**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**Curso de Pós-Graduação em
Ciências dos Alimentos**

**AVALIAÇÃO E APLICAÇÃO DE
MÉTODOS
ANALÍTICOS PARA A DETECÇÃO DE
DIETILESTILBESTROL**

ELIZABETH DE SOUZA NASCIMENTO

**Tese para obtenção do grau de
DOUTOR**

Orientador:

**Prof. Assoc. Marilene D.V.C.
Penteado**

São Paulo

1991

No fundo existe neste planeta somente um
único problema, e este se chama: como se
abre caminho? Como se chega ao ar livre?
Como se rompe o casulo, para vir a ser
borboleta?

Thomas Mann

Originalizado em: 13/06/9

Aos meus pais, irmãos, cunhados e
"piccolas" que vibram a cada pequeno
movimento meu em busca de luz.

A Myriam C. Salvadori, amiga e
indispensável colaboradora em todas as
fases da realização deste trabalho.

A Marilene D.V.C. Penteado pelo
entusiasmo e constante estímulo e apoio
na realização deste trabalho, meus
agradecimentos

AGRADECIMENTOS

- Ao Prof. Antonio Flavio Midio pela valiosa participação na elaboração deste trabalho.
- Ao Prof. Carlos Van Peteghem, e sua equipe por terem possibilitado meu real aprendizado na análise de anabólicos.
- Ao Frigorífico Kaiowa S/A, na pessoa do Eng. Décio C. Friguglietti que possibilitou a realização do experimento em animais, pela aquisição de padrões e fornecimento de parte das amostras analisadas.
- A Comunidade Flamengo e a CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior do Ministério da Educação) pela bolsa de estudos que me foi concedida junto ao Laboratório de Bromatologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de Gent, Belgica.
- Aos amigos e colegas da disciplina de Toxicologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, pelo constante estímulo.
- Aos amigos do Laboratório de Controle da Dopagem do Jockey Club de São Paulo pelo constante entusiasmo, apoio e carinho com que me cercaram durante todo o período de realização deste trabalho.
- A Luciane Ribeiro Neto, farmacêutica-bioquímica, pela valiosa colaboração técnica.
- A Diretoria do Jockey Club de São Paulo que possibilitou a realização de parte deste trabalho.

- Ao Milton Jungman que me forneceu completa assessoria nos, às vezes tortuosos, caminhos da computação.

- A Ana Tulia Folegatti pela competência demonstrada no trabalho de revisão.

- A Moema Rodrigues dos Santos pela normatização das referências bibliográficas.

- A todos aqueles que direta ou indiretamente me apoiaram na realização deste trabalho.

CONTEUDO:

Página

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVO.....	5
3. MATERIAL E METODOS.....	6
3.1. MATERIAL.....	6
3.1.1. AMOSTRAS DO EXPERIMENTO.....	6
3.1.2. AMOSTRAS AUTENTICAS.....	8
3.1.3. APARELHOS E EQUIPAMENTOS ACESSORIOS.....	8
3.1.4. MEDICAMENTO.....	10
3.1.5. SOLUÇÕES PADRÃO.....	10
3.1.6. SOLUÇÕES E REAGENTES, ADSORVENTES E SISTEMAS SOLVENTES.....	11
3.2. METODOS.....	14
3.2.1. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	14
3.2.2. EXAME ANATOMO-PATOLOGICO DA GLADULA PROSTATICA.....	15
3.2.3. ANALISE DE SITIOS DE APLICAÇÃO.....	15
3.2.4. ANALISE DE DES EM AMOSTRAS DE URINA POR GC/MS E HP TLC.....	16
3.2.5. ANALISE DE DES EM AMOSTRAS DE VISCERAS EM TECIDO MUSCULAR POR GC/MS.....	19
4. RESULTADOS.....	23
4.1. EXAME ANATOMO-PATOLOGICO DE GLANDULA PROSTATICA.....	23
4.2. ANALISE DE SITIOS DE APLICAÇÃO.....	23
4.3. ANALISE DE DES EM AMOSTRAS DE URINA POR GC/MS E HPTLC.....	23
4.4. ANALISE DE DES EM AMOSTRAS DE VISCERAS E TECIDO MUSCULAR POR GC/MS E HPTLC.....	30
4.5. ANALISE DE DES EM AMOSTRAS AUTENTICAS.....	30
5. DISCUSSÃO.....	33
6. CONCLUSÕES.....	84
7. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	86

ANEXO I.....	110
ANEXO II.....	113 111
RESUMO.....	115 113
SUMMARY.....	116 114

GLOSSARIO

HPLC - High Performance Liquid Chromatography :
Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

HPTLC - High Performance Thin Layer Chromatography :
Cromatografia em Camada Delgada de Alta Eficiência

GC/MS - Gas Chromatography/Mass Spectrometry : Cromatografia
a Gas Acoplada a Detector Seletivo de Massa

EIA - Enzyme Immunoassay : Enzima Imunoensaio

RIA - Radioimmunoassay : Radioimunoensaio

ELISA - Enzyme Linked Immunosorbent Assay : Imunoensaio por
Enzima ligada ao Anticorpo

CLIA - Chemiluminescence Immunoassay : Imunoensaio por
Quimioluminescência

HFBA - Anidrido Heptafluorbutírico

BSTFA - Bis-(trimetilsilil) trifluoracetamida

TMCS - Trimetilclorosilano

TMSI - Trimetilsililimidazol

1. INTRODUÇÃO

No mundo todo a produção de alimentos não tem acompanhado o crescimento populacional. Em 1830 a Terra era habitada por nada menos do que um bilhão de pessoas. Outros cem anos foram necessários para dobrar esse número. Todavia, em apenas trinta anos, ou seja, em 1960, a população atingiu a cifra de três bilhões e em 1983 a de quatro bilhões e meio.

Estima-se que no ano 2000 a população mundial chegue a seis bilhões e trezentos milhões de habitantes.

É certo que nas próximas décadas o mundo não apenas estará mais populoso, mas também mais poluído, menos estável ecologicamente, com maior demanda de água, alimentos e energia ⁵². Evidentemente esses fatores já constituem enorme preocupação que se manifesta, particularmente com relação aos alimentos, na busca de melhor aproveitamento do solo, no controle de pragas, nas alterações genéticas de plantas e animais visando aumentar a quantidade e qualidade dos alimentos no menor intervalo de tempo possível. Além disso, desnecessário seria discutir a importância do fator econômico-financeiro que envolve toda a indústria mundial e, em particular, a alimentícia.

Assim, acredita-se que haverá uma exigência em termos de racionalização da produção de alimentos. Entre estes, grande destaque é dado às proteínas, que constituem de 10 a 12% do valor energético total da dieta.

Proteínas vegetais são responsáveis por 70% das usadas na nutrição humana, enquanto que as animais contribuem com apenas 30%. As proteínas de origem animal são provenientes de aproximadamente 9 bilhões de animais, compreendendo 3

bilhões em gado, 600 milhões em suínos e 5,4 bilhões em aves. É evidente que, para se produzir proteína animal, necessita-se, basicamente, de proteína vegetal. Estima-se que sejam necessários 500 milhões de toneladas de proteína vegetal para produzir 50 milhões de toneladas de animal para consumo humano, ou seja, uma proporção de 10:1 ³⁰.

Em alguns países, a quantidade de grãos utilizada como ração animal chega a competir, em alto grau, com as necessidades da nutrição humana. Como consequência, tem havido uma crescente busca dos chamados promotores de crescimento, com o objetivo de aumentar a eficiência da produção animal.

No aumento da produção de carne são usados, basicamente, dois grupos de substâncias para estimular o crescimento, os antibióticos e os hormônios de acordo com suas atividades farmacoterápicas. Os primeiros são legalmente usados, sob certas condições, na maioria dos países, em rações ou na medicina veterinária, e os hormônios, ou substâncias naturais e sintéticas com atividade hormonal, que têm sua utilização vetada, ou pelo menos restringida, em vários países do primeiro mundo e também no Brasil.

É sabido que, desde a década de 40, ¹²⁰ os hormônios anabolizantes vêm sendo utilizados na produção animal com o objetivo de proporcionar maior ganho de massa muscular num menor período de tempo e a consequente economia de ração. Esta prática, desde o início da década de oitenta, tem sido motivo de preocupação devido aos possíveis riscos que os anabólicos acarretam à saúde do consumidor.

Como ocorre com qualquer substância, o destino dos hormônios anabolizantes no organismo animal, após sua administração, dependerá de sua farmacocinética, que determinará a razão de eliminação destas substâncias do organismo, na sua forma inalterada ou como produto de biotransformação.

Considerando-se que os anabólicos seguem uma cinética de primeira ordem e a administração dos hormônios baseia-se em múltiplas doses ou em implantes de liberação lenta, a concentração aumentará até atingir um estado de equilíbrio entre absorção e eliminação. Tal equilíbrio pode levar à presença de resíduos encontrados na carcaça dos animais após o abate . Ao cessar a aplicação, observa-se uma diminuição exponencial deste resíduo.

Implantes liberam anabólicos por vários dias, ou mesmo meses, e os resíduos ocorrem não somente no sítio de aplicação mas também podem estar presentes na carne, vísceras, sangue, fezes e urina do animal. A concentração nos tecidos comestíveis é semelhante àquela dos esteróides sexuais endógenos, ou seja, inferior a 1 ppb, resíduo este intimamente relacionado com o período de carência.

A maior concentração dessas substâncias ocorre no local do implante, sítio de aplicação, e, em alguns casos, mesmo decorrido o tempo recomendado entre o implante e o abate, foram detectadas quantidades significativas (superiores a 20%) do hormônio não absorvido, o que pode acarretar riscos à saúde do consumidor⁷¹.

Os principais problemas relacionados à ingestão de carne contaminada com resíduos de anabólicos são o potencial carcinogênico que apresentam e a possibilidade de crescimento precoce de pré-adolescentes^{71, 100, 145}.

Como foi dito anteriormente, em muitos países existe uma legislação proibindo todos os agentes anabolizantes ou permitindo o uso de apenas alguns deles em animais de abate. Esta legislação fundamenta-se justamente no que cada país considera como risco à saúde pública^{13, 14, 20, 132}.

Evidentemente, a única forma de se fazer cumprir a legislação é através da criação de sistemas de controle que compreendam a inspeção veterinária dos animais vivos, ou da carcaça após o abate, e a análise laboratorial da carne ou fluidos biológicos desses animais, visando à detecção de resíduos.

Tal controle tem, ou deveria ter, por objetivo, não somente assegurar a qualidade da carne ingerida no país, como também cumprir com exigências regulamentares na sua exportação, o que gera importantes divisas ao país. É interessante notar que, anualmente, são produzidos no Brasil de 3 a 3,5 milhões de toneladas de carne bovina, de 2 a 2,5 milhões de toneladas de frango e 700 mil toneladas de suínos. Desse total, de 400 a 600 mil toneladas de carne e de 300 a 600 mil toneladas de frango são destinadas à exportação, que somente em 1988 correspondeu a 500 milhões de dólares (*) .

Assim, a fiscalização da qualidade da carne ingerida ou exportada , no que concerne aos anabólicos, deve ser efetivamente realizada e, para tanto, deve-se contar com uma metodologia confiável que, em geral, compreende métodos analíticos extremamente sofisticados, pois exigem técnicas de elevada sensibilidade e equipamentos de alta resolução.

O presente trabalho visa discorrer sobre os métodos mais significativos encontrados na literatura, bem como analisar diversos tipos de amostras biológicas através de técnicas rotineiramente usadas em países desenvolvidos e que possam ser sugeridas como medidas de fiscalização neste país.

(*) (Fonte: ABIEC - Associação Brasileira dos Exportadores de Carne)

2. OBJETIVO

O presente trabalho tem por objetivo avaliar a metodologia atualmente utilizada para detectar a presença de hormônios anabolizantes na produção de animais de criação, visando a uma adequação da análise a diferentes materiais biológicos.

Os objetivos específicos foram:

- avaliar as diferentes técnicas (extração, purificação e identificação) dos métodos analíticos mais frequentemente descritos na literatura.
- aplicar a metodologia de eleição na detecção de dietilestilbestrol (DES) administrado experimentalmente em bovinos.
- aplicar esta mesma metodologia em amostras autênticas.

3 . MATERIAL E METODOS

3.1. MATERIAL

3.1.1. Amostras do experimento

3.1.1.1. Animais utilizados no experimento.

Bovino da raça Nelore, castrado, com no máximo 350 Kg de peso, ao qual foram implantados comprimidos de Dietilestilbestrol (DES), marca VI-GAIN [®], na parte inferior das orelhas .

.....1 animal.

Bovino da raça Nelore, castrado, com no máximo 350 Kg de peso, utilizado como controle no experimento.

.....1 animal.

3.1.1.2. Próstatas

Foram submetidas a exame anátomo-patológico
as próstatas dos animais do experimento
.....2 amostras.

3.1.1.3. Tecido subcutâneo dos locais de implante.

Foram analisados os tecidos correspondentes
aos sítios de aplicação do composto com
atividade hormonal, DES, em ambas as orelhas
do boi tratado.
Foram analisadas as partes correspondentes do
animal controle.
.....4 amostras.

3.1.1.4. Aliquotas de urina dos animais submetidos ao experimento.

.....16 amostras.

3.1.1.5. Visceras (fígado e rins) dos animais submetidos ao experimento.

.....6 amostras.

3.1.1.6. Tecido muscular, popularmente reconhecidos como "músculo" e "filet mignon", dos animais submetidos ao experimento.

.....4 amostras.

3.1.2. Amostras autênticas

3.1.2.1. Aliquotas de urina de animais abatidos e destinados ao comércio

.....50 amostras.

3.1.2.2. Tecido muscular de animais abatidos e destinados ao comércio

.....11 amostras

Observação:

- Todas as amostras foram enviadas ao laboratório em frascos de polipropileno, sob refrigeração, onde foram mantidas a -20° C quando foram oportunamente analisadas.

3.1.3. Aparelhos e equipamentos acessórios.

- . Cromatógrafo a gás, modelo 5870 - Hewlett Packard, acoplado ao detector seletivo de massa, impacto de eletrons, modelo 5970 - Hewlett Packard; injetor tipo "splitless"; coluna capilar Ultra 2 - Hewlett Packard, 5% fenil metil silicone, 25m de comprimento x 0,2 mm de diâmetro interno, espessura do filme 0.33um.
- . Cromatógrafo líquido de alta eficiência, modelo 480C - Instrumentos Científicos CG Ltda; coluna

Lichrosolv ODS, 5µm, comprimento 150mm x 4,6mm de diâmetro interno, pré-coluna de sílica quimicamente ligada(fase reversa) micro - Bondapack C18, 0,5 cm de comprimento e 0,6 cm de diâmetro; " loop" de 20 µL; detector de UV com comprimento de onda variável, modelo UV-GC-435, Instrumentos Científicos CG Ltda ; registrador / integrador - modelo 3392 - Hewlett Packard; forno para aquecimento da coluna - Instrumentos Científicos CG Ltda.

- . Potenciômetro, modelo B 374 -Micronal[®].
- . Centrífuga, modelo GF8 - Fanem[®].
- . Estufa- Heraus [®].
- . Fonte de luz UV, comprimentos de ondas fixas: 254 e 366 nm, -Degasa[®].
- . Cronômetro; banhos de água; agitadores mecânicos tipo vortex.
- . Aparelho para extração em fase sólida, modelo Vac Elut - J.T.Baker.
- . Ultrassom, modelo T7 -Thornton[®].
- . Gases especiais para cromatografia em fase gasosa: Hélio (99,997%) e para evaporação de amostras: Nitrogênio (99,995%), ambos da Oxigênio do Brasil
- . Bloco de aquecimento e evaporação sob fluxo de nitrogênio para frascos de derivação - fabricação doméstica.

- . Nebulizadores, pipetas automáticas, microseringas.
- . Suporte para filtração sob pressão - Millipore.
- . Freezer.
- . Cubas cromatográficas (14 x 11 x 6cm) Camag TM.

3.1.4. Medicamento

„Comprimidos VI-GAINTM“ princípio ativo DES, 15mg
Vineland Laboratories, New Jersey, USA.

3.1.5. Soluções padrão.

- . Solução metanólica de 0,1% DES [E, 3,4, bis
(p - hidroxifenil) - 3 hexeno] - Sigma
Chemical Co.
A análise por HPLC e HPTLC constatou a
presença do isômero cis (5%)
- . Solução metanólica de DES hexadeuterado¹⁶⁰
(DESd6) - {([1,1,1,6,6,6,-d6]]-E-3,4-di-(4-
hidroxifenil)-hex-3-eno) 0,1%, gentilmente
cedida pelo Prof. C. Van Peteghem.
- . Solução de hidrocarbonetos 0,1% em n-hexano

3.1.6. Soluções e reagentes, adsorventes e sistemas solventes.

. Sistemas solventes

(A) Clorofórmio- Acetona (9:1 v/v)

(B) Ciclohexano- Acetato de etila- Etanol
(77,5:20:2,5 v/v)

(C) Metanol- Água (65:35 v/v)

(D) Diclorometano- Metanol (94:6 v/v)

. Agente cromogênico.

Metanol- H₂SO₄ conc. (9:1 v/v)

Preparar a mistura metanólica no momento de uso

. Agente de derivação.

BSTFA +1% TMCS (bis- (trimetilsililtrifluoro) acetamida; trimetilclorosilano - Pierce Chemical Co.

HFBA - Anidrido hexafluoro butirico - Sigma Chemical Co.

. Metanol, grau Lichrosolv - Merck[®], bidestilado em vidro pirex

- . n-Hexano - Merck[®], bidestilado em vidro pirex
- . Acetato de etila - Merck[®], bidestilado em vidro pirex
- . Água bidestilada em vidro pirex
- . Etanol
- . Clorofórmio
- . Acetona
- . Ciclo-hexano
- . Éter dietílico lavado com solução de sulfato ferroso 25% e três vezes com água bidestilada e, subsequentemente, destilado para evitar a presença de peróxidos
- . β -glicuronidase/arilsulfatase de Helix pomatia - Sigma Chemical Co.
- . Subtilisina Carlsberg - Sigma Chemical Co.
- . Colunas de extração em fase sólida - Sep-pak C18, Waters (cat. 51910) ou Baker Bond spe, J.T. Baker Chemical Co. (cat. 7020-06)
- . Sephadex LH-20 - Sigma Chemical Co.
- . Lã de vidro tratada com DMCS - Alltech[®]
- . Na₂SO₄ anidro, Merck[®]

- . Ácido sulfúrico concentrado - Merck[®]
- . Dimetilclorosilano (DMCS) - Merck[®]
- . Filtros de membrana de celulose - MFS de 47 mm de diâmetro e poros de 0,45 µ
- . Soluções tampão
 - (1) Tampão acetato 3M
 - (2) Tampão acetato 0,2M
 - (3) Tampão TRIS 0,1 M - hidróxi - metilaminometano - Trometamol - Merck[®]
- . Cromatoplaquetas de sílica gel G 60, de alta resolução, 10 x 10 cm, com indicador de fluorescência - Merck[®]

Todos os solventes utilizados sem indicação de marca comercial foram de grau "pro-análise", obtidos de diferentes empresas.

