

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Toxicologia e Análises Toxicológicas

Determinação de estimulantes, esteroides anabolizantes, diuréticos e laxante por HPLC-DAD
e LC-MS/MS em suplementos alimentares adulterados disponíveis no Brasil

Idylla Silva Tavares

Tese para obtenção do Título de DOUTOR
Orientador: Prof. Dr. Mauricio Yonamine

São Paulo
2019

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Toxicologia e Análises Toxicológicas

Determinação de estimulantes, esteroides anabolizantes, diuréticos e laxante por HPLC-DAD
e LC-MS/MS em suplementos alimentares adulterados disponíveis no Brasil

Idylla Silva Tavares

Versão Original

Tese para obtenção do Título de DOUTOR
Orientador: Prof. Dr. Mauricio Yonamine

São Paulo
2019

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

T231d Tavares, Idylla Silva
Determinação de estimulantes, esteroides anabolizantes, diuréticos e laxante por HPLC-DAD e LC-MS/MS em suplementos alimentares adulterados disponíveis no Brasil / Idylla Silva Tavares. - São Paulo, 2019.
192 p.

Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.
Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas.
Orientador: Yonamine, Mauricio

1. Suplemento Alimentar. 2. Adulterantes. 3. Cromatografia Líquida. I. T. II. Yonamine, Mauricio, orientador.

Idylla Silva Tavares

Determinação de estimulantes, esteroides anabolizantes, diuréticos e laxante por HPLC-DAD e LC-MS/MS em suplementos alimentares adulterados disponíveis no Brasil

Comissão Julgadora da Tese para obtenção do Título de DOUTOR

Prof Dr. Maurício Yonamine/Presidente

1º examinador

2º examinador

3º examinador

4º examinador

São Paulo, _____ de _____ de 2019.

Dedico esse trabalho aos meus pais,
Diva e José, por todo incentivo pois sem eles
nada disso seria possível.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus.

Aos meus pais, José e Diva, pelo apoio e incentivo que me deram durante todos esses anos.

Ao meu orientador Prof. Dr. Mauricio Yonamine, por toda dedicação e orientação na execução desse trabalho e principalmente pela confiança em mim depositada durante todos esses anos de convívio.

À minha amiga Iolana Camprestini, que sempre me ajudou nos momentos que eu mais precisei, tanto analítica quanto psicologicamente. Sem ela acho que não teria conseguido.

Às minhas companheiras de lar, Harue e Rafaela, pela convivência diária e por me fazer sentir um amor fraterno que nunca havia conhecido.

Às minhas companheiras de laboratório, também conhecidas como as Toxigirls, Ana, Maita, Sarinha, Flávia e Gabriela, pelos abraços, pelas conversas, pelo conhecimento trocado e pela amizade sincera.

Aos toxicologistas, Flávia Pine, Kátia, Alexandre, que dividiram comigo as angústias de ser aluno de pós-graduação, e ao Jefferson pela companhia maravilhosa e pelo apoio espiritual.

Ao meu amigo e conterrâneo Anax, que no laboratório ao lado fazia eu sentir o carinho e o aconchego potiguar.

A Marcelo Filonzi pelo apoio e pela ajuda e ao Hospital Israelita Albert Einstein pela assistência prestada para realização desse trabalho.

Ao Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – SUP pela oportunidade de realizar o doutorado.

Aos funcionários da USP, em especial a Samantha e a Bia, por me ajudarem durante todo esse tempo.

Aos inúmeros amigos e familiares que compartilharam comigo alegrias e tristezas e que nunca deixaram a amizade de lado mesmo com a distância entre nós.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Meus sinceros agradecimentos.

*“Dê a quem ama: asas para voar,
raízes para voltar e motivos para ficar”*

Dalai Lama

RESUMO

TAVARES, I. S. Determinação de estimulantes, esteroides anabolizantes, diuréticos e laxante por HPLC-DAD e LC-MS/MS em suplementos alimentares adulterados disponíveis no Brasil. 2019. 192f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

A adulteração de suplementos alimentares pela adição de substâncias farmacologicamente ativas é um problema que vem se agravando nos últimos anos. Essas substâncias são adicionadas intencionalmente nos produtos, com objetivo de melhorar a sua eficácia, sem que essa adição seja devidamente informada nos rótulos. O consumo de suplementos adicionados de substâncias farmacologicamente ativas não declaradas nos rótulos é, além de um problema de saúde pública, um risco à carreira de atletas profissionais, quando se trata de doping no esporte. Neste trabalho foram desenvolvidos métodos analíticos baseados em cromatografia líquida para detecção de 19 substâncias farmacologicamente ativas em amostras de suplementos alimentares, nos níveis de contaminação cruzada e adulteração. Para tal, empregou-se a cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de arranjo de diodos (HPLC-DAD) e a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas sequencial (LC-MS/MS). As substâncias investigadas apresentam ação androgênica e anabólica (*i.e.* testosterona, metiltestosterona, propionato de testosterona, decanoato de testosterona, trembolona, estanozolol, dehidroepiandrosterona, androstenediona, decanoato de nandrolona, oxandrolona e metasterona), estimulante (*i.e.* cafeína), anorexígena (*i.e.* sibutramina), diurética (*i.e.* amilorida, bumetanida, furosemida, hidroclorotiazida e clortalidona) e laxante (*i.e.* fenolftaleína). Entre os métodos de preparo de amostra avaliados (*Quechers* e extração sólido-líquido seguida de uma etapa de precipitação de proteína), a extração sólido-líquido empregando metanol como solvente extrator e ZnSO₄ como agente precipitante apresentou recuperação acima de 80% para todas as substâncias avaliadas, sendo selecionado para o fim deste estudo. Os métodos analíticos propostos apresentaram limites de detecção e de quantificação na faixa de contaminação, foram seletivos e lineares com r^2 superior a 0,99 na faixa de concentração de interesse para todas as substâncias e valores de recuperação, precisão e exatidão dentro dos valores aceitáveis. Um conjunto amostral representativo dos suplementos alimentares comercializados no Brasil, constituído por 230 amostras, foi analisado sendo que mais de 25% do conjunto amostra foram positivos para cafeína (48), sibutramina (14), fenolftaleína (2) e furosemida (3), isoladas ou associadas entre si. Os métodos desenvolvidos utilizaram um preparo de amostra simples e apresentaram resultados satisfatórios para a investigação de possível adulteração ou contaminação com 19 das substâncias de interesse. Dos 58 suplementos alimentares adulterados, apenas 11 podem ser considerados adulterados por contaminação cruzada. Os demais, são consideradas adições dolosas por parte dos fabricantes com objetivo de melhorar a eficiência dos seus produtos. Os resultados aqui apresentados indicam a necessidade de ações mais efetivas por parte das autoridades sanitárias no sentido de fiscalizar com mais eficiência a produção e a comercialização desses produtos e alertar a população para que fiquem atentos à possível adulteração de suplementos alimentares e aos riscos associados ao consumo desses produtos.

Palavras chaves: suplementos alimentares, adulteração, cromatografia líquida.

ABSTRACT

TAVARES, I. S. Determination of stimulants, anabolic steroids, diuretics and laxative by HPLC-DAD and LC-MS/MS in adulterated dietary supplements available in Brazil. 2019. 192f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

The adulteration of dietary supplements by the addition of pharmacologically active substances is a serious issue, which is aggravating steadily. These substances are added intentionally in various products, with the aim of improving their effectiveness, but without proper labeling stating so. In addition to a public health problem, the consumption of supplements added with undeclared pharmacologically active substances also represents a career risk for professional athletes when it comes to doping in sport. In the present work, analytical methods based on liquid chromatography were developed for the detection of 19 pharmacologically active substances in dietary supplement samples at the levels of cross-contamination and adulteration. For this purpose, high performance liquid chromatography/diode array detector (HPLC-DAD) and liquid chromatography/tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) were used. The investigated substances comprise of androgenic and anabolic effects (*ie* testosterone, testosterone propionate, testosterone decanoate, trenbolone, stanozolol, dehydroepiandrosterone, androstenedione, nandrolone decanoate, oxandrolone and metasterone), stimulant (*ie* caffeine), anorexigenic (*ie* sibutramine), diuretic (*ie* amiloride, bumetanide, furosemide, hydrochlorothiazide and chlorthalidone) and laxative (*ie* phenolphthalein). Among the sample preparation methods evaluated (Quechers and solid-liquid extraction followed by a protein precipitation step), solid-liquid extraction using methanol as extraction solvent and ZnSO₄ as the precipitating agent has been chosen as it has shown recovery values above 80% for all evaluated substances. The proposed analytical methods had limits of detection and quantification within the contamination range, they were also selective and linear showing r^2 values higher than 0.99 in the concentration range of interest for all substances and accuracy within acceptable values. A representative sampling of dietary supplements marketed in Brazil, consisting of 230 samples, was analyzed and more than 25% have shown to be positive for caffeine (48), sibutramine (14), phenolphthalein (2) and furosemide (3), isolated or associated with each other. The methods developed used a simple sample preparation and presented satisfactory results for the investigation of possible adulteration or cross-contamination for the 19 of the substances of interest. From a total of 58 adulterated dietary supplements, only 11 could be considered adulterated by cross-contamination. The remaining are considered to be intentional additions by manufacturers in order to improve the efficiency of their products. The results presented in this study indicate the need for more effective measures by the health authorities towards the production and marketing of these products so that the general public is aware of their potential adulteration and the risks associated with their consumption.

Key words: dietary supplements, adulteration, liquid chromatography.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1:Quantitativo de publicações relacionadas à adulteração de suplementos alimentares no período entre 2008 e 2018; busca realizada nos bancos de dados <i>Science Direct</i> e <i>Pubmed</i> , utilizando as palavras-chaves <i>dietary supplements</i> e <i>adulteration</i> em mês e ano.....	40
Figura 2: Biossíntese da testosterona.....	62
Figura 3: Estruturas dos androgênicos 17 α alquilados.....	63
Figura 4: Estruturas dos ésteres de testosterona.....	64
Figura 5: Estrutura química da cafeína.....	66
Figura 6: Estrutura química da sibutramina.....	68
Figura 7: Estrutura química da fenolftaleína.....	69
Figura 8: Estrutura química dos diuréticos.....	70
Figura 9: Prevalência dos tipos dos suplementos alimentares selecionados para estudo.....	94
Figura 10: Origem dos suplementos alimentares utilizados nesse estudo.....	95
Figura 11: Espectros de absorbância dos esteroides anabolizantes obtidos no intervalo de 200 a 400 nm. 1- Testosterona, metiltestosterona, propionato de testosterona, decanoato de testosterona, decanoato de nandrolona e androstenediona; 2- DHEA; 3- Estanozolol e 4- Trembolona.....	98
Figura 12: Espectros de absorbância das substâncias obtidos no intervalo de 200 a 400 nm 1- Amilorida; 2- Clortalidona; 3- Furosemida; 4- Hidroclorotiazida; 5- Bumetanida ; 6- Sibutramina ; 7- Cafeína ; 8- Fenolftaleína 9- Difenilamina (PI).....	99
Figura 13. Separação cromatográfica para 1-Amilorida (RT 2.9 min); 2- Cafeína (RT 6.2 min); 3- Hidroclorotiazida (RT 7.5 min); 4- Clortalidona (RT 8.7 min); 5- Estanozolol (RT 9.2 min); 6- Sibutramina (RT 9.5 min); 7- Furosemida (RT 11.3); 8- Fenolftaleína (RT 11.9 min); 9- Trembolona (RT 12.6 min); 10- Testoterona Base (RT 14.9 min); 11 – Bumetanida (RT 16.4); 12- Metiltestosterona (RT 16.9); 14 – Androstenediona (RT 18.0 min); 15 – Difenilamina / DFA (PI) (RT 23.8 min); 16 – Propionato de testosterona (RT 26.2 min); 17- Decanoato de Testosterona (RT 37.8 min); 18 – Decanoato de Nandrolona (RT 39.8 min). Fase móvel A: ácido fosfórico 0,09% e fase móvel B: acetonitrila, a vazão constante de 1mL/min, e 25°C. Volume de injeção 10 μ L e detecção em 230 nm. Todos as substâncias estão na faixa de concentração de contaminação e a Difenilamina (PI).....	100
Figura 14: Comparação dos cromatogramas com comprimento de onda 198nm e 236nm. 12- Metiltestosterona; 13 – DHEA; 14- Androstenediona. Substâncias na concentração de efeito (tabela 1).....	101
Figura 15: Cromatogramas à esquerda foram obtidos com a separação das 17 substâncias (exceção do DHEA) e do PI adicionadas às 3 diferentes matrizes: proteína, carboidrato e aminoácido. Cromatogramas à direita representam as três matrizes extraídas sem adição dos analitos.....	105
Figura 16: Curva de linearidade para 10 analitos por HPLC-DAD.....	111
Figura 17: Análise do efeito matriz por HPLC-DAD.....	114
Figura 18: Cromatograma do padrão de cafeína por LC-MS/MS.....	118

