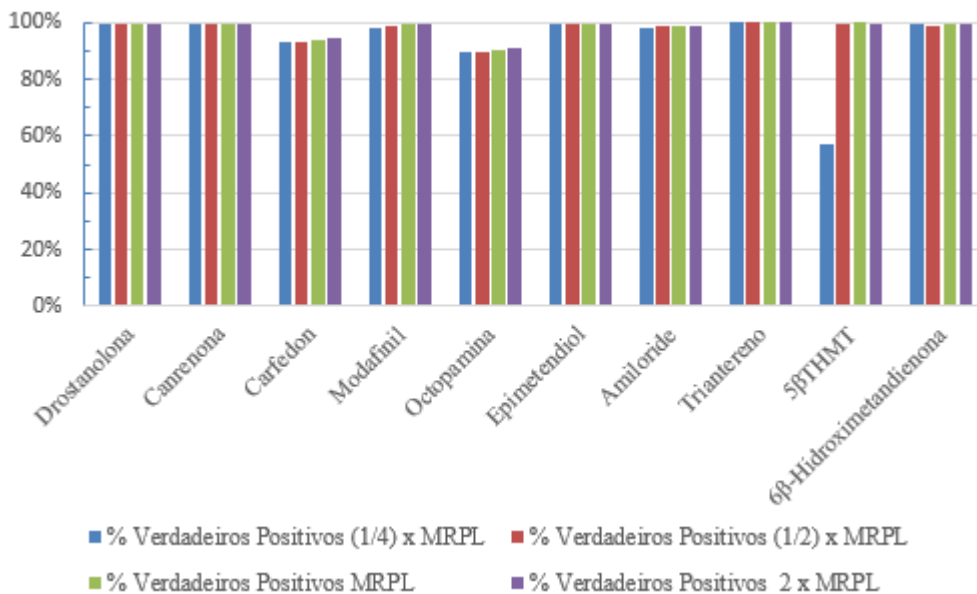
Analisando o gráfico de barras correspondente às taxas de FP é possível observar que as percentagens obtidas são bastante reduzidas, tal como seria de esperar, sendo esse um dos motivos pelo qual estes parâmetros não podem ser determinados experimentalmente. Em 100 000 resultados simulados para os vários analitos o número mais elevado de falsos positivos obtidos foi de 27. A observação destes resultados permite afirmar que os critérios utilizados pelo laboratório no processo de triagem são na generalidade simultaneamente largos o suficiente para não deixar escapar a presença de analitos, assim como apertados o suficiente para não reportar erradamente a presença destes. No entanto, para o caso dos analitos Modafinil, Octopamina, 5βTHMT e 6β-Hidroxi-metandienona observa-se taxas de TP muito inferiores a 95 %, que indicam elevadas taxas de FN ( $FN = 1 - TP$ ). Ou seja, os critérios utilizados podem deixar escapar um número elevado de verdadeiros positivos. Os falsos positivos podem, no entanto, ser reduzidos através da intervenção atenta do analista, que durante a realização da etapa de confirmação tem em conta pequenos desvios da  $d(RA)$  e  $d(TRR)$  em relação aos limites definidos. É de referir, no entanto que para o presente critério, a reportação de um resultado como FP não é crítica uma vez que se trata de um procedimento de triagem que carece posteriormente de uma confirmação com critérios mais apertados.



**Figura 3.7:** Variação das Taxas de Falsos Positivos, referentes às diferenças de razões de abundância, das substâncias em análise com a concentração. O critério de identificação utilizado na estimativa dos valores foi o critério aplicado no LAD ao procedimento de triagem.

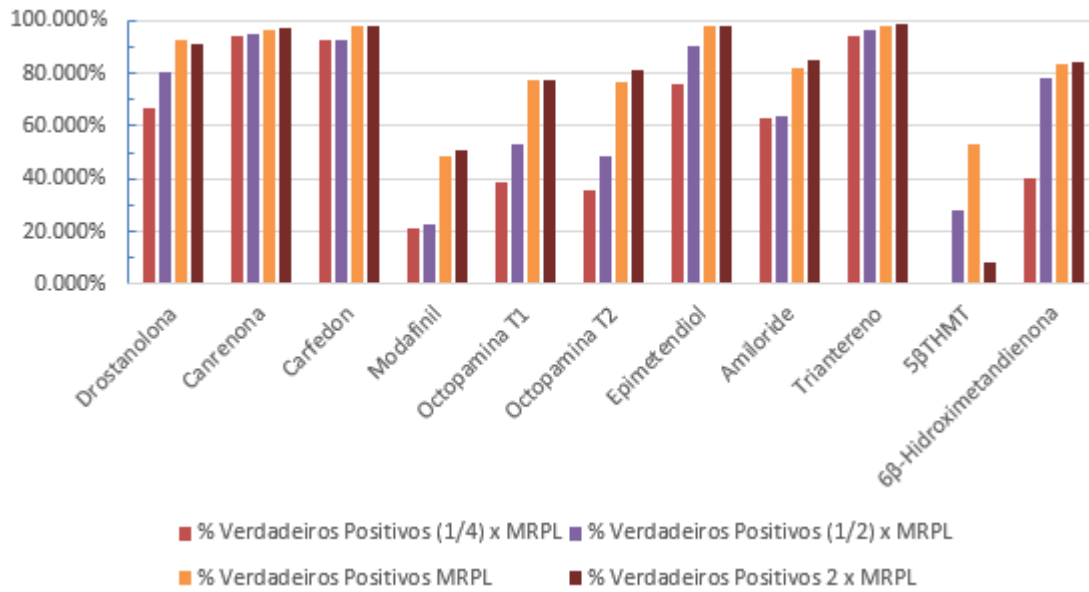
Foram ainda aplicados aos resultados de  $d(RA)$  e  $d(TRR)$  simulados, os critérios de identificação definidos pela WADA para a confirmação da presença de analitos que também se encontram descritos na secção 2.7 com o intuito de estudar e comparar o desempenho destes no que diz respeito às taxas de FP e TP em relação aos dois critérios apresentados anteriormente. Existem, no entanto, analitos cuja simples confirmação da sua presença não é considerada uma infração por si, sendo necessário evidenciar que estes se encontram acima de um dado nível de concentração. Como tal, estes casos recaem sobre o domínio das análises quantitativas. Uma vez que de entre os analitos estudados três deles devem ser analisados quantitativamente para serem considerados positivos, a estimativa das taxas de TP e FP utilizando os critérios da WADA não lhes foi aplicada. São eles os analitos THC, 19-NorA e 19-NorE.

As taxas de TP estimadas para  $d(TRR)$  dos diversos analitos estudados e ao longo da gama de concentração estudada são apresentadas na **Figura 3.8** e na **Tabela 6.16** do **Anexo 5**. É possível observar as semelhanças entre as taxas de TP referentes às diferenças de TRR estimadas através dos critérios da WADA e os critérios utilizados pelo LAD no procedimento de triagem, devendo-se estas ao valor utilizado como tolerância em ambos os critérios. Assim, e tal como no critério anterior, pode-se observar a variação crescente nas taxas de TP à medida que se utilizam níveis de concentração mais elevados, tal como alguma variação atribuída à aleatoriedade das simulações de Monte Carlo e que é responsável pela diminuição das taxas de TP quando se aumenta a concentração. De uma forma geral, os resultados obtidos vão de encontro ao esperado e rondando na sua maioria os 90 %. Quanto à taxa de FP de identificação de analitos referente  $d(TRR)$ , tal como em ambos os casos anteriores, esta foi estimada como sendo 1 % com base na experiência do analista.



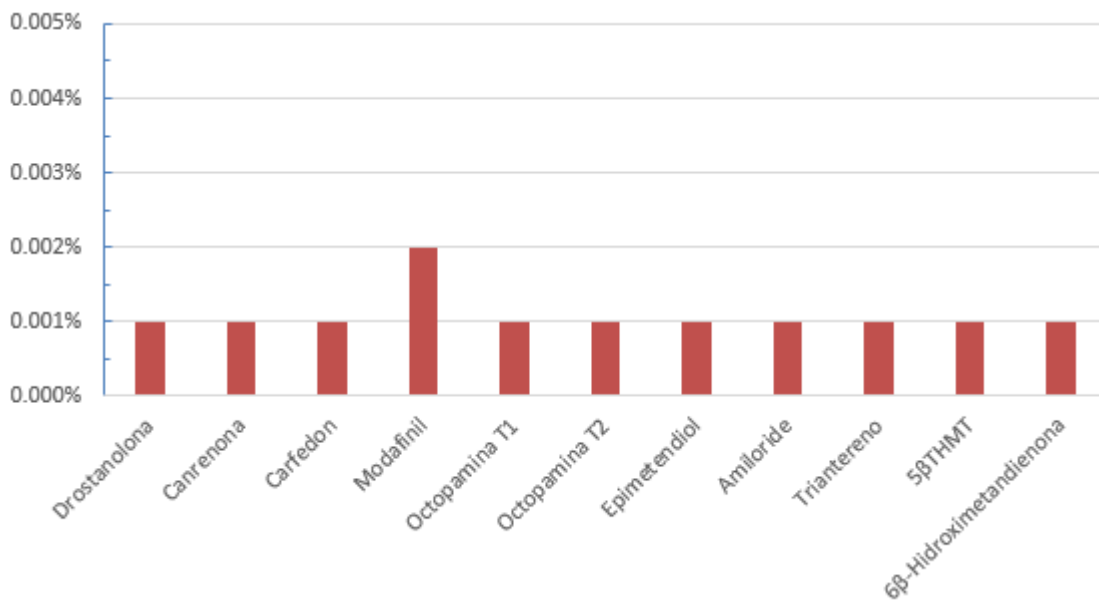
**Figura 3.8:** Taxas de Verdadeiros Positivos, referentes a  $d(TRR)$ , das substâncias em análise, aos quatro níveis de concentração estudados. O critério de identificação utilizado foi o definido pela WADA para a confirmação da presença de analitos.