Todo o material de vidro não descartável foi lavado com Extran - Merck[®], ou com solução sulfocrômica, e enxaguado exaustivamente com água desmineralizada.

Os frascos onde foram retomadas as frações recolhidas por HPLC, bem como os de derivação, foram tratados com uma solução do agente de silanização DMCS 5% em n-hexano e posteriormente lavados exaustivamente com n-hexano e metanol.

Nota: O fato de se indicar a procedência dos solventes, reativos e reagentes não denota uma excelência em relação às outras marcas existentes no mercado.

3.2. METODOS

3.2.1. Delineamento Experimental

O medicamento VI-GAIN[®], na quantidade de 30 mg, foi administrado a um dos animais, por via cutânea, sob acompanhamento veterinário, através de implantes na base externa das orelhas (dois comprimidos de 7,5 mg de DES em cada orelha). O outro animal foi utilizado como controle e submetido às mesmas condições climáticas e de alimentação do animal que sofreu o implante. Este experimento foi realizado em uma fazenda no interior do Mato Grosso.

As amostras de urina foram colhidas nos dias 0,1,2,4,7,10,15,22 do experimento. Decorridos 28 dias do implante os animais foram abatidos. Os sítios de aplicação, as amostras de vísceras (fígado e rins), de próstatas e de tecido muscular ("músculo" e "filet mignon") foram separadas do restante das carcaças e enviadas ao laboratório para análise.

3.2.2. Exame anátomo-patológico da glândula prostática

As próstatas dos animais do experimento foram submetidas a exame anátomo-patológico no Laboratório de Anatomia Patológica e Citopatologia S/C Ltda, de Presidente Prudente, onde foram avaliadas a dilatação glandular, hiperplasia do epitélio de revestimento, a hipertrofia com fibrose do estroma, a metaplasia Malpighiana e, então, dada a conclusão histológica.

3.2.3. Análise dos sítios de aplicação

O local de aplicação do agente anabolizante DES no animal tratado, constituído de cerca de 4g de tecido subcutâneo, foi submetido a uma maceração em meio metanólico, centrifugação, separação do sobrenadante e posterior extração com éter dietílico. A fração etérea foi evaporada a secura em banho-de-água, a 37° C, sob fluxo de nitrogênio.(Fig.1) Os resíduos foram duplamente aplicados em lados opostos da cromatoplaça de alto desempenho (HPTLC), acompanhados de 1 ug do padrão de DES. Um dos lados da placa foi submetido ao sistema solvente (A) enquanto o outro ao sistema solvente (B).Posteriormente, a placa foi nebulizada com agente cromogénico, aquecida a 100° C por 10 minutos e observada sob luz UV e visível.

3.2.4. Análise de DES em amostras de urina por GC/MS e HPTLC

Foram analisadas amostras de urina colhidas dos animais tratado e de controle, nos dias 0,1,2,4,7,10,15 e 22 após o implante do agente anabolizante, bem como as amostras autênticas de urina dos animais de diferentes abatedouros.

O método empregado na análise dessas amostras foi de SCHMIDT e col¹²⁹ modificado por VAN PETEGHEN (comunicação pessoal) que consiste no ajuste do pH urinário a 4,6 com tampão acetato 3M e eluição em coluna C18 com metanol. O eluato é evaporado em banho-de-água a 40 °C, sob fluxo de N₂, retomado em tampão acetato 0,2M e adicionado de β -glicuronidase para a hidrólise dos conjugados de DES. Após hidrólise a 37 °C/16 horas ou 50 °C/2 horas a solução é transferida para a mesma coluna C18 e o anabólico livre é, então, eluído da coluna com acetato de etila. O eluato é evaporado a securo a 40° C sob fluxo de N₂.

Fig.1 - Esquema do procedimento de extração utilizado para análise de sítio de aplicação em bovinos

A purificação do resíduo é feita por HPLC onde é coletada a fração correspondente ao DES. Esta é evaporada a secura a 60° C sob fluxo de N₂. As condições do HPLC foram as seguintes: - detector UV 240 nm; fluxo de solvente eluente: MeOH - H₂O (65:35) 1 mL/min. A coluna é mantida a 35° C

Como técnicas de identificação usam-se GC/MS e HPTLC. No caso de detecção por GC/MS, o resíduo obtido do HPLC é tratado com agente silanizante aquecido em estufa a 60° C/ 1h e evaporado em bloco de aquecimento a 40° C sob fluxo brando de N₂. O resíduo é retomado em 25uL de n-hexano e 1uL é injetado no cromatógrafo.

As condições do GC/MS são as seguintes:
temperatura do injetor = 250° C; temperatura da interface = 280° C; temperatura programada da coluna = 200 a 280° C, 5 C/min; fluxo de hélio = 0,5 mL/min (280° C); voltagem da fonte de eletrons = 70 eV; "dwell time" = 100 msec e voltagem da eletron multiplier = 2200 eV; fragmentação por impacto de eletrons; detecção por monitorização seletiva de ions (SIM), ions monitorizados m/z = 412, 397 e 383 para DES e m/z = 418 e 403 para DESd6, no caso da derivação com BSTFA + 1% TMCS. Para a derivação com HFBA os ions monitorizados foram m/z 660, 631, 447, e 341 para DES enquanto que para o DESd6 foram m/z 666, 347 e 637.

Para a identificação por HPTLC, os resíduos são integralmente aplicados, acompanhados do padrão de DES, e a placa é desenvolvida bidimensionalmente com os sistemas solventes (A) e (B), nebulizada com o agente cromogênico e aquecida a 100° C/ 10 min. A observação das manchas na cromatoplaça é feita visualmente ou com auxílio da fonte de UV em 366nm. A Fig. 2 ilustra o esquema analítico utilizado neste método.

Amostras de urina controle adicionadas de 50 a 200ng de DES acompanharam as análises. Em todas as amostras identificadas pela técnica de GC/MS houve a adição de 50 ng de DES deuterado.

3.2.5. Análise de DES em amostras de vísceras e tecido muscular por GC/MS

A metodologia utilizada foi a descrita por VAN PETEGHEM¹⁹⁹, com modificações realizadas pelo autor (comunicação pessoal), que consiste na digestão de amostras de tecido em meio tamponado de TRIS e subtilisina em banho-de-água a 60 °C por aproximadamente 12 h. Após centrifugação, o sobrenadante é extraído com éter dietílico, evaporado a securo, a 37°C sob fluxo de N₂. O resíduo é retomado com metanol e água sendo, posteriormente, eluído em acetato de etila através da coluna C18. O eluato é evaporado a securo a 40 °C sob fluxo de N₂. O

Fig. 2 - Fluxograma do procedimento utilizado na detecção de DES em amostras de urina.

resíduo é submetido a purificação por HPLC e a identificação por GC/MS nas mesmas condições citadas em 3.2.4.

As amostras de fígado e rins, tratadas do mesmo modo que as de tecido muscular, após extração com éter etílico, foram submetidas a uma purificação em coluna de Sephadex LH 20 e eluídas com o sistema solvente (D) ao invés de eluídas em coluna C₁₈, por apresentarem um alto grau de interferentes lipídicos. A Fig. 3 ilustra o esquema analítico utilizado neste método.

Fig. 3 - Esquema de procedimento utilizado na detecção de agentes anabolizantes em carne e vísceras por GC/MS

4. RESULTADOS

4.1. Exame anátomo-patológico da glândula prostática.

Os resultados dos exames anátomo-patológicos, de acordo com o laudo emitido pelo laboratório especializado, mostraram que :

- . Para o animal submetido ao implante com DES observaram-se sinais morfológicos de hiperplasia epitelial glandular acentuada e metaplasia Malpighiana indicando o uso abusivo de hormônios.
- . Para o animal controle foi observada uma hiperplasia moderada do epitélio de revestimento.

4.2. Análise dos sítios de aplicação.

Os resultados das análises dos sítios de aplicação por HPTLC são mostrados na Fig. 4 .Pode-se observar que as manchas dos sítios de aplicação correspondentes às orelhas direita (Add) e esquerda (Ade) apresentam os mesmos R_f do padrão de DES cis e trans.

4.3. Análise de DES em amostras de urina por GC/MS e HPTLC.

As amostras de urina recebidas pelo laboratório correspondentes aos dias 0, 1, 2, 4, 7, 10, 15, e 22 do experimento foram submetidas a marcha analítica descrita em 3.2.4.

Fig. 4 - Cromatograma por HPTLC de amostras de sítios de aplicação correspondentes às orelhas direita(Add) e esquerda (Ade) do animal tratado com DES e do animal controle (B). Sistema solvente (A). Sistema solvente (B)
 Agente cromogênico: Metanol-Acido sulfúrico conc.(9:1)

Uma vez que todos os cromatogramas obtidos por HPLC no processo de purificação apresentam o mesmo perfil, são aqui apresentados, com o objetivo apenas de ilustração, 3 cromatogramas correspondentes ao comportamento do padrão, às amostras de urina do boi tratado e de controle, onde a fração correspondente ao DES é coletada e posteriormente analisada por técnica mais sensível. (Fig. 5)

Os resultados obtidos das análises por HPTLC das amostras de urina correspondentes aos dias 0, 1, 2 foram negativos para o animal implantado. As amostras colhidas a partir do quarto dia, ou seja, nos dias 4, 7, 10, 15 e 22 após o implante, apresentaram resultados positivos para DES. As amostras correspondentes ao controle mostraram-se todas negativas.

As análises por GC-MS das urinas do animal tratado correspondentes aos dias 0 e 1 apresentaram resultados negativos para DES, enquanto que as dos dias 2, 4, 7, 10, 15 e 22 foram positivas para o hormônio analisado.

Todas as amostras de urina do animal controle apresentaram resultados negativos para DES. O resultado obtido na confirmação por GC/MS da amostra de urina colhidas no quarto dia após o implante é mostrado na Fig. 6 .Os cromatogramas correspondentes às outras amostras de urina do experimento apresentam resultados semelhantes a este. A Fig. 7 apresenta um cromatograma por GC/MS/SCAN positivo para padrão de DES, onde se observa toda a fragmentação da molécula. A Fig.8 ilustra um cromatograma GC/MS/SIM, mostrando a determinação de um ng de DES, cis e trans.

Fig 5 - Perfil cromatográfico do padrão de DES(A), amostras de urina do boi tratado (B) e controle (C) durante o processo de purificação por HPLC, coluna Lichosolv[®] ODS, fase móvel: metanol-água(65:35), 267 nm.

Fig.6 - Cromatograma por GC/MS obtido na confirmação com HFBA da presença de DES em amostra de urina colhida no 4º dia após o implante.

Fig 7 - Cromatograma por GC/MS do padrão de DES, obido no modo SCAN e sua respectiva fragmentação

Fig. 8 - Cromatograma por GC/MS/SIM de 1 ng de padrão de DES.

4.4..Análise de DES em amostras de vísceras e tecido muscular por GC/MS e HPTLC.

As amostras de vísceras (fígado e rins) e tecido muscular (" músculo" e "filet mignon") do animal tratado foram analisadas conforme descrito em 3.2.5. e os resultados apresentaram-se todos positivos para DES.

As amostras colhidas do animal controle e analisadas da mesma forma apresentaram resultados negativos para a substância em estudo. A Fig. 9 ilustra um cromatograma relativo à amostra positiva de músculo.

4.5- Análise de DES em amostras autênticas

Das 50 amostras de urina de animais destinados ao abate, apenas 11 apresentaram resultados positivos para DES. A Fig. 10 mostra o cromatograma de íons de uma dessas amostras

Das 11 amostras de tecido muscular de animais abatidos e destinados ao comércio, 6 apresentaram resultado positivo para DES.

Fig. 9 - Cromatograma por GC/MS de amostra de músculo do animal tratado com DES e a respectiva fragmentação obtida no modo SIM, onde foram monitorizados os ions m/z : 412, 397 e 383.

Fig. 10 - Cromatograma de ions (GC/MS) de amostra autêntica de urina.

5. DISCUSSÃO.

A literatura científica relativa ao uso de promotores de crescimento em animais de criação é bastante extensa e, pode ser subdividida em áreas de interesse científico distintos, tais como: efeitos no crescimento^{5,37,61,71,107,122}, modificações no metabolismo^{7,117}, níveis tissulares e séricos^{11,51}, problemas toxicológicos de relevância devidos ao uso destes compostos^{50,63,64,65,66,67,68,77,78,79,101,102,127,145}, problemas de resíduos^{17,25,118}, desenvolvimento de técnicas analíticas usadas em sua detecção^{24,29,35,42,75}, legislação pertinente ao seu uso^{13,14,20,104,132} e também fatores organolépticos e de qualidade da carcaça¹¹².

Mesmo se restringindo às técnicas analíticas envolvidas na detecção dos agentes anabolizantes, em diversos materiais biológicos, este trabalho não pretendeu, em absoluto, cobrir toda a extensão da literatura. O intuito do presente trabalho foi evidenciar técnicas que são mais frequentemente utilizadas, quer seja por pesquisadores buscando novos anabólicos para serem introduzidos na terapia humana e animal, quer seja para fiscalizar seu uso ilegal ou restrito em animais ou ainda como controle de qualidade na indústria que os produzem.

É importante salientar, numa primeira abordagem, o conceito do termo promotor de crescimento que pode se referir a mais de um tipo de substância usada na produção animal. Além dos agentes antimicrobianos, tireostáticos, anti-helmínticos, que podem favorecer o crescimento, existem também os agentes anabolizantes, que efetivamente promovem um aumento da massa

muscular , por estimularem a síntese proteica e melhorarem a taxa de conversão da ração. Aparentemente, exercem seus efeitos levando a um aumento da retenção de nitrogênio na forma de proteína muscular. Esta deposição proteica é controlada tanto por processos anabólicos quanto catabólicos. O efeito dos anabólicos é complexo e o seu exato mecanismo de ação é ainda obscuro¹¹².

Existem várias classes de anabolizantes, entre as quais os hormônios estrogênicos, que foram os primeiros a serem utilizados na pecuária, misturados à ração animal ou na forma de implante. Os andrógenos e os progestágenos, outras duas classes de compostos com atividade hormonal, são comumente administrados a animais de criação, para facilitar os cuidados durante a criação controlando o ciclo de estro, sincronizando o dia da concepção e permitindo um maior ganho de peso.

Os corticosteróides, também considerados promotores de crescimento, são usados na terapêutica veterinária pois permitem o tratamento de inflamações, particularmente a mastite e a cetose bovina¹²⁸.

Os hormônios tireostáticos permitem também, por sua vez, ganho de peso através de uma excessiva ingestão e retenção de água. A rigor, substâncias que podem inibir a produção do hormônio tireoideano tiroxina podem ser usadas para aumentar peso dos animais de abate¹²⁹.

A tabela I ilustra os diversos tipos de promotores de crescimento.

TABELA I - PRINCIPAIS CLASSES DE PROMOTORES DE CRESCIMENTO

Classe	Compostos Químicos
Estrógenos	DES Hexestrol Dienestrol Zeranol 17 Estradiol
Andrógenos	Acetato de trembolona Testosterona Metil testosterona Nortestosterona Boldenona Stanozolol
Progestágenos	Progesterona Acetato de melengestrol
Corticosteróides	Cortisona Hidrocortisona Predinisolona Dexametazona Betametazona
Tireostáticos	Metiltiouracil Propiltiouracil Feniltiouracil Tapazol
Outros	Prostaglandinas Agentes antimicrobianos Agentes antihelmínticos

Fonte: - adaptado de RYAN, J. J.¹²⁹

Os esteróides endógenos de uso mais frequente são o 17 estradiol, com atividade estrogênica, a testosterona, com atividade androgênica e a progesterona, com atividade progestogênica.

Além de sua aplicação na terapêutica humana e animal, esses agentes têm seu uso difundido no atletismo humano e animal, objetivando melhorar a performance dos atletas em competições esportivas, e na promoção do crescimento em animais destinados ao consumo, como já foi anteriormente citado^{100,145}.

Os compostos usados em humanos e em cavalos são, via de regra, esteróides estruturalmente relacionados ao andrógeno natural testosterona, enquanto que em bovinos e outros animais de corte, podem ser aplicadas combinações de agentes estrogênicos e androgênicos.

Além destes compostos endógenos, existem os chamados sintéticos "naturais", englobando vários tipos de ésteres de estradiol, testosterona ou progesterona, que ao serem introduzidos no organismo necessitam uma hidrólise para exercer sua ação, idêntica a dos hormônios endógenos. Os xenobióticos podem ser classificados de acordo com sua atividade hormonal. Entre os que apresentam atividade estrogênica estão os compostos do grupo dos estilbenos, sendo o dietilestilbestrol (DES) o mais significativo, e seus homólogos, dienestrol e o hexestrol. Também pertencem a este grupo o zeranol e o etinilestradiol⁷.

Entre os compostos xenobióticos que apresentam atividade androgênica estão a nortestosterona, a metiltestosterona, a boldenona, o estanozolol e a trembolona.

Entre os progestágenos xenobióticos estão o acetato de melengestrol e a medroxiprogesterona. A Fig. 11 apresenta as estruturas químicas desses anabólicos.

Destes compostos, o que tem causado maior preocupação do ponto de vista toxicológico é o DES, principalmente devido ao seu potencial carcinogênico, como sugerem os estudos realizados por METZLER^{99,101}, EPE^{37,38}, LIEHR^{84,86}, LI⁸³, entre outros.

Assim, no presente trabalho, optou-se pela adaptação de uma metodologia que pudesse indicar a presença deste anabólico, como resíduo, tanto na carne usada para consumo humano como em outros tipos de material biológico que se prestassem para este fim.

