

COMPARAÇÃO ENTRE A CROMATOGRAFIA GASOSA E O TESTE ELISA NA QUANTIFICAÇÃO DE CAFEÍNA NO PLASMA EQUÍNO

(COMPARISON BETWEEN GAS CHROMATOGRAPHY AND ELISA TEST TO QUANTIFY CAFFEINE IN THE HORSE PLASMA)

(COMPARACIÓN ENTRE CROMATOGRAFÍA GASEOSA Y PRUEBA DE ELISA PARA LA CUANTIFICACIÓN DE CAFEÍNA EN EL PLASMA EQUINO)

O. A. B. SOARES², A. B. CARREGARO³, M. I. MATAQUEIRO⁴, A. QUEIROZ-NETO¹

RESUMO

Sendo prático e barato, o teste ELISA vem sendo empregado na quantificação de fármacos em protocolos de testes antidoping. A cafeína é um estimulante do sistema nervoso central e ganha importância na indústria do cavalo, pois é proibida pelos órgãos reguladores dos esportes equestres. Este estudo objetivou comparar o teste ELISA à cromatografia gasosa na quantificação da cafeína plasmática em equinos. Amostras foram coletadas imediatamente antes e nos tempos 0,25h, 0,5h, 1h, 2h, 4h, 6h, 8h, 12h, 24h, 48h e 72h após a administração intravenosa de 2 mg/Kg de cafeína. Ambos métodos mostraram concentrações máximas no tempo 0,25h. O coeficiente de correlação de Pearson entre os métodos indicou baixa correlação ($r = 0,50$), sendo a equação da reta $Y=0,358 + 2,125X$. Após a classificação das amostras em grupos de acordo com a razão entre a concentração medida pelo teste ELISA e a concentração que causa 50% de inibição (I_{50}) da reação colorimétrica da curva padrão, alcançou-se a maior correlação ($r = 0,96$) no grupo com razão entre 0,68 e 1,43. Por meio desta análise, comprovou-se que o teste ELISA é capaz de quantificar cafeína em plasma equino quando este está diluído de forma a apresentar concentrações próximas do ponto médio da curva padrão (I_{50}) do teste ELISA.

PALAVRAS-CHAVE: ELISA. Cromatografia gasosa. Cafeína. Equinos.

SUMMARY

Being less expensive and more practical, ELISA test has been used to quantify several drugs in antidoping testing protocols. Caffeine is a central nervous system stimulant and it gains importance in the horse industry because it is considered a prohibited substance by many regulatory organs of equine sports. The aim of this study was to compare ELISA test and gas chromatography (GC) to quantify caffeine in the plasma of horses. Animals received 2 mg/Kg of caffeine IV. The samples were collected at the times 0h, 0.25h, 0.5h, 1h, 2h, 4h, 6h, 8h, 12h, 24h, 48h and 72h pos-caffeine. Both methods showed maximum concentration at 0.25h. Pearson's correlation coefficient between the two methods was $r = 0.50$, meaning poor correlation. The regression's equation was $Y=0.358 + 2.125X$. After classifying samples in groups according to the ratio between the concentration measured by the ELISA test and the concentration that causes inhibition

1 Professor Adjunto em Farmacologia Veterinária do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, FCAV – UNESP. Via de Acesso prof. Paulo Donato Castellane s/n. CEP 14884-900, Jaboticabal, SP. Brasil. Tel: (16) 3209-2654 ramal 222 e 224 (fax). E-mail: aqueiroz@fcav.unesp.br. Autor para correspondência.

2 Médico Veterinário – Clínica Médica do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, FCAV – Unesp, Jaboticabal, SP.

3 Professor Doutor do Departamento de Clínica de Pequenos Animais, Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, RS.

4 Bióloga, Técnica do Laboratório do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, FCAV, Unesp.

of 50% of the colorimetric reaction of the standard curve (I_{50}), a greater correlation was assessed in the group that had the ratio between 0.68 and 1.43 ($r = 0.96$). This analysis showed that ELISA test is capable of quantifying plasma caffeine in horses when the ratio between the plasma concentration and the I_{50} is close to 1.