As taxas de TP referentes às diferenças de razões de abundância, estimadas com base na aplicação dos critérios de identificação definidos pela WADA, têm uma variação com a concentração semelhante à observada aquando da aplicação do critério de identificação anterior na medida em que variam de forma crescente com o aumento da concentração (**Figura 3.9** e **Tabela 6.15** do **Anexo 5**). É, no entanto, possível notar que os valores de TP são menores comparativamente aos valores obtidos para os mesmos analitos e níveis de concentração estimados com base na aplicação do procedimento de triagem. Esta diferença deve-se à tolerância do critério utilizado, que no caso da etapa de triagem é bastante mais larga visto que o objetivo passa pela avaliação inicial e rápida da presença de todos os compostos nas amostras analisadas. O intervalo de aceitação de valores de  $d(RA)$  definido pela WADA é mais apertado pois há a necessidade de garantir que não ocorram falsos positivos. No entanto, a preocupação com a possível ocorrência de falsos positivos resulta, nalguns casos, em valores de falsos negativos elevados. Por exemplo para os analitos Modafinil e 5βTHMT existe uma probabilidade superior a 50 % da presença destes analitos abaixo de 2 x MRPL não serem detetados. Mais uma vez, e tal como em ambos os cenários anteriores, é de referir o caso do analito 5βTHMT cuja taxa de TP diminuí drasticamente entre os níveis de concentração de MRPL e 2 x MRPL pelo mesmo motivo descrito anteriormente.



**Figura 3.9:** Variação das Taxas de Verdadeiros Positivos, referentes às diferenças de razões de abundância, das substâncias em análise com a concentração. O critério de identificação aplicado na estimativa dos valores foi o critério definido pela WADA para a confirmação da presença de analitos.

As taxas de FP referentes a d(RA), foram tal como no critério anterior, definidas no geral e não em função do nível de concentração estudado uma vez que são aplicadas as mesmas razões previamente descritas a sinais três vezes superiores ao ruído observado. Tal como anteriormente as taxas de FP foram calculadas como a média de quatro diferentes simulações sucessivas de forma a apresentarem um valor mais estabilizado e próximo do real. Os resultados obtidos, apresentados na **Figura 3.10** e na **Tabela 6.14** do **Anexo 5**, estão associados a taxas de FP bastante reduzidas, o que seria de esperar visto que os critérios utilizados são mais apertados que os utilizados no procedimento de triagem, impedindo desta forma a incorreta reportação de resultados positivos, que na fase de confirmação seria bastante grave.



**Figura 3.10:** Taxas de Falsos Positivos, referentes às diferenças de razões de abundância, das substâncias em análise com a concentração. O critério de identificação aplicado na estimativa dos valores foi o critério definido pela WADA para a confirmação de analitos.

### 3.4. Razões de verosimilhança e classificação de evidências

Com o objetivo de comparar a qualidade dos exames dos diversos analitos em estudo usando os três critérios de aceitação aplicados, foram calculadas as razões de verosimilhança combinadas para as evidências necessárias à identificação de compostos por GC-MS/MS tendo por base a **Equação 1.6**. O cálculo destas LR combinadas tem em conta os valores das taxas de TP e FP das identificações baseadas nas  $d(RA)$  e  $d(TRR)$ . De forma a facilitar a interpretação e comparação dos resultados, os valores obtidos para LR foram convertidos em  $\log(LR)$  e representados graficamente. A classificação dos resultados é efetuada de acordo com a **Tabela 1.2** proposta pela *UK's Association of Forensic Science Providers*.

Da análise dos valores de LR obtidos quando são usados os critérios de aceitação estatísticos definidos no presente trabalho, e tendo em conta a tabela de classificação de evidências, constata-se que quando os analitos THC, 19-NorE, Drostanolona, Carnenona, Carfedon, Epimetendiol ou Triantereno estão presentes, a qualquer dos níveis de concentração estudados, as evidências relativas à sua presença são extremamente fortes ( $\log(LR) > 6$ ), isto é, a qualidade do exame para estes analitos é extremamente elevada. É ainda possível verificar que a qualidade das identificações é idêntica nestes casos e aos mesmos níveis de concentração (**Figura 3.11.** e **Tabela 6.17** do **Anexo 6**).

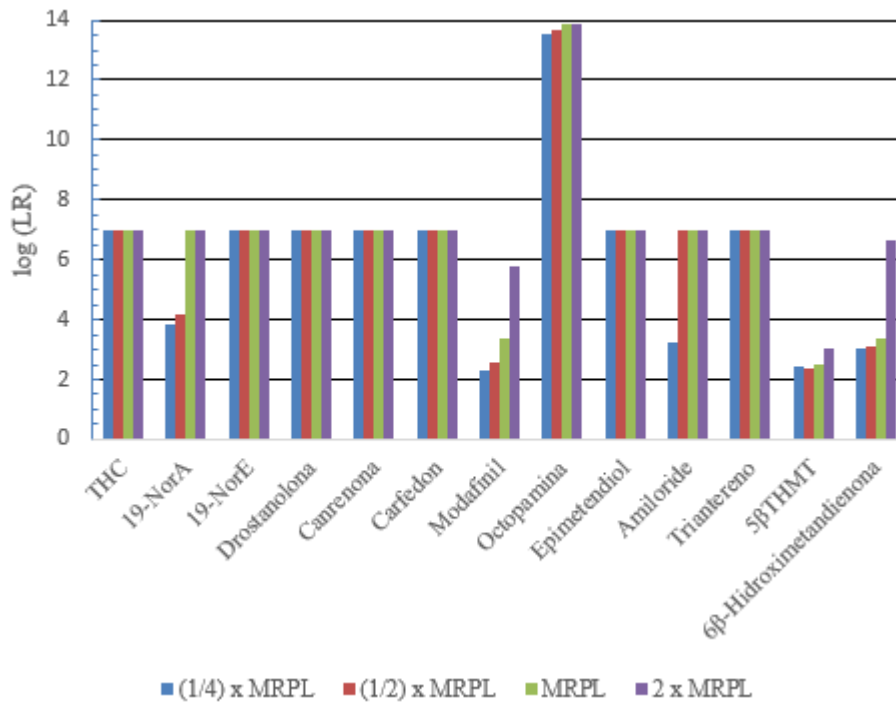
Por outro lado, é possível observar também que relativamente aos analitos 19-NorA, Amiloride e 6 $\beta$ -Hidroximentandienona, a qualidade da identificação aumenta com a concentração. No analito 19-NorA, as evidências produzidas são fortes para o nível de concentração de  $\frac{1}{4} \times MRPL$ , muito fortes para  $\frac{1}{2} \times MRPL$  e extremamente fortes para os dois níveis de concentração mais elevados. Relativamente ao analito Amiloride as evidências produzidas são consideradas fortes para o nível de concentração mais baixo e extremamente fortes para as restantes concentrações. Quanto ao analito 6 $\beta$ -Hidroximentandienona a qualidade da identificação é apenas forte para os três níveis de concentração mais baixos e extremamente forte a  $2 \times MRPL$ .

No caso do analito Octopamina, o valor de  $\log(LR)$  obtido para todos os níveis de concentração destaca-se dos valores obtidos para os restantes analitos uma vez que a presença deste é baseada na aceitação de duas razões de abundância iónicas e do tempo de retenção relativo. Isto é, a presença de uma evidência adicional na forma de uma razão de abundância leva a que a qualidade dos exames desta substância seja melhor.

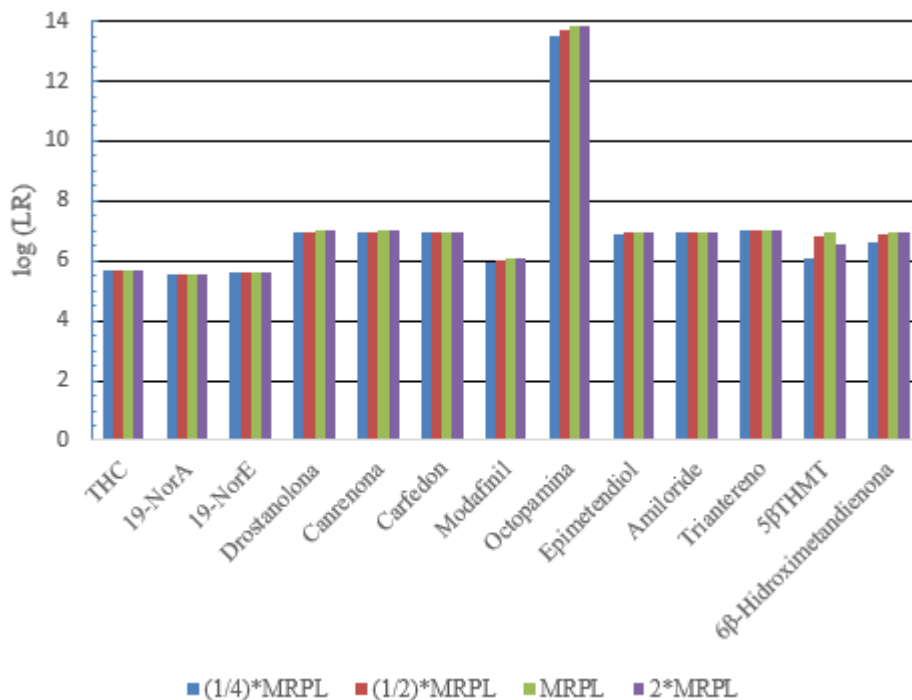
Em relação aos restantes analitos Modafinil e 5 $\beta$ THMT, as evidências relativas à sua presença quando estes se encontram nas amostras são as mais fracas de entre o lote de substância analisadas. No caso do analito Modafinil a qualidade das evidências produzidas aumenta com o aumento da concentração, no entanto para os níveis mais baixos é apenas moderadamente forte. Já o analito 5 $\beta$ THMT quando presente numa amostra conduz apenas à produção de evidências moderadamente fortes ao longo de toda a gama de concentração estudada. A explicação por trás da baixa qualidade do exame para estes analitos deve-se principalmente à presença de interferentes que resultam em estimativas de taxas de FP mais elevadas, afetando assim o valor obtido de  $\log(LR)$  nestes casos.

A qualidade das evidências da presença de analitos foi também calculada tendo em conta os critérios de identificação utilizados pelo LAD no procedimento de triagem, tendo-se obtido os resultados representados graficamente na **Figura 3.12** com a respetiva correspondência na **Tabela 6.18** do **Anexo 6**. Na figura é possível destacar que, de uma forma geral, a qualidade de identificação dos analitos é bastante elevada, sendo que as evidências obtidas para os exames dos diversos analitos aos vários níveis de concentração são ou muito fortes (casos dos analitos THC, 19-NorA e 19-NorE) ou extremamente fortes (restantes analitos), e bastante semelhantes entre si. Tal como para o caso anterior, os dados

relativos ao analito Octopamina destacam-se devido à presença de uma evidência adicional na forma de uma razão de abundâncias.