Figura 19: Cromatograma do padrão de sibutramina por LC-MS/MS.....	118
Figura 20: Amostra positiva para associação da cafeína e sibutramina	119
Figura 21: Porcentagem dos suplementos alimentares adulterados e a porcentagem dos adulterantes detectados.....	120
Figura 22: Análise por HPLC-DAD. Cromatograma do Padrão da Cafeína 50 µg.mL(A); Cromatograma da amostra positiva para Cafeína Proteína_90 (B); Cromatograma da sobreposição dos picos da Cafeína do padrão e da amostra positiva (C).....	123
Figura 23: Cromatograma da amostra de Cafeína (A) Cromatograma do Padrão da Cafeína 50µg.mL ⁻¹ (B); Cromatograma da sobreposição dos picos da Cafeína do padrão e da amostra de cafeína (C).....	126
Figura 24: Cromatograma do Padrão de Fenolftaleína 50 µg.mL ⁻¹ (A); Cromatograma da amostra positiva Termo_14 para Fenolftaleína (B); Cromatograma da sobreposição dos picos da fenolftaleína do padrão e da amostra positiva (C).	127
Figura 25: Cromatograma da amostra positiva para Sibutramina Termo_16 (B); Padrão de Sibutramina 100 µg.mL ⁻¹ (B).....	130
Figura 26: Cromatograma da amostra do suplemento alimentar (Aminoácido_04) adulterada com cafeína e sibutramina (A); Zoom na região do tempo de retenção da sibutramina (B).	131
Figura 27: Cromatograma do Padrão de Sibutramina e Fenolftaleína (A); Cromatograma da amostra positiva Termo_15 para Sibutramina e Fenolftaleína (B); Cromatograma da sobreposição dos picos de sibutramina e fenolftaleína do padrão e da amostra positiva (C).	132
Figura 28: Rótulo do suplemento alimentar "Outros_25".	133
Figura 29: Cromatograma da amostra Outros_24 (A); cromatograma com os padrões de sibutramina e furosemida 10µg.g ⁻¹ (B); sobreposição dos cromatogramas A e B (C).134	
Figura 30: Tipos de suplementos e seus adulterantes.....	135
Figura 31: Detecção de diazepam através da triagem por GC-MS.	137
Figura 32:Cromatogramas obtidos separadamente dos 11 EEA e PI por LC-MS/MS	141
Figura 33: Análise do efeito matriz para estanozolol antes e após infusão da amostra de carboidrato (CAR7).....	143
Figura 34: Curvas de Calibração para os onze EAA	146
Figura 35: Cromatograma dos EAA no LC-MS/MS.....	150

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Pesquisas relacionadas no Brasil ao percentual de frequentadores de academias que fazem uso de suplemento alimentar.	51
Quadro 2: Perfil dos usuários de suplementos alimentares em diversos países	54
Quadro 3 - Normas e ementas para categoria de suplementos alimentares publicados pela ANVISA.....	56
Quadro 4 - Substâncias farmacologicamente ativas encontradas como adulterantes em suplementos alimentares, suas DDR e as quantidades encontradas (mg/dose).....	61
Quadro 5: Métodos de preparo de amostra e técnicas analíticas empregadas na determinação de adulterantes em suplementos alimentares	75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Substância adulterante, sua classe/efeito, dose de efeito, concentração considerada contaminação e concentração a ser considerada adulteração de efeito.....	81
Tabela 2: Concentrações das substâncias utilizadas nos testes	84
Tabela 3. Comprimento de onda dos 17 analitos e Padrão Interno	97
Tabela 4: Resultado dos testes de recuperação (%) para as 3 extrações avaliadas.	103
Tabela 5: Valores de Limites de detecção obtidos para as 17 substâncias de interesse	107
Tabela 6. Resultado da recuperação e CV (%).....	108
Tabela 7. Valores de LOQ para os 10 analitos quantificados por HPLC-DAD.....	109
Tabela 8. Faixa de linearidade, os coeficientes de determinação (r^2) e fator F para os analitos elencados no estudo.....	110
Tabela 9: Efeito matriz para três matrizes analisadas.....	113
Tabela 10. Precisão intra e interdia para o suplemento de proteína do leite	115
Tabela 11. Exatidão para suplemento de proteína do leite	116
Tabela 12. Integridade de diluição da cafeína	117
Tabela 13. Tempo de retenção, íon precursor e íons qualificadores Q1 e Q2.....	117
Tabela 14 Amostras positivas para cafeína e quantidades detectadas por HPLC-DAD	121
Tabela 15. Suplementos alimentares à base de cafeína, valor descrito no rótulo e valor detectado.....	125
Tabela 16. Amostras positivas para sibutramina e valores encontrados por HPLC-DAD.....	128
Tabela 17. Tempo de retenção, íon precursor, íon quantificador (QT) e íons qualificadores Q1 e Q2 para os EEA.	140
Tabela 18. Limites de quantificação para 11 EAA.....	144
Tabela 19. Equação da reta, fator F e r^2 para os 11 EAA.....	145
Tabela 20. Resultado da precisão inter e intradia para os onze EAA por LC-MS/MS.	147
Tabela 21: Exatidão para o método proposto para EAA por LC-MS/MS.....	148
Tabela 22: Valor descrito no rótulo e valor calculado para cápsulas de DHEA e Oxandrolona	149

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ABENUTRI	Associação Brasileira das Empresas de Produtos Nutricionais
ACN	Acetonitrila
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APCI	Ionização Química à Pressão Atmosférica, do inglês: <i>Atmospheric pressure chemical ionization</i>
BCAA	Aminoácido de cadeia ramificada, do inglês: <i>branch chain amino acids</i>
CC	Concentração de Contaminação
CE	Concentração de Efeito
CV	Coefficiente de variação
DAD	Detector de arranjo de diodo, do inglês: <i>diode array detector</i>
DDR	Dose Diária Recomendada
DHEA	Deidroepiandrosterona
DSHEA	do inglês: <i>Dietary Supplement Health and Education Act</i>
EC	do inglês: <i>European Council</i>
EAA	Esteroides anabolizantes androgênicos
ESI	do inglês: <i>Eletrospray</i>
FDA	do inglês: <i>Food and Drug Administration</i>
GC-MS	Cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas, do inglês: <i>gas chromatography-mass spectrometry</i>
HCTZ	Hidroclorotiazida
HPLC - DAD	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de arranjo de diodos, do inglês: <i>high performance liquid chromatography/diode array detector</i>
HRMS	Espectrometria de massas de alta resolução, do inglês: <i>high-resolution mass spectrometry</i>
LAT-USP	Laboratório de Análises Toxicológicas da Universidade de São Paulo
LC-MS/MS	Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa sequencial, do inglês: <i>Liquid chromatography/tandem mass spectrometry</i>
LH	Hormônio Luteinizante
LLE	Extração líquido-líquido, do inglês: <i>liquid-liquid extraction</i>
LOD	Limite de detecção, do inglês: <i>limit of detection</i>

LOQ	Limite de quantificação, do inglês: <i>limit of quantification</i>
MeOH	Metanol
MRM	do inglês: <i>Multiple reaction monitoring</i>
MSTFA	n-metil-n-trimetilsililtrifluoroacetamida
NMR	Ressonância Nuclear Magnética, do inglês: <i>Nuclear Magnetic Resonance</i>
PI	Padrão Interno
PSA	Amina primário-secondária, do inglês: <i>Primary secondary amine</i>
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
SPE	Extração em fase sólida, do inglês: <i>solid phase extraction</i>
QUECHERS	do inglês: Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe
QQQ	do inglês: <i>Triple-quadrupole</i>
QTOF	do inglês: <i>Quadrupole- Time-of-flight</i>
TOF	Tempo de voo, do inglês: <i>Time-of-flight</i>
UPLC-MS	Cromatografia líquida de ultra performance acoplada à espectrometria de massas do inglês: <i>Ultra high performance liquid chromatography/mass spectrometry</i>
UV	Ultravioleta
r ²	Coefficiente de determinação
rpm	Rotações por minuto
WADA	Agência Mundial Antidoping, do inglês: <i>World Anti-Doping Agency</i>

SUMÁRIO

Capítulo I - INTRODUÇÃO.....	37
Capítulo II - CONCEITOS GERAIS E OBJETIVOS.....	43
II - 1. Suplementos alimentares.....	45
II - 1.1. Suplementos à base de carboidratos.....	45
II - 1.2. Suplementos proteicos.....	46
II - 1.3. Suplementos Termogênicos.....	47
II - 1.4. Suplementos Hipercalóricos.....	47
II - 1.5. Suplementos vitamínico e minerais.....	48
II - 2. Consumo de suplementos alimentares pela população mundial e brasileira.....	48
II - 3. Legislação relacionada aos suplementos alimentares.....	55
II - 4. Adulteração de suplementos alimentares.....	58
II - 5. Substâncias adicionadas ilicitamente em suplementos alimentares: Adulterantes	60
II - 5.1. Esteroides anabolizantes androgênicos.....	62
II - 5.2. Estimulantes.....	65
II - 5.3. Anorexígenos.....	67
II - 5.4. Laxante.....	69
II - 5.5. Diuréticos.....	69
II - 6. Determinação de adulterantes em suplementos alimentares.....	70
II - 6.1. Amostras.....	70
II - 6.2. Métodos de preparo de amostra.....	71
<i>II-6.2.1. Extração Sólido-líquido.....</i>	<i>71</i>
<i>II-6.2.2. Quechers.....</i>	<i>72</i>
II - 6.3. Técnicas Analíticas utilizadas na determinação de adulterantes em suplementos alimentares.....	72
II - 7. Objetivos.....	77
II - 7.1. Objetivo Geral.....	77
II - 7.2. Objetivos Específicos.....	77
Capítulo III - MATERIAIS E MÉTODOS.....	79
III - 1. Parte experimental.....	81

