

Identificação de Substâncias Proibidas: contribuição da Química no controle Antidoping de Enobosarm

DOI: 10.5281/zenodo.11089845

Júlia R. Vargas ^{a*}

The article sought to investigate the use of UHPLC for the detection and quantification of ostarine, a selective androgen receptor modulator used to replace other anabolic steroids. The results presented demonstrate the possibility of using the UHPLC method for analysing biological samples and, therefore, it presents itself as a promising analytical method to be used in anti-doping surveillance.

O artigo buscou investigar o uso de UHPLC para detecção e quantificação de ostarina, um modulador seletivo de receptor andrógeno utilizado em substituição a outros anabolizantes esteroides. Os resultados apresentados demonstram possibilidade de uso do método de UHPLC para análise de amostras biológicas e, portanto, apresenta-se como um método analítico promissor a ser empregado na vigilância *antidoping*.

^a Universidade de Brasília (UnB). Campus Darcy Ribeiro. Instituto de Química (IQ/UnB). Brasília, Distrito Federal, Brasil.

*E-mail: r.j.vaargas@gmail.com

Palavras-chave: *Antidoping*; Ostarine; MK2866; Enobosarm; UHPLC.

Aceito em 21 de março de 2024,
Aprovado em 24 de abril de 2024,
Publicado em 01 de maio de 2024.

Introdução

O ideal esportivo traz a crença de igualdade de oportunidades entre os atletas, que tem a dedicação, o talento e o esforço individual como fatores determinantes para a vitória. No entanto, com o avanço da ciência e da farmacologia, foram identificadas e sintetizadas muitas substâncias que atuam, direta ou indiretamente, sobre atributos físicos de interesse de atletas e, quando se há dúvida sobre a legitimidade das vitórias por uso de alguma dessas substâncias, essa confiança no mérito e na integridade dos atletas é ameaçada. O controle *antidoping* começou como uma forma de mitigar as preocupações sobre o uso de substâncias que poderiam, de alguma forma, interferir no desempenho de atletas e gerar vantagens injustas, ameaçando, portanto, a essência do esporte.¹

À medida que os casos de *doping* foram se tornando cada vez mais evidentes e ganhando cada vez mais notoriedade, surge um esforço mundial coordenado para garantir a integridade e igualdade em competições esportivas. A resolutive desse esforço é a criação da Agência Mundial *Antidoping* ou Agência Mundial Antidopagem (WADA, em inglês, *World Anti-Doping Agency*) em 1999,^{1,2} associada ao Comitê Olímpico Internacional (COI), que coordena e monitora os esforços *antidoping*, definindo padrões e diretrizes a serem aplicadas em competições esportivas ao redor do mundo.¹ Em 2003, foi introduzido o Código Mundial *Antidoping*,^{1,3} de atualização anual, que compila as substâncias

proibidas em períodos de competição e a todo tempo, bem como define os métodos de detecção. No Brasil, esse Código é observado pela Autoridade Brasileira de Controle de Dopagem (ABCD) e pelo Ministério do Esporte (MESP).²

O Código traz duas grandes categorias, a saber: **a)** substâncias e métodos proibidos em todo tempo; ou seja, são proibidas em competição e fora de competição; e **b)** substâncias e métodos proibidos em competição, que começa às 23 h 59 min do dia anterior a uma competição em que o atleta deverá participar, mas há a possibilidade de determinação de períodos diferentes para determinado esporte. Importante ressaltar que o período de competição não se finaliza após a partida, mas sim ao final da competição, com a finalização do processo de coleta de amostras. As amostras, por sua vez, podem ser de sangue, cabelo ou urina (mais comum), coletadas na presença de um responsável do evento do mesmo sexo, a fim de evitar que haja algum tipo de fraude na coleta. Os atletas podem ser submetidos à testagem *antidoping* em qualquer momento da competição.⁴ Caso seja constatado *doping*, a legislação internacional prevê sanções aplicáveis aos atletas pelos Estados e Federações Desportivas,¹ entretanto, essa discussão está fora do escopo do presente artigo.