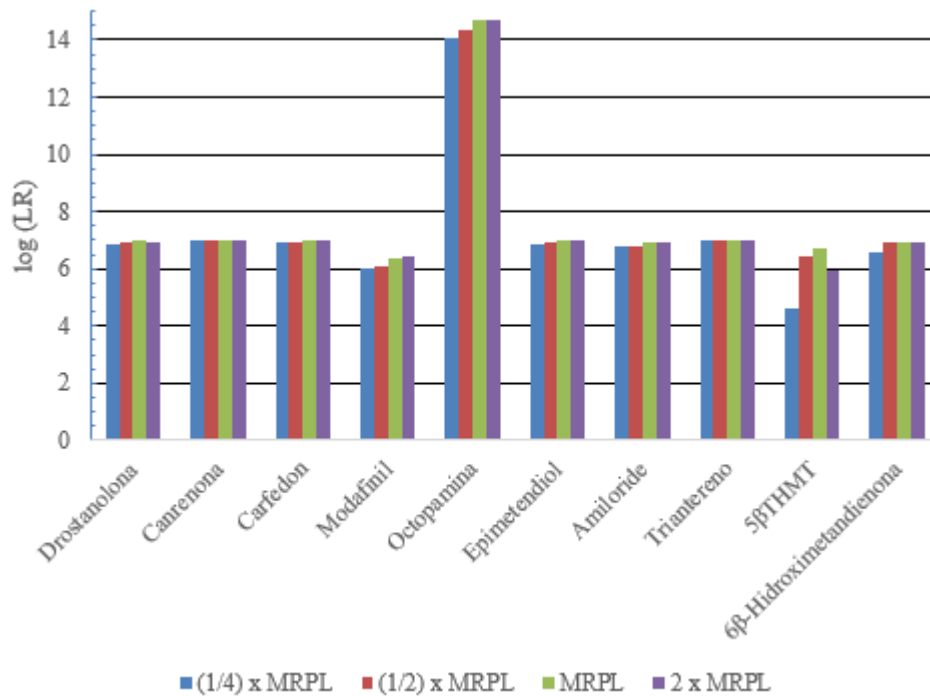
**Figura 3.11:** Representação gráfica do logaritmo das razões de verossimilhança associado aos níveis de concentração estudados com base em d(TRR) e d(RA) considerando os critérios estatísticos de aceitação dos valores de d(TRR) e d(RA).



**Figura 3.12:** Representação gráfica do logaritmo das razões de verossimilhança associado aos níveis de concentração estudados com base em d(TRR) e d(RA) considerando o critério de identificação aplicado no LAD ao procedimento de triagem.

Adicionalmente foi ainda calculada a qualidade do exame tendo em conta os critérios de identificação definidos pela WADA para a confirmação da presença de analitos. Com base nestes, constata-se que para todos os analitos, a sua presença numa amostra leva à produção de evidências

extremamente fortes, com exceção do analito 5 $\beta$ THMT, cuja presença nas amostras aos níveis de concentração de  $\frac{1}{4} \times \text{MRPL}$  e  $2 \times \text{MRPL}$  é apenas corroborada por evidências muito fortes. O analito Octopamina, tal como referido nos dois casos anteriores, destaca-se pela utilização de uma evidência adicional, comparativamente com os restantes analitos, pois é necessária a aceitação de duas razões de abundância iónicas para confirmar a sua presença (**Figura 3.13** e **Tabela 6.19** do **Anexo 6**).



**Figura 3.13:** Representação gráfica das razões de verosimilhança sob a forma Log(LR) para os vários analitos às diversas gamas de concentração estudadas, obtidas para critério de identificação definido pela WADA para a confirmação de analitos.

Após a apresentação das conclusões extraídas das **Figuras 3.11** a **3.13** convém focar que a qualidade de uma metodologia de identificação de compostos é dependente dos valores de LR dos resultados positivos e da taxa de falsos negativos.

### 3.5. Probabilidade *a posteriori*

Para além das razões de verosimilhança da identificação do vários analitos aplicando os três critérios estudados, foi também calculada a probabilidade *a posteriori*  $P(X|e)$  de o analito em causa estar presente quando se obtém um resultado positivo na análise, com o objetivo de estimar a incerteza dos exames usando uma métrica alternativa à LR. O conceito de probabilidade *a posteriori* é de interpretação mais direta por não precisar de uma tabela conversora de LR em níveis de qualidade de evidência.

Os cálculos realizados foram efetuados tendo em conta duas probabilidades *a priori* distintas: assumindo um valor neutro da presença do analito (i.e.,  $P(X) = 0.5$  e  $O(X) = 1$ ) e utilizando os valores referentes ao número de resultados positivos para análises de dopagem do ano de 2015 (World Anti-Doping Agency 2015a) e sumarizadas na **Tabela 3.4**. Posteriormente foram utilizadas as **Equações 1.4** e **1.5** para calcular o valor da distribuição *a posteriori*  $O(X|e)$  e transformá-la numa probabilidade *a posteriori* ( $P(X|e)$ ).

**Tabela 3.4:** Dados relativos a análises de dopagem realizadas pelos laboratórios acreditados pela WADA no ano de 2015. Cálculo da distribuição *a priori* com base nos valores reportados.

<b>Total de análises</b>	303369
<b>Análises positivas <math>P(X)</math></b>	3809
<b>Análises negativas <math>P(\neg X)</math></b>	299560
<b>Distribuição <i>a priori</i> <math>O(X)</math></b>	0,013

As probabilidades *a posteriori* associadas a resultados positivos obtidos para diversas concentrações de analito por aplicação dos diferentes critérios de identificação, considerando as duas probabilidades *a priori* mencionadas encontram-se sumarizadas nas **Tabelas 3.5 a 3.10**. Os valores de  $P(X|e)$  devem ser apresentados com um número elevado de algarismos significativos porque as diversas casas decimais da percentagem de  $P(X|e)$  encerram informação relevante. Por análise das tabelas constata-se que, de uma forma geral, quando se observam evidências da presença de um analito a probabilidade de este se encontrar na amostra é bastante elevada rondando valores entre os 90 % e os 100 %, isto é, para este tipo de análises qualitativas a probabilidade de um resultado positivo estar correto é elevada. No entanto, assumindo  $O(X) = 1$  ou  $O(X) = 0,013$  a *Association of Forensic Sciences* só considera que uma evidência é conclusiva se as  $P(X/e)$  forem superiores a 99,9999 % e 99,9923 % respetivamente.

É também possível observar a diferença existente quando é utilizada uma probabilidade *a priori* neutra ou quando este valor é estimado com base nos resultados das análises reportadas pela WADA. Assim, no primeiro caso, a probabilidade *a posteriori* é mais elevada, como seria de esperar, pois parte-se do princípio que uma amostra tem tanta probabilidade de ter analito como de não ter. A diferença entre  $P(X/e)$  estimado considerando  $O(X) = 0,013$  ou  $O(X) = 1$  é maior quanto menor for o valor de  $P(X/e)$  estimado por  $O(X) = 0,013$

Destaca-se também nestes resultados, a relação com os resultados obtidos para as razões de verosimilhança, sendo que aqueles que apresentam uma probabilidade *a posteriori* mais baixa têm uma menor LR, isto é, a qualidade de resultados positivos é mais reduzida devido a menor qualidade das evidências recolhidas, como se pode verificar nos analitos Modafinil e 5 $\beta$ THMT.

Como observado nos resultados previamente analisados, é ainda de mencionar que a probabilidade de um resultado positivo estar correto aumenta à medida que aumenta a concentração de analito, sendo esta variação mais visível para determinados casos. Esta variação é expectável visto que as evidências obtidas são mais fortes quanto mais o sinal instrumental se destacar do ruído ou de possíveis interferentes de matriz.

**Tabela 3.5:** Probabilidade *a posteriori*  $P(X|e)$  dos analitos a diversos níveis de concentração, tendo em conta o critério estatístico de aceitação estabelecido e  $O(X) = 0,013$ .

Analito \ Concentração	$P(X e)$ (%)			
	$\frac{1}{4} \times MRPL$	$\frac{1}{2} \times MRPL$	$MRPL$	$2 \times MRPL$
<b>THC</b>	99,999	99,999	99,999	99,999
<b>19-NorA</b>	98,921	99,465	99,999	99,999
<b>19-NorE</b>	99,999	99,999	99,999	99,999
<b>Drostanolona</b>	99,999	99,999	99,999	99,999
<b>Canrenona</b>	99,999	99,999	99,999	99,999
<b>Carfedon</b>	99,999	99,999	99,999	99,999
<b>Modafinil</b>	73,121	81,632	96,849	99,988
<b>Octopamina</b>	99,718	99,940	100,000	100,000
<b>Epimetendiol</b>	99,999	99,999	99,999	99,999
<b>Amiloride</b>	95,357	99,999	99,999	99,999
<b>Triantereno</b>	99,999	99,999	99,999	99,999
<b>5<math>\beta</math>THMT</b>	77,334	74,955	79,173	93,556
<b>6<math>\beta</math>-Hidroximetandienona</b>	99,998	99,999	99,999	99,998

**Tabela 3.6:** Probabilidade *a posteriori*  $P(X|e)$  dos analitos a diversos níveis de concentração, tendo em conta o critério estatístico de aceitação estabelecido e  $O(X) = 1$ .

Analito \ Concentração	$P(X e)$ (%)			
	$\frac{1}{4} \times MRPL$	$\frac{1}{2} \times MRPL$	$MRPL$	$2 \times MRPL$
<b>THC</b>	100,000	100,000	100,000	100,000
<b>19-NorA</b>	99,986	99,993	100,000	100,000
<b>19-NorE</b>	100,000	100,000	100,000	100,000
<b>Drostanolona</b>	100,000	100,000	100,000	100,000
<b>Canrenona</b>	100,000	100,000	100,000	100,000
<b>Carfedon</b>	100,000	100,000	100,000	100,000
<b>Modafinil</b>	99,535	99,715	99,959	100,000
<b>Octopamina</b>	99,996	99,999	100,000	100,000
<b>Epimetendiol</b>	100,000	100,000	100,000	100,000
<b>Amiloride</b>	99,938	100,000	100,000	100,000
<b>Triantereno</b>	100,000	100,000	100,000	100,000
<b>5<math>\beta</math>THMT</b>	99,629	99,577	99,667	99,912
<b>6<math>\beta</math>-Hidroximetandienona</b>	100,000	100,000	100,000	100,000

**Tabela 3.7:** Probabilidade a posteriori  $P(X|e)$  dos analitos a diversos níveis de concentração, tendo em conta o critério de aceitação de  $d(RA)$  definido pelo LAD para o procedimento de triagem e  $O(X) = 0,013$ .

