

---

# Desenvolvimento e validação de método para determinação simultânea de testosterona, metil e propionato de testosterona por cromatografia líquida de alta eficiência por CLAE-UV

---

**Blanca Elena Ortega MARKMAN, Olívia UESSUGUI, Elizabeth Meihuey WU, Roberta Fiusa MAGNELLI**  
*Núcleo Físico Químico de medicamentos, Centro de Medicamentos, Cosméticos e Saneantes, Instituto Adolfo Lutz*

---

A testosterona e seus ésteres metil e propionato são esteroides androgênicos e referem-se aos hormônios sexuais masculinos. A testosterona é um derivado do ciclopentano perhidrofenantreno, com 19 átomos de carbono, é convertida em 5-alfa-dihidrotestosterona pela enzima 5-alfa-redutase, potencializando a sua ação. A testosterona também pode ser transformada em vários tecidos periféricos para formar o estradiol. O papel do estradiol no homem ainda não está claro, mas um excesso absoluto ou relativo pode provocar feminização. Na mulher, a testosterona é produzida em quantidade muito menor e cumpre importantes funções em aspectos como humor, apetite sexual e sensação de bem-estar.<sup>1</sup> A testosterona e derivados também produzem efeitos anabólicos sistêmicos quando agem em diversos órgãos.

A metil testosterona e o propionato de testosterona são derivados sintéticos da testosterona e apresentam propriedades anabolizantes e antineoplásicas. São utilizados pela Medicina para suprir a deficiência de testosterona e no tratamento dos sintomas da andropausa nos homens. Nas

mulheres, como paliativo no tratamento de câncer de mama, nas dores pós-parto, nos tratamentos de alguns sintomas da menopausa<sup>1</sup>, entre outros. São indicados também para quadros de hipogonadismo, na deficiência do metabolismo proteico e amplamente utilizados no meio desportivo com o objetivo de melhorar o desempenho atlético<sup>2</sup>.

Atualmente, os frequentadores de academias e de clubes do país se defrontam com um dos maiores problemas que aflige a sociedade, que é o uso de anabolizantes, com a finalidade de aumento da massa muscular, principalmente<sup>2,3</sup>. O uso abusivo de anabolizantes esteroidais é feito em grande parte por jovens que praticam atividades física e fazem uso de suplementos alimentares contendo anabolizantes ou como medicamento de uso oral ou injetável<sup>3</sup>.

No Brasil, a maioria desses produtos comercializados é de procedência estrangeira, sendo alguns importados legalmente e outros por via clandestina, pois não possuem registro sanitário. Os rótulos desses produtos são traduzidos como sendo suplementos nutricionais. A Portaria nº 222, de 24 de março de 1998<sup>4</sup>, define os alimentos destinados para praticantes de atividade física com identidade

e características mínimas de qualidade e exclui substâncias estimulantes, hormônios e outras consideradas como *doping* pelo Comitê Olímpico Internacional (COI).

O objetivo deste estudo foi desenvolver e validar um método analítico por cromatografia líquida de alta eficiência para determinação simultânea de testosterona e dos sais metil e propionato de testosterona, para atender a demanda dos Serviços de Vigilância Sanitária e Órgãos de Defesa do Consumidor. A metodologia implantada irá analisar anabolizantes em formulações de uso veterinário, suplementos alimentares e/ ou vitamínicos.

Na validação do método, foram utilizadas as substâncias químicas de referência de testosterona, metil testosterona e propionato de testosterona, procedentes do laboratório Fluka Analytical. Os reagentes utilizados foram: metanol, acetonitrila (grau HPLC) e ácido acético p.a., da Merck. Filtros de celulose regenerada de 0,45 µm foram utilizados para filtrar as amostras e a fase móvel. Também foi utilizado uma matriz de suplemento alimentar isenta das substâncias anabolizantes.

Equipamentos utilizados: balança analítica Mettler Toledo modelo AL 204, cromatógrafo líquido de alta eficiência marca Shimadzu série LC-10A/VP, equipado com bomba LC-10AD-VP, detector ultravioleta UV-VIS SPD-10 AV-VP, forno CTO-10 AC-VP, injetor manual Rheodyne modelo 7725 I e alça de 20 µL. Os cromatogramas

foram processados pelo sistema de controle SCL-10 A-VP.

Para o desenvolvimento da metodologia, as condições utilizadas foram: coluna Lichrospher 60 RP-18 select B com partículas de 5 µm, de 250X4 mm da Agilent; detector UV; comprimento de onda em 254 nm, temperatura de 25 °C, fluxo de 1,0 mL/min, fase móvel acetonitrila, metanol e água ultrapurificada (1,5:1:1), como diluente da fase móvel, volume de injeção 20 µL.