BOLDENONA

MEGESTROL

TREMBOLONA

PROGESTERONA (P)

Fig. 11 - Estruturas químicas dos anabólicos

TESTOSTERONA (T)

ETINILESTRADIOL (EE)

ZERANOL (ZER)

ZEARELENONA (ZEA)

Fig. 11 (continuação) - Estruturas químicas dos anabólicos

17 β ESTRADIOL (E) 17 α ESTRADIOL (E)

ESTRONA

ESTRIOL

NORETISTERONA

Fig. 11 (continuação) - Estruturas químicas dos anabólicos

HEXESTROL (HEX)

DIETILESTILBESTROL (DES)

DIENESTROL (DIEN)

19 NORTESTOSTERONA (NT)

Fig. 11 (continuação) - Estruturas químicas dos anabólicos

A escolha específica do DES deveu-se, também, ao fato de ser de conhecimento público que este composto, legalmente vetado, tem seu uso difundido na pecuária brasileira, embora esta afirmação pôde ser comprovada apenas quando partidas de carne brasileira exportadas foram devolvidas ao país.

Assim, o delineamento experimental utilizado no presente trabalho visava, fundamentalmente, fornecer amostras autênticas para testar os métodos adaptados anteriormente com amostras adicionadas.

Para tanto, após rápida pesquisa sobre o assunto, onde foram avaliados os métodos usados por JANSEN e col⁴³, BOURSIER e BELLI⁹, RUMSEY e col¹²², MARTIN e STOB⁹¹ e GALBRAITH e TOPPS³⁹, optou-se por um implante de 30 mg de DES (4 comprimidos de VI-GAIN[®]) em gado Nelore de 350 Kg de peso.

Os implantes de DES foram previamente analisados para comprovação de sua concentração real, uma vez que resultados preliminares de um estudo paralelo mostram que implantes de venda ilícita não apresentam, em absoluto, as concentrações indicadas nos rótulos.

Assim, considera-se importante discutir com mais detalhes este problema.

Num estudo anteriormente realizado, 3 bois foram implantados com DES, em concentrações supostamente compatíveis com as descritas na literatura. Após procedimento semelhante ao do atual experimento, os animais foram abatidos e as amostras de urina, carne e fígado foram analisadas por RIA e GC/MS com resultados sistematicamente negativos. Assim, diante da inesperada resposta, decidiu-se testar a concentração dos comprimidos do mesmo lote daquele implantado aos animais.

Surpreendentemente não se detectou a presença de DES, mas na verdade, o composto encontrado foi o hexestrol em concentrações tão insignificantes que não poderiam ter sido sequer detectadas em urina, e, muito menos, na carne dos animais implantados.

Por esta razão, estabeleceu-se um novo protocolo de trabalho onde foram previamente testadas diversas partidas de implantes e injeções oleosas, baseando-se nos métodos descritos por CAMERONI e col¹⁶, CARIGNAN e col¹⁷, DE BEER²⁶, LEA e col⁷⁸, EL-YAZBI e col³⁶, MORETTIE col¹⁰⁶, SOKOLOVA e col¹³⁹ e KLING e di ZEREGA⁷⁴ para conseguirem-se alguns comprimidos que pudessem, com confiança, ser implantados aos novos animais para obtenção das amostras desejadas.

O estudo realizado demonstrou que nenhuma das formulações analisadas apresentava a concentração de acordo com o conteúdo declarado. Algumas apresentavam outros hormônios que não os indicados, outras a total ausência deles.

Aqueles que efetivamente apresentavam DES, continham, sempre, concentrações muito inferiores às declaradas. Acredita-se que estes compostos, de venda ilegal, sejam também produzidos ilegalmente, uma vez que, em correspondências trocadas com o laboratório estrangeiro cujo nome consta do rótulo de várias destas formulações disponíveis no comércio paralelo, tomou-se conhecimento de que este anabólico deixou de ser produzido pelo laboratório em questão.

Uma vez analisados diversos implantes e injeções oleosas, escolheu-se o lote onde a concentração era a maior, ou seja, 7,5 mg por implante, e 4 deles foram aplicados no animal teste. As bases das orelhas foram o local de implante

escolhido, por ser usado normalmente por pecuaristas na Europa⁹⁰ e no Brasil (S.I.C.).

Entretanto, através de informações obtidas de técnicos do Serviço de Fiscalização Veterinária da Comunidade Flamengo, soube-se que, atualmente, a tendência é a de aplicar-se o hormônio na forma de implante no reto dos animais, por ser um local bastante irrigado e de difícil controle.

Segundo LELIEVRE⁷⁹ outros sítios de aplicação podem também ser encontrados no pescoço, sob as patas ou dentro do focinho.

Resolvido, então, o problema da identidade quali e quantitativa das formulações, o animal foi implantado com DES e, para que se obtivessem amostras sabidamente negativas para o composto estudado, ou seja, brancos de urina, tecido muscular, próstata e vísceras, escolheu-se um animal controle da mesma raça.

Embora parte do DES possa depositar-se também na gordura do animal, em virtude de sua lipossolubilidade, este material biológico não foi de interesse neste experimento.

Outra amostra biológica, as fezes dos animais, também não apresentou interesse, embora tenham concentrações maiores que no tecido muscular. Vários autores^{10,100,121} preconizam o uso deste material.

As amostras de urina, tanto do controle como do animal tratado, colhidas durante 22 dias alternados após o implante, permitiram atingir um dos objetivos do presente trabalho, que era o de identificar amostras sabidamente positivas. Não se pretendeu quantificar o composto em questão, o que poderá ser realizado numa segunda fase,

quando será avaliada a concentração presente em cada uma das amostras obtidas.

A presença de hormônios em animais de criação pode ser, ainda, detectada nos abatedouros, através da análise histológica de amostras de próstata dos animais abatidos, que devem ser recolhidas logo após o abate.

Os anabólicos podem causar metaplasia, porém não se pode associá-la à presença de concentrações de diferentes resíduos na carne bovina. Este teste, apesar de pouco conclusivo e de não identificar o tipo de composto administrado ao animal, é usado rotineiramente em alguns países, como um teste de triagem no uso de anabólicos.

No presente delineamento experimental, tão logo os animais foram sacrificados, suas glândulas prostáticas foram enviadas a um laboratório especializado para o exame anátomo-patológico.

As observações histológicas indicaram modificações metaplásicas no epitélio periférico glandular. O resultado é dado na forma de pontos com os seguintes significados:

- (-) = negativo
- (+) = poucas áreas metaplásticas
- (++) = moderadas áreas metaplásticas
- (+++) = muitas áreas metaplásticas

A ocorrência de metaplasia escamosa, critério que define o teste de próstata usado como triagem na pesquisa de anabólicos em animais de corte, evidencia o tratamento hormonal, e foi, então, considerada como resposta positiva no presente experimento.

As modificações metaplásticas aparentemente são resultantes da proliferação de células basais com aumento do número de

células do epitélio glandular, como foi observado por KRDES & -TEPPEMA (apud JANSEN e col^{as}), em estudo de microscopia eletrônica.

O animal controle, por sua vez, apresentou moderada dilatação glandular e moderada hiperplasia epitelial sem a presença de metaplasia, o que pode ser considerado normal.

É importante notar-se que este teste não é conclusivo uma vez que pode apresentar falsos resultados positivos, conforme relatam KARG & VOGT⁷⁰.

JANSEN e col^{as}, estudando a influência do tratamento de dipropionato de DES em novilhos, considerou, em seu experimento, como suspeita de lesão as próstatas onde era evidente a presença de hiperplasia que, porém, não apresentavam metaplasia. Neste mesmo experimento, o autor também não observou nenhum resultado falso positivo, embora pôde constatar alguns falsos negativos ao observar que os resultados do teste histológico da próstata correlacionavam-se bem com as concentrações urinárias de DES no momento da abate do animal, ou seja, altos valores, na faixa de 6,6 a 460 ppb, mostravam alterações prostáticas positivas ou suspeita de lesão. Porém, em concentrações de 1,3 ppb as próstatas apresentavam falsos resultados negativos.

Assim, devido a uma rápida reparação das alterações metaplásicas e à dificuldade de diagnóstico de outras lesões em cortes histológicos corados com hematoxilina/eosina, este teste apresenta valor limitado como triagem do uso ilegal de estrógenos em animais adultos. Todavia, parece ser adequado aos novilhos de 3 a 5 meses e impúberes e, embora seja usado em alguns países, como a Bélgica, Luxemburgo e Holanda, não é específico e tampouco informa com exatidão a presença ou ausência de resíduos.⁷¹

Uma análise bastante interessante, de realização relativamente simples, é a do tecido subcutâneo do local de implante dos anabólicos em animais tratados.

Esta pesquisa pode ser feita por diversas técnicas como por exemplo, HPTLC²⁰, HPLC⁵² e até espectrofotométricas¹⁵², quando as concentrações presentes são grandes o bastante para permitir a detecção dos agentes anabólicos.

A análise dos locais de implante é uma prática rotineira em países europeus e, a rigor, o resultado que apresenta vai depender muito da eficácia com que veterinários e/ou técnicos do serviço de fiscalização realizam seu trabalho, bem como da prática do analista em interpretar os resultados obtidos.

Assim, se os primeiros forem cuidadosos na inspeção da carcaça poderão, eventualmente, encontrar pontos necrosados ou com princípio de lesão que podem indicar um possível implante, além de poder encontrar comprimidos parcialmente absorvidos ou na forma de cistos.

Este tecido é então retirado da carcaça, dividido em duas partes iguais, uma para a prova e outra para eventual contraprova, acondicionados em frascos, lacrados e enviados ao laboratório capacitado.

A análise pode ser realizada como indicada em 3.2.3., sendo acompanhada de misturas de padrões de diversos anabólicos na placa de HPTLC. A Fig. 12 ilustra um típico sítio de aplicação, já preparado para ser analisado no laboratório, onde podem ser observados os implantes parcialmente não absorvidos.

Ainda a título de ilustração, podem ser observados na Fig.13 cromatogramas HPTLC de extratos de amostras autênticas dos sítios de aplicação X, Y, Z e W, que contêm respectivamente as seguintes misturas de agentes anabolizantes X: β -éster de testosterona, 17- β estradiol, dehidrotestosterona e acetato de medroxiprogesterona; Y: β éster de nortestosterona, acetato de medroxiprogesterona e 17 β éster de estradiol; Z: éster de clortestosterona e W: etinilestradiol, β éster de nortestosterona, éster de testosterona, o que pode ser comprovado através da comparação com o hRf de mistura de padrões em 2 sistemas solventes diferentes. O branco de referência foi ali colocado apenas como ilustração do comportamento cromatográfico de uma amostra negativa. Não necessariamente esta análise deve ser acompanhada de um controle.

Ao analisarem-se os sítios de injeção no presente trabalho, tinha-se em mente demonstrar a validade desse método, bem como verificar com que facilidade o veterinário do laboratório encontraria o local de implante.

Obteve-se sucesso em ambos, por ter sido bastante simples para o veterinário realizar sua tarefa, bem como comprovar-se analiticamente o implante do DES no animal do experimento.

Este método, que pode ser usado como triagem na detecção de anabólicos, deve gerar resultados absolutamente irrefutáveis, pois, como em uma análise dessa natureza estão envolvidos interesses econômicos e sociais, quando comprovada a fraude, haveria, a rigor, o confisco e incineração de todo o lote relativo à carcaça analisada. Por isto, órgãos oficiais de fiscalização como o da Holanda recomendam que um resultado confiável deve basear-se em pelo menos 2 técnicas de identificação, usando-se 2 princípios analíticos diferentes. De acordo com esta filosofia, é possível

realizar-se uma investigação em 2 estágios, onde, uma técnica simples e relativamente barata é seguida de outra para confirmação, mais elaborada e dispendiosa que pode ser realizada por cromatografia tridimensional (HPLC/HPTLC)²⁰ ou GC/MS; HPLC com detector de arranjo de diodos²², no caso de um resultado positivo.

Um fator importante, a ser considerado, é que as concentrações dos hormônios nos locais de implante são, normalmente, bastante elevadas, na faixa de microgramas a miligramas. Portanto, nesta análise, o limite de detecção não constitui problema.

Um outro ponto interessante é que este tipo de análise dispensa a hidrólise dos anabólicos, pois os compostos implantados podem ser encontrados inalterados. Assim, podem ser pesquisados os xenobióticos com atividade estrogênica como o DES, dienestrol, hexestrol e zeranol; andrógenos como acetato de trembolona, nortestosterona, metiltestosterona e progestágenos como medroxiprogesterona e os naturais como testosterona, estradiol, progesterona também frequentemente usados na Europa e Estados Unidos como anabólicos. A maioria destes compostos são administrados como tal ou como ésteres de ácidos carboxílicos alifáticos ou ácido

Fig. 12 - Sítio de aplicação já isolado da orelha do animal

Fig. 13 - Cromatograma por HPLC observado em luz UV 254nm e no visível após revelação com MeOH-H₂SO₄(9:1).

Misturas de padrões:

m1: clortestosterona, decanoato de nortestosterona, acetato de trembolona, mestranol, benzoato de estradiol, noretisterona, dienestrol, estradiol.

m2: cipionato de testosterona, cipionato de estradiol, medroxiprogesterona, DES trans, estradiol, DES cis

m3: isocaproato de testosterona, laurato de nortestosterona, acetato de mengestrol, metiltestosterona, hexestrol, nortestosterona

m4: enantato de testosterona, decanoato de estradiol, acetato de mengestrol, medroxiprogesterona, dipropionato de DES trans, boldenona, dipropionato de DES-cis.

m5: propionato de testosterona, valerato de estradiol, 19 noretisterona, etinilestradiol, 17OH progesterona, testosterona, estanozolol.

X: ester de testosterona, 17 β estradiol, boldenona, acetato de medroxiprogesterona

W: etinilestradiol, ester de nortestosterona, ester de testosterona

Y: nortestosterona, acetato de medroxiprogesterona, éster de 17 β estradiol

Z: Clortestosterona, ester de testosterona

benzóico em formulações tais como implantes, soluções oleosas, suspensões aquosas, cremes, emulsões⁵⁰.

Segundo MAGHUIIN-ROGISTER⁷⁰, em 1987 os hormônios mais encontrados em formulações do mercado paralelo belga e em sítios de aplicação foram os seguintes:

- estradiol (e seus ésteres)
- etinilestradiol
- nortestosterona (e seus ésteres)
- metiltestosterona
- acetato de trembolona
- medroxiprogesterona
- acetato de clormadinoma
- acetato de melengestrol
- testosterona e seus ésteres
- vários glicocorticóides

Atualmente encontram-se diversos agentes anabolizantes que, até há alguns anos, eram usados principalmente em doping humano e equino, como estanozolol e boldenona.

Esta péssima prática pecuária pode causar sérios riscos à saúde dos consumidores, particularmente devido ao fato de que quantidades de 10 a 100 mg podem ser encontradas nos locais de implante.

Segundo KARG e col.⁷¹, nos sítios de injeção podem ser encontradas concentrações de 0,2 a 20mg de hormônios. É importante mencionar que, embora estas quantidades sejam efetivamente elevadas nos locais de aplicação, seus valores decrescem rapidamente a partir de uma distância superior a 5 cm e podem não ser detectados a 25 ou 30 cm do local de implante⁷⁰. Os efeitos desses hormônios variam, mas, como exemplo, pode-se citar o etinilestadiol que, em dose única de 2 a 5ug, pode gerar inibição de gonadotrofina, ou ainda 5ug diárias em crianças pode levar ao aparecimento de

ginecomastia e em mulheres, cerca de 50ug diárias produz um tipo específico de sangramento.

Ainda segundo KARG e col.⁷¹, após a proibição do DES em 1980, na Alemanha, outros hormônios foram identificados em "coquetéis" ilegais como nortestosterona e acetato de progesterona. Os mais comumente observados durante os anos de 1986 a 1988 foram os ésteres da testosterona e benzoato de estradiol; ou 17 α etinilestradiol e 17 α - metiltestosterona; além de combinações de enantato de testosterona, 19-NT decanoato e progesterona. Ainda devido a esta prática ilegal deve-se ainda considerar os seguintes fatos:

- (1) existem coquetéis de hormônios disponíveis no mercado paralelo com nenhuma ou falsas declarações dos hormônios presentes nos rótulos;
- (2) os sítios de aplicação são frequentemente intramuscular, em tecidos que podem vir a ser ingeridos;
- (3) a dose é frequentemente alta.

Estes mesmos pontos podem ser extrapolados ao DES com uma preocupação ainda maior devido ao seu potencial carcinogênico.

O uso dos "coquetéis" talvez seja, ainda, restrito a países desenvolvidos, se considerada a relativa disponibilidade de obtenção do DES no Brasil e seu baixo custo em relação aos outros anabólicos. Pode-se então conjecturar que estas misturas não estejam ainda muito difundidas no mercado brasileiro.

Num experimento paralelo por nós realizado em um laboratório belga, um reduzido número de amostras (11) de carnes foram submetidas a RIA para os agentes anabolizantes DES,

nortestosterona, metiltestosterona, estradiol, etinilestradiol, testosterona, acetato de trembolona, medroxiprogesterona, exceção feita ao zeranol, de uso permitido por algum tempo no Brasil, que não pode ser analisado pela não disponibilidade, naquela ocasião, do anticorpo e nem do composto marcado. Os resultados foram todos negativos exceto para uma das amostras que se apresentou positiva para estradiol e testosterona, com quantidades inferiores a 100 pg e que ao ser analisada por GC/MS não confirmou o resultado do RIA. Deste experimento, podem-se tecer as seguintes considerações:

- (1) Embora o número de amostras analisadas fosse realmente pequeno e, portanto, estatisticamente não significativo, este experimento pode sugerir que o uso de anabolizantes talvez seja pouco difundido em animais de corte destinados à exportação ou, talvez, seja observado o período de carência e, neste caso, os anabólicos não são detectados.
- (2) Considerando-se que as amostras analisadas eram originárias, em sua maior parte, de animais cujos testes histológicos de próstata apresentaram resultados positivos, fica, mais uma vez, demonstrada, a inespecificidade deste teste.
- (3) Técnicas imunoquímicas como RIA e ELISA, embora menos onerosas, mais rápidas e que permitem um maior número de ensaios por lote, podem fornecer falsos resultados positivos e levam, invariavelmente, à necessidade de contar-se com um teste de confirmação mais específico, como por exemplo o GC/MS.