Analito \ Concentração	P(X e) (%)			
	$\frac{1}{4} \times MRPL$	$\frac{1}{2} \times MRPL$	MRPL	$2 \times MRPL$
THC	99,983	99,983	99,983	99,983
19-NorA	99,979	99,978	99,979	99,979
19-NorE	99,981	99,981	99,981	99,981
Drostanolona	99,999	99,999	99,999	99,999
Canrenona	99,999	99,999	99,999	99,999
Carfedon	99,999	99,999	99,999	99,999
Modafinil	99,991	99,993	99,993	99,993
Octopamina	100,000	100,000	100,000	100,000
Epimetendiol	99,999	99,999	99,999	99,999
Amiloride	99,999	99,999	99,999	99,999
Triantereno	99,999	99,999	99,999	99,999
5 $\beta$ THMT	99,999	99,999	99,999	99,999
6 $\beta$ -Hidroxi metandienona	99,996	99,999	99,999	99,998

**Tabela 3.8:** Probabilidade *a posteriori* para os analitos e respetivos níveis de concentração estudados, tendo em conta o critério de aceitação de  $d(RA)$  definido pelo LAD para o procedimento de triagem e  $O(X) = 1$ .

Analito \ Concentração	P(X e) (%)			
	$\frac{1}{4} \times MRPL$	$\frac{1}{2} \times MRPL$	MRPL	$2 \times MRPL$
THC	100,000	100,000	100,000	100,000
19-NorA	100,000	100,000	100,000	100,000
19-NorE	100,000	100,000	100,000	100,000
Drostanolona	100,000	100,000	100,000	100,000
Canrenona	100,000	100,000	100,000	100,000
Carfedon	100,000	100,000	100,000	100,000
Modafinil	100,000	100,000	100,000	100,000
Octopamina	100,000	100,000	100,000	100,000
Epimetendiol	100,000	100,000	100,000	100,000
Amiloride	100,000	100,000	100,000	100,000
Triantereno	100,000	100,000	100,000	100,000
5 $\beta$ THMT	100,000	100,000	100,000	100,000
6 $\beta$ -Hidroxi metandienona	100,000	100,000	100,000	100,000

**Tabela 3.9:** Probabilidade *a posteriori*  $P(X|e)$  dos analitos a diversos níveis de concentração, tendo em conta o critério de aceitação de  $d(RA)$  definido pela WADA para a identificação de compostos e  $O(X) = 0,013$ .

Analito \ Concentração	P(X e) (%)			
	$\frac{1}{4} \times MRPL$	$\frac{1}{2} \times MRPL$	MRPL	$2 \times MRPL$
Drostanolona	99,658	99,309	99,654	99,600
Canrenona	99,368	99,303	99,331	99,303
Carfedon	93,389	92,929	94,054	94,528
Modafinil	98,292	98,963	99,616	99,488
Octopamina	89,401	89,922	90,738	91,349
Epimetendiol	99,793	99,829	99,784	99,879
Amiloride	98,469	98,794	98,719	98,792
Triantereno	99,993	99,981	99,988	99,987
5 $\beta$ THMT	57,440	99,960	99,968	99,949
6 $\beta$ -Hidroxi metandienona	99,581	99,176	99,388	99,415

**Tabela 3.10:** Probabilidade *a posteriori*  $P(X|e)$  dos analitos a diversos níveis de concentração, tendo em conta o critério de aceitação de  $d(RA)$  definido pela WADA para a identificação de compostos e  $O(X) = 1$ .

Analito \ Concentração	P(X e) (%)			
	$\frac{1}{4} \times MRPL$	$\frac{1}{2} \times MRPL$	MRPL	$2 \times MRPL$
Drostanolona	100,000	100,000	100,000	100,000
Canrenona	100,000	100,000	100,000	100,000
Carfedon	100,000	100,000	100,000	100,000
Modafinil	100,000	100,000	100,000	100,000
Octopamina	100,000	100,000	100,000	100,000
Epimetendiol	100,000	100,000	100,000	100,000
Amiloride	100,000	100,000	100,000	100,000
Triantereno	100,000	100,000	100,000	100,000
5 $\beta$ THMT	99,998	100,000	100,000	100,000
6 $\beta$ -Hidroxi metandienona	100,000	100,000	100,000	100,000

### 3.6. Comparação dos critérios de identificação estudados

Os resultados obtidos pelas três abordagens baseadas em diferentes critérios de identificação são distintos entre si podendo, no entanto, afirmar-se que, no geral, todas elas garantem a identificação dos analitos estudados aos vários níveis de concentração com uma qualidade de resultados positivos extremamente elevada. Há, no entanto, necessidade de destacar e justificar as diferenças observadas ao nível de taxas de TP, FN, FP, LR e probabilidade *a posteriori*, prendendo-se estas com a forma como os critérios foram definidos.

No caso do critério estatístico definido no presente trabalho, tendo em conta que os limites foram definidos para um nível de confiança de 95 %, os resultados positivos ficam associados a taxas de TP e FN de 95 % e 5 %, respetivamente, independentemente do analito e nível de concentração. Os valores de TP e FN foram confirmados experimentalmente através de 260 ensaios realizados em amostras independentes das utilizadas na definição dos limites. Quanto aos FP e uma vez que os limites são definidos com base no desempenho experimental dos analitos, quando os sinais de analito são muito

dispersos a taxa de FP é mais elevada comparativamente com o observado quando são usados os outros critérios estudados. Estes dois fatores aliados levam a que, por exemplo, as LR e as probabilidades *a posteriori* para determinados analitos como o Modafinil ou o 5 $\beta$ THMT sejam menores comparativamente com o observado para os restantes critérios.

Relativamente ao critério aplicado pelo LAD na fase de triagem, constata-se que, na generalidade dos casos, este é lato o suficiente para que não sejam reportados muitos FN e apertado o suficiente para que não sejam reportadas incorretamente como positivas (suspeitas) muitas amostras, exigindo que sejam sujeitas ao procedimento de confirmação qualitativa. No que diz respeito a taxas de TP para  $d(RA)$ , este critério permite obter valores elevados, mas nem sempre superiores a 95 %, especialmente para analitos cuja razão de abundâncias seja mais variável entre amostras. Como as taxas de FP no geral são extremamente baixas para este critério, a qualidade de resultados positivos é extremamente elevada mesmo para casos onde os TP sejam reduzidos, como se pode verificar ao longo dos resultados obtidos.

Por fim, o critério definido pela WADA é ainda mais apertado pois destina-se à confirmação final da presença de analito onde é importante que não seja reportada erradamente a presença de analitos nas amostras. Desta forma, a tendência observada é a de que se verifiquem valores mais reduzidos nas taxas de TP como consequência da obtenção de valores mínimos nas taxas de FP. Tal como para o critério anterior, por mais baixas que sejam as taxas de TP, as taxas de FP são também extremamente baixas o que conduz a qualidade de resultados positivos extremamente elevadas. É assim evidente que a WADA na definição dos critérios harmonizados de identificação de compostos optou por reduzir drasticamente os FP a custo do aumento dos FN. Nalguns casos, nomeadamente nos analitos Modafinil e 5 $\beta$ THMT, é notório este aumento nas taxas de FN, observando-se para alguns níveis de concentração valores deste parâmetro superiores a 50 % enquanto que os FP nestes casos se mantêm extremamente baixos. Por outro lado, os critérios estatísticos de identificação de compostos definidos no presente trabalho permitem um balanço mais harmonizado entre FN e FP que poderá auxiliar o analista na aplicação dos critérios regulamentados pela WADA.



## **Capítulo 4 – Conclusão**

---



Neste trabalho desenvolveu-se e avaliou-se o desempenho de uma ferramenta computacional que produz critérios estatísticos de identificação da presença de substâncias dopantes em amostras biológicas por GC-MS/MS. Os critérios estatísticos definidos foram comparados com dois critérios previamente aplicados, um ao procedimento de triagem e outro ao procedimento de confirmação final da presença de substâncias dopantes ou relacionadas com estas. Esta comparação foi realizada através da estimativa a incerteza do exame com recurso a métricas do Teorema de Bayes.

A ferramenta computacional utilizada recorre a Simulações Monte Carlo de diferenças de variáveis correlacionadas (i.e., tempos de retenção relativos, TRR), e razões de abundâncias iônicas, RA) caracterizadas experimentalmente de forma a modelar a distribuição dos parâmetros de identificação. A distribuição de diferenças de TRR,  $d(TRR)$  e de RA,  $d(RA)$  é na maioria dos casos não normal, não sendo assim recomendada a utilização de estatística normal no seu estudo.

A ferramenta computacional foi implementada numa folha de cálculo de MS-Excel “transparente” (i.e., cujos algoritmos podem ser acompanhados) e de simples utilização que permite definir os critérios estatísticos de identificação e avaliar o desempenho da identificação, ao nível das taxas de verdadeiros positivos, TP, e falsos positivos, FP, para os analitos monitorizados a diferentes níveis de concentração. Permite ainda a comparação de forma imediata destes parâmetros de desempenho considerando os diversos critérios de identificação estudados. Os critérios de identificação estatísticos definidos foram testados através da análise de amostras independentes das utilizadas na sua definição, tendo os resultados obtidos sido satisfatórios.

Por comparação dos parâmetros de desempenho obtidos para as três abordagens podem ser retiradas algumas conclusões. Em primeiro lugar, a qualidade dos resultados positivos é extremamente elevada na maioria dos casos, apresentando, no entanto, algumas diferenças dependendo do critério em causa. As metodologias de identificação distinguem-se mais pela taxa de falsos negativos, FN, que, nalguns casos apresentam valores bastante elevados.

Para o critério estatístico definido existem alguns casos em que os resultados positivos apresentam níveis de qualidade inferiores ao desejado devido à taxa de FP. De entre os três critérios estudados, apenas o critério definido neste trabalho permite estimar como variam as taxas de FP com a concentração, sendo que nos restantes casos o valor estimado é independente desta. Esta avaliação da variação das taxas de FP em função da concentração realça as vantagens do critério definido, pois permite estudar de uma forma mais exata o desempenho das análises qualitativas. Relativamente às taxas de TP para o critério definido, no presente trabalho estas foram definidas para 95 % de forma a balancear as diversas taxas de resultados falsos. No entanto, o nível de confiança do critério estatístico pode ser alterado com implicações nos diversos parâmetros de desempenho.

A análise dos critérios estudados permite ainda concluir que o critério definido pela WADA para o procedimento de confirmação qualitativa é seguro no que diz respeito a resultados positivos, não existindo dúvida da sua classificação. No entanto, este critério está associado a elevadas taxas de FN, devido à apertada tolerância dos intervalos de aceitação, que podem ser reduzidas por uma avaliação mais atenta por parte do analista.