KEY WORDS: ELISA. Gas chromatography. Caffeine. Horses.

RESUMEN

Siendo práctica y barata, la prueba de ELISA ha sido empleada en la cuantificación de fármacos en protocolos de pruebas antidoping. La cafeína es un estimulante del sistema nervioso central y gana importancia en la industria de caballos, pues su uso es prohibido por los órganos reguladores de deportes ecuestres. El objetivo de este estudio fue comparar el uso de la prueba de ELISA con el método de cromatografía gaseosa para la cuantificación de cafeína plasmática en equinos. Las muestras fueron colectadas antes y en los tiempos 0,25h, 0,5h, 1h, 2h, 4h, 6h, 8h, 12h, 24h, 48h y 72h después de la administración intravenosa de 2 mg/Kg de cafeína. Ambos métodos mostraron concentraciones máximas en el tiempo 0,25h. El coeficiente de correlación de Pearson entre los métodos indicó baja correlación ($r = 0,50$), siendo la ecuación de la recta obtenida: $Y = 0,358 + 2,125X$. Después de la clasificación de las muestras en grupos, de acuerdo con la razón entre la concentración medida por la prueba de ELISA y la concentración que causa 50% de inhibición (I_{50}) de la reacción colorimétrica de la curva padrón, se alcanzó la mayor correlación ($r = 0,96$) en el grupo con razón entre 0,68 e 1,43. Por medio de este análisis, fue comprobado que la prueba de ELISA es capaz de cuantificar cafeína en plasma equino cuando éste está diluido presentando concentraciones próximas al punto medio de la curva padrón (I_{50}) de la prueba ELISA.

PALABRAS-CLAVE: ELISA. Cromatografía gaseosa. Cafeína. Equinos.

INTRODUÇÃO

Devido à importância inerente ao doping tanto na medicina esportiva humana quanto na equina, a quantificação de determinadas substâncias presentes em amostras colhidas de atletas dá-se pela utilização de técnicas precisas como a cromatografia gasosa (CG) ou líquida (HARKINS et al., 1998, CARREGARO et al., 2001).

O ensaio imunoenzimático (ELISA) é utilizado rotineiramente como pré-seleção na determinação de fármacos em exames antidoping e, atualmente, surge como alternativa para análise quantitativa de algumas substâncias (EDGAR et al., 1996, CARREGARO et al., 2001). Por esse motivo, estudos vêm sendo feitos para verificar a acuidade do teste ELISA para análise quantitativa, comparando-o com outras metodologias consagradas (IL'YASOVA et al., 2004).

Abad et al. (1993) compararam os resultados obtidos com o teste ELISA e CG na quantificação de nicotina, obtendo um índice de correlação (r) de 0,88. Carregaro et al. (2001) também compararam as duas técnicas para a quantificação de cafeína em plasma humano, obtendo um $r = 0,82$. Além disso, verificaram que as amostras diluídas próximas ao ponto médio da curva-padrão de ELISA (I_{50} – concentração que determina 50% de inibição da absorbância máxima obtida na curva padrão) apresentaram maior correlação. Entretanto, os resultados quantificados pelo ELISA foram maiores que os obtidos com a CG, provavelmente em decorrência da alimentação não controlada dos indivíduos, fazendo com

que houvesse reação cruzada devido à presença de outras metilxantinas.

A cafeína é, sem dúvida, um dos fármacos estimulantes mais difundidos em todo o mundo. Por meio da ingestão de cafeína do café, chá, chocolate, bebidas à base de cola e recentemente dos energéticos e suplementos nutricionais, tanto as pessoas comuns procuram um meio de diminuir o cansaço e a fadiga, como, principalmente, os atletas utilizam-na de modo lícito ou ilícito, objetivando melhorar seus desempenhos (KAMBER et al., 2001).