III - 1.1. Substâncias de interesse	81
III - 1.2. Reagentes e Padrões Analíticos.....	82
III - 2. Amostras.....	83
III - 2.1. Coleta das amostras	83
III - 2.2. Conjunto amostral	83
III - 3. Equipamentos:	83
III - 3.1. Determinação por HPLC-DAD.....	83
III - 3.2. Determinação por LC-MS/MS	83
III - 4. Métodos Analíticos	84
III - 4.1. Método de preparo de amostra	84
<i>III-4.1.1. Quechers (adaptado).....</i>	<i>85</i>
<i>III-4.1.2. Extração sólido-líquido seguida de precipitação de proteína.....</i>	<i>85</i>
III - 4.2. Métodos cromatográficos para determinação de adulterantes em suplementos alimentares.....	86
<i>III-4.2.1. Método cromatográfico baseado em HPLC-DAD.....</i>	<i>86</i>
<i>III-4.2.2. Método cromatográfico para confirmação de resultados positivos obtidos por HPLC-DAD, baseado em LC-MS/MS</i>	<i>86</i>
<i>III-4.2.3. Método Cromatográfico para determinação de EAA em suplementos alimentares baseado em LC-MS/MS.....</i>	<i>87</i>
III - 4.3. Avaliação dos Métodos Analíticos propostos para determinação de adulterantes em suplementos alimentares.....	87
<i>III-4.3.1. Seletividade</i>	<i>87</i>
<i>III-4.3.2. Recuperação.....</i>	<i>88</i>
<i>III-4.3.3. Efeito Matriz:</i>	<i>88</i>
<i>III-4.3.4. Precisão.....</i>	<i>89</i>
<i>III-4.3.5. Exatidão</i>	<i>89</i>
<i>III-4.3.6. Integridade de diluição</i>	<i>89</i>
<i>III-4.3.7. Uniformidade amostral</i>	<i>90</i>
<i>III-4.3.8. Limites de Detecção e Quantificação.....</i>	<i>90</i>
<i>III-4.3.9. Linearidade</i>	<i>90</i>
Capítulo IV - RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	91
IV - 1. Conjunto amostral	93

IV - 2. Método analítico baseado em HPLC-DAD e confirmação por LC-MS/MS.....	96
IV - 2.1. Desenvolvimento do método analítico por HPLC-DAD	96
IV-2.1.1. Espectro de UV e seleção do comprimento de onda para identificação das substâncias adulterantes.....	96
IV-2.1.2. Método de preparo de amostra para a determinação de adulterantes por HPLC-DAD.....	102
IV - 2.2. Avaliação do método analítico proposto para determinação de substâncias adulterantes em suplementos alimentares por HPLC-DAD	104
IV-2.2.1. Seletividade.....	104
IV-2.2.2. Limites de Detecção	106
IV-2.2.3. Recuperação	108
IV-2.2.4. Limites de Quantificação.....	108
IV-2.2.5. Linearidade.....	109
IV-2.2.6. Efeito Matriz.....	112
IV-2.2.7. Precisão.....	115
IV-2.2.8. Exatidão.....	116
IV-2.2.9. Integridade de diluição.....	116
IV-2.2.10. Uniformidade amostral	117
IV - 2.3. Método analítico por LC-MS/MS para a confirmação dos resultados obtidos pelo método baseado em HPLC-DAD	117
IV - 2.4. Análise de amostras de suplementos alimentares por HPLC-DAD e confirmação por LC-MS/MS	119
IV-2.4.1. Cafeína	121
IV-2.4.2. Fenolftaleína.....	126
IV-2.4.3. Sibutramina	127
IV-2.4.4. Sibutramina e Cafeína.....	130
IV-2.4.5. Sibutramina e Fenolftaleína	131
IV-2.4.6. Sibutramina e Furosemida	132
IV-2.4.7. Estudo de caso: investigação de Diazepam nas amostras positivas para anorexígenos.....	136
IV - 3. Método analítico para determinação de esteroides andrógenos anabolizantes em suplementos alimentares por LC-MS/MS	138
IV - 3.1. Método de preparo de amostra.....	138

IV - 3.2. Determinação de EAA por LC-MS/MS.....	139
IV - 3.3. Avaliação do método analítico baseado em LC-MS/MS para determinação de EAA em suplementos alimentares	142
IV-3.3.1. Efeito Matriz.....	142
IV-3.3.2. Limites de quantificação.....	143
IV-3.3.3. Linearidade.....	144
IV-3.3.4. Precisão.....	147
IV-3.3.5. Exatidão.....	148
IV - 3.4. Análise de suplementos alimentares quanto à presença de EAA por LC-MS/MS ..	150
Capítulo V - CONCLUSÃO.....	153
Capítulo VI - REFERÊNCIAS.....	157
Capítulo VII - ATIVIDADES CURRICULARES E EXTRACURRICULARES.....	184
VII - 1. Disciplinas cursadas	185
VII - 2. Participação em eventos.....	185
VII - 3. Trabalhos apresentados em congressos.....	186
VII - 4. Publicação em Livros	186
VII - 4.1. Palestras ministradas.....	186
VII - 4.2. Mesa Redonda	187
VII - 4.3. Mini-cursos ministrados:	187
VII - 4.4. Ficha do aluno.....	188
VII - 5. Curriculum Lattes.....	190

Capítulo I - INTRODUÇÃO

A adulteração de suplementos alimentares pela adição de substâncias não declaradas na composição química presente nos rótulos das embalagens vem se agravando nos últimos anos. No Brasil, os suplementos alimentares são classificados como alimentos, de maneira que a fiscalização da sua produção e comercialização não segue o rigor estabelecido sobre os medicamentos. Essa deficiência na fiscalização, que não afeta apenas o Brasil, mas também diversos países, possibilita, se não incentiva, a prática de adulteração e aumenta a probabilidade de contaminação desses produtos por substâncias farmacologicamente ativas (GILARD *et al.*, 2015; NEVES; CALDAS, 2015).

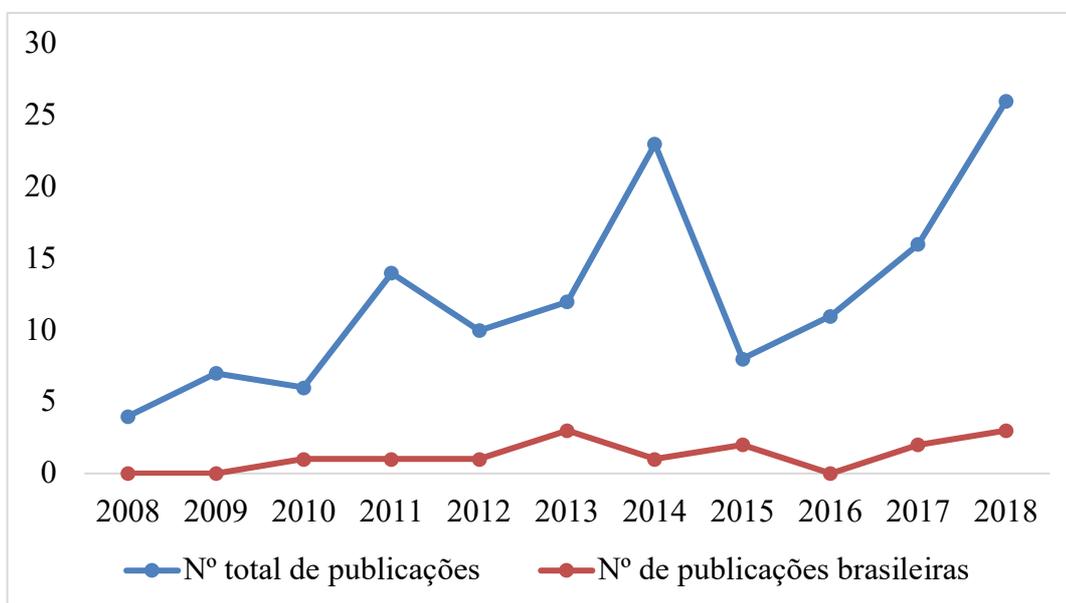
Substâncias farmacologicamente ativas apresentam efeitos terapêuticos sobre o organismo humano e, por isso, são adicionadas intencionalmente aos suplementos alimentares com objetivo de melhorar a eficácia dos produtos para diferentes fins. Nos últimos anos, substâncias com efeitos estimulantes, anorexígenos, diuréticos, anabolizantes, laxantes, ansiolíticos, hipoglicemiantes, dentre outros, foram encontradas como adulterantes em formulações de suplementos alimentares em diversos países, inclusive no Brasil (COOPMAN; CORDONNIER, 2012; NEVES; CALDAS, 2015).

Os suplementos alimentares adulterados com substâncias farmacologicamente ativas representam riscos à saúde dos consumidores, uma vez que o consumidor não tem a informação de que ao ingerir o produto, estará também ingerindo níveis desconhecidos de substâncias com efeito terapêutico. Esse consumo inesperado pode causar diversos efeitos adversos, tais como alérgicos, problemas cardiovasculares, hepáticos, renais, dentre outros, dependendo dos níveis de adulteração e da tolerância do consumidor a tais substâncias (GEYER *et al.*, 2009). Além de problema de saúde pública, essa adulteração representa risco aos atletas profissionais quando se trata de *doping* no esporte; segundo a Agência Mundial Antidoping, do inglês *World Anti-Doping Agency* (WADA), o atleta é responsável pelo que consome, podendo ser penalizado até mesmo pelo uso de um suplemento ilicitamente adulterado (WADA, 2016).

Os Estados Unidos (EUA) e a União Europeia possuem um efetivo sistema para detecção e divulgação à população das ocorrências de adulteração de suplementos alimentares comercializados em suas localidades. No Brasil, por outro lado, não existem programas de controle e fiscalização de produção, qualidade e venda dos suplementos alimentares, daí a evidente importância em se conhecer a prevalência dessa adulteração no Brasil. Vale ressaltar que o mercado de suplementação alimentar brasileiro é o terceiro maior no mundo, tendo movimentado aproximadamente R\$ 1,5 bilhões em 2018. (DCI, 2018; NEVES; CALDAS, 2015).

Em termos de pesquisas científicas realizadas em todo o mundo sobre a problemática da adulteração de suplementos alimentares (Figura 1), observa-se que o número de publicações em revistas indexadas vem aumentando nos últimos 10 anos, com destaque para o período entre 2015 e 2018, que passou de 8 para 26 publicações por ano. Esse aumento nas publicações demonstra a preocupação mundial cada vez maior com essa problemática. Nesse rol de publicações foram incluídas como adulterantes as substâncias estimulantes, diuréticas, laxantes, anabolizantes, além das antidiabéticas, antitireoidianas, anti-inflamatórias, anti-hipertensivas, ansiolíticas, inibidoras da fosfatidilesterase e analgésicas.

Figura 1:Quantitativo de publicações relacionadas à adulteração de suplementos alimentares no período entre 2008 e 2018; busca realizada nos bancos de dados *Science Direct e Pubmed*, utilizando as palavras-chaves *dietary supplements e adulteration* em mês e ano.



FONTE: Autoria Própria

No Brasil, 13 estudos envolvendo casos de adulteração de suplementos alimentares foram publicados, além de uma revisão bibliográfica, o que corresponde a 10% da produção mundial. Contudo, ao contrário do que se observa no nível mundial, observa-se que o número de publicações relacionadas ao tema no país vem se mantendo praticamente constante, oscilando entre 1 e 3 publicações anualmente (CARVALHO *et al.*, 2010; CARVALHO *et al.*, 2011; CARVALHO *et al.*, 2012; CAVALCANTI *et al.*, 2013; MOREIRA *et al.*, 2013; MOREIRA; MARTINI; CARVALHO, 2014; NEVES; MARCHETI; CALDAS, 2013; NEVES; CALDAS, 2015; NEVES; CALDAS, 2017a; NEVES; CALDAS, 2017b; PEREIRA *et al.*, 2018; SANTOS *et al.*, 2018a; VIANA *et al.*, 2015 e VIANA *et al.*, 2018). Nesse mesmo período, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) publicou apenas 2

alertas a população, chamando a atenção sobre a qualidade e as fraudes nesse tipo de produto. (ANVISA, 2011 e ANVISA, 2014).

Os dados apresentados acima mostram que a preocupação existe, e que devido à gravidade da ingestão não intencional de substâncias farmacologicamente ativas, pesquisas que abordem a ocorrência de adulteração, as substâncias utilizadas, e as consequências da ingestão de suplementos alimentares adulterados por seus consumidores, além de informativos de alerta à população brasileira, são cada vez mais necessários. Conhecer o atual cenário em termos de ocorrência e de novas substâncias utilizadas são de extrema importância para nortear a elaboração de legislações cada vez mais específicas e de programas de fiscalização, de monitoramento e de informação à população, principalmente no que diz respeito à qualidade de produção e dos componentes permitidos nesses produtos.