O procedimento de triagem usado no laboratório está associado a TP e FP mais altos que os observados quando se usam os critérios da WADA, no entanto, o desempenho observado nestas duas fases da identificação não é substancialmente diferente.

O critério estatístico desenvolvido pode ser utilizado como uma ferramenta auxiliar da identificação de substâncias dopantes nos fluídos biológicos com vista a diminuir as taxas de FN, dos outros critérios de identificação tendo como consequência um aumento potencial da taxa de FP, que

deve estar sob controlo por forma a que não sejam incorretamente reportados resultados como positivos. A determinação da incerteza do exame permite reduzir a apresentação de FP visto que um positivo como uma LR menor que 1 000 000 jamais será reportado como um resultado conclusivo. Deve ainda destacar-se que, apesar da grande utilidade da folha de MS-Excel desenvolvida para a definição de critérios de identificação estatísticos, estes não devem ser seguidos inflexivelmente, isto é, há que interpretar os resultados tendo em conta toda a informação disponível sobre o sistema estudado.

#### **4.1. Perspetivas futuras**

Em termos de perspetivas futuras, pode concluir-se que a ferramenta computacional desenvolvida pode ser aplicada à identificação de outras substâncias dopantes habitualmente pesquisadas nos fluidos biológicos dos atletas. A sua utilidade não se limita, no entanto, a substâncias dopantes, podendo também ser aplicada a drogas de abuso e/ou pesticidas, quando analisados por diferentes técnicas cromatográficas.

A vantagem da utilização da ferramenta desenvolvida assim como dos critérios por esta definidos prende-se também com a estimativa da incerteza dos resultados das análises qualitativas, que não é ainda tida em conta nos laboratórios de análise, e que permite a reportação de resultados de uma forma mais fiável. A estimativa de LR permite ainda identificar os procedimentos para o qual a qualidade do exame é adequada, evitando assim o dispêndio de recursos em análises qualitativas adicionais.

Em suma, perspetivam-se novas aplicações para a ferramenta desenvolvida neste trabalho na identificação das mais variadas classes de compostos em matrizes complexas (e.g. biológicas, forenses e ambientais).



## **Capítulo 5 – Bibliografía**

---



- Agilent, T., 2015. What are the differences between Autotune and standard spectra tune? Available at: <http://www.agilent.com/> [Acedido Junho 9, 2017].
- Agilent Technologies, 2010. Gas Chromatograph - Operating Guide. , pp.11–15.
- Aitken, C.G.G. & Taroni, F., 2004. *Statistics and the Evaluation of Evidence* 2nd ed. V. Barnett, ed., England: John Wiley&Sons, Ltd.
- Avois, L. et al., 2006. Central nervous system stimulants and sport practice. *Brit. J. Sports Med.*, 40, pp.16–20.
- Beckett, A.H. & Cowan, D.A., 1979. Misuse of drugs in sport. *Brit. J. Sports Med.*, 1966, pp.185–194.
- Bergamaschi, M.M. & Crippa, J.A.S., 2013. Why should Cannabis be Considered Doping in Sports? *Frontiers in psychiatry*, 4(May), pp.32–42. Available at: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fpsy.2013.00032/abstract>.
- Bettencourt da Silva, R.J.N., 2016. Evaluation of trace analyte identification in complex matrices by low-resolution gas chromatography - Mass spectrometry through signal simulation. *Talanta*, 150, pp.553–567. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2015.12.033>.
- Botrè, F., 2008. New and old challenges of sports drug testing Francesco Botr e. *Journal of Mass Spectrometry*, 43(June), pp.903–907.
- Brabanter, N. de, 2013. *Improvements in Anti-Doping Methods: a focus on cannabinoids*. Universiteit Gent.
- Cadwallader, A.B. et al., 2010. The abuse of diuretics as performance-enhancing drugs and masking agents in sport doping : pharmacology , toxicology and analysis. *British Journal of Pharmacology*, 161, pp.1–16.
- Cowan, D.A., 2011. Drug Testing in Human Sport. Em A. C. Moffat, M. D. Osselton, & B. Widdop, eds. *Clarke's Analysis of Drugs and Poisons*. Pharmaceutical Press.
- Dawling, S., 2011a. Gas Chromatography. Em A. C. Moffat, M. D. Osselton, & B. Widdop, eds. *Clarke's Analysis of Drugs and Poisons*. Pharmaceutical Press, pp. 636–717.
- Dawling, S., 2011b. Gas Chromatography. Em A. C. Moffat, M. D. Osselton, & B. Widdop, eds. *Clarke's Analysis of Drugs and Poisons*. Pharmaceutical Press, pp. 648–649.
- Deventer, K., 2006. *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry , an evolution in doping analysis*. Universiteit Gent.
- Dizikes, P., 2010. MIT News. *Explained: Monte Carlo simulations*. Available at: <http://news.mit.edu/2010/exp-monte-carlo-0517> [Acedido Junho 26, 2017].
- Docherty, J., 2008. Pharmacology of stimulants prohibited by the World Anti-Doping Agency ( WADA ). *British Journal of Pharmacology*, 154(March), pp.606–622.
- Domon, B. & Aebersold, R., 2006. Mass Spectrometry and Protein Analysis. *Science*, 312(April), pp.212–217.
- Ellison, S.L.R., 2000. Uncertainties in qualitative testing and analysis. *Eurachem*, 5, pp.346–348.
- Ellison, S.L.R., Gregory, S. & Hardcastle, W.A., 1998. Quantifying uncertainty in qualitative analysis. *Analyst*, 123(May), pp.1155–1161.
- EURACHEM/CITAC Working Group, 2012. Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement A. Ellison, Stephen L. R.; Williams, ed. , pp.108–114.

- Grob, R.L., 2004. Theory of Gas Chromatography. Em R. L. Grob & E. F. Barry, eds. *Modern Practice Guide of Gas Chromatography*. Nova Jérσία: Wiley-Interscience, pp. 25–64.
- Harrison, R.L., 2010. Introduction To Monte Carlo Simulation. *National Institutes of Health*, pp.17–21.
- Harvey, D., 2000. Chromatographic and Electrophoretic Methods. Em *Modern Analytical Chemistry*. McGraw-Hill, pp. 543–621.
- Honório, K.M., Arroio, A. & Da Silva, A.B.F., 2006. Aspectos terapêuticos de compostos da planta *Cannabis sativa*. *Quimica Nova*, 29(2), pp.318–325.
- Huestis, M.A., Mazzoni, I. & Rabin, O., 2011. Cannabis in sport: Anti-doping perspective. *Sports Medicine*, 41(March 2003), pp.949–966.
- Instituto Português do Desporto e da Juventude, 2012. Laboratório de Análises de Dopagem (LAD). Available at: <http://www.ipdj.pt/lad.html> [Acedido Novembro 3, 2016].
- Instituto Português da Qualidade, 2012. Vocabulário Internacional de Metrologia ( VIM ) - Conceitos Fundamentais e Gerais e Termos Associados.
- IonSource, 2016. Introduction to MS Quantitation and Modes of LC/MS Monitoring. *Mass spectrometry Educational Resource*. Available at: <http://www.ionsource.com/tutorial/msquan/intro.htm> [Acedido Fevereiro 23, 2017].
- Jiménez, C. et al., 2006. Stability studies of amphetamine and ephedrine derivatives in urine. *Journal of Chromatography B: Biomedical Applications*, 843, pp.84–93.
- Kroese, D.P. et al., 2014. Why the Monte Carlo Method is so important today. *WIREs Computational Statistics*, pp.1–10.
- LeBeau, M., 2011. Measuring and Reporting Uncertainty. Em A. C. Moffat, M. D. Osselton, & B. Widdop, eds. *Clarke's Analysis of Drugs and Poisons*. Pharmaceutical Press, pp. 371–387.
- Mareck, U. et al., 2008. Factors influencing the steroid profile in doping control analysis. *Journal of Mass Spectrometry*, 43(June), pp.877–891.
- McDermott, S., 2011. Drugs of Abuse. Em A. C. Moffat, M. D. Osselton, & B. Widdop, eds. *Clarke's Analysis of Drugs and Poisons*. Pharmaceutical Press, p. 200.
- McNair, H.M. & Miller, J.M., 1997. Instrument Overview. Em *Basic Gas Chromatography*. New York: Wiley-Interscience, pp. 14–27.
- Müller, R.K. et al., 1995. Chromatographic techniques-the basis of doping control. *Journal of Chromatography B: Biomedical Applications*, 674, pp.1–11.
- Müller, R.K., 2010. History of Doping and Doping Control. Em *Handbook of Experimental Pharmacology: Doping in Sports*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp. 1–18.
- Polet, M., 2015. *Development of CG-C-IRMS Methods for Anti-Doping Purposes*. Universiteit Gent.
- Pulido, A. et al., 2003. Uncertainty of results in routine qualitative analysis. *Trends in Analytical Chemistry*, 22(10), pp.647–654.
- Reardon, C.L. & Creado, S., 2014. Drug abuse in athletes. *Substance Abuse and Rehabilitation Open*, pp.95–105.
- Renterghem, P. Van, Eenoo, P. Van & Delbeke, F.T., 2010. Population based evaluation of a multi-parametric steroid profiling on administered endogenous steroids in single low dose. *Steroids*, 75(13–14), pp.1047–1057. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.steroids.2010.06.013>.
- Reusch, W., 2013. The Nature of Mass Spectra. *Mass Spectrometry*. Available at: <https://www2.chemistry.msu.edu/faculty/reusch/virttxtjml/spectrpy/massspec/masspec1.htm> [Acedido Dezembro 15, 2016].