As soluções padrão estoques foram preparadas e diluídas adequadamente. Para a preparação da solução da matriz, foi pesada quantidade suficiente de suplemento alimentar para que a concentração final fosse 1 mg.mL<sup>-1</sup>. Todas as soluções foram filtradas em filtro de 0,45 µm e 20 µL dessas soluções e injetadas no cromatógrafo. Antes de proceder os estudos de validação do método, fez-se a verificação da conformidade do sistema utilizando-se a matriz de suplemento alimentar adicionada dos padrões.

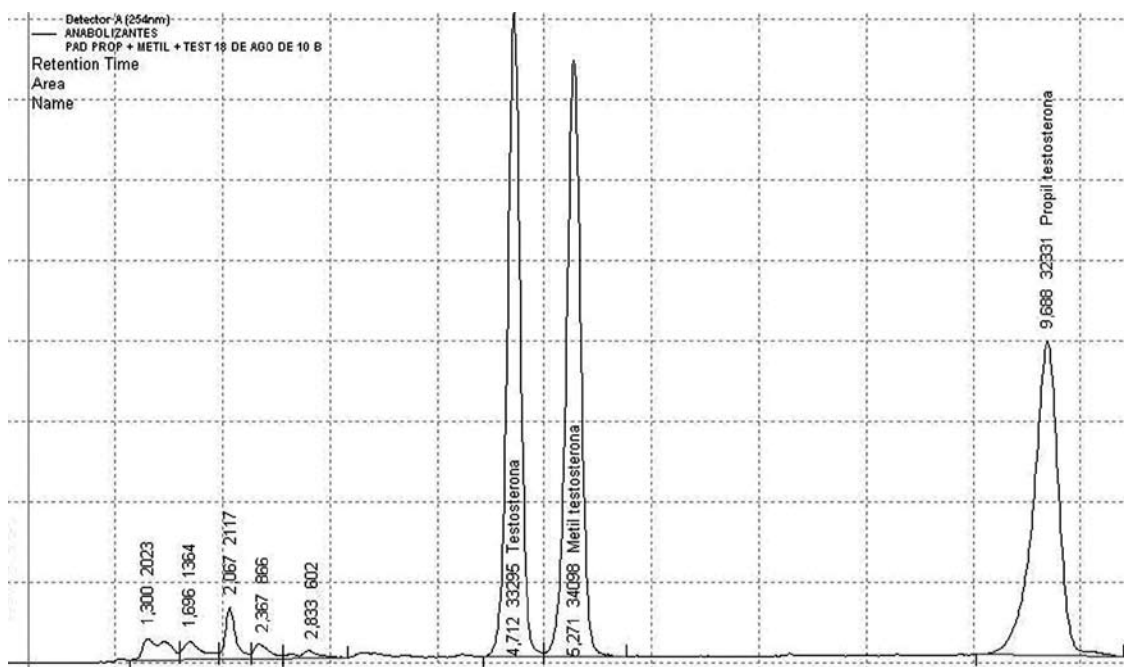
Os critérios de desempenho do método levaram em consideração o tempo de retenção dos padrões, a resolução, o alargamento dos picos, o número de pratos teóricos e a repetibilidade.

As características do método desenvolvido e a adequação do sistema estão apresentados na tabela 1 e na figura 1, respectivamente.

Conforme mostra a figura 1 o método desenvolvido e otimizado mostrou um bom

**Tabela 1.** Parâmetros de conformidade do sistema para testosterona, metil testosterona e propionato de testosterona, obtidos do sistema cromatográfico desenvolvido

Parâmetros	Valores Encontrados			Valores Recomendados
	Testosterona	Metil Testosterona	Propionato testosterona	
Fator de alargamento (TF)	0,98	1,01	0,82	TF ≤ 2
Pratos teóricos (N)	8571	34463	39041	em geral > 2000
Repetibilidade (RDS %)	0,23	0,27	0,28	<1% para n>5
Resolução (Rs)	8	2	13	Rs >2
Fator de retenção (K)	4	5	9	K>2
Fator de capacidade	3	3	4	-



**Figura 1.** Cromatograma da determinação simultânea dos padrões de testosterona, metil testosterona e propil testosterona, obtidas pelo cromatógrafo líquido SPD 10 AVP Shimadzu, coluna C-18 (Lichrospher 60 RP-18 select B, Agilent) de 250X4 mm (5 $\mu$ m), em 254 nm, fase móvel de acetonitrila:metanol:água ultrapurificada (1,5:1:1), a 25 °C; fluxo de 1,0 mL/min, volume de injeção de 20  $\mu$ L

desempenho quanto à separação simultânea de testosterona, metil testosterona e propionato de testosterona, apresentando picos simétricos e reprodutíveis. Os tempos de retenção foram de 4,71, 5,27 e 9,68 minutos para testosterona, metil testosterona e propil testosterona, respectivamente. O método proposto apresenta o sistema de adequação com fator de resolução, fator capacidade, assimetria e a repetitividade adequados quando comparados com os valores recomendados, conforme mostra a tabela 1.