Por sua capacidade estimulante central, a cafeína tornou-se um poderoso agente utilizado com o propósito de aumentar o aporte cardiopulmonar, tanto em seres humanos quanto em animais (KUROSAWA et al., 1999). A mobilização de ácidos graxos, gerando energia e poupando glicogênio muscular, também contribui para aumentar seu consumo no meio esportivo (GREENE et al., 1983, HARKINS et al., 1998).

Como já esteve na lista de substâncias proibidas pela *World Anti Doping Agency*, vários trabalhos foram realizados para avaliar a concentração de cafeína em suplementos vitamínicos e energéticos na tentativa de discernir o doping acidental do doloso (KAMBER et al., 2001). Na medicina veterinária esportiva, embora a cafeína seja considerada substância proibida pela Federation Equestre International (FEI, 2002), há estudos recentes mostrando seus efeitos na espécie equina (CARREGARO et al., 2004, SAVAGE et al., 2005).

O presente estudo objetivou a comparação das técnicas de cromatografia gasosa (CG) e ELISA na quantificação da cafeína em plasma equino, com o

intuito de investigar a validade do uso isolado do teste imunoenzimático como método de análise em exames antidoping.

MATERIAL E MÉTODOS

Todos os procedimentos foram submetidos ao Comitê de Ética em Pesquisa Animal, e por ele aprovados, estando em conformidade com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal.

Foram utilizadas sete éguas da raça Puro Sangue Inglês provenientes do plantel da FCAV – Unesp, *Campus* de Jaboticabal, mantidas a pasto e alimentadas, adicionalmente, com ração comercial, sal mineral e feno, todos desprovidos de qualquer substância do grupo das metilxantinas.

A dose de cafeína utilizada baseou-se no estudo de Queiroz-Neto et al (2001) que determinaram 2,0mg/kg, IV, a dose máxima inefetiva dessa substância em equinos.

As coletas de plasma foram realizadas imediatamente antes (tempo zero) à administração intravenosa de 2,0mg/Kg de cafeína (Sigma Chemical Co.) diluída em 10mL de solução fisiológica e a 0,25h, 0,50h, 1h, 2h, 4h, 6h, 8h, 12h, 24h, 48h e 72h pós-administração. As amostras foram colhidas por meio de venopunção jugular contra-lateral à administração do fármaco, com auxílio de tubos previamente heparinizados. Após isso, as amostras foram centrifugadas por 15 minutos a 626g, transferidas para tubos limpos e congeladas a -20°C , até o momento da análise.

O método de extração das amostras utilizado seguiu o preconizado por Greene et al. (1983). As amostras foram colocadas em tubos de ensaio com 3 mL de solução saturada de cloreto de sódio e 6 mL de diclorometano (Sigma Chemical Co.), agitadas por 4 minutos e centrifugadas por 1 hora, a 4°C , a 626g.

Após a centrifugação, a parte aquosa foi descartada por aspiração e a fase orgânica colocada em um outro tubo onde foi evaporada até *secura* sob fluxo de N_2 em banho-maria a 35°C . Posteriormente, as amostras foram ressuspensas com 50 μL de metanol e homogeneizadas com auxílio do agitador de tubos Phoenix agitadas por 15 segundos e injetadas no cromatógrafo (CP-8400, Varian Ind. Com. Ltda, São Paulo – SP, Brasil) equipado com um detector de nitrogênio-fósforo nas seguintes condições: coluna CP SIL 5CB 30 m x 0,25 mm x 0,25 μm , hidrogênio num volume de 4,7mL/min e ar sintético na razão de 167mL/min., fluxo constante de hélio, na razão de 21mL/min. Uma pequena fração (1 μL) foi injetada a uma temperatura de 230°C . A temperatura inicial do forno era de 70°C e a final 280°C ($20^{\circ}\text{C}/\text{min}$).