- Ríos, A. et al., 2003. Quality assurance of qualitative analysis in the framework of the European project «MEQUALAN». *Accred Qual Assur*, pp.68–77.
- Salgueiro, P., 2016. *Desenvolvimento de modelos quimiométricos com fiabilidade examinológica conhecida para a previsão de acelerantes de combustão em amostras de resíduos de incêndios*. Universidade de Lisboa.
- Saugy, M. et al., 2006. Cannabis and sport. *British journal of sports medicine*, 40 Suppl 1(August), pp.i13–i15.
- Simposium Digital Healthcare, 2016. *Guia Prático sobre a Luta Contra a Dopagem* 1st ed. Simposium Digital Healthcare, ed., Lisboa.
- Singapore Accreditation Council, 2008. A Guide on Measurement Uncertainty in Chemical & Microbiological Analysis. , (March).
- Sottas, P.-E., Saugy, M. & Saudan, C., 2010. Endogenous Steroid Profiling in the Athlete Biological Passport. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*, 39(1), pp.59–73. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecl.2009.11.003>.
- Technische Universität München, 2016a. Diuretics and other masking agents. *Substances and methods*. Available at: <http://www.doping-prevention.com/da/substances-and-methods/diuretics-and-other-masking-agents/diuretics-and-other-masking-agents.html> [Acedido Dezembro 5, 2016].
- Technische Universität München, 2016b. Stimulants. *Substances and methods*. Available at: <http://www.doping-prevention.com/da/substances-and-methods/stimulants/stimulants.html> [Acedido Dezembro 13, 2016].
- Thevis, M., 2010a. History of Sports Drug Testing. Em D. M. Desiderio & N. M. M. Nibbering, eds. *Mass Spectrometry in Sports Drug Testing: Characterization of Prohibited Substances and Doping Control Analytical Assays*. Wiley, pp. 1–44.
- Thevis, M., 2010b. Limitations and Perspectives of Mass Spectrometry - Based Procedures in Doping Control Analysis. Em D. M. Desiderio & N. M. M. Nibbering, eds. *Mass Spectrometry in Sports Drug Testing: Characterization of Prohibited Substances and Doping Control Analytical Assays*. Wiley, p. 344.
- Thevis, M., 2010c. Mass Spectrometry and the List of Prohibited Substances and Methods of Doping. Em D. M. Desiderio & N. M. M. Nibbering, eds. *Mass Spectrometry in Sports Drug Testing: Characterization of Prohibited Substances and Doping Control Analytical Assays*. Wille, pp. 44–69.
- Thevis, M. et al., 2010. Stimulants and Doping in Sport. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*, 39, pp.89–105.
- UK's Association of Forensic Science Providers, 2009. Standards for the formulation of evaluative forensic science expert opinion. *Science & Justice*, 49(3), pp.161–164. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.scijus.2009.07.004>.
- United Nations Office on Drugs and Crimes, 2012. Discussion Paper Cannabis A Short Review. , pp.1–29.
- Ventura, R. & Segura, J., 1996. Detection of diuretic agents in doping control. *Journal of Chromatography B: Biomedical Applications*, 687, pp.127–144.
- Ventura, R. & Segura, J., 2010. Masking and Manipulation. Em *Handbook of Experimental Pharmacology: Doping in Sports*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp. 327–354.
- Verroken, M., 2000. Drug use and abuse in sport. *Baillière's Clinical Endocrinology and Metabolism*, 14(1), pp.1–23.
- World Anti-Doping Agency, 2015a. *2015 Anti-Doping Testing Figures* Anti-Doping Testing Figures by

Laboratory, Montreal, Quebec.

- World Anti-Doping Agency, 2016a. Athlete Biological Passport. *Questions and Answers*. Available at: <https://www.wada-ama.org/en/questions-answers/athlete-biological-passport#item-436> [Acedido Novembro 3, 2016].
- World Anti-Doping Agency, 2016b. Blood Doping. *Questions and Answers*. Available at: <https://www.wada-ama.org/en/questions-answers/blood-doping> [Acedido Novembro 3, 2016].
- World Anti-Doping Agency, 2017a. Decision Limits for the Confirmatory Quantification of Threshold Substances. Em *WADA Technical Document – TD2017DL*. Montreal, Quebec, pp. 1–14.
- World Anti-Doping Agency, 2011. Doping Control Officer’s Training Tool Kit. , (May Version 3.0).
- World Anti-Doping Agency, 2016c. International Standard for Laboratories. Available at: <https://www.wada-ama.org/en/resources/world-anti-doping-program/international-standard-for-testing-and-investigations-isti-0>.
- World Anti-Doping Agency, 2017b. International Standard for Testing and Investigations. Available at: <https://www.wada-ama.org/en/resources/world-anti-doping-program/international-standard-for-testing-and-investigations-isti-0>.
- World Anti-Doping Agency, 2015b. International Standard for the Protection of Privacy and Personal Information. Available at: <https://www.wada-ama.org/en/resources/data-protection/international-standard-for-the-protection-of-privacy-and-personal>.
- World Anti-Doping Agency, 2016d. International Standard for Therapeutic Use Exemptions. , (January), pp.1–25. Available at: <https://www.wada-ama.org/en/resources/therapeutic-use-exemption-tue/international-standard-for-therapeutic-use-exemptions-istue>.
- World Anti-Doping Agency, 2016e. International Standards. *What we do*. Available at: <https://www.wada-ama.org/en/international-standards#Testing> [Acedido Novembro 3, 2016].
- World Anti-Doping Agency, 2017c. Prohibited List.
- World Anti-Doping Agency, 2014. Teacher’s Tool Kit. , (December Version 3.0).
- World Anti-Doping Agency, 2015c. World Anti-Doping Code. , pp.11–12.
- World Anti-Doping Agency - Laboratory Expert Group, 2016. Endogenous Anabolic Androgenic Steroids. Em *WADA Technical Document – TD2016EAAS*. Montreal, Quebec, pp. 1–16.
- World Anti-Doping Agency - Laboratory Expert Group, 2015a. Minimum Required Performance Levels for Detection and Identification of Non-Threshold Substances. Em *WADA Technical Document – TD2015MRPL Document*. Montreal, Quebec, pp. 2–5.
- World Anti-Doping Agency - Laboratory Expert Group, 2015b. WADA Technical Document – TD2015IDCR: Minimum Criteria for Chromatographic-Mass Spectrometric Confirmation of the Identity of Analytes for Doping Control Purposes. Em Montreal, Quebec, pp. 1–5.

## **Capítulo 6 – Anexos**

---



## Anexo 1: Limites de aceitação

**Tabela 6.1:** Limites estatísticos de aceitação de diferenças de razões de abundância e de tempos de retenção relativos entre um controlo e a solução analisada, definidos para um nível de confiança de 95%, para o nível de concentração de analito correspondente a  $\frac{1}{4} \times \text{MRPL}$ .

Analito	d(RA)		d(TRR)	
	Min	Max	Min	Max
THC	-0,079	0,13	-0,005	0,005
19-NorA	-0,387	0,226	-0,007	0,007
19-NorE	-0,260	0,150	-0,007	0,008
Drostanolona	-0,153	0,113	-0,007	0,006
Canrenona	-0,052	0,055	-0,007	0,007
Carfedon	-0,064	0,046	-0,011	0,01
Modafinil	-0,663	0,728	-0,008	0,008
Octopamina T1	-0,388	0,414	-0,013	0,012
Octopamina T2	-0,745	0,866	-0,013	0,012
Epimetendiol	0,084	0,099	-0,006	0,006
Amiloride	-0,334	0,192	-0,008	0,008
Triantereno	-0,121	0,094	-0,004	0,004
5 $\beta$ THMT	0,123	0,664	-0,021	0,028
6 $\beta$ -Hidroxi metandienona	-0,366	0,07	-0,007	0,007

**Tabela 6.2:** Limites estatísticos de aceitação de diferenças de razões de abundância e de tempos de retenção relativos entre um controlo e a solução analisada, definidos para um nível de confiança de 95%, para o nível de concentração de analito correspondente a  $\frac{1}{2} \times \text{MRPL}$ .

Analito	d(RA)		d(TRR)	
	Min	Max	Min	Max
THC	-0,069	0,057	-0,005	0,005
19-NorA	-0,467	0,271	-0,008	0,008
19-NorE	-0,301	0,225	-0,008	0,008
Drostanolona	-0,149	0,079	-0,007	0,007
Canrenona	-0,04	0,04	-0,007	0,007
Carfedon	-0,058	0,039	-0,011	0,011
Modafinil	-0,719	0,566	-0,008	0,007
Octopamina T1	-0,147	0,237	-0,012	0,012
Octopamina T2	-0,353	0,572	-0,012	0,012
Epimetendiol	-0,052	0,073	-0,006	0,006
Amiloride	-0,298	0,296	-0,008	0,007
Triantereno	-0,081	0,077	-0,005	0,005
5 $\beta$ THMT	-0,163	0,501	-0,005	0,005
6 $\beta$ -Hidroxi metandienona	-0,149	0,073	-0,007	0,007

**Tabela 6.3:** Limites estatísticos de aceitação de diferenças de razões de abundância e de tempos de retenção relativos entre um controlo e a solução analisada, definidos para um nível de confiança de 95%, para o nível de concentração de analito correspondente a  $2 \times$  MRPL.

Analito	d(RA)		d(TRR)	
	Min	Máx	Min	Máx
THC	-0,055	0,061	-0,005	0,005
19-NorA	-0,28	0,234	-0,007	0,007
19-NorE	-0,134	0,157	-0,008	0,008
Drostanolona	-0,051	0,075	-0,007	0,007
Canrenona	-0,031	0,02	-0,007	0,007
Carfedon	-0,029	0,03	-0,011	0,011
Modafinil	-0,452	0,352	-0,007	0,007
Octopamina T1	-0,085	0,137	-0,011	0,011
Octopamina T2	-0,194	0,24	-0,011	0,011
Epimetendiol	-0,042	0,038	-0,006	0,006
Amiloride	-0,19	0,198	-0,008	0,008
Triantereno	-0,048	0,068	-0,005	0,005
5 $\beta$ THMT	-0,594	0,086	-0,005	0,005
6 $\beta$ -Hidroxi metandienona	-0,091	0,073	-0,006	0,007

## Anexo 2: Diferenças de razões de abundâncias e tempos de retenção relativos entre controlo e amostras analisadas

**Tabela 6.4:** Diferenças de razões de abundância de ião entre um controlo positivo e as amostras fortificadas para um nível de concentração de analito correspondente a  $\frac{1}{4} \times$  MRPL. Os valores a negrito encontram-se fora dos limites de aceitação estabelecidos para um nível de confiança de 95%.

Analito	d(RA)				
	#01	#02	#03	#04	#05
THC	-0,067	-0,008	-0,041	-0,014	-0,007
19-NorA	-0,009	0,068	-0,039	-0,022	0,069
19-NorE	-0,051	-0,042	-0,153	-0,100	0,010
Drostanolona	-0,065	0,042	-0,023	-0,036	-0,007
Canrenona	0,029	0,012	0,015	-0,003	0,009
Carfedon	-0,042	-0,027	-0,055	-0,017	<b>-0,093</b>
Modafinil	0,179	0,396	0,325	0,176	0,190
Octopamina T1	-0,093	0,069	0,350	-0,040	0,215
Octopamina T2	0,026	-0,012	0,045	-0,088	0,032
Epimetendiol	0,026	-0,043	-0,020	-0,043	-0,012
Amiloride	-0,002	-0,020	-0,270	-0,033	0,000
Triantereno	0,017	0,006	-0,016	-0,061	-0,023
5 $\beta$ THMT	<b>-0,054</b>	0,329	<b>0,032</b>	0,300	0,232
6 $\beta$ -Hidroxi metandienona	-0,162	-0,060	-0,357	<b>0,077</b>	<b>-1,572</b>

**Tabela 6.5:** Diferenças de tempos de retenção relativos entre um controlo positivo e as amostras fortificadas para um nível de concentração de analito correspondente a  $\frac{1}{4} \times \text{MRPL}$ . Todos os valores se encontram dentro dos limites de aceitação estabelecido para um intervalo de confiança de 95%.