Este trabalho visa o estudo das cinco principais classes de substâncias farmacologicamente ativas reportadas na literatura como adulterantes de suplementos alimentares, tais quais, estimulantes, anorexígenos, laxantes, diuréticos e esteroides anabolizantes.

Para a apresentação deste trabalho, a tese foi dividida em seis capítulos: esta introdução geral do assunto foi definida como capítulo I. Na sequência, o capítulo II apresenta uma contextualização dos temas abordados, os conceitos gerais do tema e os objetivos do projeto. O capítulo III aborda os procedimentos utilizados na composição do conjunto amostral e nas etapas do desenvolvimento e validação dos métodos analíticos propostos para o objetivo deste trabalho. O capítulo IV mostra os resultados obtidos com relação aos métodos analíticos e ao estudo da ocorrência de 19 substâncias de diferentes classes terapêuticas no conjunto amostral de suplementos alimentares comercializados no Brasil. Por fim, no capítulo V encontra-se a conclusão do trabalho realizado.

Capítulo II - CONCEITOS GERAIS E OBJETIVOS

II - 1. SUPLEMENTOS ALIMENTARES

No Brasil, denomina-se ‘suplemento alimentar’, um conjunto de produtos para ingestão oral, apresentado em formas farmacêuticas e destinado a suplementar a alimentação de indivíduos saudáveis com nutrientes, substâncias bioativas, enzimas ou probióticos isolados ou combinados (ANVISA, 2018).

A Lei de saúde e educação de suplemento alimentar – do inglês *The Dietary Supplement Health and Education Act* (DSHEA) –, promulgada em 1995 nos EUA, definiu suplemento alimentar como: “um produto ingerido por via oral que contém um ou mais ingredientes nutricionais”. A lei americana definiu o termo ingrediente nutricional como vitaminas, minerais, ervas, aminoácidos ou outras substâncias nutricionais utilizadas pelo homem para complementar sua dieta (FDA, 1995; FINLEY; ELLWOOD; HOADLEY, 2014). Já a União Europeia define suplemento alimentar como “alimento que tem por finalidade suplementar uma dieta regular. São produtos concentrados em nutrientes com efeito nutricional e fisiológico, comercializados na forma de cápsulas, pastilhas, tabletes ou outras formas similares como sachês de pó, ampolas com líquidos” (EU, 2001).

Os suplementos alimentares são utilizados pela população em geral com diferentes propósitos, incluindo equilíbrio alimentar, compensação da falta de nutrientes, exercícios físicos ou estilo de vida pouco saudável, manutenção da saúde, prevenir doenças crônicas, melhorar a aparência, melhorar o bem-estar e condições mentais, melhoria do desempenho sexual, aprimoramento do desempenho esportivo, dentre outros.

Atualmente, são disponibilizados aos consumidores uma ampla gama de suplementos alimentares, os quais são classificados de acordo com a sua composição base. Os mais utilizados são os suplementos constituídos à base de carboidratos (que produzem energia de forma rápida), suplementos proteicos à base de aminoácidos (para aumento e produção da síntese proteica muscular), suplementos lipídicos (para possíveis aumentos da oxidação muscular esquelética), os hipercalóricos (para atletas praticantes de exercício de grande aporte calórico), os termogênicos (queimadores de gordura para redução do peso corporal) e os suplementos vitamínicos (eliminação de radicais livres) (SCHENEIDER *et al.*, 2008).

II - 1.1. Suplementos à base de carboidratos

Os suplementos à base de carboidratos são a principal fonte de energia durante a atividade física, principalmente nas atividades aeróbicas de longa duração e de alta intensidade. São muito utilizados por atletas, pois tendem a aumentar ou manter a

concentração de glicogênio muscular, melhorando assim a *performance* em eventos de longa duração, além de retardar a fadiga (SCHENEIDER *et al.*, 2008).

II - 1.2. Suplementos proteicos

Os suplementos proteicos são aqueles formulados com as proteínas provenientes principalmente do soro do leite, albumina, creatina e aminoácidos. São os suplementos alimentares de escolha para aqueles que almejam hipertrofia e aumento de massa muscular. É recomendado por especialistas e seu consumo deve estar de acordo com a ingestão proteica total diária. O consumo adicional acima das necessidades diárias (1,8g/kg/dia) não determina ganho de massa muscular adicional, nem promove aumento do desempenho, pelo contrário, podem levar à problemas renais e o excesso de proteína ser armazenado na forma de gordura (CORRÊA; NAVARRO, 2014).

Os suplementos proteicos provenientes da proteína do soro do leite ou *whey proteín*, são escolhidos pela maioria dos praticantes de atividade física, em especial as mulheres (CORRÊA; NAVARRO, 2014). As proteínas do soro do leite são extraídas durante o processo de fabricação do queijo. Possui alto valor nutricional, contendo alto teor de aminoácidos essenciais especialmente os de cadeia ramificada, alto teor de cálcio e de peptídeos bioativos do soro. Tem rápida absorção intestinal, o que proporciona elevada concentração de aminoácidos no plasma. Pesquisas recentes demonstram sua grande aplicabilidade no esporte, com possíveis efeitos sobre a síntese proteica muscular esquelética, redução da gordura corporal, assim como na modulação da adiposidade, e na melhora do desempenho físico. Análise de seus compostos bioativos evidenciam outros benefícios como efeito hipotensivo, antioxidante e hipocolesterolêmico (HARAGUCHI; ABREU; PAULA, 2006).

A albumina é a proteína mais abundante do corpo humano e é considerada uma proteína completa, devido seu alto valor biológico. A albumina contém os nove aminoácidos considerados essenciais ao organismo humano (leucina, lisina, isoleucina, metionina, fenilalanina, treonina, valina, triptofano e histidina) necessários para a reconstrução muscular após a prática de treinos intensos. O leite (lactoalbumina) e os ovos (ovoalbumina) são considerados fontes ricas de albumina (PERALTA; MARIA; AMANCIO, 2002).

A creatina, ou ácido metil-guanidinoacético, é um aminoácido que se tornou um dos recursos ergogênicos nutricionais mais utilizados nas últimas décadas. Seus produtos são utilizados com o objetivo de reduzir a fadiga e aumento de massa corporal magra. A creatina é sintetizada naturalmente no fígado, nos rins e no pâncreas a partir dos aminoácidos glicina,

arginina e metionina. Tais aminoácidos são absorvidos pelo organismo, especialmente na ingestão e carnes, peixes e aves (LINHARES; LIMA, 2006), mantendo-se como uma reserva de energia nas células musculares. Sua principal função é facilitar a regeneração da ATP (Adenosina de Trifosfato) por meio da ação enzimática; a quebra das moléculas de creatinina, promove grande liberação de energia, promovendo rápida regeneração da ATP após a prática de exercícios de alta intensidade. Isso reduz a fadiga e catalisa a formação de massa muscular. A suplementação é mais efetiva naqueles indivíduos com níveis iniciais baixos deste composto nos músculos, como vegetarianos e idosos (PERALTA; MARIA; AMANCIO, 2002).

Os aminoácidos de cadeia ramificada, conhecidos por BCAA (do inglês *Branched-Chain Amino Acids*), tais como a leucina, isoleucina e valina, são os únicos aminoácidos não degradados no fígado. Seu metabolismo ocorre principalmente no músculo esquelético, e sua oxidação é promovida pelo exercício físico. No músculo, os BCAAs são responsáveis pela síntese de proteínas e pela produção de energia (ETZEL, 2003; SHIMOMURA *et al.*, 2004).

Outro aminoácido amplamente utilizado como suplemento proteico é a glutamina. A suplementação alimentar com produtos à base desse aminoácido antes, durante e após o exercício físico de alta intensidade tem se mostrado eficaz para reverter as concentrações plasmáticas teciduais durante o treino intenso (PIMENTA *et al.*, 2008). A glutamina é o aminoácido livre mais abundante no músculo e no plasma, podendo também ser encontrada em vários outros tecidos humanos. Embora não seja um aminoácido essencial, é um importante substrato celular, sendo fonte de energia, de nitrogênio e de carbono para síntese de outras moléculas, além de melhorar a *performance* e o crescimento da massa muscular magra (LINHARES; LIMA, 2006).

II - 1.3. Suplementos Termogênicos

Os suplementos alimentares termogênicos têm sido cada vez mais utilizado na diminuição de peso. Esses produtos são aqueles formulados com substâncias de difícil digestão, promovendo maior consumo de calorias no processo de digestão e, por consequência, um aumento na temperatura corporal. Esse mecanismo ocasiona diminuição do apetite e aumento do gasto energético (SCHENEIDER *et al.*, 2008).

II - 1.4. Suplementos Hipercalóricos

Enquanto os termogênicos são usados para a perda de peso, os hipercalóricos proporcionam aumento do peso, além de serem utilizados para completar o aporte calórico de

atletas que possuem alto gasto energético. São ricos em carboidrato e proteína e pobres em gordura, auxiliando no ganho de massa magra. Entretanto, o uso torna-se abusivo por pessoas que substituem refeições importantes como café da manhã e almoço por esses suplementos (SCHENEIDER *et al.*, 2008)

II - 1.5. Suplementos vitamínico e minerais

As vitaminas e os minerais são utilizados pela maioria da população em geral e, principalmente por atletas. Esses micronutrientes desempenham papel importante na produção de energia, na síntese da hemoglobina, na manutenção da massa óssea, na função auto-imune e na proteção dos tecidos contra danos oxidativos (GUERRA; SOARES; BURINI, 2001).

II - 2. CONSUMO DE SUPLEMENTOS ALIMENTARES PELA POPULAÇÃO MUNDIAL E BRASILEIRA

Segundo Moreira, Navarro e Navarro (2014), os praticantes de atividade física são os principais usuários dos suplementos alimentares. Esse grupo de usuários buscam melhora na performance, ganho de massa muscular e/ou perda de peso, e consideram a suplementação alimentar um recurso saudável para atingir os objetivos pretendidos, sem os indesejáveis efeitos colaterais dos medicamentos. Corroborando com o estudo anterior, diversos trabalhos publicados no mundo estudaram o consumo de suplementos por atletas e praticantes de atividades físicas (DE ROSE *et al.*, 2006; FAYH *et al.*, 2013; GOSTON; CORREIA, 2010; JACOBSON *et al.*, 2012; KRISTIENSEN *et al.*, 2005; NOGUEIRA; SOUZA; BRITO, 2013; OLIVER; LEON, GUERRA-HERNANDEZ, 2011; SAEEDI *et al.*, 2013; SILVA; MARINS, 2013).

No Brasil, diversas pesquisas foram realizadas acerca do percentual de frequentadores de academia que faziam uso de suplementos alimentares. O Quadro 1 mostra a frequência de usuários de suplementos alimentares por região brasileira, a composição e para qual fim o produto foi utilizado. Considerou-se como suplementos proteicos aqueles cuja composição continham tanto a proteína propriamente dita (proteína do leite e albumina), quanto os aminoácidos (BCAAs e a creatina) em sua formulação, pois, alguns autores englobaram todas essas na mesma categoria de suplementos à base de proteína

As regiões Sul e Sudeste são as que possuem maior número de pesquisas. A faixa etária analisada variou entre 18 e 60 anos, sendo a média dos usuários em torno de 27 anos, o que caracteriza uma população usuária de adultos jovens. Além disso, as pesquisas foram realizadas com ambos os sexos sendo observada predominância de usuários do sexo

masculino. O grau de instrução da maioria dos usuários foi superior completo, todavia esse dado não influenciou na decisão de consumir ou não suplementos alimentares (QUEIROZ *et al.*, 2009).