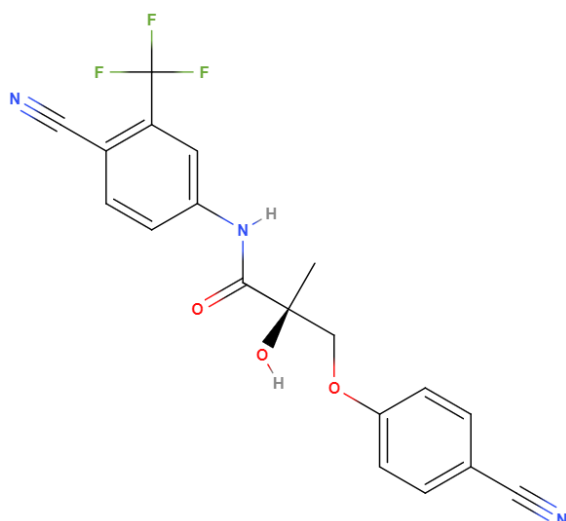
Nos últimos anos, diversos avanços têm sido feitos no movimento *antidoping*, e para citar alguns, tem-se o desenvolvimento de sensores eletroquímicos para corticosteróides,⁵ biossensores para testosterona⁶ e dexametasona,⁷ sensores biomiméticos para detecção de

hidroclorotiazida⁸, substâncias previstas no Código Mundial *Antidoping*. Entretanto, com o aumento crescente das competições, nos mais diversos níveis, a fiscalização, por vezes, é insuficiente e pode incentivar atletas a utilizarem substâncias proibidas pela falta de análises e aplicações de sanções àqueles merecedores.⁹

No Brasil, um caso que ganhou bastante notoriedade nos últimos anos foi o da Oposta da Seleção Brasileira de Vôlei, Tandara Caixeta, condenada a quatro anos de suspensão pelo uso de Ostarina, uma substância proibida em todo o tempo, durante as Olimpíadas de Tóquio de 2020.¹⁰

A Ostarina (de fórmula molecular C₁₉H₁₄F₃N₃O₃, também tratada com os nomes: ostarine, MK-2866, GTx-024 ou enobosarm) é um modulador seletivo de receptor andrógeno (SARM, em inglês: *selective androgen receptor modulator*)^{11,12} que foi desenvolvido no intuito de prevenir e tratar perda de massa muscular, podendo ser utilizado na reposição de testosterona.¹³ Ou seja, trata-se de um fármaco que se liga a receptores androgênicos de forma seletiva e sem estar associado aos efeitos colaterais comuns de outros anabolizantes esteroides (AAS, em inglês *anabolic and steroids*),^{11,14} como acne, ginecomastia, crescimento da próstata¹⁴ e outros, enquanto atua como agente seletivo e estimulante de cicatrização de lesões musculares. Pelas propriedades associadas à melhora de performance, a ostarina entrou para a lista de substâncias proibidas a todo o tempo em 2008.¹¹

Figura 1. Estrutura molecular da Ostarina. Feita pela autora com uso do *software MolView*®.



Os SARM são uma classe relativamente nova de substâncias e apesar de alguns compostos já estarem no Código, alguns similares já podem ser encontrados no mercado. Contudo, é importante dizer que a ostarina e sua comercialização, no Brasil, é controlada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Dessa forma, trazendo novamente o caso da atleta Tandara Caixeta, que argumentou *doping* não intencional por contaminação cruzada a partir da farmácia de manipulação onde adquiria seus suplementos, o controle exercido pela Agência foi suficiente para que o Tribunal de Justiça Desportiva Antidopagem a suspendesse por quatro anos.^{10,15} De qualquer forma, estudos têm sido desenvolvidos a fim de demonstrar que a ostarina pode ser transferida por fluidos corporais, como saliva, e pode ser responsável por *doping* não intencional.¹⁶ Além disso, o método de coleta (urina, cabelo, sangue ou unhas, por exemplo) é importante para a determinação da janela de uso da substância, bem como a quantificação precisa é importante, uma vez que doses altas podem indicar uso contínuo ou uso recreacional, ambos entendidos como *doping* pela WADA atualmente.¹⁷