Analito	d(TRR)				
	#01	#02	#03	#04	#05
<b>THC</b>	-0,0005	-0,0009	-0,0007	-0,0001	-0,0004
<b>19-NorA</b>	0,0005	0,0001	0,0008	0,0005	0,0010
<b>19-NorE</b>	-0,0004	-0,0004	0,0007	0,0001	0,0002
<b>Drostanolona</b>	-0,0002	-0,0002	-0,0003	0,0001	-0,0001
<b>Canrenona</b>	-0,0005	-0,0003	0,0013	0,0002	0,0007
<b>Carfedon</b>	-0,0006	0,0005	0,0001	0,0005	0,0003
<b>Modafinil</b>	0,0001	0,0014	0,0022	0,0008	0,0010
<b>Octopamina</b>	-0,0005	-0,0005	0,0002	-0,0005	-0,0007
<b>Epimetendiol</b>	0,0009	0,0005	0,0012	0,0005	0,0007
<b>Amiloride</b>	0,0002	0,0002	0,0015	0,0010	0,0006
<b>Triantereno</b>	0,0005	0,0005	0,0011	0,0005	0,0011
<b>5βTHMT</b>	0,0004	0,0000	0,0001	-0,0008	-0,0004
<b>6β-Hidroxi metandienona</b>	0,0000	0,0000	0,0015	0,0000	0,0009

**Tabela 6.6:** Diferenças de razões de abundância de ião entre um controlo positivo e as amostras fortificadas para um nível de concentração de analito correspondente a  $\frac{1}{2} \times \text{MRPL}$ . Os valores a negrito encontram-se fora dos limites de aceitação estabelecidos para um nível de confiança de 95%.

Analito (RA)	d(RA)				
	#01	#02	#03	#04	#05
<b>THC</b>	0,009	-0,016	-0,019	-0,029	-0,051
<b>19-NorA</b>	-0,039	-0,021	0,041	-0,002	0,071
<b>19-NorE</b>	-0,066	-0,068	-0,061	-0,036	-0,056
<b>Drostanolona</b>	-0,057	-0,030	-0,030	0,009	-0,023
<b>Canrenona</b>	-0,022	0,013	0,007	0,018	0,003
<b>Carfedon</b>	-0,034	-0,021	-0,015	-0,002	-0,049
<b>Modafinil</b>	0,092	0,166	0,254	-0,012	0,123
<b>Octopamina T1</b>	-0,001	0,078	0,167	-0,051	0,024
<b>Octopamina T2</b>	0,018	0,013	0,053	-0,029	-0,004
<b>Epimetendiol</b>	0,002	0,035	0,017	0,025	-0,031
<b>Amiloride</b>	0,005	-0,041	-0,126	-0,004	-0,038
<b>Triantereno</b>	-0,036	0,033	0,026	-0,005	0,000
<b>5βTHMT</b>	-0,026	0,179	0,032	0,030	0,314
<b>6β-Hidroxi metandienona</b>	-0,062	-0,042	-0,111	0,060	<b>-0,828</b>

**Tabela 6.7:** Diferenças de tempos de retenção relativos entre um controlo positivo e as amostras fortificadas para um nível de concentração correspondente a  $\frac{1}{2} \times \text{MRPL}$ . Todos os valores se encontram dentro dos limites de aceitação estabelecidos para um intervalo de confiança de 95%.

Analito	d(TRR)				
	#01	#02	#03	#04	#05
THC	-0,0004	-0,0004	-0,0010	-0,0001	-0,0008
19-NorA	0,0002	0,0006	0,0017	0,0001	0,0002
19-NorE	-0,0003	-0,0003	0,0012	0,0001	0,0001
Drostanolona	0,0002	0,0002	0,0002	0,0001	-0,0005
Canrenona	-0,0001	0,0001	0,0020	0,0002	0,0005
Carfedon	-0,0001	0,0010	0,0006	0,0005	0,0010
Modafinil	-0,0003	0,0005	0,0019	0,0001	0,0005
Octopamina	-0,0011	-0,0011	-0,0005	-0,0005	-0,0001
Epimetendiol	-0,0042	0,0006	0,0013	0,0005	0,0002
Amiloride	0,0002	0,0006	0,0017	0,0005	0,0002
Triantereno	0,0006	0,0006	0,0013	0,0008	0,0004
5 $\beta$ THMT	0,0008	0,0003	0,0009	0,0003	-0,0001
6 $\beta$ -Hidroxi metandienona	0,0005	0,0005	0,0020	0,0000	0,0005

**Tabela 6.8** Diferenças de razões de abundância de ião entre um controlo positivo e as amostras fortificadas para um nível de concentração de analito correspondente a  $2 \times \text{MRPL}$ . Os valores a negrito encontram-se fora dos limites de aceitação estabelecidos para um intervalo de confiança de 95%.

Analito (RA)	d(RA)				
	#01	#02	#03	#04	#05
THC	-0,009	-0,020	-0,019	-0,016	-0,013
19-NorA	-0,030	0,030	0,038	0,056	0,016
19-NorE	-0,042	-0,069	-0,067	-0,032	-0,067
Drostanolona	0,000	-0,007	-0,005	0,008	-0,040
Canrenona	-0,004	0,015	0,010	0,007	0,011
Carfedon	-0,016	-0,008	-0,004	-0,013	-0,017
Modafinil	-0,092	0,047	0,008	-0,061	-0,041
Octopamina T1	0,002	-0,037	-0,063	0,002	0,020
Octopamina T2	-0,026	-0,052	-0,025	-0,036	-0,006
Epimetendiol	0,009	0,005	0,004	0,004	0,023
Amiloride	-0,018	0,024	-0,006	-0,004	0,015
Triantereno	-0,009	0,011	0,013	-0,010	-0,005
5 $\beta$ THMT	-0,400	-0,299	-0,215	-0,124	-0,139
6 $\beta$ -Hidroxi metandienona	0,026	0,043	-0,004	0,024	<b>-0,162</b>

**Tabela 6.9:** Diferenças de tempos de retenção relativos entre um controlo positivo e as amostras fortificadas para um nível de concentração correspondente a  $2 \times MRPL$ . Todos os valores se encontram dentro dos limites de aceitação estabelecidos para um intervalo de confiança de 95%.

Analito	d(TRR)				
	#01	#02	#03	#04	#05
<b>THC</b>	-0,0004	-0,0009	-0,0016	-0,0005	-0,0008
<b>19-NorA</b>	0,0002	0,0001	0,0012	0,0001	0,0006
<b>19-NorE</b>	0,0001	-0,0007	0,0007	0,0001	0,0001
<b>Drostanolona</b>	0,0002	-0,0002	-0,0007	0,0001	-0,0001
<b>Canrenona</b>	0,0004	0,0000	0,0016	0,0005	0,0006
<b>Carfedon</b>	0,0021	0,0016	0,0001	0,0029	0,0021
<b>Modafinil</b>	0,0000	0,0001	0,0009	-0,0002	0,0000
<b>Octopamina T1</b>	-0,0001	-0,0005	-0,0020	-0,0005	-0,0001
<b>Epimetendiol</b>	0,0002	0,0001	0,0008	0,0001	0,0002
<b>Amiloride</b>	0,0010	0,0005	0,0007	0,0010	0,0002
<b>Triantereno</b>	0,0006	0,0002	0,0008	0,0005	0,0006
<b>5<math>\beta</math>THMT</b>	0,0003	-0,0001	0,0004	0,0003	0,0003
<b>6<math>\beta</math>-Hidroxi metandienona</b>	0,0005	0,0000	0,0015	0,0000	0,0005

### Anexo 3: Taxas de Falsos Positivos e Verdadeiros Positivos para os critérios de aceitação definidos no presente trabalho

**Tabela 6.10:** Taxas de Falsos Positivos e Verdadeiros Positivos, referentes à identificação baseada em valores de d(RA) observados aos quatro níveis de concentração estudados, considerando os critérios estatísticos definidos para este parâmetro.

Analito	FP $\frac{1}{4} \times MRPL$ (%)	FP $\frac{1}{2} \times MRPL$ (%)	FP MRPL (%)	FP $2 \times MRPL$ (%)	TP (%)
<b>THC</b>	0,001	0,001	0,001	0,001	95
<b>19-NorA</b>	1,252	0,617	0,001	0,001	95
<b>19-NorE</b>	0,001	0,001	0,001	0,001	95
<b>Drostanolona</b>	0,001	0,001	0,001	0,001	95
<b>Canrenona</b>	0,001	0,001	0,001	0,001	95
<b>Carfedon</b>	0,001	0,001	0,001	0,001	95
<b>Modafinil</b>	42,183	25,821	3,733	0,014	95
<b>Octopamina T1</b>	42,128	20,914	0,001	0,001	95
<b>Octopamina T2</b>	69,460	29,549	0,001	0,001	95
<b>Epimetendiol</b>	0,001	0,001	0,001	0,001	95
<b>Amiloride</b>	5,588	0,001	0,001	0,001	95
<b>Triantereno</b>	0,001	0,001	0,001	0,001	95
<b>5<math>\beta</math>THMT</b>	33,634	38,343	30,188	7,904	95
<b>6<math>\beta</math>-Hidroxi metandienona</b>	7,862	7,311	3,618	0,002	95

### Anexo 4: Taxas de Falsos Positivos e Verdadeiros Positivos aplicando os critérios utilizados pelo laboratório no procedimento de triagem

**Tabela 6.11:** Taxas de Falsos Positivos, FP, observada utilizando a diferença de razões de abundância máxima admissível usando o procedimento de triagem do LAD.