A maior prevalência de consumo dos suplementos alimentares no Brasil foi em Recife (94,9%), seguido por Ribeirão Preto e Brasília (86%), Belo Horizonte (81%) e Manaus (79%), conforme demonstrado no Quadro 1. Os produtos mais consumidos foram os suplementos à base de proteína, uma vez que o objetivo a ser alcançado mais relatado foi de hipertrofia e ganho de massa muscular. Com exceção da cidade de Pau dos Ferros no Rio Grande do Norte (11,5%), todas as pesquisas indicaram que mais de 20% dos frequentadores de academia faziam uso de suplemento alimentar. Uma justificativa possível para esse baixo percentual, seria pelo pouco tempo em que os usuários aderiram à atividade física rotineiramente; os estudos mostraram que há uma relação direta entre o tempo de práticas de exercício em academias com o consumo de academia ao fato de o atleta consumir suplementos alimentares (QUEIROZ *et al.*, 2009).

Segundo pesquisa feita por Goston *et al.* (2010), os homens adultos jovens consomem suplementos alimentares ricos em proteínas e carboidratos, enquanto as mulheres e os homens acima dos 45 anos, preferem os suplementos à base de plantas, multivitamínicos e minerais.

Quadro 1: Pesquisas relacionadas no Brasil ao percentual de frequentadores de academias que fazem uso de suplemento alimentar.

Região	Estado	Cidade	Percentual (n° de entrevistados)	Suplemento predominante	Indicação	Referência	
Norte	Amazonas	Manaus	79% (250)	Proteínas	Educador Físico	VIEIRA <i>et al.</i> , 2018	
	Pará	Belém	42% (79)	Proteínas	Educador Físico	ARAÚJO; SOARES., 1999	
	Rondônia	Porto Velho	55% (191)	Proteínas	Educador Físico	PEDROSA <i>et al.</i> , 2010	
Nordeste	Bahia	Vitória da Conquista	33,6% (137)	Proteínas	Nutricionista	BRITO; LIBERALI, 2012	
	Ceará	Juazeiro do Norte	25,2% (127)	Proteínas	Não relatado	PEREIRA <i>et al.</i> , 2017	
	Paraíba	João Pessoa	34,3% (108)	Proteínas	Nutricionista	ESPÍNOLA; COSTA; NAVARRO, 2008	
	Pernambuco	Recife	94,9% (59)	Proteínas	Indicação de amigos	SANTOS <i>et al.</i> , 2013	
	Rio Grande do Norte	Natal		65% (334)	Proteínas	Indicação de amigos	CORRÊA; NAVARRO, 2014
		Pau dos Ferros		11,5% (97)	Proteínas	Indicação de amigos	QUEIROZ <i>et al.</i> , 2009
Sudeste	Espírito Santo	Cachoeiro de Itapemirim	58,4% (113)	Proteínas	Nutricionista/Médico	MOREIRA; NAVARRO; NAVARRO, 2014	
		Vitória	70% (100)	Proteínas	Educador Físico	SANTOS; SANTOS, 2002	
		Belo Horizonte	36,8% (1102)	Proteínas	Iniciativa Própria	GOSTON <i>et al.</i> , 2010	
		Vale do Aço	40,2% (368)	Proteínas	Iniciativa Própria	COSTA; ROCHA; QUINTÃO, 2013	
		Montes Carlos	65% (100)	Proteínas	Iniciativa Própria	CARDOSO; VARGAS; LOPES, 2017	
		Santo Antônio do Monte	44% (308)	Proteínas	Indicação de amigos	SANTOS; MONTSERRAT; OLIVEIRA, 2015	

	Rio de Janeiro	Campos dos Goytacazes	30% (334)	Proteínas	Indicação de amigos	LINHARES; LIMA, 2006
		Niterói e São Gonçalo	32% (160)	Proteínas	Não profissional	ROCHA; PEREIRA, 1998
	São Paulo	Cananéia	53% (60)	Proteínas	Indicação de amigos	GOMES <i>et al.</i> , 2017
		Ribeirão Preto	52% (102)	Proteínas	Indicação de amigos	GOMES <i>et al.</i> , 2008
		São Paulo	61,2% (201)	Proteínas	Indicação de amigos	HIRSCHBRUCH; FISBERG; MOCHIZUKI, 2008
Sul	Paraná	Francisco Beltrão	52,9% (140)	Proteínas	Educador Físico	DOMENEGHINI <i>et al.</i> , 2018
		Londrina	26,64% (244)	Proteínas	Educador Físico	MIARKA <i>et al.</i> , 2007
	Santa Catarina	Balneário Camboriú	77% (257)	Proteínas	Educador Físico	SCHENEIDER <i>et al.</i> , 2008
		Florianópolis	50% (98)	Proteínas	Indicação de amigos	WAGNER, 2011
		Palhoça	40% (150)	Proteínas	Indicação de amigos	AMARAL, 2017
	Rio Grande do Sul	Caxias do Sul	29,9% (87)	Proteínas	Indicação de amigos	THEODORO, RICALDE; AMARO, 2009
		Porto Alegre	63,3% (316)	Proteínas	Indicação de amigos	FAYH <i>et al.</i> , 2013
		Santa Maria	26 % (23)	Proteínas	Indicação de amigos	LIMA; MORAES; KIRSTEN, 2010
		Santa Cruz do Sul	43,3% (80)	Proteínas	Indicação de amigos	JOST; POLL, 2014
	Centro-Oeste	Distrito Federal	Brasília	86% (110)	Proteínas	Indicação de amigos
Goiás		Goiânia	34% (183)	Proteínas	Nutricionista	ARAÚJO; ANDREOLO; SILVA, 2002
		Anápolis	46,7% (150)	Proteínas	Não profissional	SANTOS <i>et al.</i> , 2018b

Fonte: Autoria própria

Ainda de acordo com o Quadro 1, a prevalência de consumidores de suplementos alimentares varia entre as cidades brasileiras (11,5 a 94,9%); na maioria das cidades (53%) a prevalência é entre 25 e 50%, contudo em uma parcela, cerca de 30%, a prevalência do consumo de suplementos alimentares está entre 50 e 75% da população. Destaca-se aqui o dado relacionado à indicação da suplementação: apenas 13% dos consumidores de suplementos consultaram um profissional apto a prescrever suplementação (nutricionistas/médicos), e 63% fizeram uso ou por indicação de amigos ou por iniciativa própria. Esses dados mostram o descuido com os perigos da suplementação pelos consumidores, provavelmente por considerarem se tratar de um alimento considerado seguro e não medicamento que pode apresentar efeitos colaterais.

Além dos frequentadores de academia, a população mundial de um modo geral também faz uso de suplementação alimentar. Diferentemente dos usuários frequentadores de academia, quando observa-se a população de maneira aleatória, a prevalência de uso de suplementos alimentares é maior entre mulheres com idade mais avançada e os multivitamínicos/minerais, os extratos à base de plantas e de aminoácidos são os produtos utilizados preferencialmente (BAILEY *et al.*, 2011; KIELY *et al.*, 2001; ROVIRA *et al.*, 2013; SKEIE *et al.*, 2009). Resultado semelhante foi reportado em um estudo feito na Finlândia, com adolescentes entre 12 e 18 anos (MATTILA *et al.*, 2010). Já uma pesquisa realizada na Espanha, com adultos entre 35 e 80 anos, demonstrou uma prevalência baixa (9,3%) do uso de suplementos alimentares, o que pode ser explicado devido aos hábitos de vida saudável dessa população, na qual a retirada dos macro e micronutrientes é realizada por meio da refeição (ROVIRA *et al.*, 2013).

No Brasil, um levantamento com 1.007 brasileiros com mais de 17 anos, de todas as regiões do país mostrou que em 2015, 54% dos brasileiros consumiram algum tipo de suplemento alimentar. Produtos à base de ácidos graxos (ômega-3), aminoácidos (BCAA), minerais (cálcio), óleos (óleo de fígado de bacalhau), plantas (*goji berry*), proteínas (*whey protein*), vitaminas (multivitamínicos) entre outros (fibras, probióticos) apresentaram maior frequência de uso entre os participantes do estudo (ABRENUTRE, 2015).

O Quadro 2 mostra os resultados obtidos após pesquisa da frequência de uso de suplementos alimentares em vários países, indicando o perfil do usuário, os principais suplementos utilizados e a prevalência de uso dos entrevistados.

Quadro 2: Perfil dos usuários de suplementos alimentares em diversos países

País	Entrevistados	Suplementos Alimentares predominantes	Percentual (n)	Referência
Alemanha	Atletas de elite	Vitaminas/Minerais e Carboidrato	91,1% (1.138)	DIEHL <i>et al.</i> , 2012
Alemanha	Atletas de elite	Vitaminas/Minerais e Carboidrato	80% (164)	BRAUNH <i>et al.</i> , 2009
Canadá	Atletas de elite	Carboidrato e Cafeína	98,6% (221)	KRISTIANSEN <i>et al.</i> , 2005
Espanha	Frequentadores de academia	Proteína	57,16% (415)	OLIVER; LEON, GUERRA-HERNANDEZ, 2011
Espanha	População aleatória	Vitaminas	9,3% (6.352)	ROVIRA <i>et al.</i> , 2013
EUA	Frequentadores de academia	Proteína e Creatina	84,7% (229)	SHEPPARD <i>et al.</i> , 2000
EUA	Militares que frequentam academia	Bebidas energéticas	46,7% (106.698)	JACOBSON <i>et al.</i> , 2012
EUA	Frequentadores de academia	Vitaminas/Minerais e Proteínas	84,7% (222)	MORRISON; GIZIS; SHORTER, 2004
EUA	População aleatória	Vitaminas	49% (18.758)	BAILEY <i>et al.</i> , 2011
Finlândia	Adolescentes (12 a 18 anos)	Vitaminas e produtos à base de plantas	45% (22.519)	MATILTA <i>et al.</i> , 2009
Inglaterra	População aleatória	Vitaminas/Minerais e antioxidantes	35,5% (15.465)	HARRISON <i>et al.</i> , 2004
Irã	Frequentadores de academia	Vitaminas/Minerais e Creatina	66,7% (1.625)	SAEEDI <i>et al.</i> , 2013
Itália	Frequentadores de academia	Hiperproteico e Creatina	30,1% (207)	BIANCO <i>et al.</i> , 2011
Irlanda	População aleatória	Vitaminas	23% (1379)	KIELY <i>et al.</i> , 2001

Fonte: Autoria Própria

Por meio dos resultados mostrados no Quadro 2, observa-se que os atletas de elite apresentaram percentuais mais altos de consumo de suplementos alimentares, sendo mais consumidos aqueles à base de carboidratos e de vitaminas. Esses usuários estão mais preocupados com a *performance* e com a saúde, diferentemente daqueles que buscam hipertrofia e aumento de massa muscular. A pesquisa quando realizada na população aleatória relatou uso de vitaminas/minerais e suplementos à base de plantas. E, por último, os frequentadores de academia utilizam preferencialmente os suplementos à base de proteínas e aminoácidos, corroborando com os dados obtidos na população brasileira.

II - 3. LEGISLAÇÃO RELACIONADA AOS SUPLEMENTOS ALIMENTARES

No Brasil, até meados de 2018, os suplementos alimentares eram categorizados pela ANVISA como “alimentos para atletas” por meio da Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 18 de 2010. Não existia juridicamente a classe dos suplementos alimentares. Esses produtos eram classificados em diferentes subclasses:

I - Suplemento hidroeletrolítico para atletas;

II - Suplemento energético para atletas;

III - Suplemento proteico para atletas;

IV - Suplemento para substituição parcial de refeições de atletas;

V - Suplemento de creatina para atletas; VI - suplemento de cafeína para atletas (ANVISA, 2010).