Para a quantificação da cafeína por cromatografia

gasosa, utilizaram soluções-padrão de cafeína diluídas em metanol (Merk, Darmstadt, Alemanha) para obtenção das curvas-padrão por meio de cinco concentrações previamente determinadas (0,2; 1; 5; 10 e 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

O teste ELISA foi baseado no método de EDGAR et al. (1996) e realizado com kits da Neogen Co., Lexington – KY, EUA específicos para cafeína. Em cada cavidade injetaram-se 20 μL da amostra ou das soluções-padrão, as quais foram obtidas da mesma forma que no CG, porém, diluídas em solução tampão, para as concentrações de 1, 5, 10, 50 e 100 $\eta\text{g}/\text{mL}$. Depois, adicionaram-se 180 μL do complexo droga-enzima, diluído 1:180. A solução formada foi levemente homogeneizada por 1 minuto e incubada por 45 minutos em temperatura ambiente. Após esse período, o líquido foi descartado e a placa completamente seca. Cada cavidade foi lavada em triplicata com 300 μL de tampão para lavagem. Posteriormente, adicionaram-se 150 μL de substrato e a placa foi agitada por 30 minutos, em temperatura ambiente. Os resultados foram obtidos com o uso de aparelho para leitura de placas de ELISA, com filtro de luz para comprimento de onda de 650nm.

A análise de variância (ANOVA) e teste de Tuckey ($p < 0,05$) para comparações múltiplas foram realizados por meio de programa computacional (SAS v. 8.02. SAS Institute Inc., Cary - NC, EUA), assim como a determinação da correlação entre os dois métodos.

RESULTADOS

As leituras realizadas no cromatógrafo tiveram a duração de 10 minutos, o tempo de retenção do pico da cafeína foi de aproximadamente 5,8 minutos. As curvas-padrão obtidas foram validadas quando pelo menos quatro diluições enquadravam-se nela. Para isso, determinou-se um coeficiente de correlação (r^2) igual ou superior a 0,995. Desse modo, obteve-se relação entre os pontos acima de 99,5%. Para cada dia de leitura das amostras foi realizada uma curva-padrão correspondente.

As curvas-padrão obtidas no teste ELISA foram validadas de modo similar ao anterior, quando pelo menos quatro diluições enquadravam-se nela. Para isso, determinou-se um coeficiente de correlação (r^2) igual ou superior a 0,95.

Após a quantificação das amostras de plasma, obteve-se um índice de correlação de Pearson (r) de 0,50, indicando baixa correlação. A equação da reta obtida foi $Y = 0,358 + 2,125X$. Na tentativa de se obter uma correlação superior, dividiu-se o total de amostras em blocos com o número de amostras equivalente, considerando a razão (RZ) entre a concentração da amostra obtida na leitura do teste ELISA e o I_{50} da curva padrão.

Os diferentes blocos com suas respectivas RZ, coeficientes de correlação (r), equação de regressão e totais de amostras (n) são mostrados na Tabela 1. O bloco que

merece destaque é o que possui a RZ entre 0,68 e 1,43 (bloco 2), cujo coeficiente de correlação foi $r = 0,96$ e cujo RZ ao redor de 1 indica uma diluição próxima à I_{50} da curva padrão. O diagrama de dispersão desse grupo é apresentado na Figura 1.

DISCUSSÃO

Mesmo considerando que a maioria dos estudos de quantificação da cafeína tenham sido realizados por cromatografia líquida (SALVADORI et al., 1994, GREENE et al., 1983), a cromatografia gasosa tem-se mostrado eficiente na detecção da cafeína presente em amostras biológicas (CARREGARO et al., 2004). O tempo de retenção dos picos e as curvas-padrão com coeficientes de correlação sempre acima de 0,995 garantiram a linearidade do método.

A quantificação da cafeína pelo teste ELISA mostrou-se linear na medida em que foram observadas curvas-padrão com coeficiente de correlação acima de 0,95.