A determinação de resíduos de hormônios em material biológico é uma tarefa difícil. Para tal, os métodos químicos utilizados, para serem considerados satisfatórios, deverão preencher uma série de requisitos¹, entre eles:

- deve ser adequado a uma rotina regular realizada por pessoas qualificadas;
- deve permitir o manuseio de um grande número de amostras num pequeno espaço de tempo, para poder ser usado como um instrumento de fiscalização;
- deve ser seletivo para o composto, de modo a evitar resultados falsos positivos;
- deve quantificar, de forma inequívoca, a concentração do composto presente;
- deve permitir tanto a quantificação do composto livre quanto de seu conjugado;
- não deve ser muito oneroso, pois inviabilizaria as análises de vigilância sanitária.

Muitos métodos satisfazem alguns desses itens, mas nenhum satisfaz a todos. É possível, entretanto, conseguir resultados bastante satisfatórios com métodos que preencham a maioria desses requisitos. (Tabela II)

O primeiro ponto a ser considerado é a natureza do material biológico.

A urina é uma das amostras mais frequentemente utilizadas na detecção de anabólicos, tanto em atletas humanos ou equinos quanto em animais de criação, como pode ser constatado na Tabela II.

Este tipo de material biológico é relativamente fácil de ser obtido e trabalhado, apresentando os agentes anabolizantes em concentrações maiores do que, por exemplo, no tecido muscular. Porém os métodos analíticos usados para este tipo de amostra são geralmente elaborados e demorados, se comparados com o método para sítio de aplicação.

Invariavelmente seguem a sequência:

- extração com solvente orgânico ou em fase sólida;
- hidrólise do agente anabolizante conjugado;

TABELA II - METODOS ANALITICOS USADOS NA DETECÇÃO DE ANABOLICOS

AGENTE	AMOSTRA	HIDROLISE	EXTRAÇÃO PURIFICAÇÃO	IDENTIFICAÇÃO	REFERENCIA
DES Estilfoestrol	PLASMA FIGADO PROSTATA MUSCULO		LIQ-LIQ HPLC	GC/MS	1
Estradiol e Metabólitos	URINA PLASMA	HELIX POMATIA	LIQ-LIQ SEPHADEX	RIA	11
DES	URINA	HELIX POMATIA	LIQ-LIQ SILICA	HPTLC	10
17 Trembolona	URINA	HELIX POMATIA	LIQ-LIQ SILICA	HPTLC/RIA	12
DES,DIEN,HEX ZE,ZEA	FIGADO	HELIX POMATIA	LIQ-LIQ SPE	GC/MS	23
DES, NT,MT,TB	URINA	HELIX POMATIA		EIA	31
DES, E, EE,HEX	ALIMENTO	GLICURONIDASE ARILSULFATASE	LIQ-LIQ	GC/MS	40
DES	URINA	HELIX POMATIA	SPE C18	RIA	41
Metabólitos estrogênicos	URINA	HELICASE	XAD-2 SEPHADEX	GC/MS	41
DES	URINA	GLICURONIDASE ARILSULFATASE	SPE C18 HPLC	GC	46
Nortestosterona	URINA;BILE TECIDOS		IAC HPLC	GC/MS	47
DES				RIA	54
TB,TBA	RAÇÃO;AGUA URINA		LIQ-LIQ SILICA	HPLC; GC	55
DES	RIM	GLICURONIDASE de FIGADO BOVINO	LIQ-LIQ/LIQ	GC, GC/MS	57
DES	URINA	HELIX POMATIA	SPE C18/HPLC	GC/MS	61
PG,T,MP,NT,DIEN			HPLC		59

CONTINUAÇÃO DA TABELA II - METODOS ANALITICOS USADOS NA DETECÇÃO DE ANABOLICOS

AGENTE	AMOSTRA	HIDROLISE	EXTRAÇÃO PURIFICAÇÃO	IDENTIFICAÇÃO	REFERENCIA
E, HEX, ZER, EE, NT, TB, DES					
DES	URINA	HELIX POMATIA	LIQ-LIQ/HPLC	HPLC	67
Trombolona	URINA	HELIX POMATIA	LIQ-LIQ/HPLC	HPLC	66
DES	URINA	HELIX POMATIA	LIQ-LIQ/HPLC	RIA	65
DES, DIEN, HEX, ZER, ZEA				HPLC	60
19 NT, EE				HPTLC	64
DES	ALIMENTO		SOXHLET/CELITE	ESPECTROTONETRIA	68
DES	TECIDO		LIQ-LIQ/SEPHADEX	HPLC; GC/	73
DES, DIEN, HEX	CARNE/ORGAOS		LIQ-LIQ/SEPHADEX	GC	76
DES, HEX, DIEN				GC, GC/MS	77
Hormônios			LIQ-LIQ	HPLC; GC ESPECTROTOMETRIA UV	78
DES				EIA	80
ZER, ZEA, Taleranol	URINA	GLICURONIDASE	XAD/TLC	GC/MS; HPLC	72
DES, TB, ZER	PLASMA/TECIDO	HELIX POMATIA	LIQ-LIQ	MS/MS	89
E, ZER, DES, ZEA	MUSCULO		LIQ-LIQ/Al ₂ O ₃	HPLC	96
DES, ZER, E	TECIDO		LIQ-LIQ	HPTLC	93
DES	FEZES		LIQ-LIQ/LIQ	HPTLC; GC/MS	106
DES	MUSCULO		LIQ-LIQ/SEPHADEX	RIA; HPLC	108
ZER, DES				ELISA	110
DES, HEX, DIEN, Indenestrol				HPLC/MS	111
NT, E, MPA	CARNE; LEITE GORDURA: RIM		SPE C18/HPLC	EIA	115

CONTINUAÇÃO DA TABELA II - METODOS ANALITICOS USADOS NA DETECÇÃO DE ANABOLICOS

AGENTE	AMOSTRA	HIDROLISE	EXTRAÇÃO PURIFICAÇÃO.	IDENTIFICAÇÃO	REFERENCIA
DES,DIEN,TB,E	URINA	HELIX POMATIA	LIQ-LIQ/HPLC	TLC	116
DES,E,Estrona	PLASMA	HELIX POMATIA	LIQ-LIQ/SEPHADEX	RIA	117
ZER,ZEA	MUSCULO;FIGADO	GLICURONIDASE	LIQ-LIQ	GC/MS;HPLC/MS	120
DES	ALFAFA		LIQ-LIQ	GC	123
DES	URINA			TLC	130
DES,T,,MT	CARNE	ESTERASE	LIQ-LIQ/LIPIDEX	HPTLC	136
DES,DIEN,HEX,EE TB,ZER,NT,E,T,MT	TECIDO;URINA		LIQ-LIQ/HPLC	HPTLC;GC/MS	137
E,DES,HEX,DIEN, Estilbestrol	CARNE		LIQ-LIQ/SILICA	GC/MS	141
DES	URINA		LIQ-LIQ/SILICA	GC	147
DES,DIEN,HEX,MT EE,ZER,TB	URINA	HELIX POMATIA	LIQ-LIQ/HPLC	GC/MS	149
DES	CARNE	SUBTILISINA	LIQ-LIQ/SEPHADEX	HPLC	156
DES	CARNE	SUBTILISINA	LIQ-LIQ/LIQ	GC/MS	155
DES	URINA;TECIDO	HELIX POMATIA	XAD	HPLC;HPTLC	158
EE,TBA,P6		GLICURONIDASE	SPE	RIA	151
DES,DIE	TECIDO		LIQ-LIQ	GC/MS	159

- reextração dos compostos hidrolizados por partição líquido-líquido ou fase sólida;
- purificação em colunas de sílica ou outro adsorvente ou HPLC
- identificação por RIA, ELISA, CLIA, HPTLC, HPLC, GC/MS, etc...

HOFFMAN^{33,34} acredita ser desnecessário um tratamento prévio da urina quando o método de identificação é RIA ou ELISA. Porém, grande parte dos trabalhos que usam estes métodos de identificação para detectar anabólicos indicam sempre algum tipo de extração e hidrólise^{31,41,73}, enquanto outros acreditam que, para diminuir o número de falsos positivos, seja necessária também uma purificação^{6,11,15,151}.

Segundo KABRA⁶⁷, a extração é a fase limitante na análise de anabólicos em fluidos biológicos. Devido à complexidade do substrato e à baixa concentração envolvidas nesta análise, são necessárias várias etapas para se atingir o processo de identificação final.

Numa análise de rotina, a preparação da amostra deveria seguir os critérios de:

- (1) seletividade na extração do anabolizante de interesse;
- (2) reprodutibilidade e eficiência em termos de recuperação;
- (3) rapidez na execução;
- (4) simplicidade em relação à manipulação envolvida na extração do composto desejado;
- (5) custo compatível com uma análise de rotina.

Existem basicamente 2 tipos de técnicas de extração usadas na análise de hormônios anabolizantes. A primeira é a extração por partição líquido-líquido, onde se emprega cloreto de metileno ou éter dietílico para extrair o

composto na sua forma livre. A segunda, relativamente recente, é a extração em fase sólida (SPE), que vem sendo usada, cada vez mais, na extração de anabólicos livres e conjugados.

As técnicas de extração por partição líquido-líquido, usadas na separação e concentração de anabólicos, podem variar de uma simples extração, usando-se um único solvente, até complicadas extrações, com tampões alcalinos.

O tipo de extração e a purificação são, geralmente, determinados pela eficiência e seletividade das técnicas cromatográficas usadas na identificação final da análise. Quanto mais específicos e eficientes são os sistemas cromatográficos, menores são os processos de extração e purificação para se obter o resultado desejado. Para melhorar a sensibilidade do ensaio, algumas vezes a extração deve ser feita em diversas etapas como, por exemplo, concentrando o anabólico desejado. Na análise de anabólicos, vários métodos de extração, realizados num pH específico com um solvente orgânico apolar, como o cloreto de metileno, clorofórmio éter dietílico^{10,11,12,22,56,65,82,116} apresentam variação de 0,1 a 10 ml, às vezes mais, no volume de urina utilizado. Após separação das fases, a orgânica é evaporada e o resíduo retomado em pequena quantidade da fase móvel ou solventes polares. A fase orgânica pode ser lavada com hidróxido de sódio para remover alguns componentes ácidos interferentes. Pode também remover estrógenos fenólicos e, assim, esta fase pode ser usada para a detecção dessas substâncias.

Frequentemente este tipo de extração oferece uma baixa recuperação devido às perdas durante o processo de neutralização.

O advento do suporte de sílica quimicamente ligada agilizou o uso de técnicas de extração em fase sólida neste tipo de análise. A sílica oferece muitas vantagens sobre as outras fases, pois fornece áreas de superfície de aproximadamente 500 m²/g que permitem grande capacidade de ligação.

A sílica é também mecanicamente estável, o que permite que resista a altas ou reduzidas pressões para acelerar o preparo da amostra. A especificidade e capacidade da sílica, quimicamente ligada em isolar uma vasta gama de compostos, é atribuída à grande variedade de grupamentos funcionais que podem a ela estar ligados. A interação química específica permite ao analista obter uma extração seletiva do composto de interesse.

Atualmente, vários autores preconizam o uso da extração em fase sólida. Alguns deles^{2,3,4,6,34,42,43,74,134,147,153} usam resinas XAD-2, Sephadex, Carboxypack e colunas de sílica gel ligadas, como por exemplo Sep-pak e Bond-Elut. A utilidade destas colunas deve-se à interação específica com o composto de interesse, um mecanismo bastante diferente da solubilidade, que é a base das técnicas de extração líquido-líquido. Desse modo, estas interações são mais seletivas e mais eficientes que as de partição líquido-líquido¹¹⁴. Devido ao custo e dificuldades de importação das colunas, o presente trabalho foi iniciado testando-se um método de extração líquido-líquido¹⁴⁴.

A maior dificuldade neste tipo de extração, além das perdas dos compostos altamente polares, está relacionada ao tempo necessário à execução desta técnica pois, frequentemente formam-se emulsões, exigindo centrifugação ou uso de maior quantidade de solventes para quebrá-las.

Assim, optou-se pela extração em fase sólida que se mostrou mais rápida, eficiente e de maior reprodutibilidade,

permitindo o uso de menor quantidade de solventes, fato que diminui consideravelmente o tempo necessário para a evaporação dos eluatos, além de evitar que o analista se exponha desnecessariamente aos solventes.

A extração é eficiente em toda a faixa de polaridade apresentada pelos agentes anabolizantes e seus metabólitos. Considerações interessantes e úteis sobre o uso, otimização e possível reutilização de colunas de sílica C18 (Sep-pak) são feitas por Heikkinen⁴⁹.

Após a extração, quer seja por partição líquido-líquido quer por fase sólida, a etapa seguinte consiste de um processo de hidrólise para liberar os hormônios de suas formas conjugadas.

A revisão da literatura realizada no presente trabalho mostra que a grande maioria dos autores usa, como técnica de hidrólise, a enzimática ao invés da ácida (Tabela II).

Numa ótima revisão realizada em 1986, Shackleton¹³³ discute o uso de vários tipos de β -glicuronidase disponíveis para a hidrólise de anabólicos conjugados e observa que, frequentemente, este tipo de reação não oferece uma recuperação total dos anabólicos conjugados, porque alguns deles, como por exemplo o DES, se conjugam também com sulfatos. Daí a necessidade de se usar misturas de β -glicuronidase e arilsulfatase.

Um problema a ser enfrentado com a hidrólise enzimática é a lentidão da reação, tornando as técnicas de rotina mais demoradas. Isto pode constituir-se num problema quando os resultados precisam ser fornecidos rapidamente.

Entretanto, em alguns casos, o processo de hidrólise pode ser acelerado aumentando-se a temperatura do ensaio.

No presente trabalho, as amostras foram tratadas com Helix pomatia e submetidas a 37°C/16 horas. Quando havia urgência em se obter resultados, as condições de hidrólise eram alteradas para 55°C/2 horas.

Muitas vezes é necessário determinar-se a atividade da β -glicuronidase usada na hidrólise dos hormônios conjugados, o que pode ser feito através da determinação espectrofotométrica da porcentagem de hidrólise de p-nitrofenilglicuronida e p-nitrofenilsulfato.

Um outro fator importante ao se usar hidrólise enzimática com β -glicuronidases e arilsulfatases de diferentes origens como as provenientes de Helix pomatia, β -glicuronidase de Escherichia coli e de fígado bovino, e sulfatase parcialmente purificada de Helix pomatia, é que apresentam pequenas concentrações de estrógenos e andrógenos, como por exemplo testosterona, dihidroepiandrosterona, estradiol e estrona.

Isto resulta em falso aumento da concentração destes hormônios, que pode ser significativo para o resultado da análise. Esses resultados errôneos podem ser evitados extraíndo-se as enzimas com éter antes de serem utilizadas, o que permite que a atividade enzimática praticamente não se altere e os resultados da hidrólise sejam mais precisos⁴⁵.

Essas considerações naturalmente não se aplicam aos xenobióticos como o DES, zeranol e trembolona.

Foram testadas também a solvólise (acetato de etila-ácido sulfúrico³⁴) e a metanólise¹⁴³ (metanol-cloreto de acetila). Embora sejam mais rápidas, levam a uma recuperação inferior no caso de compostos conjugados ao ácido glicurônico e a um maior número de interferentes no processo final de

identificação, sendo, porém, eficientes para compostos que se conjugam em maior proporção com sulfatos como boldenona e nandrolona.

Segundo Axelson e col.⁴, na maioria dos métodos a hidrólise enzimática ou a solvólise são fatores limitantes na análise e levam a perdas incontornáveis de ésteres e conjugados. Isto ocorre devido à desconhecida seletividade da enzima e solubilidade diferencial na mistura de solvólise.

O pH ideal de hidrólise com Helix pomatia é 4,7 que pode ser atingido nas urinas bovinas, cujo pH varia de 6,9 a 8,9 usando-se ácido acético glacial até aproximadamente pH 6,0 e, com a adição do tampão acetato, pode-se atingir o pH ideal.

Alguns autores sugerem que o pH de hidrólise seja atingido com o tampão, porém, observa-se na prática que às vezes são necessários vários mL para se obter o pH adequado, o que leva a uma diluição da amostra. Esta diluição muitas vezes prolonga o tempo de extração quando se usa coluna de fase sólida.

Como o DES é conjugado tanto com ácido glicurônico como com sulfato a Helix pomatia contendo glicuronidase/arilsulfatase, mostra-se bastante eficiente na hidrólise destes conjugados.

Embora a triagem dos anabólicos seja mais efetivamente realizada em amostras de urina, em função das quantidades presentes, é necessário que se possa contar com métodos sensíveis e precisos para tecido animal, pois muitas vezes este é o único tipo de amostra disponível para o controle do uso ilegal dos anabólicos.

No presente trabalho foi basicamente utilizado, no preparo de amostras de carne e vísceras, o método de VAN PETEGHEM¹⁹⁸⁵, por adequar-se bem a condições laboratoriais existentes.

A digestão da matéria proteica é feita pela subtilisina, protease que tem a vantagem de facilitar o trabalho, pois um grande número de amostras pode ser digerido ou durante a noite, sem que sejam afetadas as concentrações de DES, seus glicuronatos e sulfatos e sua isomeria cis - trans. Na realidade, entre 6 e 8 horas a 60°C, pode ser observada a digestão total do tecido animal. Entretanto, para facilitar a análise, as amostras foram submetidas a banho-de-água a 60°C/16 horas .

Esse tipo de digestão parece ser bastante adequado, embora não seja a única forma de ser realizado. Pode-se também usar uma maceração do tecido com auxílio de um liquidificador em meio cetônico, como indica Coffin, ou homogenização em meio tamponado (acetato) e destruição do tecido com auxílio de um "Politron", conforme indicado por Covey, 1985. É interessante notar que, após a maceração da amostra, esse autor preconiza uma hidrólise por 12 horas com α -glicuronidase por tratar-se de amostras de fígado onde existe uma grande proporção de anabólicos já conjugados. Tal hidrólise não é necessária para tecido muscular, uma vez que ali ocorre o armazenamento de compostos inalterados e não na forma de glicuronatos e sulfatos. Portanto, segundo o método de Van Peteghen, modificado pelo próprio autor (comunicação pessoal), a extração com éter dietílico é realizada logo após a digestão das amostras de tecido muscular.

Tanto para tecido muscular quanto para vísceras (realizando-se ou não hidrólise dos conjugados), o éter dietílico, ao extrair os anabólicos, extrai também gordura, cuja quantidade presente vai direcionar a próxima etapa do método

analítico. No caso de baixa concentração de lipídeos é feita uma purificação em coluna Sep-pak . Ao contrário, se a concentração lipídica for grande, deve-se então usar Sephadex LH-20 que, com o sistema solvente indicado, permite a eluição dos anabólicos livres de lipídeos.