A RDC nº243, de 26 de julho de 2018, passou a adotar o termo “suplemento alimentar” e o definiu como “um produto para ingestão oral, apresentado em formas farmacêuticas, destinado a suplementar a alimentação de indivíduos saudáveis com nutrientes, substâncias bioativas, enzimas ou probióticos, isolados ou combinados” (ANVISA, 2018). Os “alimentos para atletas” passaram a integrar o grupo dos suplementos alimentares, sendo então revogada a RDC nº 18/2010 (ANVISA, 2018e).

Além da publicação da RDC nº 243/2018, cinco outros atos normativos foram publicados para legalização dos suplementos alimentares, conforme quadro a seguir.

Quadro 3 - Normas e ementas para categoria de suplementos alimentares publicados pela ANVISA

Normas	Ementas	Referência
RDC nº 239/2018	Estabelece os aditivos alimentares e coadjuvantes de tecnologia autorizados para uso em suplementos alimentares.	ANVISA, 2018a
RDC nº 240/2018	Categorias de alimentos e embalagens isentos e com obrigatoriedade de registro sanitário. Altera a Resolução - RDC nº 27, de 6 de agosto de 2010.	ANVISA, 2018b
RDC nº 241/2018	Dispõe sobre os requisitos para comprovação da segurança e dos benefícios à saúde dos probióticos para uso em alimentos.	ANVISA, 2018c
RDC nº 242/2018	Regulamenta o registro de vitaminas, minerais, aminoácidos e proteínas de uso oral, classificados como medicamentos específicos. Altera a Resolução - RDC 24, de 14 de junho de 2011, a Resolução - RDC 107, de 5 de setembro de 2016, a Instrução Normativa - IN 11, de 29 de setembro de 2016 e a Resolução - RDC 71, de 22 de dezembro de 2009.	ANVISA, 2018d
RDC nº 243/2018	Dispõe sobre os requisitos sanitários dos suplementos alimentares.	ANVISA, 2018e
Instrução Normativa nº 28/2018	Estabelece as listas de constituintes, de limites de uso, de alegações e de rotulagem complementar dos suplementos alimentares.	ANVISA, 2018f

Fonte: Autoria própria

A RDC nº 243/2018 dispõe ainda sobre os requisitos para composição, qualidade, segurança e rotulagem dos suplementos alimentares e para atualização das respectivas listas de constituintes, limites de uso, alegações e rotulagem complementar desses produtos (ANVISA, 2018). Dentre as normativas, essa resolução traz quais são os ingredientes já estabelecidos para compor, tradicionalmente, um produto alimentício, ou seja, aqueles ingredientes que não necessitam de classificação como “novos alimentos” ou “novos ingredientes”, e que não descaracterizam a finalidade de uso ou a forma de apresentação de produto como suplemento alimentar. Ademais, proíbe na sua composição, conforme artigo 7º:

Art. 7º Não são permitidos na composição de suplementos alimentares:

I - substâncias consideradas como *doping* pela Agência Mundial Antidopagem;

II - substâncias sujeitas a controle especial, conforme Portaria nº 344, de 12 de maio de 1998, que aprova o regulamento técnico sobre substâncias e medicamentos sujeitos a controle especial, e suas atualizações;

III - substâncias obtidas das espécies que não podem ser utilizadas na composição de produtos tradicionais fitoterápicos, conforme Anexo I da Resolução - RDC nº 26, de 13 de maio de 2014, que dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos e o registro e a notificação de produtos tradicionais fitoterápicos; e

IV - óleos e gorduras parcialmente hidrogenados.

A legislação brasileira difere, expressamente, os suplementos alimentares dos medicamentos. Essa distinção também é evidente nos países da União Europeia, como trata o *European Council* (EC) 2001. Para ambas as legislações, o uso de substâncias farmacologicamente ativas é expressamente proibido em produtos classificados como “suplementos alimentares”. A legislação europeia permite o uso de substâncias com efeitos farmacológicos a uma determinada concentração nos produtos classificados como “*borderline products*” ou produtos limítrofes, desde que sua composição esteja descrita nos rótulos dos produtos (EC 2001; LACHENMEIER *et al.*, 2012). Já a legislação dos EUA, diferentemente da brasileira e da europeia, permite que uma gama de substâncias farmacologicamente ativas como os esteroides anabolizantes, sejam adicionadas aos suplementos alimentares (FDA, 1995; FINLEY; ELLWOOD; HOADLEY, 2014).

A legislação brasileira também difere da americana na questão da rotulagem dos produtos. Nos suplementos alimentares comercializados no Brasil, o fabricante deve inserir, obrigatoriamente, informações relativas à recomendação de uso, instruções de conservação e identificação de ingredientes. Indicações sobre os grupos populacionais aos quais se direciona o suplemento e advertências expressas ao consumidor, como “Este produto não é um medicamento”, “Não exceder a recomendação diária de consumo indicada na embalagem” e “Mantenha fora do alcance de crianças” são informações obrigatórias dos rótulos de produtos vendidos no Brasil. Palavras, marcas, imagens ou qualquer outra representação gráfica, inclusive em outros idiomas, que afirmem, sugiram ou impliquem, expressa ou implicitamente, que: o produto possui finalidade medicamentosa ou terapêutica”; “o produto contém substâncias não autorizadas ou proibidas”; “a alimentação não é capaz de fornecer os componentes necessários à saúde”; ou “o produto é comparável ou superior a alimentos convencionais” são proibidas (ANVISA, 2018f). Já a legislação americana permite várias alegações nos rótulos dos suplementos alimentares inclusive sem autorização prévia do FDA. Essas alegações incluem

declarações de benefícios relacionados à doenças causadas por deficiências de nutrientes, declarações que descrevam o papel de um nutriente destinado a afetar a estrutura ou função em humanos, que caracterizem o mecanismo documentado pelo qual um nutriente ou ingrediente aja para manter a estrutura ou função ou que descrevam bem-estar geral pelo consumo de um nutriente ou ingrediente (FDA, 1995).

II - 4. ADULTERAÇÃO DE SUPLEMENTOS ALIMENTARES

Adulteração de suplemento alimentar é definida como a adição de substâncias não declaradas, a troca intencional de ingredientes ou a identificação errônea de espécies vegetais presentes no produto, realizadas pelo próprio fabricante, visando o aumento do lucro e das vendas (ROCHA; AMARAL; OLIVEIRA, 2016).

A Vigilância Sanitária Americana listou 332 formulações de suplementos nutricionais adulterados entre 2007 e 2012. Mais de 95% deles foram comercializados como produtos para melhora do desempenho sexual, seguido de produtos para ganho de massa muscular e perda de peso (GILARD *et al.*, 2015). Quanto à origem, a maior taxa de adulteração foi encontrada entre as formulações chinesas (BOGUZ *et al.*, 2006; HE *et al.* 2014; THEVIS *et al.*, 2008).

Essa adulteração pode estar relacionada tanto pela adição dolosa de substâncias, com o propósito de aumentar a eficiência aparente do produto, como pela contaminação cruzada durante a sua produção. A diferença entre a adição dolosa e a contaminação cruzada é o nível de concentração de uma substância não permitida presente no produto inspecionado (COOPMAN; CORDONNIER, 2012). Níveis de concentração abaixo do valor terapêutico pode indicar contaminação cruzada, enquanto que concentração no nível ou acima da concentração terapêutica é considerada adulteração intencional (GEYER *et al.*, 2009).

Em 2005, a vigilância sanitária alemã confiscou suplementos alimentares adulterados com elevadas quantidades de esteroides anabolizantes androgênicos (EAA). A análise de formulações de vitamina C, multivitamínicos e tabletes de magnésio produzidos pelo mesmo fabricante na mesma linha de produção e com o mesmo intervalo de tempo, detectou a presença dos mesmos esteroides, indicando uma possível contaminação cruzada (GEYER *et al.*, 2009). Já nos EUA, a adição intencional de adulterantes foi observada pela detecção do diurético bumetanida ($> 1 \text{ mg g}^{-1}$) nos níveis compatíveis com os valores terapêuticos, descartando possível contaminação cruzada alegada pelo fabricante (HOGGAN *et al.*, 2007).

Um fator determinante que facilita a prática de adulteração é a deficiência no controle da produção e comercialização de suplementos alimentares. Em quase todo o mundo eles são

classificados como alimentos e a sua produção e controle de qualidade dependem única e exclusivamente do produtor, sem a necessidade de autorização prévia para a comercialização do produto. Práticas éticas, rigorosas diretrizes de produção e medidas de controle de qualidade podem assegurar a não contaminação dos produtos, ou até mesmo a da matéria prima empregada nas formulações ao longo do processo de fabricação (CHAMPAGNE; EMMEL, 2011; GILARD *et al.*, 2015).

Após a publicação da RDC nº 240/2018, que dispõe sobre as categorias de alimentos e embalagens isentos e com obrigatoriedade de registro sanitário, somente os suplementos contendo enzimas ou probióticos devem ser registrados na Anvisa. Os demais suplementos alimentares, inclusive aqueles destinados à crianças, são dispensados da obrigatoriedade de registro e devem seguir as disposições da Resolução nº 23/2000 (Regulamento técnico sobre o manual de procedimentos básicos para registro e dispensa da obrigatoriedade de registro de produtos pertinentes à área de alimentos) para sua regularização junto ao órgão de Vigilância Sanitária da localidade da empresa fabricante. Ou seja, mesmo após uma série de publicações acerca dos suplementos alimentares, ainda continuam tendo o mesmo tratamento que os alimentos (ANVISA, 2000; ANVISA, 2018b).

Resultados positivos em exame *antidoping* têm sido reportados na literatura como uma consequência do consumo de suplementos alimentares adulterados (GEYER *et al.*, 2009). Isso implica em risco aos atletas de alto nível de competição, uma vez que o “princípio de responsabilidade” implantado pela WADA não distingue *doping* deliberado de inadvertido, em decorrência de consumo de suplementos alimentares adulterados (WADA, 2016). Mesmo baixas concentrações de adulterantes podem levar a resultados positivos em exames *antidoping*.

A Federação Alemã de Futebol suspendeu um jogador durante o campeonato pelo resultado positivo de metabólitos primários da nandrolona na urina, em decorrência do uso de um suplemento de creatinina adulterado com este EAA (STRIEGEL *et al.*, 2004). Outro caso de reprovação em exame *antidoping* ocorreu com a detecção de produtos de biotransformação da sibutramina. Esses produtos foram encontrados em exame *antidoping* após o atleta ter consumido uma única dose de um chá de origem chinesa adulterado; em seu rótulo continha a descrição “conteúdo natural” (THEVIS *et al.*, 2008).

Além de casos positivos em exames *antidoping*, a adulteração é um problema de saúde pública (GEYER *et al.*, 2009). Casos de adulteração de suplementos alimentares foram detectados com substâncias em concentrações maiores do que os níveis terapêuticos, provocando efeitos adversos nos consumidores, tais como dor de cabeça, vertigens e sonolência (JUNG; HERMANNNS-CLAUSEN; WEINMANN, 2006).

Dados oriundos de laudos periciais emitidos pela Polícia Federal Brasileira, entre 2007 e 2013, identificaram 180 casos de adulterações, principalmente em suplementos hormonais e emagrecedores. Comparando as legislações de suplementos alimentares no Brasil com a americana e a europeia, a legislação brasileira é a mais restritiva, limitando quais formulações podem ser comercializadas como suplementos alimentares e quais devem ser registradas como medicamentos. Apesar de possuírem uma legislação mais flexível, os EUA e a União Europeia dispõem de mecanismos adequados para notificação e divulgação ao público da detecção de suplementos irregulares, incluindo a consolidação anual de ocorrências e sua estratificação por tipo de produto. O Brasil não dispõe de sistema semelhante, tendo sido encontrados apenas dois alertas da ANVISA reportando a detecção de sibutramina e fenolftaleína em suplementos emagrecedores. Esses achados indicam que as autoridades brasileiras não estão tratando o assunto com a mesma prioridade que outros países, a despeito dos potenciais riscos à saúde implicados (ANVISA, 2011; ANVISA, 2014; NEVES; CALDAS, 2015).