<i>Analito</i>	<i>FP d(RA) (%)</i>
<i>THC</i>	0,022
<i>19-NorA</i>	0,027
<i>19-NorE</i>	0,024
<i>Drostanolona</i>	0,001
<i>Canrenona</i>	0,001
<i>Carfedon</i>	0,001
<i>Modafinil</i>	0,008
<i>Octopamina T1</i>	0,001
<i>Octopamina T2</i>	0,001
<i>Epimetendiol</i>	0,001
<i>Amiloride</i>	0,001
<i>Triantereno</i>	0,001
<i>5βTHMT</i>	0,001
<i>6β-Hidroximetandienona</i>	0,001

**Tabela 6.12:** Taxas de Verdadeiros Positivos, TP, observada utilizando a diferença de razões de abundância máxima admissível usando o procedimento de triagem do LAD. São apresentados valores estimados para quatro níveis de concentração de analito.

<i>Analito</i>	<i>TP d(RA) (%)</i>			
	$\frac{1}{4} \times MRPL$	$\frac{1}{2} \times MRPL$	<i>MRPL</i>	$2 \times MRPL$
<i>THC</i>	99,563	99,791	99,849	99,862
<i>19-NorA</i>	98,902	97,771	97,929	98,901
<i>19-NorE</i>	99,347	98,758	99,716	99,743
<i>Drostanolona</i>	94,566	95,491	98,620	98,768
<i>Canrenona</i>	96,914	97,690	99,020	99,316
<i>Carfedon</i>	96,914	97,240	99,020	98,993
<i>Modafinil</i>	76,085	89,886	93,499	94,226
<i>Octopamina T1</i>	52,222	73,259	89,946	89,846
<i>Octopamina T2</i>	73,582	85,215	95,823	96,154
<i>Epimetendiol</i>	73,366	88,953	97,454	97,079
<i>Amiloride</i>	92,210	92,018	95,383	95,659
<i>Triantereno</i>	99,135	99,292	99,484	99,670
<i>5βTHMT</i>	19,644	66,635	86,190	38,657
<i>6β-Hidroximetandienona</i>	40,885	80,611	84,974	86,371

**Tabela 6.13:** Taxas de Verdadeiros Positivos, TP, observadas utilizando a diferença de tempos de retenção relativos máxima admissível usando no procedimento de triagem do LAD. São apresentados valores estimados para quatro níveis de concentração de analito.

<i>Analito</i>	<i>TP d(TRR) (%)</i>			
	$\frac{1}{4} \times MRPL$	$\frac{1}{2} \times MRPL$	<i>MRPL</i>	$2 \times MRPL$
<i>THC</i>	99,979	99,963	99,968	99,959
<i>19-NorA</i>	99,531	98,765	99,612	99,572
<i>19-NorE</i>	98,977	98,313	98,781	98,070
<i>Drostanolona</i>	99,613	99,330	99,625	99,561
<i>Canrenona</i>	99,413	99,294	99,307	99,381
<i>Carfedon</i>	93,457	93,011	94,198	94,489
<i>Modafinil</i>	98,280	98,955	99,624	99,543
<i>Octopamina</i>	89,105	89,909	90,857	91,398
<i>Epimetendiol</i>	99,786	99,857	99,782	99,860
<i>Amiloride</i>	98,479	98,836	98,658	98,744
<i>Triantereno</i>	99,996	99,989	99,989	99,989
<i>5<math>\beta</math>THMT</i>	57,817	99,961	99,969	99,941
<i>6<math>\beta</math>-Hidroxi metandienona</i>	99,520	99,508	99,569	99,651

### Anexo 5: Taxas de Falsos Positivos e Verdadeiros Positivos aplicando os critérios definidos pela WADA para a confirmação de analitos

**Tabela 6.14:** Taxas de Falsos Positivos, FP, observadas utilizando a diferença de razões de abundância de íons máxima admissível indicada pela WADA.

<i>Analito</i>	<i>FP d(RA) (%)</i>
<i>Drostanolona</i>	0,001
<i>Canrenona</i>	0,001
<i>Carfedon</i>	0,001
<i>Modafinil</i>	0,002
<i>Octopamina T1</i>	0,001
<i>Octopamina T2</i>	0,001
<i>Epimetendiol</i>	0,001
<i>Amiloride</i>	0,001
<i>Triantereno</i>	0,001
<i>5<math>\beta</math>THMT</i>	0,001
<i>6<math>\beta</math>-Hidroxi metandienona</i>	0,001

**Tabela 6.15:** Taxas de Verdadeiros Positivos, TP, observadas utilizando a diferença de razões de abundância de íons máxima admissível indicada pela WADA. São apresentados valores estimados para quatro níveis de concentração de analito.

<i>Analito</i>	<i>TP d(RA) (%)</i>			
	$\frac{1}{4} \times MRPL$	$\frac{1}{2} \times MRPL$	<i>MRPL</i>	$2 \times MRPL$
<i>Drostanolona</i>	67,172	80,257	92,744	91,561
<i>Canrenona</i>	94,585	95,324	96,344	97,545
<i>Carfedon</i>	92,865	92,866	98,287	98,342
<i>Modafinil</i>	21,136	22,892	48,745	50,842
<i>Octopamina T1</i>	38,825	53,273	77,541	77,556
<i>Octopamina T2</i>	35,867	48,324	76,561	81,545
<i>Epimetendiol</i>	76,096	90,278	97,853	98,230
<i>Amiloride</i>	62,876	63,702	82,247	85,297
<i>Triantereno</i>	93,985	96,828	97,920	98,558
<i>5<math>\beta</math>THMT</i>	0,761	27,840	53,461	8,467
<i>6<math>\beta</math>-Hidroximetandienona</i>	40,477	78,459	83,746	84,404

**Tabela 6.16:** Taxas de Verdadeiros Positivos, TP, observadas utilizando a diferença de tempos de retenção relativos máxima admissível indicada pela WADA. São apresentados valores estimados para quatro níveis de concentração de analito.

<i>Analito</i>	<i>TP d(TRR) (%)</i>			
	$\frac{1}{4} \times MRPL$	$\frac{1}{2} \times MRPL$	<i>MRPL</i>	$2 \times MRPL$
<i>Drostanolona</i>	99,658	99,309	99,654	99,600
<i>Canrenona</i>	99,368	99,303	99,331	99,303
<i>Carfedon</i>	93,389	92,929	94,054	94,528
<i>Modafinil</i>	98,292	98,963	99,616	99,488
<i>Octopamina</i>	89,401	89,922	90,738	91,349
<i>Epimetendiol</i>	99,793	99,829	99,784	99,879
<i>Amiloride</i>	98,469	98,794	98,719	98,792
<i>Triantereno</i>	99,993	99,981	99,988	99,987
<i>5<math>\beta</math>THMT</i>	57,440	99,960	99,968	99,949
<i>6<math>\beta</math>-Hidroximetandienona</i>	99,581	99,176	99,388	99,415

## Anexo 6: Razões de verosimilhança para os diferentes critérios de identificação estudados

**Tabela 6.17:** Valores do logaritmo da razão de verosimilhança  $\log(LR)$  da identificação dos analitos estudados usando várias gamas de concentração, considerando os critérios de aceitação estudados definidos no presente trabalho.

<i>Analito \ Concentração</i>	<i>log (LR)</i>			
	$\frac{1}{4} \times MRPL$	$\frac{1}{2} \times MRPL$	<i>MRPL</i>	$2 \times MRPL$
<i>THC</i>	6,96	6,96	6,96	6,96
<i>19-NorA</i>	3,86	4,17	6,96	6,96
<i>19-NorE</i>	6,96	6,96	6,96	6,96
<i>Drostanolona</i>	6,96	6,96	6,96	6,96
<i>Canrenona</i>	6,96	6,96	6,96	6,96
<i>Carfedon</i>	6,96	6,96	6,96	6,96
<i>Modafinil</i>	2,33	2,54	3,38	5,81
<i>Octopamina</i>	13,52	13,70	13,85	13,86
<i>Epimetendiol</i>	6,96	6,96	6,96	6,96
<i>Amiloride</i>	3,21	6,96	6,96	6,96
<i>Triantereno</i>	6,96	6,96	6,96	6,96
<i>5<math>\beta</math>THMT</i>	2,43	2,37	2,48	3,06
<i>6<math>\beta</math>-Hidroximetandienona</i>	3,06	3,09	3,40	6,65

**Tabela 6.18:** Valores do logaritmo da razão de verosimilhança  $\log(LR)$  da identificação dos analitos estudados usando várias gamas de concentração, considerando o critério de identificação aplicado no LAD na etapa de triagem.

<i>Analito \ Concentração</i>	<i>log (LR)</i>			
	$\frac{1}{4} \times MRPL$	$\frac{1}{2} \times MRPL$	<i>MRPL</i>	$2 \times MRPL$
<i>THC</i>	5,66	5,66	5,66	5,66
<i>19-NorA</i>	5,57	5,56	5,57	5,57
<i>19-NorE</i>	5,62	5,61	5,62	5,61
<i>Drostanolona</i>	6,97	6,98	6,99	6,99
<i>Canrenona</i>	6,98	6,99	6,99	6,99
<i>Carfedon</i>	6,96	6,96	6,97	6,97
<i>Modafinil</i>	5,96	6,03	6,05	6,06
<i>Octopamina</i>	13,48	13,70	13,85	13,86
<i>Epimetendiol</i>	6,86	6,95	6,99	6,99
<i>Amiloride</i>	6,96	6,96	6,97	6,98
<i>Triantereno</i>	7,00	7,00	7,00	7,00
<i>5<math>\beta</math>THMT</i>	6,06	6,82	6,94	6,59
<i>6<math>\beta</math>-Hidroximetandienona</i>	6,61	6,90	6,93	6,93

**Tabela 6.19:** Valores do logaritmo da razão de verossimilhança  $\log(LR)$  da identificação dos analitos estudados usando várias gamas de concentração, considerando o critério de identificação definido pela WADA para a confirmação de analitos.

<i>Analito \ Concentração</i>	<i>log (LR)</i>			
	$\frac{1}{4} \times MRPL$	$\frac{1}{2} \times MRPL$	<i>MRPL</i>	$2 \times MRPL$
<i>Drostanolona</i>	6,83	6,90	6,97	6,96
<i>Canrenona</i>	6,97	6,98	6,98	6,99
<i>Carfedon</i>	6,94	6,94	6,97	6,97
<i>Modafinil</i>	6,02	6,05	6,39	6,40
<i>Octopamina</i>	14,05	14,32	14,69	14,72
<i>Epimetendiol</i>	6,88	6,95	6,99	6,99
<i>Amiloride</i>	6,79	6,80	6,91	6,93
<i>Triantereno</i>	6,97	6,99	6,99	6,99
<i>5<math>\beta</math>THMT</i>	4,64	6,44	6,73	5,93
<i>6<math>\beta</math>-Hidroxi metandienona</i>	6,61	6,89	6,92	6,92