Isto foi observado e avaliado com bastante cuidado num estudo paralelo por nós realizado, num laboratório belga, onde tentava-se estabelecer a eficiência de recuperação entre as colunas Sep-pak, Lipidex 5000 e a Sephadex LH-20 para melhor purificação do DES em amostras de fígado a serem posteriormente quantificadas por RIA. Para tanto, usou-se DES marcado com trítio monitorizado em líquido de cintilação para contagem em contador . Foram adicionadas quantidades diferentes do composto radioativo às amostras de fígado controle. Os eluatos obtidos das colunas foram recolhidos diretamente em frascos de cintilação e lidos no contador de partículas .

O melhor resultado, em termos de recuperação, foi o fornecido com colunas de Sephadex LH-20. É importante notar que ocorrem perdas no processo, ou seja, perde-se DES nas paredes do tubo onde é feita a diluição do composto marcado, nas colunas usadas e até nas ponteiros das pipetas, daí a necessidade de se contar com um material de vidro que contenha o menor número de sítios ativos possível. Por isso, recomenda-se sempre que sejam de borosilicato da melhor qualidade e descartados após uso para evitar contaminação.

A Sephadex LH-20 tem a vantagem de ser completamente inerte, se comparada a materiais "mais ativos" como sílica ou alumina, o que permite que compostos lábeis atravessem a coluna sem sofrer modificação química. O fato de ser inerte permite também uma boa recuperação. Neste tipo de coluna, os solventes eluentes são normalmente um clorado e um álcool (por exemplo, cloreto de metileno-metanol 96:4, v/v) ou

hidrocarbonetos e álcoois(por exemplo ciclohexano-etanol 90:20,v/v).¹³³

Tecidos ricos em lipídeos, como fígado e rins, podem ser facilmente trabalhados com este tipo de coluna, observando-se uma completa remoção da gordura e posterior eluição do DES ou outros anabólicos.

Isto fica evidente ao se trabalhar com fígado que apresenta uma gordura de forte coloração alaranjada que é eluída integralmente antes dos anabólicos.

A coluna de Sephadex LH-20 tem a desvantagem de eluir os anabólicos lentamente e não poder ser operada em alta pressão porque, neste caso, sofre uma considerável contração.

PEARSON MURPHY & DIEZ D'AUX¹¹³ fornecem dados interessantes no uso deste tipo de fase e BOURNE⁹ apresenta uma aplicação prática deste material na extração de nortestosterona. A Lipidex 5000 é hidrofóbica, estável e pode ser usada tanto em sistemas de fase normal quanto de fase reversa. SJOVAL e AXELSON¹³⁵ publicaram dados sobre os volumes de eluição relativos a vários esteróides C19 e C27 em vários sistemas solventes.

O maior inconveniente neste tipo de extração ou purificação cromatográfica líquido-gel é o tempo requerido, pois a velocidade de eluição deve ser lenta devido à lenta difusão no gel. Não se pode também pensar no uso de alta pressão por causar contração da fase.

Uma dificuldade prática observada nestes tipos de colunas preparadas no momento do uso, é que dificilmente se tem um controle sobre o exato tamanho e volume da coluna, e estas variações podem influenciar no rendimento do método.

No caso do DES em coluna de Lipidex 5000, observou-se que, para eluí-lo, eram necessários grandes volumes do solvente apropriado, hexano-cloreto de metileno 85:5 v/v, o que levava um considerável gasto de tempo. No entanto, Lipidex 5000 é recomendado para compostos apolares ou neutros.¹³³.

Tanto as análises de amostra de urina quanto as de tecido muscular ou vísceras do presente experimento foram acompanhadas de brancos de referência e de adicionados de DES, numa concentração compatível com as perdas do processo. Para se controlar as perdas das substâncias devido à possível adsorção do material de vidro ou colunas cromatográficas, as amostras foram acompanhadas do padrão interno DESd6. O composto deuterado é o que mais se presta como padrão interno, uma vez que apresenta o mesmo comportamento em termos de solubilidade, eluição e adsorção.

No caso de não se poder contar com o composto deuterado, deve-se usar uma substância a mais semelhante possível. ABRANSON¹, em análises de DES em plasma, fígado e próstatas de animais, usou como padrão interno o dimetilestilbestrol.

A preparação adequada do material biológico é decisiva para uma bem sucedida aplicação de técnicas analíticas de identificação e quantificação.

Compostos endógenos que possam interferir na análise de anabólicos devem ser removidos. Um outro ponto importante a ser considerado é que a purificação das amostras protege partes sensíveis dos equipamentos analíticos de interferentes como lipídeos, proteínas e partículas insolúveis.

A preparação da amostra biológica na análise de hormônios varia também de acordo com as exigências técnicas dos vários

instrumentos analíticos. Um exemplo disto é a análise por HPLC que exige, para maior duração da coluna e eficiência cromatográfica, uma purificação ou extração prévia das amostras, que pode ser feita por técnicas as mais diferentes como cromatografia em camada delgada ou papel ou ainda, como já foi anteriormente mencionado, em colunas de Sephadex, Lipidex, sílica e outras.

A cromatografia líquida foi utilizada no presente trabalho como uma mera fase de purificação das amostras onde, mediante prévia eluição do padrão de DES, se estabelece o tempo de retenção do composto, determinando-se o intervalo de colheita da fração que contém a substância em questão. Assim, com o sistema solvente escolhido, o DES é eluído numa fração de 4mL entre o terceiro e sétimo minutos do desenvolvimento cromatográfico.

Em análises multiresiduais, a técnica por HPLC é muito útil, pois permite a eluição de diferentes frações contendo diferentes hormônios. Um exemplo disto é dado por SMETS¹³⁷, que separa resíduos de hormônios em urina por diluição isocrática e coleta 4 frações onde, na primeira, são recolhidos DES, hexestrol, dienestrol, zeranol, trembolona e etinilestradiol; na segunda, -nortestosterona e estradiol; na terceira, -nortestosterona e -testosterona e, na quarta, -testosterona e -metiltestosterona. Estas são posteriormente identificadas por HPTLC.¹³⁷

A cromatografia líquida pode, assim, servir como uma técnica preparativa cuja eficiência dependerá do tamanho da coluna, do volume do "loop" do aparelho e da utilização de uma pré-coluna adequada⁴⁰.

Como técnica de identificação, a grande vantagem da HPLC é a de permitir a análise de vários compostos instáveis que

podem ser detectados sem auxílio de derivação ou exposição ao calor.

JANSEN ⁶⁷utiliza esta técnica tanto para purificação das amostras quanto na identificação do anabólico. Na fase de purificação é eluída a fração correspondente ao DES e na fase de identificação, após concentração do primeiro eluato, usando-se um sistema solvente diverso do primeiro, foi possível detectar o anabólico.

Como se observa na Fig. 5, os extratos de amostras de urina, purificados por HPLC, com detecto de UV, continham muitos interferentes na faixa de eluição do DES, impedindo a identificação de baixas concentrações deste composto, devido à pouca sensibilidade do detector utilizado.

A técnica por HPLC tem, ainda, maior potencial do que a de cromatografia a gas para realizar separações difíceis por poder usar um maior número de mecanismos, tais como, adsorção, partição, partição em fase reversa, permeação em gel e troca iônica, entre outros, com a vantagem de ser relativamente mais rápida..

Os adsorventes para HPLC de esteróides podem ser sílica, alumina e o octadecilsilano (ODS)ligado, que geralmente suportam a fase menos polar dos chamados de partição por fase reversa.

No presente trabalho, a coluna utilizada foi justamente a ODS, que se presta muito bem a esse tipo de análise. Cromatogramas de agentes anabolizantes por HPLC são quase que exclusivamente monitorizados por detector de UV . Isto é possível, uma vez que a maioria dos esteróides possuem grupos que absorvem bem nesse comprimento de onda, tais como 4 ou ^{1.4}, 3-ceto para andrógenos, progestágenos e corticosteróides e o anel aromático A para estrógenos.

Derivados esteróides, com uma única dupla ligação isolada ou compostos com atividade estrogênica como o DES, hexestrol e dienestrol podem ser facilmente detectados por UV na faixa de comprimento de onda de 210 a 254 nm. A Trembolona, porém, é mais eficientemente detectada em 350 nm⁸².

Um tópico interessante a ser abordado em relação ao uso de HPLC na purificação de DES, é o que se refere à isomeria cis-trans que esse composto apresenta.

Deve-se mencionar que a quantificação do DES em amostras biológicas fica bastante dificultada justamente devido à existência destas formas isoméricas que são facilmente interconvertidas.

A isomeria cis-trans do DES existe como mistura em equilíbrio, sendo o isômero trans o mais estável e abundante.

Sendo o DES um composto fenólico conjugado a uma dupla ligação, é fácil sua conversão às formas cis e trans através da fenalenona. A dissolução, tanto da forma cis quanto da trans, se processa em pouco tempo num solvente polar levando à mistura de ambos na mesma solução, mesmo partindo-se de padrão puro de DES trans¹²⁴.

Como é sabido, o trans-DES é a forma ativa do estrógeno, daí a utilização de anti-oxidantes quando eram misturados à ração animal para conservar esta forma.¹⁵⁰

RYAN ¹²⁴, observou que existe um problema relacionado à proporção de picos cromatográficos, cis e trans, quando quantidades inferiores a 500 ng de DES são derivados e detectados por GC/MS.

A proporção dos picos é variável mas, geralmente, quando o DES está em solução em solventes polares, a proporção é de aproximadamente 1:3 (cis-trans).

Em baixas concentrações, tanto do padrão quanto em amostras de carne ou urina, o pico cromatográfico do DES-trans é frequentemente menor que o cis. Uma vez que isto não ocorre quando concentrações elevadas do padrão são derivadas e depois diluídas antes da injeção no cromatógrafo, este é provavelmente um fenômeno dependente da concentração, como foi notado por DONOHO ³³.

WHITE & LUDWIG¹⁵⁰ estudaram isomerização do DES e caracterização do isômero cis e observaram que ocorre uma rápida isomerização da forma trans para uma mistura de equilíbrio cis-trans.

Esse equilíbrio parece depender de uma série de fatores, nem todos bem elucidados. Alguns deles são temperatura, tipo de solvente e a presença de outras substâncias químicas.

Quando o DES está em solução, o tipo de solvente utilizado tem grande efeito sobre a velocidade de isomerização. Em clorofórmio, benzeno ou éter, esta velocidade é relativamente rápida, enquanto que é lenta em acetona, metanol, etanol, etilenoglicol, propilenoglicol, polietilenoglicol, dimetilsulfóxido ou dimetilformamida.

Esta isomerização do DES trans para a mistura de equilíbrio cis-trans pode ser bastante inibida e, em alguns casos, limitada, como foi dito anteriormente, usando-se pequenas quantidades de anti-oxidantes tais como ácido ascórbico ou hidroquinona.

Estes autores afirmam, ainda, que devem ser tomados cuidados ao se preparar soluções padrão de DES cis ou trans,

pois esta isomeria em estudos quantitativos pode levar a falsos resultados. Daí a necessidade de se avaliar o teor de DES cis ou trans antes e durante este tipo de experimento.

COVEY²¹, em estudo quantitativo de DES, em fígado, conclui que a proporção cis-trans é bastante dependente da matriz analisada e apresenta vários cromatogramas ilustrando esse problema.

DERKS e col.³², trabalhando com DES trans puro, observou a formação do isômero cis após adicionar a forma trans em amostras de urina e a silanização do resíduo para injeção no GC/MS. Estes autores concluíram que a isomeria se formava durante a reação de silanização e que as proporções relativas dos isômeros dependem da natureza do substrato.

No método de VAN PETEGHEM¹⁵⁵, utilizado no presente trabalho, também se observa esse tipo de isomeria. A proporção cis-trans de uma solução padrão contendo 1 ng de DES após silanização é de 75/25. Porém, se o DES passa por todo o processo de extração, purificação e derivação, a proporção muda para aproximadamente 40/60, que não é constante e não pode ser usada como critério de identificação do DES.

No presente trabalho, as amostras de urina, vísceras e tecidos foram purificadas por HPLC, porém a fração recolhida para posterior análise foi a correspondente apenas ao DES trans e não ao cis.

Como pode ser observado na Fig. 6, DES cis e trans apresentam tempos de eluição bastante diferentes. Assim, o composto de menor importância quantitativa, o cis, foi descartado no processo de purificação por HPLC, por facilitar a execução da análise. DERKS³² preconiza o mesmo procedimento.

Portanto, no presente trabalho apenas DES trans é determinado pois, como enfatiza VAN PETEGHEM¹⁰⁵, carne contaminada com DES, em qualquer concentração não se presta a consumo humano, de acordo com a maior parte das legislações vigentes sobre alimentos.

Uma vez purificada por HPLC, a fração contendo o resíduo do composto estudado é submetida à última etapa do método que pode consistir de uma identificação por HPTLC ou por GC/MS. No primeiro caso, todo o resíduo proveniente de amostras de urina passa pelo processo descrito em 3.2.4., onde quantidades de DES na faixa de até 20 ng podem ser visualizadas. Alguns autores ^{10, 95} conseguem, com este mesmo procedimento, visualizar quantidades ainda menores.

Alguns autores preconizam também o uso de outros reativos cromogênicos como iodo e amido⁹⁵, ácido sulfúrico concentrado e 1% de vanilina ou proporções diferentes de ácido sulfúrico concentrado em metanol ou etano^{105, 127},

Em estudos preliminares, todos esses agentes foram testados, porém o que permitiu uma melhor visualização das manchas, tanto em UV quanto no visível, em baixas concentrações de DES, foi o metanol-ácido sulfúrico concentrado 9:1 v/v.

Doutros autores usam também sistemas solventes diferentes^{27, 116}, porém os utilizados neste trabalho foram os que mais se adequaram aos objetivos propostos.

Embora em análises por HPTLC utilize-se todo o resíduo da amostra, a quantidade de interferentes é muito grande na visualização das manchas. Tal fato diminui consideravelmente a sensibilidade do método e, portanto, esta técnica é mais vantajosa para amostras que contenham concentrações mais

elevadas, como ocorre, por exemplo, em amostras de locais de implante.

Esta, porém, é uma técnica bastante preconizada e ainda usada como confirmação em países como a Holanda e a Bélgica.¹⁴² O anexo I contém os critérios a serem seguidos numa identificação por HPTLC.

As análises realizadas no presente trabalho, tanto de amostras de urina como tecido muscular e vísceras, foram submetidas também a GC/MS.

Esta é uma das técnicas mais importantes na identificação de anabólicos, uma vez que combina o poder de resolução do cromatógrafo a gás a alta seletividade do detector de massa, criando uma possibilidade única na identificação de anabólicos presentes em baixíssimas concentrações (ppb - ppt) em misturas complexas.

Utilizando-se as facilidades de uma rápida varredura, o espectro de massa de picos individuais obtidos da separação do GC pode ser registrado tanto na forma de "total ion" quanto em SIM, ao se monitorizar íons característicos do composto. Neste caso a seletividade da separação pode ser consideravelmente aumentada.

Esta técnica é usada com frequência em vários laboratórios como o método mais preciso e específico na confirmação dos métodos de triagem para anabólicos, tanto no controle da dopagem quanto na fiscalização do uso ilegal destes compostos, como promotor de crescimento em animais de corte.

Segundo GOROG⁴⁴, a análise da maioria dos esteróides por cromatografia a gás exige prévia derivação no sentido de diminuir a instabilidade ao calor apresentada pelos anabólicos.

Tal derivação é útil, também, para evitar a adsorção parcial ou completa desses compostos, em sítios ativos das fases estacionárias.

Isto é importante ao analisarem-se pequenas quantidades do composto em questão. Assim, a derivação leva a uma maior volatilidade, eficiência na separação e melhor sensibilidade na sua detecção, o que é confirmado por Schanzer, 1988 ao afirmar que os esteróides e outros anabólicos isolados devem ser derivados para melhorar as propriedades cromatográficas e o padrão de fragmentação, por aumentar a abundância de ions na faixa de maior massa.

Dependendo do agente de derivação utilizado, pode-se introduzir na molécula do anabólico um grupo de alto peso molecular, propiciando maior seletividade e especificidade à técnica cromatográfica.

No presente trabalho, foram testadas misturas de vários agentes de derivação como MSTFA/TMCS/piridina; TMSI; BSTFA/TMCS/piridina; BSTFA em acetonitrila; HFBA em acetonitrila entre outros. Os melhores resultados foram os obtidos com a mistura comercialmente disponível do BSTFA, com 1% de TMCS como catalizador e com HFBA.

Para DES e seus homólogos, o hexestrol e o dienestrol, o BSTFA, como agente de derivação se mostrou bastante adequado, embora numa mesma análise, os ions múltiplos correspondentes a estes compostos, ao serem monitorizados, apresentam, na coluna cromatográfica usada, tempos de retenção muito próximos, mesmo variando-se as condições de temperatura da coluna.

Isto não acontece quando a derivação é realizada com HFBA, que permite a perfeita separação dos estilbenos.

Os derivados de DES, tanto com HFBA quanto com BSTFA, apresentam picos correspondentes aos isômeros cis-trans e, a abrangente discussão anterior sobre esta isomeria, se aplica também a estes derivados e à sua identificação por GC/MS.

O Anexo II apresenta os critérios a serem seguidos numa identificação e confirmação de anabólicos por GC/MS.

Observa-se que para o DES como derivado TMS, devem ser monitorizados os íons m/z 412, 397 e 383, que se positivos, devem ser confirmados como derivados HFB e os selecionados serão m/z 341, 660, 631, 447.

Estes critérios foram observados no presente trabalho. É interessante notar que o DES e o dienestrol, de acordo com os critérios do Anexo II, podem ser confirmados por detector de massa por impacto de elétrons. Porém, o hexestrol só tem sua presença confirmada se detectado por ionização química em gás NH_3 , detector este nem sempre disponível.

Além dos tempos de retenção, outro parâmetro utilizado como critério de avaliação da presença de DES nas amostras analisadas é o Índice de Retenção (I.R.), onde se tem, como referência uma mistura de n-alcenos de comprimentos de cadeia adequados, conforme proposto por PIOTCZYK & LARSON¹¹⁴. Através de uma simples equação matemática são obtidos os valores de I.R. tanto do padrão quanto das amostras. O valor de I.R. das pode diferir daquele do padrão em apenas 5%.