Após verificar a conformidade do sistema, o método foi validado de forma independente para testosterona, metil testosterona e propionato de testosterona, de acordo com a RDC n° 899<sup>5</sup> e incluiu a determinação dos seguintes parâmetros:

### Limite de detecção e quantificação

Os ruídos das linhas de base foram determinados com o diluente e os limites de detecção (LD) e foram estabelecidos na razão de 3:1 de sinal/ruído. Os valores individuais determinados foram: 0,01; 0,01; 0,01  $\mu$ g/L<sup>-1</sup>

para testosterona, metil testosterona e propionato de testosterona, respectivamente.

Os limites de quantificação (LQ) foram determinados com valores superiores ao critério de 3 x LD com aceitação de um desvio padrão relativo de  $\leq 2\%$ . Os valores determinados foram: 0,04; 0,06; 0,15  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> para testosterona, metil testosterona e propionato de testosterona, respectivamente.

### Exatidão

A exatidão foi determinada pela medida de três níveis de concentrações em triplicatas independentes, adicionando-se cada padrão à matriz em concentrações entre: 0,022 – 0,028  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>, (nível I, 50 %); 0,044 – 0,055  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> (nível II, 100%) e 0,066 – 0,083  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> (nível III, 150). Os valores encontrados para a recuperação foram: 100%, 98% e 95% (testosterona); 101%, 100% e 102% (metil testosterona); 101%, 99% e 99% (propionato de testosterona) para os níveis I, II e III, respectivamente. Critérios para aceitação: 85 – 120%<sup>5</sup>.

## Precisão

A precisão foi determinada por análises de replicatas ( $n = 9$ ) dos padrões adicionados à matriz nas concentrações: 0,44; 0,46; 0,55  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  de testosterona, metil testosterona e propionato de testosterona, respectivamente. Os desvios padrões relativos (RSD%) obtidos foram de: 0,592%; 2,827%; 1,144%, respectivamente. Limite estabelecido: 3%<sup>5</sup>.

## Linearidade

As linearidades do método proposto foram estabelecidas numa faixa contemplando cinco concentrações diferentes em quadruplicata para cada anabolizante. Os intervalos de concentrações estabelecidos foram: 0,040 a 0,84  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  para testosterona; 0,06 a 0,86  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  para metil testosterona e 0,15 a 0,95  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  para propionato de testosterona. O coeficiente de regressão linear ( $r^2$ ) obtido foi de 0,9996; 0,9999; 0,9996 para testosterona, metil testosterona e propionato de testosterona, respectivamente. Segundo a RDC nº 899<sup>5</sup>, o  $r^2$  deve ser igual ou superior a 0,99 e os valores obtidos pelo método desenvolvido obedecem a esse critério.

O desenvolvimento de um método analítico envolve a otimização de vários estágios como a preparação da amostra, a separação cromatográfica e a quantificação. Parâmetros como a fase móvel, a coluna cromatográfica e o comprimento de onda de detecção devem ser pré-estabelecidos. A validação do método analítico é importante, porque garante o sucesso da utilização da metodologia desenvolvida, além de

detectar erros de procedimento analítico e oferecer evidências comprovadas da eficiência do método.

O método CLAE-UV desenvolvido e validado no presente trabalho é simples, seletivo, exato e preciso para a quantificação dos anabolizantes esteroidais estudados.

## REFERÊNCIAS

1. Martindale. The complete drug reference. 34.ed. London: The Royal Pharmaceutical Society of Great Britain; 2005.p.1527.
2. Silva PRP, Danielsk R, Czepielewski MA. Esteróides anabolizantes no esporte. Rev Bras Med Esporte, São Paulo. 2002; 8 (6): 235-43.
3. Tatiana Sousa Cunha; Nádia Sousa Cunha; Maria José Costa Sampaio Moura; Fernanda Klein Marcondes. Esteroides anabólicos androgênicos e sua relação com a prática desportiva. Rev Bras Cienc Farm. 2004;40 (2):165-79.
4. BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria nº 222, de 24 de março de 1998. Regulamento Técnico Para Fixação de Identidade e Qualidade para Alimentos para Praticantes de Atividade Física. Diário Oficial [da] União, Brasília- Seção 1, DF, p. 13-5.
5. BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada. Resolução – RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Determina a publicação do “Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos” anexo, fica revogada a Resolução RE nº 475, de 19 de março de 2002. Diário Oficial [da] União, Brasília – Seção 1, DF, p.56-9, 02 de junho de 2003.
6. United State Pharmacopeia 31. Ed. Rockville: United State Pharmacopeial Conventions. 2008;p.752-7.