A ostarina é, hoje, o SARM mais relevante em esportes e, portanto, muitos estudos têm sido desenvolvidos para entender melhor seus efeitos no metabolismo e o comportamento de eliminação do composto.¹¹ É de interesse ímpar justamente por apresentar menos efeitos colaterais e uma meia vida de 24 h.¹² Esse composto se liga aos receptores andrógenos para a realização do anabolismo proteico em músculos e ossos. Atualmente, para identificação em SARM em testes *antidoping* são comumente empregadas as técnicas de cromatografia gasosa e líquida associadas à espectrometria de massas,^{18,19} entretanto, outras técnicas têm passado por processo de estudo e validação, como o uso de SPE (em inglês: *solid-phase extraction*), que tem apresentado resultados promissores.¹¹ No estudo citado, foram testadas doses únicas de 1 µg, 10 µg e 50 µg e, apesar do tempo de meia vida da substância ser de 24 h, traços de ostarina foram identificados pela técnica em períodos de 72 a 120 h, 96 a 168 h e 120 a 216 h, respectivamente.

Metodologia

A pesquisa que culminou no artigo referencial¹⁴ buscou desenvolver um método preciso, sensível, rápido e de baixo custo para a determinação e quantificação de Ostarina em cápsulas por Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência, mais comumente tratado como UHPLC (em inglês: *Ultra-High Performance Liquid Chromatography*), associado a UV. As

cápsulas de Ostarina foram adquiridas *on-line* de um *site* especializado em suplementos esportivos e a referência do composto foi adquirida de AbMole BioScience, uma empresa fornecedora de reagentes químicos.

Foi preparada uma solução estoque de 200 µg/mL de ostarina em metanol e, a partir dessa, foram preparadas soluções em 6 níveis de concentração diferentes entre 1 - 25 µg/mL a partir de diluições com 0,1% de ácido fórmico (1, 5, 10, 15, 20 e 25 µg/mL). As soluções a partir da ostarina padrão (adicionada de farinha de arroz e estearato de magnésio, para simular a lista de ingredientes fornecida pelo fabricante) foram preparadas no dia de análise em 5 níveis de concentração, a saber: 1, 10, 15, 20 e 25 µg/mL. As soluções passaram por processo de extração com metanol, diluídas com soluções 0,1% de ácido fórmico e filtradas com *nylon* de *mesh* 0,45 µm. Foram preparadas soluções placebo para comparação utilizando somente farinha de arroz e estearato de magnésio. Para o preparo das amostras partindo das cápsulas adquiridas, seus conteúdos foram homogeneizados e 51 mg do conteúdo foram pesados e sobre estes foram performados os processos de extração idênticos aos utilizados para as demais amostras de ostarina padrão.

Quanto ao equipamento, foi utilizado um Flexar-10 UHPLC (Perkin-Elmer) com amostrador automático, temperatura controlada e detector PDA UV-VIS. Todas as análises foram realizadas por cromatografia em fase reversa. A fase móvel era composta de metanol (75%) e 0,1% de ácido fórmico (25%) em regime de eluição isocrática com fluxo de 0,5 mL/min. O volume de injeção utilizado foi de 5 µL e a detecção feita em 270 nm. As soluções padrão de ostarina foram usadas na confecção da curva analítica.

Resultados e discussão

A curva analítica gerada possuía coeficiente de determinação $R^2 = 0,9962$. Esse coeficiente é amplamente utilizado nas ciências exatas, uma vez que é usado para avaliar o quão bem um modelo se ajusta aos dados experimentais. É a partir deste que se avalia a precisão (ou seja, repetibilidade das amostras e do método) e a exatidão. É muito usado em avaliações quimiométricas também. A acurácia e precisão obtida a partir dos 5 níveis de concentração das soluções preparadas com o padrão de ostarina demonstraram resultados interessantes que são apresentados, de forma simplificada, nas Tabelas 1 e 2. Torna-se importante dizer de antemão à apresentação das tabelas que “a partir das corridas” significa a análise individual dos cromatogramas em relação ao padrão e

que “entre as corridas” significa a análise comparativa entre os cromatogramas obtidos para as várias corridas de amostras preparadas para terem as mesmas concentrações, para avaliar a variabilidade e sensibilidade do método em relação às diminutas diferenças entre as amostras.