Como pode ser também observado no Anexo II, um outro critério de identificação é o de que abundâncias relativas dos íons fragmentados mais significativos devem coincidir em aproximadamente 10%. SCHANZER¹²⁶ preconiza que neste tipo de critério as abundâncias relativas devam coincidir não em 10 mas em 5%.

Embora esse critério também tenha sido seguido, observou-se que, em situações nas quais a quantidade da substância analisada presente na amostra é muito pequena (ng), a relação pode fornecer valores maiores que 10%.

Para se testar a eficiência da derivação, COVEY²¹, indica a adição de 1 ng de DES ao resíduo, derivando-o com HFBA e quantificando por GC/MS/SIM as concentrações relativas dos derivados diheptafluorobutila; monoheptafluorobutila e DES livre no íon molecular de cada um destes compostos. Este autor observou a produção de 95% do primeiro composto e 5% do segundo, enquanto que o DES livre não foi detectado. Ainda segundo este autor, o rendimento deste tipo de derivação em extratos de tecidos pode diminuir para 75% na faixa de concentração de 1 ppb, devido à competição dos interferentes e à presença de quantidades traço de H₂O.

A eficiência da derivação pode variar de 70 a 90% para o DES, dependendo, principalmente, da extensão da derivação conseguida.

No presente trabalho, controlou-se a eficiência de resposta derivando-se 1 ng de DES com BSTFA / 1% TMCS e avaliando-se o derivado TMS formado por GC/MS/SIM. Este teste foi realizado em triplicata, em diferentes oportunidades. A Fig. 8 mostra o comportamento cromatográfico de 1 ng de DES-TMS.

Segundo STAN¹⁴⁰, derivados sililados são lábeis e hidrolizam-se rapidamente na presença de traços de água. Daí a necessidade de se manter a amostra em excesso de reagente silanizante e injetar a mistura diretamente no cromatógrafo a gás.

Porém, observou-se no presente trabalho que, se mantidos livres de H₂O, em misturas solventes como acetonitrila, n-

hexano ou octano, estes derivados se mantêm estáveis por vários dias.

Embora as amostras não tenham sido quantificadas, foram adicionadas de padrão DESd6 na concentração de 5 ppb mostrando a eficiência do método nas condições indicadas pela legislação.

Das amostras analisadas, 22% foram positivas para DES na urina e 54% em carnes. Vale lembrar que esses dados se restringem a um número pequeno de amostras.

Embora não fosse objetivo do presente trabalho, doze amostras de urina foram também analisadas para hexestrol e dienestrol. Destas, quatro mostraram-se positivas para hexestrol por GC/MS/SIM, mas não foram confirmadas segundo os critérios preconizados no Anexo II, por não se dispor de detector de ionização química. No entanto, todos os outros índices de confiabilidade, como tempo de retenção, proporção relativa de íons e índice de retenção relativa aos hidrocarbonetos, foram satisfatórios.

Este tipo de resultado pode ser verdadeiro, uma vez que, em alguns implantes analisados no estudo em andamento já mencionado, observou-se a troca do DES pelo hexestrol em alguns lotes, embora este resultado possa ter sido obtido pelo uso de compostos a base de hexestrol e DES como os "Hexettes" também encontrados no mercado paralelo.

Através da literatura consultada, pode-se observar que a pesquisa de resíduos de substâncias hormonais, em amostras biológicas de animais usados para consumo humano, não é recente, pois há dezenas de anos vem sendo realizada em países desenvolvidos.

No Brasil, o método utilizado por órgãos oficiais até há pouco tempo era o físico-químico, que fazia uso da cromatografia gasosa como técnica de identificação, porém este não era conclusivo, uma vez que tal análise era dificultada pela presença de substâncias interferentes.⁴⁴⁴

Recentemente, soube-se, através da imprensa, que laboratórios brasileiros, que há algum tempo vêm se empenhando na detecção dos estilbenos, obtiveram resultados positivos para este composto em amostras biológicas obtidas em várias localidades do país.

Sabe-se, também, que, devido ao uso ilegal deste composto, frigoríficos enviam, para análise histológica, próstatas de animais abatidos para exportação, na tentativa de afastar o transtorno de uma possível devolução da carne, pelo país comprador, o que implica em pesados prejuízos.

Como aparentemente existe um uso disseminado do DES no Brasil, visando promover o crescimento dos animais de criação, é importante que se consiga realizar, efetivamente, a determinação de resíduos do DES e de outros anabólicos em amostras biológicas, não só para suprir uma exigência na exportação a países desenvolvidos, mas, principalmente, para assegurar a qualidade da carne consumida internamente.

A legislação brasileira indica que qualquer desses compostos, tenha seu uso proibido como promotor de crescimento. Existem aí alguns aspectos interessantes a serem considerados. Proibir apenas, sem criar condições para um controle efetivo, não produz efeito algum, uma vez que os anabólicos, por serem eficazes como promotor de crescimento, continuarão a ser usados. Daí, a necessidade de se criar uma fiscalização que possa efetivamente coibir seu uso.

Como foi dito anteriormente, tudo indica que o DES e seus homólogos continuem a ser usados sem um efetivo controle no Brasil. Pouco se sabe do possível uso de outros xenobióticos, como zeranol e a trembolona e, menos ainda, em relação aos endógenos produzidos sinteticamente, como ésteres de estradiol, progesterona e testosterona.

Em países europeus, que proíbem a utilização de todos os anabólicos e observam uma fiscalização rígida, ainda assim, existe o abuso, embora não relacionado ao DES.

Este abuso gera enorme polêmica entre legisladores e pesquisadores, polêmica esta relacionada à liberação ou não dos chamados hormônios "endógenos sintéticos".

De acordo com DEBACKERE³⁰, a proibição de todos os anabólicos gera um problema momentaneamente difícil de ser contornado em relação aos "endógenos sintéticos", uma vez que, se usados de acordo com a boa prática pecuária, são indistinguíveis dos endógenos analítica e fisiologicamente. Este autor considera que, em estudos realizados em carne obtidas de gado tratado com estes hormônios em condições controladas, ou seja, na forma de implante, 60 dias antes do abate, observou-se que existem muitos fatores garantindo a segurança da carne, ou seja, a ausência de risco de resíduos tóxicos ao consumidor, a saber:

- as concentrações encontradas na carne de animais tratados foram inferiores às aquelas que podem estar presentes em outros produtos comestíveis de origem animal.

- a ingestão dessas pequenas quantidades de resíduos na carne tratada provou ser consideravelmente inferior às observadas no leite de animais não tratados.

- a produção de hormônios endógenos, mesmo em determinadas faixas etárias, como em mulheres na menopausa e em pré-adolescentes, é muito maior do que a quantidade consumida através da carne de animais tratados.

- hormônios endógenos não exercem, virtualmente, nenhuma atividade quando ingeridos por via oral, porque no máximo 10% escapam da metabolização hepática após absorção pelo trato gastro-intestinal. Pela mesma razão, não sofrem efeito acumulativo. A fração não degradada e que atinge a circulação é insignificante, se comparada com a produção endógena normal.

- no processo de metabolização os produtos formados são iguais aos endógenos e seguem as mesmas vias de metabolismo intermediário seguidas pelos hormônios produzidos endogenamente. Por isto, têm a mesma afinidade pelos mesmos receptores, nos mesmos órgãos alvo, com o mesmo grau de ligação proteica e com a mesma eventual toxicidade. Portanto, baseando-se nestes dados, este autor acredita que os hormônios "endógenos sintéticos" possam ser usados para promover aumento da produção de carne, desde que um rígido controle seja exercido em relação à forma de uso (implante), local (base da orelha), qualificação do aplicador (veterinário), observação do período de carência mínimo (p.ex. 60 dias antes do abate) e com a possibilidade de remoção do implante, caso seja necessário, abater o animal antes de completado o período de carência.

Estas considerações sobre a aparente segurança no uso de esteróides endógenos são corroboradas pelos especialistas do JECFA (Comitê de especialistas da FAO/WHO para aditivos em alimentos)¹⁰⁹, que consideram desnecessário se estabelecer uma Ingestão Diária Aceitável (IDA) para estradiol, progesterona e testosterona. Para o zeranol, este Comitê estabelece uma IDA de 0 - 0,05 ug/kg de peso corpóreo, enquanto que para o acetato de trembolona a IDA temporária estabelecida foi de 0 - 0,01ug/Kg de peso corpóreo, baseando-se num nível de não efeito de 2ug/Kg de peso corpóreo/dia.

Parece haver um certo consenso em relação à liberação destes compostos para uso em animais de criação, se respeitada a boa prática pecuária.

Outro consenso, absolutamente geral, está em manter a proibição do uso do DES e seus homólogos pelos efeitos nocivos que podem acarretar.

Dessa forma, independentemente de decisões futuras de se liberar ou não certos tipos de anabólicos, é fundamental que laboratórios credenciados tenham infra estrutura adequada para realizar análises destes compostos e exercer uma fiscalização de forma efetiva, pois os produtores, alguns por desconhecimento, outros apenas visando interesses comerciais, continuarão a utilizar-se destes compostos pela eficácia que apresentam, sem considerar os possíveis riscos à saúde dos consumidores.

6. CONCLUSÕES

A partir da avaliação da literatura feita no presente trabalho, pode-se ter um rápido conhecimento da metodologia mais atual e recomendável em análise de anabólicos, permitindo concluir que:

- a enzima de excelência na análise de urina bovina é a Helix pomatia, enquanto que na carne é a Subtilisina;
- as técnicas de extração e purificação mais utilizadas em trabalhos que buscavam métodos mais sensíveis são a extração em fase sólida (spe) e o HPLC, respectivamente;
- a técnica de GC/MS é a mais recomendada na identificação de DES em diferentes materiais biológicos de animais de abate.

Considerando-se os resultados experimentais obtidos no presente trabalho pode-se concluir que:

- o método para a detecção de anabólicos em sítio de aplicação mostrou-se eficiente, de fácil execução, custo relativamente baixo e, portanto, importante subsídio para o controle do uso de anabólicos em animais de abate
- os métodos para a detecção de DES em urina, carne e vísceras de animais tratados com esse anabolizante mostraram-se satisfatórios, atendendo aos critérios de sensibilidade e confiabilidade preconizados internacionalmente;
- os métodos propostos aplicados à análise de amostras de diferentes materiais biológicos de animal controle apresentaram resultado negativo para DES, com a vantagem de não apresentarem picos cromatográficos que pudessem interferir na análise de amostras autênticas;
- embora a porcentagem de positivos em amostras de carne autênticas tenha sido elevada, deve-se considerar o reduzido número de amostras e o fato de que todas eram provenientes

de animais cujo teste histológico era positivo para anabólicos.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS (*)

1. ABRAMSON, F.P. & LUTZ, M.P. - Application of a capillary gas chromatographic-selected-ion recording mass spectrometric technique to the analysis of Diethylstilbestrol and its phosphorylated precursors in plasma and tissues. J. Chromatogr., Amsterdam, 339: 87-95, 1985.
2. ADATIA, R. & COOKE, M. - An improved method for steroid profile analysis using capillary gas chromatography. Chromatographia, Braunschweig, 25(7): 598-602, 1988.
3. ANDERSSON, S. H. G. & SJÖVALL, J. - Preparation of enol-tert-butyldimethylsilyl and mixed tert-butyldimethylsilyl-trimethylsilyl ethers for gas chromatography-mass spectrometry of steroids and bile acids. J. Chromatogr., Amsterdam, 289: 195-206, 1984.
4. AXELSON, M.; SAHLBERG, B.L.; SJÖVALL, J. - Analysis of profiles of conjugated steroids in urine by ion exchange separation and chromatography-mass spectrometry. J. Chromatogr., Amsterdam, 224: 355-370, 1981.

(*)De acordo com a norma NB 66/78 preconizada pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). As abreviaturas dos títulos de periódicos seguem o CHEMICAL ABSTRACT SERVICE SOURCE INDEX (CASSI) 1991.

5. BARBOSA C.; MAZZA, V.A.; CAPELOZZA, C.N.Z. ; MARCOS, A.C.M.; CAZES, R.L. Efeito do anabolizante zeranol no ganho de peso de novilhas nelorados em pastagens de capim-colonião. Zootecnia, Nova Odessa, 21(3):213-225, 1983.

6. BENRAAD, Th, J. STEPHANY R.W.; ROSMALEN, F.M.A.; HOFMAN, J.A.; LOEBER, J.G.; ELVERS L.H. - The necessity of chromatographic purification prior to radioimmunoassay of diethylstilbestrol in urine of cattle. Q. The Hague, 3(4):154-157, 1981.

7. BOLT, H.M. - Metabolism of estrogens natural and synthetic. Pharmacol.The., Oxford, 4:19-48, 1979

8. BOURNE, A. R. - A convenient system for the separation of some steroids on SEPHADEX LH-20. J. Chromatogr., Amsterdam, 92: 465-466, 1974.

9. BOURSIER, B. & BELLI - évolution des méthodes de recherche des résidus de diethylstilbestrol dans la viande de veau - comparaison des test biologiques et radio-immunologiques. Rec.Méd.Vét., Paris, 161(1):33-39, 1985

10. BOURSIER, B.; LEDOUX, M. - Détection du diethylstilbestrol dans les urines de veaux par chromatographie en couche mince haute performance. Analysis, Paris, 9(1-2):29-31, 1981.

11. BOURSIER, B.; LEDOUX, M.; RICHOU-BAC, L. - Teneurs plasmatiques et urinaires en estradiol 17 α et en estradiol 17 Beta chez le veau traité au benzoate d'estradiol. Applications au contrôle(1).Rec.Med.Vét. Paris, 159(4):419-423, 1983.

12. BOURSIER, B.; DELPONT, C. - Détermination des résidus de 17α trenbolone urinaire chez le veau. Utilisation d'une méthode de chromatographie couche tats obtenus par RIA. Rec.Méd.Vét., Paris, 162(2):157-162, 1986.
13. BRASIL. Leis, decretos etc. Portaria nº 450, 27 nov. 1986. Diário Oficial da União, Brasília, 28 nov. 1986
14. BRASIL. Leis, decretos etc. Portaria nº 279, 30 nov. 1988. Diário Oficial da União, Brasília, 2 dez 1988.
15. BRUNN, H.; FISTER, P.; EIGEN BRODT, E; STOJANOWIC, V.- False-positive results in the radio immunoassay detection of stilbene derivatives after administration of fluorinated corticosteroids to animals. Food Chem. Toxicol., Oxford, 23(10):931-935, 1985.
16. CAMERONI, R.; GAMBERININI, G; FERIOLI, V.; NABEI, M.T.; COPPI, G.- Determinazione di principi attivi in formulazioni farmaceutiche mediante cromatografia liquida ad alta pressione-progesterone. Farmaco Ed. Prat., Pavia, 33(7):291-300, 1978.
17. CARIGNAN, G.; LODGE, B.A., SKAKUM, W. - High Performance Liquid Chromatographic Analysis of Testosterone Esters in Oily Solution. J. Pharm Sci, Washington, 69(10):1214-6, 1980
18. CARTONI, G. P. ; CIARDI, M.; GIARRUSSO, A.; ROSATI, F.- Capillary gas chromatographic mass spectrometric detection of anabolic steroids. J. Chromatogr., Amsterdam, 279:515-522, 1983.

19. COFFIN, D.E. & PILON, J.C. - Gas chromatographic determination of Diethylstilbestrol residues in Animal Tissues. J. Assoc. Off. Anal. Chem. Washington, 56(2):352-357, 1973.
20. COMMISSION - Décision de la commission du 16 juillet 1987 arrêtant les méthodes à utiliser pour la recherche de résidus de substances à effet hormonal et de substances à effet thyrostatique. Journal officiel des Communautés Européennes. No L223/18 11.8.87
21. COVEY, Th. R.; MAYLIN, G.; HENION, J. - Quantitative secondary ion monitoring gas diethylstilbestrol in bovine liver. Biomed. Mass Spectrom. 12(6):274-287. 1985.
22. COVEY, Th. R.; LEE, E.D. HENION, J.D. - High-speed liquid chromatography/ Tandem mass spectrometry for the determination of drugs in Biological samples. Anal. Chem., Washington, 58:2453-2460, 1986
23. COVEY, Th. ; SILVESTRE D.; HOFFMAN, M.K.; HENION, J.D. - A Gas Chromatographic/Mass spectrometric screening, confirmation, and quantification method for Estrogenic compounds. Biomed. Environ. Mass Spectrom. London, 15:45-56, 1988.
24. CURVERS, J.; MARIS, F.; CRAMERS, C.; SCHUTJES, C.; RIJKS, J. - Increased speed of steroid analysis by capillary GC and GC-MS; effects of samples pretreatment and sample introduction. J. High Resolut. Chromatogr. Chromatogr., Heidelberg, 7(7):414-422, 1984.
25. DAY, W.E.; VANATTA, L.E.; SIECK R.F. - The confirmation of diethylstilbestrol residues in Beef Liver by gas chromatography - Mass Spectrometry. J. Assoc. Off. Anal. Chem., Washington, 58(3):520-524, 1975.