Ao se verificar o índice de correlação entre as duas técnicas empregadas ($r = 0,50$), percebe-se uma correlação positiva e discreta. Abad et al. (1993) quantificaram 245 amostras de nicotina em fumaças condensadas de cigarro por meio das duas técnicas utilizadas neste estudo, obtendo boa correlação entre ambas ($r = 0,88$). Os autores frisaram a vantagem econômica do teste ELISA já que este foi cinco vezes mais econômico.

Em outra comparação das duas técnicas, Li et al. (1989) quantificaram resíduos de herbicida em água, solo e ar, obtendo um $r = 0,98$ para amostras provenientes de água e solo e um $r = 0,78$ para as vindas do ar. Entretanto, os valores mensurados através do teste ELISA foram superiores ao triplo dos registrados na CG, o que vem ao encontro do que foi encontrado no presente trabalho.

Esta disparidade de resultados pode ser atribuída a reações cruzadas possíveis de ocorrer devido a menor

especificidade do teste ELISA, como salientado por Li et al. (1989) e Carregaro et al. (2001). No presente estudo, essa reação cruzada poderia advir dos metabólitos da cafeína, os quais possuem moléculas muito semelhantes as da própria cafeína e que teoricamente poderiam ser detectadas pelo teste ELISA, como sugerido por Edgar et al. (1996).

Ao dividir as amostras em blocos de acordo com razão (RZ) entre a concentração obtida no teste ELISA e o I_{50} da curva padrão, verificou-se um aumento do coeficiente de correlação entre as técnicas chegando a um $r = 0,96$ para o bloco com RZ entre 0,68 e 1,43. Esses resultados aproximam-se, de certa forma, aos encontrados por Carregaro (2002), o qual obteve maior índice de correlação nos blocos com RZ entre 0,6 e 0,7 ($r = 0,83$) e entre 0,7 e 0,8 ($r = 0,85$), evidenciando que as amostras diluídas para gerar resultados próximos ao I_{50} são indicadas para analisar pelo método ELISA; por outro lado, este mesmo pesquisador encontrou melhores resultados com RZ abaixo de 1, o que não ocorreu no presente trabalho.

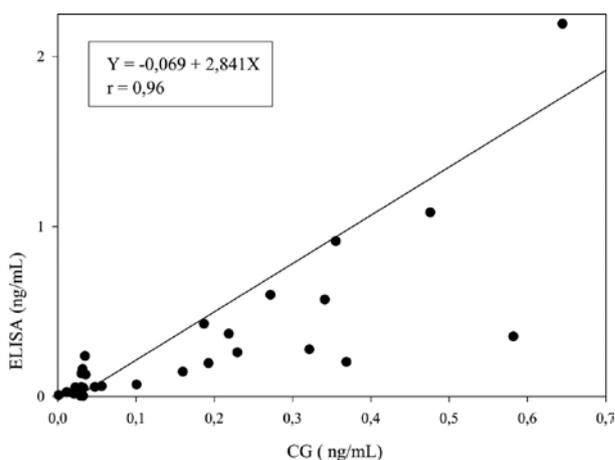


Figura 1 - Diagrama de dispersão do grupo com maior correlação entre os métodos.

Tabela 1 - Número de amostras (n), coeficiente de correlação (r) e equação da reta dos diferentes blocos divididos de acordo com a razão (RZ) entre a concentração obtida no teste ELISA e o ponto médio da curva padrão.

Bloco	Intervalo RZ	n	Coefficiente de correlação (r)	Equação de regressão
1	0,20 ___ 0,68	17	0,81	$Y = 0,049 + 0,572X$
2	0,68 ___ 1,43	16	0,96	$Y = -0,069 + 2,841X$
3	1,43 ___ 2,12	17	0,73	$Y = 0,224 + 2,920X$
4	2,12 ___ 2,40	17	0,09	$Y = 0,980 + 0,355X$
5	2,40 ___ 3,70	17	0,93	$Y = -0,049 + 5,928X$
6	3,70 ___ 5,70	19	0,89	$Y = 0,1645 + 6,619X$
Total	0,20 ___ 5,70	103	0,50	$Y = 0,358 + 2,125X$

CONCLUSÃO

O teste ELISA apresentando vantagens de caráter prático e financeiro, pode ser utilizado para a quantificação da cafeína em plasma equino já que apresentou bons índices de correlação com a cromatografia gasosa, técnica analítica consagrada, quando as amostras são diluídas de modo a se obter concentrações próximas ao I_{50} da curva padrão.