Tabela 1. Resultados obtidos a partir das corridas. Adaptada da referência 14.¹⁴

| Concentração Nominal (µg/mL) | Acurácia média (%) | Precisão (RSD, %) |
|------------------------------|--------------------|-------------------|
| 1,39 | 108,97 | 1,92 |
| 10,03 | 99,14 | 1,24 |
| 14,93 | 101,72 | 0,82 |
| 19,93 | 93,04 | 1,55 |
| 25,02 | 104,34 | 1,07 |

Tabela 2. Resultados obtidos entre as corridas. Adaptada da referência 14.¹⁴

| Concentração Nominal (µg/mL) | Acurácia média (%) | Precisão (RSD, %) |
|------------------------------|--------------------|-------------------|
| 1,38 | 112,41 | 1,70 |
| 10,09 | 98,23 | 1,53 |
| 14,95 | 100,20 | 1,00 |
| 20,14 | 91,71 | 1,02 |
| 24,99 | 103,42 | 1,87 |

Em relação à extração do analito, a repetibilidade foi testada na concentração 20 µg/mL com cinco replicatas, obtendo rendimento de extração de 93,98% nas corridas, com Desvio Padrão Relativo entre as replicatas (RSD) de 1,72%. Entre corridas, o rendimento foi de 95,35% com RSD de 0,88%. Esses resultados indicam repetibilidade e precisão adequadas para análise do analito de estudo. O tempo de retenção é um dado importante quando realizando análises por cromatografia. Cada substância interage de forma diferente com as fases móvel e estacionária, levando uma quantidade de tempo específica (tempo de retenção) para ser detectada no detector. O método proposto pelos autores¹⁴ se mostrou altamente seletivo para a ostarina (tempo de retenção de 1,7 min).

Apesar do método ter sido testado a partir do material sólido de cápsulas, a versatilidade do equipamento e o preparo de amostras utilizado pelos autores indica que há possibilidade de análise a partir de outros materiais aquosos, como urina ou

soluções preparadas a partir de amostras de sangue, podendo ser aplicado para investigação de *doping* intencional ou não intencional durante competições. É importante ressaltar também que UHPLC é um método rápido e foi notificado pelos autores que as corridas tiveram tempo médio de 2,5 min. Considerando a alta demanda de análises durante períodos de competição, a aplicação deste método pode ser de interesse dos laboratórios credenciados pela WADA.

A utilização do UHPLC também abre a possibilidade de uso de HPLC, uma técnica semelhante, mas muito mais comum em laboratórios de análise. A utilização de HPLC para esse tipo de avaliação precisaria passar pelo processo de validação analítica antes que seus resultados pudessem ser usados em processos *antidoping*, mas na ausência de UHPLC, é uma boa alternativa. Os dois métodos partem de princípios iguais, mas UHPLC oferece vantagens sobre o uso do HPLC tradicional (que continua sendo uma ótima técnica analítica, respeitadas as especificidades do método e do preparo adequado de amostras), como a melhor resolução e sensibilidade, menores tempos de análise e menor consumo de solventes, por exemplo.

Conclusões

Em resumo, foi abordada a importância da Química no movimento *antidoping*, com enfoque nos estudos de detecção e quantificação de ostarina. O estudo referencial¹⁴ demonstrou que a técnica de UHPLC é sensível para a detecção e quantificação, dentro de preceitos de precisão e acurácia esperados pela WADA, de ostarina, uma substância com uso crescente nos últimos anos por suas propriedades associadas à melhora de performance em atletas. O método proposto oferece uma abordagem confiável no monitoramento *antidoping*, tendo potencial de detecção não só da ostarina, mas de muitas outras substâncias proibidas.

Contribuições por Autor

O artigo e a inclusão de algumas observações são de Júlia R. Vargas.

Conflito de interesse

Não há conflito de interesses.

Agradecimentos

Ao grupo PET-Química/IQ/UnB/MEC, à Secretaria de Educação Superior do Ministério da Educação (SeSU/MEC) e ao Decanato de Ensino de Graduação (DEG/UnB) pelo apoio ao Programa de Educação Tutorial pela bolsa concedida. Ao Instituto de Química (IQ/UnB) e à Universidade de Brasília pelo suporte e espaço fornecidos.