II - 5. SUBSTÂNCIAS ADICIONADAS ILICITAMENTE EM SUPLEMENTOS ALIMENTARES: ADULTERANTES

As principais classes de substâncias farmacologicamente ativas detectadas como adulterantes em suplementos alimentares são: estimulantes (cafeína e efedrina), anorexígenos (sibutramina e rimonabanto), ansiolíticos (benzodiazepínicos), antidepressivos (fluoxetina), diuréticos (bumetanida, furosemida e hidroclorotiazida), laxante (fenolftaleína), e esteroides anabolizantes (CARVALHO *et al.* 2011; COOPMAN; CORDONNIER, 2012; CHO *et al.*, 2014; CHO *et al.*, 2015; HE *et al.*, 2014; KHASAN *et al.* 2014). Além dessas classes, substâncias hipoglicemiantes, anestésicas, hormônios para tireoide, analgésicos, dentre outros, também foram encontradas em suplementos alimentares de maneira ilícita (DECONINCK *et al.*, 2016a; KHASAN *et al.*, 2014; KIM *et al.* 2014; LI *et al.* 2010; ZHU *et al.* 2014).

O Quadro 4 mostra as principais substâncias detectadas como adulterantes em amostras de suplementos alimentares e suas respectivas concentrações reportadas pela literatura.

Quadro 4 - Substâncias farmacologicamente ativas encontradas como adulterantes em suplementos alimentares, suas DDR e as quantidades encontradas (mg/dose).

Substância	DDR* (VO)	Quantidades detectadas (por dose)	Referências
Cafeína	210 – 420 mg**	0,025 a 100 mg	CIANCHINO <i>et al.</i> , 2008; STRANO-ROSSI <i>et al.</i> , 2015; VIANA <i>et al.</i> 2015.
Sibutramina	15 mg***	4,4 a 30 mg	CHAMPAGNE; EMMEL, 2011; CSURPOR <i>et al.</i> , 2012; GUO <i>et al.</i> , 2014; JUNG; HERMANNNS-CLAUSEN; WEINMANN, 2006; VAYSSE <i>et al.</i> , 2010
Bumetanida	1 mg	1 mg	HOGGAN <i>et al.</i> , 2007
Furosemida	40 a 80 mg	1 mg a 57 mg	CIANCHINO <i>et al.</i> , 2007; MOREIRA <i>et al.</i> , 2013.
Hidroclorotiazida	50 mg	2,4 a 45 mg	GUO <i>et al.</i> , 2014; MOREIRA <i>et al.</i> , 2013.
Fenolftaleína	197 mg****	4,4 a 1167 mg	KHASAN <i>et al.</i> , 2014; VAYSSE <i>et al.</i> , 2010
Testosterona	150 mg (SC)	45 ng a 0,8 mg	BAUME <i>et al.</i> , 2006; VAN POUCKE <i>et al.</i> , 2007; STEPAN; CUHRA; BARSOVA, 2008; ODOARDI <i>et al.</i> , 2015
Metiltestosterona	25 mg	7 mg	ABATTE <i>et al.</i> , 2014;
Decanoato de testosterona	100 mg (IM)	NQ	BOGUZ <i>et al.</i> , 2006; MARTTELO, FELLI, CHIAROTTI, 2007
Androstenediona	50 – 150 mg	0,4 μ g a 9 mg	ABATTE <i>et al.</i> , 2014; BAUME <i>et al.</i> , 2006; ODOARDI <i>et al.</i> , 2015
DHEA	50 – 100 mg	5 μ g a 28 mg	ABATTE <i>et al.</i> , 2014; BAUME <i>et al.</i> , 2006; STEPAN; CUHRA; BARSOVA, 2008; ODOARDI <i>et al.</i> , 2015
Trembolona	75 mg	77 ng	PELEGRINI <i>et al.</i> , 2012
Estanozolol	10 a 50 mg	25 μ g a 40	ODOARDI <i>et al.</i> , 2015; PELEGRINI <i>et al.</i> , 2012
Decanoato de nandrolona	50 mg (IM)	22 μ g a 2	BAUME <i>et al.</i> , 2006; MARTTELO, FELLI, CHIAROTTI, 2007; STEPAN; CUHRA; BARSOVA, 2008.
<p>* DDR obtida do BRUNTON <i>et al.</i>, 2012, ** ANVISA, 2018 ; *** ANVISA, 2016 ; **** Valor obtido do da bula do AGAROL (Johnson &Johnson);</p>			
NQ - Não quantificada; VO- Via Oral; SC – Subcutânea; IM- Intramuscular			

Fonte: Autoria própria

Observa-se que os níveis de concentração variaram desde aproximadamente cem milhões de vezes abaixo da dose diária recomendada (DDR) (*i.e.* trembolona), indicando possíveis contaminações ocorridas durante o processo, até concentrações dez vezes acima da DDR (*i.e.*, fenolftleína), correspondendo a uma adulteração intencional.

II - 5.1. Esteroides anabolizantes androgênicos

Os esteroides anabólicos androgênicos (EAA) são um grupo de compostos naturais e sintéticos formados a partir da testosterona ou de um de seus derivados, cuja indicação terapêutica clássica está associada a situações de hipogonadismo (CUNHA *et al.*, 2004).

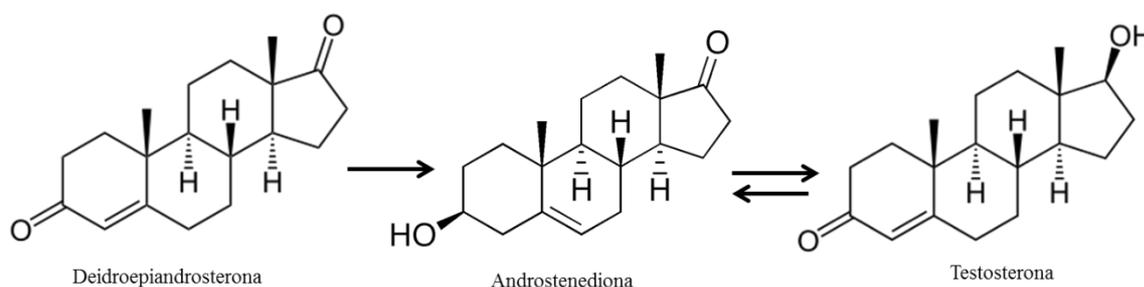
A testosterona é o principal hormônio androgênico circulante no organismo humano nos homens. É sintetizado pelas células de *Leydig* dos testículos, em resposta ao hormônio luteinizante hipofisário (LH), e pelo ovário nas mulheres. Em ambos os sexos, a testosterona é sintetizada também pelo córtex supra-renal. A androstenediona e a deidroepiandrosterona são precursores da testosterona (Figura 2) e são considerados androgênicos fracos.

As ações da testosterona e dos andrógenos correlatos podem ser divididas em duas categorias principais:

Efeitos androgênicos: relacionados, especificamente, com a função reprodutora e com as características sexuais secundárias

Efeitos anabólicos: relacionados à estimulação do crescimento e maturação dos tecidos não reprodutores (BRUNTON *et al.*, 2012; CUNHA *et al.*, 2004).

Figura 2: Biossíntese da testosterona



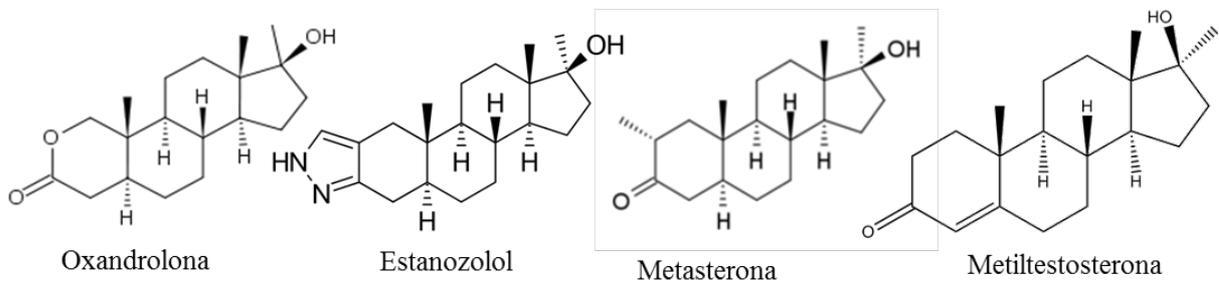
Fonte: adaptado do BRUNTON *et al.*, 2012

A testosterona é o hormônio responsável pela diferenciação sexual masculina no útero e pelas alterações masculinas na puberdade. A incapacidade de produção de testosterona pelo feto leva à diferenciação masculina incompleta e, durante a puberdade, à diminuição de alguns

aspectos da virilização, a qual pode ocorrer em vários graus. Nas mulheres, o papel fisiológico da testosterona e as consequências de sua deficiência ainda não são conhecidos. Alguns autores citam a influência sobre a libido, a energia, a massa e força muscular e a densidade óssea (BRUNTON *et al.*, 2012).

Apesar de ser prontamente absorvida pelo trato gastrointestinal, a testosterona sofre rápido metabolismo hepático. Na tentativa de melhorar a biodisponibilidade dessa substância, reações de alquilação e esterificação da posição 17α hidroxila da testosterona foram desenvolvidas pela indústria farmacêutica. Esses compostos 17α alquilados (Figura 3) são administrados por via oral, porém são menos androgênicos e mais hepatotóxicos que a testosterona natural (BRUNTON *et al.*, 2012).

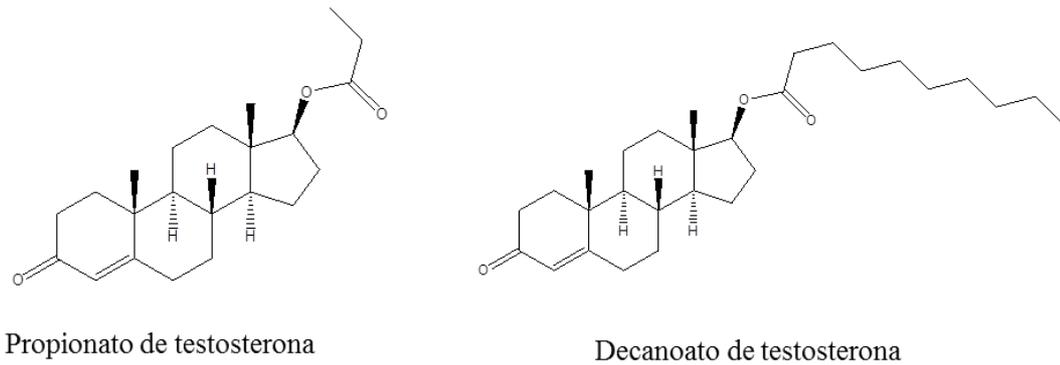
Figura 3: Estruturas dos androgênicos 17α alquilados.



Fonte: BRUNTON *et al.*, 2012

A esterificação com um ácido graxo na posição 17α da testosterona origina compostos mais lipofílicos, como o propionato de testosterona e decanoato de testosterona (Figura 4). Os ésteres de testosterona provocam concentrações séricas de testosterona que permanecem na faixa terapêutica durante semanas (BRUNTON *et al.*, 2012).

Figura 4: Estruturas dos ésteres de testosterona



Fonte: BRUNTON *et al.*, 2012

Além dos esteroides anabolizantes oriundos da testosterona, existem os pró-hormônios e os *designer* esteroides:

Pro-hormônios: são precursores dos esteroides que são convertidos no esteroide ativo por metabolização hepática. Os primeiros pró-hormônios foram introduzidos no mercado em 1996, tais quais a deidroepiandrosterona (DHEA) e a androstenediona (BRUNTON *et al.*, 2012).