26. DE BEER, J.O.- On line high-performance liquid chromatographic diode array apectrophotometric analysys of steroidal hormones in illegal preparations. J. Chromatogr. Amsterdam, 489:139-155, 1989.
27. DE BRABANDER, H.; VANHEE, P.; VAN HOYE, S; VERBEKE, R. - Improved chromatographic clean-up of analabolics in bovine urine. J. Planar Chromatogr., Heildelberg, 2:33-38, 1989
28. DE RUIG, W.G.; HOOIJERINK, H.; WESEMAN, J.M. - Detection of anabolica in meat (administration sites) by three-dimensional HPLC/HPTLC. Fresenius Z. Anal. Chem., Wiesbaden, 320:749-752, 1985.
29. DE RUIG, W.G.; STEPHANY, R.W.; DIDKSTRA, G. - Quality critères for the detection of analytes in test samples with special reference to anabolic agents and related compounds. J. Chromatogr., Amsterdam, 489:89-93, 1989.
30. DEBACKERE, M.- Use of anabolics in beef production. J.S.Afr. Vet. Assoc., Pretoria, 60(2):71-5, 1989.
31. DEGAND, G.; SCHMITZ, P.; MAGHUIN-ROGISTER, G.-Enzyme immunoassay screening procedure for the syntetic anabolic estrogens and androgens, diethylstilbeltrol, nortestosterone, methyltestosterone and trembolone in bovine urine. J. Chromatogr., Amsterdam, 489:235-243, 1989.
32. DERKS, H. J. G. M.; FREUDENTHAL, J.; LITYENS, J. L. M.; KLAASSEN, R.; GRAMBERG, L.G.; BORRIAS VAN TONGEREN, V. - Identification and quantification of

- diethylstilbestrol in the urine of cattle by both low and high resolution gas chromatography-mass spectrometry. Biomed. Mass Spectrom., London, 10(3): 209-214, 1983.
33. DONOHO, A.L.; JOHNSON, W.S.; SIECK, R.F.; SULLIVAN, W.L.
- Gas chromatographic determination of Diethylstilbestrol and its glucuronide in cattle tissues. J. Assoc. Off. Anal. Chem., Washington, 56(4): 785-792, 1973.
34. DUMASIA, M.C.; HOUGHTON, E.; BRADLEY, C.V.; WILLIAMS, D.H.-Studies related to the metabolism of anabolic steroids in the horse: the metabolism of 1-dehydrotestosterone and the use of Fast Atom Bombardment Mass Spectrometry in the identification of steroid conjugates. Biomed. Mass Spectrom., London, 10(7):434-440, 1983.
35. EINIG, R.G. - Gas-liquid chromatographic determination of diethylstilbestrol at low levels in mixed feeds. J. Assoc. Off. Anal. Chem., Washington, 59(4):821-824, 1976
36. EL-YAZBI, F.A.; KORANY, M.A.; ABDEL-RAZAK, D.; ELSAYED, M.A.- Derivative spectrophotometric analysis of estradiol ester, testosterone and progesterone in oily injections. Anal. Lett., New York, 18(B17): 2127-2142, 1985.
37. EPE, B., METZLER, M. - Possible role of covalent protein binding in cell transformation by diethylstilbestrol. Suppl. Cancer Res. Clin. Oncol., 113:315, 1987.
38. EPE, B. METZLER, M. - Nature of the macromolecular binding of diethylstilbestrol to DNA and protein

following oxidation by peroxidase/hydrogenperoxidase.
Chem. Biol. Interact., Shannon, 56:351-361, 1985.

39. GALBRAITH, H. & TOPPS, J.H. - Effects of hormones on the growth and body composition of animals. Nutr. Abstr. Rev. Ser. B, 51:521-540, 1981.
40. GALLI, C.L.; MARINOVICH, M.; SAUTEBIN, L.; GALLI, G.; PAULETTI, R. - Selected ion monitoring, a method of choice for the determination of estrogen residues in food. Toxicol. Lett., 15: 193-198, 1983.
41. GASPAR, P. & MAGHUIN-ROGISTER, G. - Rapid extraction and purification of diethylstilbestrol in bovine urine hydrolysates using reversed-phase C18 columns before determination by radioimmunoassay. J. Chromatogr., Amsterdam, 328: 413-416, 1985.
42. GERHARD, K.; LUDWIG-KÖHN, H.; HENNING, H.V.; REMBERG, G.; ZEEK, A. - Identification of oestrogen metabolites in human urine by capillary gas chromatography and mass spectrometry., Biomed. Environ. Mass Spectrom., London, 18:87-95, 1989.
43. GIPS, H.; KORTE, K.; MEINECKE, B.; BAILER, P. - Separation of C₂₁-, C₁₉- and C₁₈-steroids on SEPHADEX LH-20 microcolumns. J. Chromatogr. Amsterdam, 193:322-328, 1980
44. GOROG, S., ed. Steroid analysis in pharmaceutical industry: hormonal steroids, sterols, vitamins D, cardiac glycosides. New York, Halsted Press, 1989.p.218-240

45. GRAEF, V & MARTINI, K - Steroid content of glucuronidase and sulfatase preparations, Clin. Chem., Winston-Salem, 32(7): 1416, 1986.
46. GROB, Jr, K.; NEUKOM, H.P.; ETTER, R. - Coupled high-performance liquid chromatography as a replacement for gas chromatography-mass spectrometry in the determination of diethylstilbestrol in bovine urine. J. Chromatogr., Amsterdam, 357:416-422, 1986.
47. HAASNOOT, W.; SCHILT, R.; HAMERS, A.R.M.; HUF, F.A.; FARJAM, A.; FREI, R.W.; BRINKMAN, U.A.Th. - Determination of α -19 Nortestosterone and its metabolites - 19-nortestosterone in biological samples at the sub parts per billion level by high performance liquid chromatography with on line immunoaffinity sample pretreatment. J. Chromatogr., Amsterdam, 489: 157-171, 1989.
48. HEFFTMAN, E. & HUNTER, I.R. - High pressure liquid chromatography of steroids. J. Chromatogr., Amsterdam, 165: 283-299, 1979.
49. HEIKKINEN, R.; FOTSIS, Th; ADLERCREUTZ, H. - Reversed-phase C_{18} cartridge for extraction of estrogens from urine and plasma. Clin. Chem., Winston-Salem, 27(1):1186-1189, 1981.
50. HEITZMAN, R. J.; HARWOOD, D.J.; REYNOLDS, I.P. - What hazard are associated with the use of anabolic agents for meat production? - ARC Res. Rev., UK, London, 5(2):63-66, 1978.
51. HEITZMAN, R. J. - The absorption, distribution, and excretion of anabolic agents. J. Anim. Sci., Champaign, 57(1):233-8, 1983.

52. HODGES, J. - Animal Production: World Trends In
INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON ANABOLIC HORMONES IN ANIMAL
PRODUCTION AND HUMAN NUTRITION, Roma, 1984.
Proceedings, 1984, p.58-63.
53. HOFFMAN, B. - Use of radioimmunoassay for monitoring
hormonal residues in edible animal products. J.
Assoc. Off. Anal. Chem., Washington, 61(5):1263-1273,
1978
54. HOFFMAN, B. & BLIETZ, C. - Application of
radioimmunoassay (RIA) for the determination of
residues of anabolic sex hormones. J. Anim. Sci.
Champaign, 57(1):239-246, 1983.
55. HOLDER, C.L.; BIAKEMORE, W.M.; BOWMAN, M.C. - Trenbolone
acetate and Trenbolone: trace analysis in animal
chow, wastewater and human urine by high pressure
liquid chromatography and electron capture gas
chromatography. J. Chromatogr. Sci., Niles, 17:91-97,
1979.
56. HOUGHTON, E. & TEALE, P. - Capillary Column gas
chromatographic mass spectrometric analysis of
Anabolic steroid residues using splitless injections
made at elevated temperatures Biomed. Mass. Spectrom.
London, 8(8):356-361, 1981.
57. HSU, S.H.; ECKERLIN, R.H.; HENION, J.D. - Identification
and quantitation of trenbolone in bovine tissue by
gas chromatography - mass spectrometry.
J. Chromatogr., Amsterdam, 424:219-229, 1988.
58. JANSEN, E.H.J.M.; BLITTERSWIJK, H.; STEPHANY, R.W. -
Monitoring and identification of residues of anabolic

preparation in slaughtered cattle by HPLC with diode array detection. Vet. Q., The Hague, 6(2), 60-65, 1984.

59. JANSEN, E.H.J.M.; BLITTERSWIJK, H.V.; ZOONTJES, P.W.; BOTH-MIEDEMA, R.; STEPHANY, R.W. - Selectivity of a diol phase high-performance liquid chromatographic system in trace analysis of anabolic compounds. J. Chromatogr., Amsterdam, 1985.
60. JANSEN, E.H.J.M.; BOTH-MIEDEMA, R.; VAN DEN BERG, R.H. - Application of optimization procedures for the separation of anabolic compounds by high-performance liquid chromatography. J. Chromatogr., Amsterdam, 489, 57-64, 1989.
61. JANSEN, E.H.J.M.; FREUDENTHAL, J., VAN ROSSUM, H.J.; LITJENS, J.L.M.; STEPHANY, R.W. - Quantitative determination of Diethylstilboestrol in bovine urine with isotope dilution mass spectrometry. Biomed. Environ. Mass Spectrom., London, 13: 245-249, 1986.
62. JANSEN, E.H.J.M.; STEPHANY, R.W. - Effective control for diethylstilbestrol in cattle in the Netherlands. Vet. Q., The Hague, 7(1): 35-38, 1985.
63. JANSEN, E.H.J.M.; - ; STEPHANY, R.W.; VOS, J.G.; RUITENBERG, E.J.; BENRAAD, Th.J.; DE BOER, F.; DE RUIJ, W.G.; WEIJMAN, J.; SCHMIDT, N.A. - Application of diethylstilbestrol dipropionate in bulls. Vet.Q., The Hague, 11(1): 1-11, 1989.
64. JANSEN, E.H.J.M.; VAN DEN BOSCH, D.; STEPHANY, R.W.; VAN LOOK, L.J.; VAN PETEGHEM, C. - Quantitative analysis of anabolics on thin-layer chromatographic plates using image analysis techniques. J. Chromatogr., Amsterdam, 489: 205-212, 1989.

65. JANSEN, E.H.J.M.; VAN DEN BERG; R.H.; VAN BLITTERSWIJK, H.; BOTH-MIEDEMA, R.; STEPHANY, R.W. - A highly specific detection method for diethylstilbestrol in bovine urine by radioimmuno assay following high performance liquid chromatography. Food Addit. Contamin., London, 2(4):271-281, 1985
66. JANSEN, E.H.J.M.; ZOONTJES, P.W.; VAN BLITTERSWIJK, H.; BOTH-MIEDEMA, R.; STEPHANY, R.W. - Fast high-performance liquid chromatographic screening method for the presence of trenbolone and its major metabolite in urine of slaughter cattle. J. Chromatogr., Amsterdam, 319:436-439, 1985.
67. JANSEN, E.H.J.M.; ZOONTJES, P.W.; VAN BLITTERSWIJK, H.; BOTH-MIEDEMA, R.; STEPHANY, R.W. - Screening of parts - per-billion levels of diethylstilbestrol in bovine urine by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. J. Chromatogr., Amsterdam, 347:379-383, 1985.
68. JEFFUS, M.T.; KENNER C.T. - Quantitative determination and confirmation of low levels of DES in Feeds. J. Anal. Off. Anal. Chem., Washington, 55(6):1345 - 1353, 1972.
69. KABRA, P.M. - Clinical analysis of individual steroids by column liquid chromatography. J. Chromatogr., Amsterdam, 429:155-176, 1988
70. KARG, H & VOGT, K. - Control of hormone treatment in animals and residues in meat - regular aspects and approaches in methodology. J. Assoc. Off. Anal. Chemic. Washington, 61(5): 1201-1208, 1978.

71. KARG, H.; MEYER, H.H.D.; HOFFMANN, B. - Hormonale leistungsforderer bei lebensmittelliefernden Tieren. Deutsches Arzteblatt., Köln, 87(9): 667-674, 1990.
72. KIM, H.L. ; RAY, A.C.; STIPANOVIC, R.D. - Rapid separation and identification of urinary metabolites of zeranol by HPLC - UV Spectrophotometry. J. Agric. Food Chem., Washington, 34:312-315, 1986.
73. KING, J.R.; NONY, C.R. BOWMAN, M.C. - Trace analysis of diethylstilbestrol (DES) in animal chow by parallel high-speed liquid chromatography, electron-capture gas chromatography and radioassays. J. Chromatogr. Sci., Niles, 15, 14-21, 1977.
74. KLING, O.R.; di ZEREGA G.S. - Quantitative separation of estrogens, androgens and progestogens using reverse phase high pressure liquid chromatography - Steroids, San Francisco, 40(4), 1982.
75. LAITEM, L. GASPAR, P. BELLO, I. - Detection of trenbolone residues in meat and organs of slaughtered animals by thin-layer chromatography. J. Chromatogr., Amsterdam, 147:538-539, 1978.
76. LAITEM, L. GASPAR, P.; BELLO, I. - Stable derivatives for gas chromatographic determination of synthetic anabolic stilbene residues (Diethylstilbestrol, Dieristrol and Hexestrol) in meat and organs of treated cattle at the sub-parts per billion (10⁻⁹) level. J. Chromatography., Amsterdam, 156:267-273, 1978.
77. LAWRENCE, J.F.; RYAN, J.J. - Comparision of electron-capture and electrolytic conductivity detection for

- the gas-liquid chromatographic analysis of Heptafluorobutyril derivatives of some agricultural chemicals. J. Chromatogr., Amsterdam, 130:97-102, 1977.
78. LEA, A.R. ; KAYABA, W.J.; HAILEY, D.M. - Analysis of diethylstilbestrol and its impurities in tablets using reversed-phase high-performance liquid chromatography. J.Chromatogr., Amsterdam, 177:61-68, 1979.
79. LELIEVRE, H. - Utilisation d'implants et de preparations a base d'anabolisants. Bilan de cinqannees de controle (1977-1981). Bull. Soc. Vét. Prot. Fr., Paris, 66(7):449-59, 1982.
80. LELIEVRE, H; MAMAS, S.; GLEDEL, J.; DRAY, F. - Enzymo-immunodosage du diéthylstilboestrol. Sci. Aliments, Paris, 8, 149-70, . 1988.
81. LEME, P.R.; CAMARGO, D.F.V.; MARCOS, A.C.M. - Efeito do zeranol no desempenho de bovino da raça Nelore inteiros e castrados em confinamento. Zootecnia, Nova Odessa, 22(1):17-26, 1984
82. LESNE, M. - Modern drug analysis in biological fluids suitable for clinical pharmacokinetics. J. Phar. Biomed. Anal., New York, 1(4):415-434, 1983.
83. LI, J.J.; LI, S.A. - Estrogen - induced tumorogenesis in hamsters: roles for hormonal and cancinogenic activities. Arch. Toxicol., Berlin, 55:110-118, 1984.
84. LIEHR, J.G. - Possible role of 4',4" - diethylstilbestrol quinone in diethylstilbestrol

- cancerogenesis. J. Toxicol. Environ. Health.,
Washington, 16:693-701, 1985.
85. LIEHR, J.G.; AVITTS, T.A.; RANDERATH, E.; RANDERATH, K.
- Estrogen-induced endogenous DNA adduction: possible
mechanism of hormonal cancer. Proc. Natl. Acad. Sci.,
Washington, 83:5301-5305, 1986
86. LIEHR, J.G.; BALLATORE, A.M.; DAGUE, B.B.; ULVBELEN,
A.A. - Cancinogenecity and metabolic activation of
Hexestrol. Chem. Biol. Interact., Shannon, 55:157-176,
1985
87. LIEHR, J.G.; HALL, E.R.; AVITTS, T.A.; RANDERATH, E.;
RANDERATH, K. - Localization of Estrogen-induced DNA
adducts and cytochrome P-450 activity at the site of
renal cancerogenesis in the Hamster kidney. Cancer
Res., Philadelphia, 47:2156-159, 1987.
88. LUTZ, W.K.; JAGGI, W.; SCHLATTER, CH. - Covalent binding
of diethylstilbestrol to DNA, in rat and hamster
liver and kidney. Chem. Biol. Interact.,
Shanon, 42:251-257, 1982.
89. MAFFEI FACINO, R.; CARINI, M.; DAFORNO, A.; TRALDI, P.;
POMPA, G. - A rapid method for simultaneous detection
by Collisionally Activated dissociation mass analysed
ion kinetic Energy spectrometry of parts per trillion
of Diethylstilbestrol, Zeranol and Trenbolone in
Plasma and Edible Tissues of Cattle. Biomet.
Environ. Mass Spectrom., London, 13:121-127, 1986.
90. MAGHUNIN - ROGISTER, G. - Hormonen in het vlees -
Toxicologische impact voor de Vlansverbruiker en
controles methoden. W. Z. Dierenartsen
Wereld, 15(Feb/Mar):15-21, 1988.

91. MARTIN, T.G. & STOB, M. - Grow and carcass traits of holstein steers&bulls implanted with diethylstilbestrol. J. Dairy Sci., 61:132-134, 1978
92. MAT SUI, M.; HAKOZAKI, M. KINUYAMA, Y. - Extraction of steroid di conjugates using amberlite XAD-2 resin. J. Chromatogr., Amsterdam, 115:625-628, 1975.
93. MEDINA, M. B. - Direct Radioimmunoassay of 17 - Estradiol in ether extracts of bovine sera. J. Agric. Food Chem., Washington, 34:1046-1049, 1986.
94. MEDINA, M. B.; SCHWARTZ, D.P. - Isolation of estrogens in bovine plasma & tissue extracts using alumina and ion. exchange microcolumns. J. Agric. Food Chem., Washington, 34:907-910, 1986.
95. MEDINA, M.; SHCWARTZ, D.P. - A multi-residue TLC screening procedure for anabolic oestrogens and detection of oestradiol, DES or zeranol in chicken muscle issue extracts. Food Addit. Contam., London, 4(4):415-427, 1987.
96. MEDINA, M. B.; SHERMAN, J.T. - High performance liquid chromatographic separation of anabolic oestrogens and ultraviolet detection of 17 beta oestradiol, zeranol, diethylstilbestrol or zearalenone in avian musche tissue extracts. Food aadit. Contam., London, 3(3):263-272, 1986.
97. MELNIK, S.; COLE, Ph; ANDERSON, D.; HERBST, A. - Rates and risks of diethylstilbestrol - related clear-cell adenocarcinoma of vagina and cervix - an update. N. Engl. J. Med., Boston, 316:514-6, 1987.

98. METZLER, M. - Biochemical toxicology of diethylstilbestrol. Rev. Biochem. Toxicol., New York, 6:191-220. 1984.
99. METZLER, M. - Metabolic activation of xenobiotic stilbene estrogens. Fed. Proc. Fed. Am. Soc. Exp. Biol., Washington, 46(5):1855-1857, 1987.
100. METZLER, M. - Metabolism of some anabolic agents: Toxicological and analytical aspects. J. Chromatogr., Amsterdam, 489:11-21, 1989.
101. METZLER, M. - Metabolism of stilbene estrogens and steroidal estrogens in relation to carcinogenicity - Arch. Toxicol., Berlin, 55:104-109, 1984.
102. METZLER, M. - Studies on the mechanism of carcinogenicity of diethylstilbestrol: role of metabolic activation. Cosmet. Toxicol., London, 19:611-615, 1981.
103. MEYER, H. H.D.; HOFFMANN, S. - Development of a sensitive microtitration plate enzyme-immunoassay for the anabolic steroid trenbolone. Food Addit. Contam., London, 4(2):149-60, 1987.
104. MINTZ, M. & COHEN, J.S. Power Inc.: public and private rulers and how to make them accountable. New York, Bantam Books, cap. 39, p. 605 - 617.
105. MORETTI, G.; BONIFORTI, L.; SECCO, F.; AMICI, M.; CAMMARATA P.; INNOCENTI, R. - Ricerca dei residui di Dietilstilbestrolo nelle feci di bovini mediante HPTLC e GC-MS. Ann. Ist. Super. Sanità., Roma, 21(3):391-400, 1985.