Notas e referências

- 1 F. M. A. Aith, Regulação antidoping e saúde pública: limites à exposição humana ao risco sanitário e a glória desportiva, *Rev. Saúde Pública*, 2013, **47**, 1015–1018.
- 2 Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre-RS, Brazil, D. G. Vasques, F. P. Mariante Neto, N. M. N. Cardoso and M. P. Stigger, The independence of brazilian antidoping as to the ties between the State and sports federations, *J. Phys. Educ*, 2021, **32**, 1-10.
- 3 Agência Mundial Antidopping, Lista de Substâncias Proibidas, *Código Mundial Antidopagem*, 2024, <https://www.wada-ama.org/en/resources/world-anti-doping-code-and-international-standards/prohibited-list>.
- 4 COI, *Regras Antidoping Aplicáveis aos Jogos Olímpicos Rio 2016*, Rio de Janeiro, RJ, 2016, <https://www.cob.org.br/pt/documentos/download/444ff79060454/>.
- 5 Y. Xu, ELECTROCHEMICAL SENSOR FOR DOPING CORTICOSTEROIDS IN SPORTS, *Rev Bras Med Esporte*, 2023, **29**, 1-4.
- 6 Z. Ni, TESTOSTERONE BIOSENSOR IN SPORTS DOPING, *Rev Bras Med Esporte*, 2023, **29**, 1-4.
- 7 S. K. Purnama, R. I. Doewes, G. Elumalai, S. H. Azmi, I. Nuryadin, and Manshuralhudlari, BIOSENSOR DEVELOPMENT IN SPORTS DOPING WITH DEXAMETHASONE, *Rev Bras Med Esporte*, 2023, **29**, 1-4.
- 8 M. R. S. Ruy, E. C. Figueira and M. D. P. T. Sotomayor, Biomimetic sensor for detection of hydrochlorothiazide employing amperometric

- detection and chemometrics for application in doping in sports, *J Braz Chem Soc*, 2015, **26**, 2069–2076.
- 9 C. J. Brito, R. L. Mozer, E. M. A. De Bem, P. H. B. De Carvalho, A. C. C. Queiroz, F. Da IBello, L. B. M. Barreto and B. Miarka, Exploratory study on illegal pharmacologic agents in mixed martial arts performance, *Revista Brasileira de Cineantropometria e Desempenho Humano*, 2018, **20**, 269–279.
 - 10 Tandara vê pena de quatro anos por doping “injusta e desproporcional”, <https://agenciabrasil.ebc.com.br/esportes/noticia/2022-05/tandara-ve-pena-de-quatro-anos-por-doping-injusta-e-desproporcional>, (accessed 24 March 2024).
 - 11 K. Walpurgis, A. Rubio, F. Wagener, O. Krug, A. Knoop, C. Görgens, S. Guddat and M. Thevis, Elimination profiles of microdosed ostarine mimicking contaminated products ingestion, *Drug Test Anal*, 2020, **12**, 1570–1580.
 - 12 A. Turza, A. Pop, M. Muresan-Pop, L. Zarbo and G. Borodi, Crystal and molecular structure of ostarine and andarine, *Journal of Molecular Structure*, 2020, **1199**, 1–11.
 - 13 Primacêutica, Ficha técnica de substância (OSTARINA), São Paulo, SP, 2011.
 - 14 A. Miklos, A. Tero-Vescan, L. Farczádi and D.-L. Muntean, Development and Validation of an UHPLC Method for Ostarine Determination in Dietary Supplements, *Acta Med Marisiensis*, 2019, **65**, 49–54.
 - 15 Comitê não deve aceitar ‘uso acidental’ de ostarina por Tandara, diz médico, <https://www.cnnbrasil.com.br/esportes/comite-nao-deve-aceitar-uso-acidental-mesmo-que-tandara-prove-diz-medico/>, (accessed 24 March 2024).
 - 16 J.-C. Alvarez, I. Etting and I. A. Larabi, Body fluid contamination in the context of an adverse analytical finding in doping: About a case involving ostarine, *Clinica Chimica Acta*, 2024, **557**, 1–6.
 - 17 P. Kintz, The forensic response after an adverse analytical finding (doping) involving a selective androgen receptor modulator (SARM) in human athlete, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2022, **207**, 1–5.
 - 18 V. Vasilev, N. Boaydjiev, T. Deneva, D. Arabadzhyska, M. Komrakova and K. Georgieva, Effects of Ostarine and Endurance Training on Some Functional, Hematological, and Biochemical Parameters in Male Rats, *Asian J Sports Med*, **15**, 1–10.
 - 19 M. Thevis and W. Schänzer, Detection of SARMs in doping control analysis, *Mol Cell Endocrinol*, 2018, **464**, 34–45.