ARTIGO RECEBIDO: Setembro/2006
APROVADO: Junho/2007

REFERÊNCIAS

- ABAD, A. et al. Comparison of a monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay and gas chromatography for the determination of nicotine in cigarette smoke condensates. **Analytical Chemistry**, v.65, p.3227-3231, 1993.
- CARREGARO, A. B. et al. Comparison of the quantification of caffeine in human plasma by gas chromatography and ELISA. **Brazilian Journal of medical and Biological Research**, v.34, p.821-824, 2001.
- CARREGARO, A. B. Estudo farmacocinético da cafeína em equinos submetidos à acidificação urinária. Comparação entre cromatografia a gás e teste ELISA. Jaboticabal, 2002. 66f. Tese (Mestrado em Medicina Veterinária – área de concentração em patologia animal). Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2002. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.
- CARREGARO, A. B. et al. Study of caffeine in urine and saliva of horses subjected to urinary acidification. **Journal of Applied Toxicology**, v.24, n.6, p.513-8, 2004.
- EDGAR, T. et al. ELISA assay for caffeine. Proceedings of the 11th International Conference of Racing Analysts and Veterinarians, Brisbane, Australia, p.478-480, 1996.
- FEI - FEDERATION EQUESTRE INTERNATIONALE. **FEI Veterinary Regulations**, 9th Edition effective 01 January 2002, ANNEX IV, PROHIBITED SUBSTANCES. Disponível [http://www.horsesport.org/FEI/fei_04_04.html]. Acessado em: 26 jul .2005.
- GREENE, E. W. et al. Pharmacology, pharmacokinetics and behavioral effects of caffeine in horses. **American Journal of Veterinary Research**, v.44, p.57-63, 1983.
- HARKINS, J.D. et al. An Overview of Methylxanthines and Their Regulation in the Horse. **Equine Practice**, v.20, p.10-16, 1998.
- IL'YASOVA, D. et al. Epidemiological Marker for Oxidant Status: Comparison of the ELISA and the Gas Chromatography/Mass Spectrometry Assay for Urine 2,3-dinor-5,6-dihydro-15-F2t-isoprostane. **AEP**, v.14, n.10, p.793-797, 2004.
- KAMBER, M. et al. Nutritional supplements as a source for positive doping cases? **International Journal of Sport Nutrition and Exercise Metabolism**, v.11, n.2, p.258-63, 2001.
- KUROSAWA, M. et al. Effects of caffeine and promazine hydrochloride on plasma catecholamines in thoroughbreds at rest and during treadmill exercise. **Equine Veterinary Journal Suppl**, v.30, p.596-600, 1999.
- LI, Q. X., GEE, S. J. et al. Comparison of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay and gas chromatography procedure for determination of molinate residues. **Analytical Chemistry**, v.61, p.819-823, 1989.
- QUEIROZ-NETO, A. et al. Effects of caffeine on locomotor activity of horses. Determination of the No-Effect Threshold. **Journal Applied Toxicology**, v.21, p.229-234, 2001.
- SALVADORI, M. C. et al. Determination of xantines by high-performance liquid chromatography and thin-layer chromatography in horse urine after ingestion of guaraná powder. **Analyt**, v.119, p.2701-2703, 1994.
- SAVAGE, K. A. et al. Effects of caffeine on exercise performance of physically fit Thoroughbreds. **American Journal of Veterinary Research**, v.66, n.4, p.569-73,