106. MORETTI, G.; CAVINA, G.; ALIMENTI, R.; CAMMARATA, P.; VALVO L. - HPLC Analysis of steroid for mulations, acting as anabolics, unlawfully used in veterinary. In: SIMPOSIUM ON THE ANALYSIS OF STEROIDS. Szeged, 1984. Proceedings. 1984, p.471-477
107. NOGUEIRA, J.R.; BARBOSA, C.; ESPIRITO SANTO de CAMPOS, B. - Intervalos de aplicação do anabolizante zeranol no ganho de peso de novilhos nelores astrados, em pastagens de capim colônia (*Panicum maximum*, Jaxq.). Zootecnia, Nova Odessa, SP, 21(3)213-225, 1983
108. O'KEEFFE, M.; HOPKINS, J.P. - Application of sorbent extraction chromatography to the purification of diethylstilboestrol extracted from muscle tissue and determined by radioimmunoassay. J. Chromatogr., Amsterdam, 489:199-204, 1989.
109. ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Evaluation of certain veterinary drug residues in food. Geneva, 1988. 21-28. Technical report Series, 763.
110. PALEOLOGO ORIUNDI, M.; RUSSO, V; DANESE, M; BERTI, F. - Enzyme Immunoassay for the detection of the anabolic agents zeranol and diethylstilbestrol. In: SYMPOSIUM ON THE ANALYSIS OF ANABOLICS AND DOPING AGENTS IN BIOSAMPLES. Ghent, 199. Proceedings 1990, p.33.
111. PARKER, C.E.; LEVY, L.A.; SMITH, R.W.; YAMAGUCHI, K.; GASKELL, S.J., KORACH, K.S. - Separation and detection of enantiomers of stilbestrol analogues by combined high-performance liquid chromatography-thermospray mass spectrometry. J. Chromatogr. Amsterdam, 344:378-384, 1985.

112. PATTERSON, R.L.S.; SALTER, L.J. - Anabolic agents and meat quality: a review. Meat Sci., Barking, 14:191-220, 1985.
113. PEARSON MURPHY, B.E.; DIEZ D'AUX, R.C. - The use of sephadex LH-20 column chromatography to separate unconjugated steroids. J. Steroid Biochem. Oxford, 6:233-7, 1978
114. PLOTCHYK, L.L.; LARSON, P. - Advances in fused - silica column technology for the analysis of underivatized drugs. J. Chromatogr., Amsterdam, 257:211-226, 1983.
115. RAPP, M.; MEYER, H.H.D. - Determination of hormone contamination in milk replacers by high-performance liquid chromatography and immunoassay. J. Chromatogr., Amsterdam, 489:181-189, 1989.
116. REUVERS, T.; PEROGORDO, E. - Método cromatográfico para la detección de anabolizantes en orina de animales destinados al consumo humano. Alimentaria, Madrid, 27-31, 1986.
117. RICHOU-BAC, L. - Niveaux plasmatiques et tissulaires en estradiol 17 beta, estrone et DES chez des jeunes bovins traités aux anabolisants. Aspects zootechniques et qualitatifs. Rec. Méd. Vét., Paris, 154(5):441-450, 1978.
118. RICHOU-BAC, L. - Le problème des anabolisants en France et dans les pays du Marché Commun. Contrôle de leur emploi, aspects toxicologiques et qualitatifs. Bull. Acad. Vet., 56:57-72, 1983.

119. RICO, A.G. - Metabolism of endogenous and exogenous anabolic agents in cattle. J. Anim. Sci., Champaign, 57(1):226-32, 1983.
120. ROYBAL, J.E.; MUNNS, R.K.; MORRIS, W.J. HURLBUT, J.A. SHIMODA, W. - Determination of Zeranol/Zearalenone & their metabolites in edible Animal tissue by liquid chromatography with Electrochemical Detection and Confirmation by Gas Chromatography/Mass Spectrometry. J. Assoc. Off. Anal. Chem., Washington, 71(2):263-271, 1988.
121. RUIG, W.G.; VAN DER STRUIJS, T.D.B.; HOOFERINK, H.; WESEMAN, J. M.; BINNENDIJK, G.M. - The determination of DES and other anabolics in urine and faeces by LC-EC and by HPTLC. Poster presented at Analytica 82. Munich 1982-04-027/30 abstracts.
122. RUMSEY, T.S.; TYRREL, H.F.; MOE, P.W. - Effect of diethylstilbestrol and synovex-s on fasting metabolism measurements of beef steers. J. Anim. Sci., 50:160-166, 1980.
123. RUTHERFORD, B.S. - Gas chromatographic determination of cis and trans - diethylstilbestrol in Feed Premix. J. Assoc. Off. Anal. Chem., Washington, 53(6):1242-1243, 1970.
124. RYAN, J.J.; PILON, J.C. - Chemical confirmation of Diethylstilbestrol residues in beef livers. J. Assoc. Off. Anal. Chem., Washington, 59(4):817-820, 1976.
125. RYAN, J.J. - Chromatographic analysis of hormones residues in food. J. Chromatogr., Amsterdam, 127: 53-89, 1976.

126. SCHANZER, W. - Sample preparation and determination of anabolic steroids. Fresenius Z. Anal. Chem., Wiesbaden, 330:339, 1988.
127. SCHEUTWINKEL, M.; HUDE, W. v.d.; BASLER, A. - Studies on the genotoxicity of the anabolic drugs trenbolone & zeranol. Arch. Toxicol., Berlin, 59:4-6, 1986.
128. SCHILT, R.; WESEMAN, J.M.; HOOIJERINK, H.; KORBEE, H.J.; TRAAG, W.A.; VAN STEENBERGEN, M.J.; HAASNOOT, W. - Screening and confirmation of thyresostatics in urine by gas chromatography with nitrogen-phosphorus detection and gas chromatography mass spectrometry after sample clean-up with a mercurated affinity column. J. Chromatogr., Amsterdam, 489:127-137, 1989.
129. SCHMIDT, N.A.; BORBURGH, H.J.; PENDERS, T.J.; WEYKAMP, C.W. - Steroid profiling - an update. Clin. Chem., Winston-Salem, 31(4):637-639, 1985.
130. SCHULLER, P.L. - The detection of stilboestrol (DES) in urine by thin-layer chromatography - J. Chromatogr., Amsterdam, 31:237-240, 1967.
131. SETCHELL, K.D.R.; SHACKLETON, C.H.L. - The group separation of plasma & urinary steroids by column chromatography on SEPHADEX LH-20. Clin. Chim. Acta., Amsterdam, 47:381-8, 1973.
132. SETTEPANI, J.A. - Anabolic hormones in animal production and human nutrition in the United States. In: International Symposium on Anabolic hormones in animal production and human nutrition. Rome, 1984. Abstracts, 1984, p.24

133. SHACKLETON, C.H.L. - Profiling Steroid Humans and urinary steroids. J. Chromatogr. Amsterdam, 379:91-156, 1986.
134. SHACKLETON, C.H.L.; WHITNEY, J.O. - Use of SEP-PAK cartridges for urinary steroid extraction evaluation of the method for use prior to gas chromatographic analysis. Clin. Chim. Acta, Amsterdam, 107:231-43, 1980.
135. SJØVALL, J.; AXELSON, M. - General and selective isolation procedures for GC/MS analysys of steroids in tissues and body fluids. J. Steroid Biochem., Oxford, 11:129-134, 1979.
136. SMETS, F.; VERSCHAEREN, A - Chromatographic purification and separation of Anabolics in Biological Extracts on Hydroxyalkoxy propil - Sephadex (Lipidex). Z. Lebensm. Unters. Forsh., Munich, 169:32-35, 1979.
137. SMETS, F. - Purification of biological samples by the HPLC column switching technique for the detection of anabolic residues by HPTLC. Institute of Hygiene & Epidemiology. Brussels. Technical report
138. SMYTH, M.; FRISCHKORN, C.G.B. - Trace determination of some phenolic growth - promoting hormones in meat by high-performance liquid chromatography with voltammetric detection. Fresenius A. Anal. Chem. Wiesbaden, 310, 220-223, 1980.
139. SOKOLOVA, T.M.; ARZAMASTZEV, A.P.; TYGYNTAEV, G.J.; LEVCHENKO, N.K.; OSOKIN, D.M. - High performance liquid chromatograhly of steroidal drugs. J. Chromatogr., Amsterdam, 365:137-144, 1986.

140. STAN, H.; ABRAHAM, B. - All glass open-split interface for gas chromatography-mass spectrometry. Anal. Chem., Washington, 50(14):2161-4, 1978.
141. STAN, H.J.; ABRAHAM, B. - Determination of residues of anabolic drugs in meat by gas chromatography mass spectrometry. J. Chromatogr., Amsterdam, 195:231-241, 1980.
142. STEPHANY, R.W.; JANSEN, E.H.J.M. - Annotated bibliography of selected RIVM papers on the detection and metabolites of hormonal anabolic agents in slaughter animals. BENELUX Economische UNION. Hormones and Antihormones. Doc. nr.: SF/LABIL87(20)
143. TANG, P.W.; CRONE D.L. - A new method for hydrolyzing sulfate and glucuranyl conjugates of Steroids. Anal. Biochem., Baltimore, 182:289-294. 1989.
144. TEIXEIRA, O.M.C.C. - Análise de hormônio dietilestilbestrol (DES) por cromatografia gasosa. Cienc. Tecnol. Aliment., Campinas, 1988.
145. THOMAS, J.A., ed. Drugs, athletes, and physical performance. New York, Plenum, 1988 p.11-30.
146. TIPPINS, B. - Selective sample preparation of endogenous biological compounds using solid-phase extration. Int. Lab., Fairfield, (23):28-36, 1987
147. TIRPENOU, A.E.; KILIKIDIS, S.D. KAMARIANOS, A.P. - Modified method for eletron capture gas-liquid chromatographic determination of diethylstilbestrol residues in urine of fattened bulls. J. Assoc. Off. Anal. Chem., Washington, 66(5):1230-1233, 1983.

148. TOBIOKA, H. KAWASHIMA, R. - Gas liquid chromatographic determination of Hexestrol residues in adipose tissue. J. Assoc. Off. Anal. Chem., Washington, 64(3):709-13, 1981.
149. TUINSTRA, L.G.M.Th; TRAAG, W.A.; KEUKENS, H.J.; VAN MAZIJK, R.J. - Procedure for the gas chromatographics - mass spectrometric confirmation of some exogenous growth - promoting compounds in the urine of cattle. J. Chromatogr., Amsterdam, 279:533-542, 1983.
150. WHITE, W.A.; LUDWIG, N.H. - Isomerization of α , α' -diethylstilbestrol, isolation and characterization of the cis isomer. J. Agric. Food Chem. Washington, 19(2):388-390, 1971.
151. WILLEMART, J.P.; BOUFFAULT, J.C.; EGRON, L. - Excretions urinaires de divers steroides chez le veau de boucheries apres traitement anabolisant. Rec. Méd. Vét., Paris, 165(5):475-484, 1989.
152. UMBERGER, E.J.; BANES, D.; KUNZE, F.M; COLSON, H.S. - Chemical determination of Diethylstilbestrol residues in the tissues of treated chickens. J. Assoc. Off. Anal. Chem., Washington, 46(3):471-479, 1963.
153. VAN GINKEL, L.A.; STEPHANY, R.W.; VAN ROSSUM, H.J.; STEINBUCH, H.M.; ZOMER G.; VAN DE HEEFT, E.; DE JONG, P.J.M. - Multi-immunoaffinity chromatography: a simple and highly selective clean-up method for multi-anabolic residue analysis of meat. J. Chromatogr., Amsterdam, 489:111-120, 1989

154. VAN LOOK, L.; DESCHUTERE, Ph; VAN PETEGHEM, C. - Thin-layer chromatographic method for the detection of anbolics in fatty tissues. J. Chromatogr., Amsterdam, 1989. 489:213-218, 1989
155. VAN PETEGHEM, C.H.; LEFEVERE, M.F.; VAN HAVER, G.M.; DELEENHEER, A.P. - Quantification of Diethylstilbestrol residues in meat samples by gas chromatography - Isotope dilution mass spectrometry J.Agric.Food Chem., Washington, 35(2):228-31, 1987.
156. VAN PETEGHEM C. H.; VAN HAVER, G.M. - Chromatographic purification and radio-imunoassay of diethylstilbestrol residues in meat. Anal. Chim. Acta, Amsterdam, 182:293-298, 1986.
157. VERBEKE, R.; VANHEE, P. - Sensitive and specific post-column fluorimetric determination of Diethylstilboelrol residues in extracts of urine and animal tissues at the 1 ppb* level. J. Chromatogr. Amsterdam, 265:239-255, 1983.
158. VERBEKE, R. - Sensitive multi-residue method for detection of anabolics in urine and in tissues of slaughtered animals. J. Chromatogr., Amsterdam, 177: 69-84, 1979.
159. YINGHUA, Y.; LI, L. - Determination of Diethylstilbestrol and dienestrol in chicken by GC and selected ion monitoring. In: CONFERENCE OF MASS SPECTROMETRY. San Francisco, 1986. Abstracts.
160. ZOMER, G.; DERKS, H.J.G.M.; WYNBERG, H. - Synthesis of hexadeuterated diethylstilbestrol (1,1,1,6,6,6,-d6 e-3,4-di-(4-hydroxyphenyl)-hex-3-ene). J. Labelled Compd. Radiopharm. Chilchester, 20(11):1237-42, 1983.

ANEXO I

Critérios para a identificação de agentes anabolizantes por TLC ou HPTLC.

- os valores de Rf devem estar de acordo com o do padrão (faixa de variação de 3% se mantidas as mesmas condições).
- a aparência (cor, intensidade, entre outros) da mancha correspondente ao anabólico deve ser idêntica a do padrão.
- o centro da mancha mais próxima a do anabólico deve estar separada de pelo menos metade da soma do diâmetro da mancha correspondente ao anabólico.
- para identificação, deve-se co-cromatografar o padrão e a amostra. Assim, a mancha que se suspeita ser a correspondente ao agente em questão deve aumentar de intensidade. Não devem aparecer novas manchas e a aparência da mancha suspeita deve permanecer a mesma, porém mais intensa.
- para confirmação, é necessário que se faça uma cromatografia bidimensional.

ANEXO II

Critérios para a identificação do anabólico por GC/MS.

(1) Critérios associados à cromatografia a gás.

- o tempo de retenção da substância analisada deve ser o mesmo daquele do padrão, dentro de uma margem de mais ou menos 5 segundos.

- se for usado um padrão interno o tempo de retenção relativo (B/A) do composto estudado deve ser igual àquele do padrão, dentro de uma margem de mais ou menos $5/A$ na matriz apropriada, onde:

A = tempo de retenção absoluto do padrão interno, em segundos.

B = tempo de retenção absoluto da substância estudada, em segundos.

(2) Critérios associados ao detector de massa.

- todos os íons monitorizados devem derivar da substância pesquisada eluída num único tempo de retenção.

- devem ser determinadas as abundâncias de pelo menos 4 íons, por impacto de elétrons, ou pelo menos 2 íons e, preferivelmente mais, por ionização química, que sejam os mais significativos da estrutura do composto.

- as abundâncias relativas dos íons detectados, expressas como uma porcentagem da intensidade do íon de maior abundância (pico base) devem ser as mesmas das observadas no padrão, com uma margem de mais ou

menos 20% por ionização química (CI) e mais ou menos 10% por impacto de elétrons (EI).

- as condições do detector de massa devem ser, se possível, otimizadas para se obter o íon molecular da substância no espectro MID.
- critérios especiais devem ser observados para DES, hexestrol e dienestrol ao se usar EI: os derivados TMS de dienestrol, hexestrol e DES produzem apenas 3 fragmentos de íons característicos. Portanto, neste caso a presença destes estilbenos é apenas indicativa, podendo ser confirmada, para DES e dienestrol, analisando-se os derivados HFB. A presença de hexestrol é indicada através dos fragmentos dos íons m/z 331, 332, 303 e 304, obtidos por EI na análise de seu derivado HFB. Para confirmar a presença de hexestrol, deve-se analisar outra alíquota de amostra por ionização química em gás NH_3 , monitorizando-se apenas os íons positivos. A proporção de abundância dos íons fragmentados da amostra analisada do hexestrol deve ser igual a dos íons fragmentados do padrão de hexestrol, com uma margem de mais ou menos 10%..

RESUMO

O uso de hormônios como promotores de crescimento em animais de criação foi proibido em vários países, inclusive no Brasil, desde os anos setenta. Para o controle destes anabolizantes, foi desenvolvida uma enorme variedade de métodos, tanto com propósitos de triagem como de confirmação.

Os métodos mais usados são os físico-químicos, entre eles os cromatográficos, tais como cromatografia em camada delgada, cromatografia a gás acoplada a espectrômetro de massa, cromatografia líquida de alta eficiência com detector UV, e os ensaios imunológicos tais como radioimunoensaio ou enzimaensaio.

Este trabalho revisa os métodos analíticos mais usados internacionalmente no controle de substâncias anabolizantes em tecidos e urina de animais de criação para consumo humano. Atenção especial é dada ao anabolizante potencialmente cancerígeno, Dietilstilbestrol (DES) em relação ao seu uso no Brasil e às dificuldades envolvidas em sua determinação.

São propostos neste trabalho métodos para detecção do DES em sítios de aplicação, na urina, no tecido muscular e nas vísceras, bem como são apresentados os resultados da aplicação dessa metodologia em amostras de animais implantado e de controle e amostras autênticas.

SUMMARY

Since the seventies, the use of hormonal anabolics as growth promoters in livestock fattening has been banned in many countries, including Brazil. For control purposes a wide range of methods have been developed for both large-scale screening and confirmation. The most used methods are the physical-chemical ones, such as thin-layer chromatography (TLC), gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS), high performance liquid chromatography (HPLC) with UV detector and immunochemical assay (RIA) or enzyme immuno assay (ELISA). This thesis reviews the most used methods for the control of anabolics in tissue as well as in the urine of cattle raised for human consumption. Special attention is given to the potentially carcinogen Diethylstilbestrol, its possible use in Brazil and the difficulties involved in its determination.

Suitable methods for the detection of DES in samples from injection sites, urine, tissue and organs of implanted and control animals, are presented, as well as results obtained from authentic samples.