Designer esteroides: são aqueles com estrutura molecular modificada dos esteroides clássicos, com o mesmo efeito ou com efeitos potencializados (LOOTENS *et al.*, 2011). Eles foram sintetizados com o propósito de evitar a detecção em exames antidoping e contornar a legislação (LOOTENS *et al.*, 2011). Apenas alguns *designer* esteroides, tais como metil-1-testosterona, 6-metiltestosterona e metilestebolona, foram proibidos por órgão de vigilância sanitária, mas mesmo assim têm sido encontrados ilicitamente em formulações de suplementos alimentares (CAVALCANTI *et al.*, 2013; PARR *et al.*, 2011a; PARR *et al.*, 2011b).

As formas de administração dos EAA são por via oral, por via injetável ou tópica, na forma de cremes ou géis. Na medicina, esses esteroides são usados no tratamento de casos de atrasos na puberdade, osteoporose, endometriose, impotência, anemia ou câncer de mama. Quando utilizados por atletas, fisiculturistas ou praticantes de atividade física, esses esteroides aumentam a massa muscular e reduzem a gordura corporal. Nesses casos, são administrados em concentrações maiores do que as DDR (COOPMAN; CORDONNIER, 2012). O consumo dessas superdoses leva à disfunção hepática, desordens menstruais, virilização, ginecomastia, aumento de doenças cardiovasculares e transtornos psicológicos (GEYER *et al.*, 2009).

Os primeiros relatos de uso dessas substâncias por atletas datam de 1954. Como resultado do abuso, o Comitê Olímpico proibiu seu uso em 1974 e os testes nos atletas foram implementados em larga escala a partir de 1976 (EENOO; DELBEKE, 2006). Atualmente, a

WADA proíbe o uso de EAA dentro e fora das competições (WADA, 2016), mas apesar de proibidos continuam sendo consumidos por atletas (CHO *et al.*, 2015).

Há aproximadamente 15 anos, os esteroides anabolizantes androgênicos começaram a ser detectados em suplementos alimentares, tais quais testosterona, propionato de testosterona, DHEA, androstenediona, metiltestosterona, metasterona, metandienona, estanozolol, oxandrolona, , nandrolona, decanoato de nandrolona, trembolona decanoato de testosterona e suas concentrações encontradas estão elencadas no Quadro 4 (ABATTE *et al.*, 2014; BOGOUZ *et al.*, 2006; CHO *et al.*, 2015; COOPMAN; CODORNNIER, 2012; HE, *et al.* 2014; ODOARDI *et al.*, 2015; PELLEGRINI *et al.*, 2012; VAN POUCKE *et al.*, 2007).

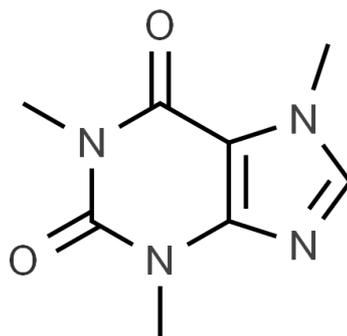
II - 5.2. Estimulantes

Estimulantes, também conhecidas por psicoestimulantes, são substâncias que estimulam o sistema nervoso central (SNC). Elas são utilizadas para melhorar o desempenho físico e mental, o humor, o estado de alerta e para auxiliar a perda de peso (CHANG; SHEN, 2013).

A cafeína (1,3,7 – trimetilxantina) (Figura 5) é o estimulante mais consumido em todo o mundo estando presente em refrigerantes, cafés, chás, chocolates e associados a fármacos analgésicos (CIANCHINO *et al.*, 2008; THEVIS *et al.*, 2008; VIANA *et al.*, 2018). Sua ação neurológica consiste no bloqueio dos receptores de adenosina – um neurotransmissor responsável pela inibição da liberação de neurotransmissores excitatórios, como a dopamina e a noradrenalina, no SNC. Como consequência, com o antagonismo do receptor da adenosina, a cafeína é responsável pelo aumento da atividade neuronal em várias áreas do cérebro (AZEVEDO *et al.*, 2016). Apresenta, também, efeito termogênico, ou seja, aumenta o gasto energético do indivíduo, promovendo o uso da gordura corpórea como fonte de energia, em detrimento do glicogênio (GREENWAY, 2001).

O consumo moderado de cafeína (210 a 420 mg) afeta, também, o sistema cardiovascular. Excessivas quantidades de cafeína (>2000 mg) podem causar taquicardia, hipertensão, arritmia como também causar significantes efeitos tóxicos como náuseas, vômitos, convulsões e até morte (GURLEY; STEELMAN; THOMAS, 2015).

Figura 5: Estrutura química da cafeína



Fonte: *Chemspider*

O uso de cafeína em suplementos alimentares iniciou em 1994 com a aprovação do DSHEA, principalmente em formulações multi-ingredientes e em combinação com efedrina, indicadas para o emagrecimento e melhora no desempenho esportivo (GURLEY; STEELMAN; THOMAS, 2015). A combinação de cafeína e efedrina apresentava efeitos mais significativos na perda de peso do que a efedrina ou a cafeína isoladamente (GREENWAY, 2001). Contudo, após inúmeros estudos que demonstraram seus efeitos maléficos ao organismo, os suplementos à base dessa associação foram retirados do mercado em 2004 pela FDA. (GURLEY; STEELMAN; THOMAS, 2015).

Após o banimento dos suplementos contendo cafeína e efedrina, surgiu uma nova geração de suplementos alimentares comercializados como “livres de Ephedra”. Esses produtos continham várias fontes naturais de cafeína e outros extratos de plantas, contendo substâncias com efeitos variados (tais como sinefrina e ioimbina). A quantidade de cafeína nesses produtos costuma exceder aquele presente em bebidas e alimentos e a maioria dos produtos não indica a concentração de cafeína. Esses produtos continuam sendo divulgados como auxiliares na perda de peso, energéticos e melhoradores do desempenho esportivo, com a recomendação de uso durante a prática de atividades físicas (NEVES; CALDAS, 2017a).

Estudos demonstram que a combinação de exercícios vigorosos com ingestão de altas doses de cafeína pode ser perigosa para alguns usuários, uma vez que a prática de exercícios diminui a excreção urinária da cafeína (SCHWENK; COSTLEY, 2002; GURLEY; STEELMAN; THOMAS, 2015; NEVES; CALDAS, 2017a).

Até 2003, a cafeína constava na lista de substâncias proibidas em competições esportivas caso fosse detectada na urina em concentrações maiores que $12 \mu\text{g mL}^{-1}$. Porém, foi retirada e incluída no programa de monitoramento, no qual as substâncias ficam em observação para rastreamento de tendências em eventuais abusos (WADA, 2016). No Brasil, existem os

denominados suplementos de cafeína para atletas que são produtos destinados a aumentar a resistência aeróbia em exercícios físicos de longa duração e devem fornecer uma quantidade entre 210 e 420 mg por dose, quando consumidos de maneira isolada (ANVISA, 2018).

Estudos mostraram concentrações de cafeína detectadas em suplementos alimentares entre 0,025 e 100 mg por dose (Quadro 4) (CIANCHINO *et al.*, 2008; STRANO-ROSSI *et al.*, 2015), ou seja, abaixo da dose terapêutica. Todavia estudos têm demonstrado quantidades de cafeína em suplementos além dos valores já especificados nos rótulos, atingindo valores de até 1000 mg por dose (VIANA *et al.*, 2015). Um dos motivos dessa elevada quantidade de cafeína nesses produtos pode estar associado à legislação americana que não obriga os produtores a informar a quantidade de cafeína presente em seus produtos (NEVES; CALDAS, 2017a).

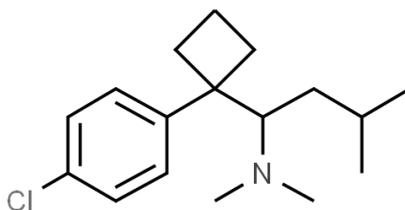
Além da cafeína, outros estimulantes foram detectados como adulterantes nos suplementos nutricionais como a efedrina, pseudoefedrina, norefedrina, metilpseudoefedrina e sinefrina (BAUME *et al.*, 2006; CIANCHINO *et al.*, 2008; DECONINCK *et al.*, 2016b; DEVENTER *et al.*, 2007; LESIAL *et al.*, 2016; MARCHEI *et al.*, 2006; VIANA *et al.*, 2015; KIM *et al.*, 2014).

II - 5.3. Anorexígenos

Substâncias anorexígenas são aquelas utilizadas no tratamento da obesidade. No Brasil, essas substâncias são de uso restrito e estão elencadas na lista B2 (Lista das substâncias psicotrópicas e anorexígenas) da Portaria 344/98. O seu uso é permitido apenas com receituário médico tipo B2 e com restrições como uso por determinado período de tempo e dose diária (ANVISA, 1998).

A substância anorexígena mais detectada como adulterante em suplementos alimentares é a sibutramina (Figura 6). A sibutramina um inibidor da receptação da serotonina e da noradrenalina, que promove e mantém a perda de peso em pessoas obesas (ROCHA; AMARAL; OLIVEIRA, 2016). Entre seus efeitos farmacológicos destacam-se: redução do apetite, sensação de saciedade e indução da termogênese. Entretanto, a sibutramina estimula o SNC e desencadeia efeitos colaterais como nervosismo, xerostomia, dor de cabeça, constipação, dormência e parestesia. Ademais, tem sido associada ao aumento da pressão arterial e da frequência cardíaca, e com isso aumenta o risco de ataques cardíacos. Devido a esses efeitos adversos, em 2010, a sibutramina foi retirada do mercado nos países da Europa e Estados Unidos. Todavia, no Brasil seu uso continua permitido (ANVISA, 1998; DECONINCK *et al.*, 2012).

Figura 6: Estrutura química da sibutramina



Fonte: *Chemspider*

De acordo com a lista da FDA de suplementos alimentares adulterados, de 416 alertas emitidos entre 2010 e 2015, 37% correspondia a suplementos para emagrecimento, dos quais 87% continham adição ilícita de sibutramina (FDA 2015; ROCHA; AMARAL; OLIVEIRA, 2016). No mesmo período, a União Europeia emitiu um alerta informando que 64 suplementos alimentares para emagrecimento comercializados nos países europeus, oriundos da China, EUA, Tailândia, Filipinas, Holanda, Reino Unido, Kosovo e Austrália, estavam adulterados com sibutramina (ROCHA; AMARAL; OLIVEIRA, 2016). Análogos da sibutramina como desmetilsibutramina, didesmetilsibutramina e 11-Desisobutil-11-benzilsibutramina também foram detectados (KIM *et al.*, 2014; MANS *et al.* 2013). No Brasil, 02 alertas foram emitidos pela ANVISA pelo uso de sibutramina como adulterante em suplementos alimentares (ANVISA, 2011; ANVISA, 2014).

Diversos casos de intoxicação pelo uso de suplementos alimentares adulterados com sibutramina foram reportados na literatura. Os sintomas relatados foram mal-estar, taquicardia, cefaleia, agitação, hipertensão arterial, náusea, vômito, dispneia, insônia e aumento da temperatura corporal (MULLER; WEINMANN; HERSMANNNS-CLAUSEN, 2009). Além desses, foram reportados distúrbios psicomotores e síndrome serotoninérgica em consumidores de suplemento alimentar adulterado pela adição de sibutramina, cafeína e fenolftaleína (LAM *et al.*, 2012; SHAPIRA *et al.*, 2016).

Outros anorexígenos detectados em suplementos alimentares foram a fentermina, a fluoxetina, a fenfluramina e a anfepramona (AKAMATSU; MTISUHASHI, 2014; KHASAN *et al.*, 2014; KIM *et al.*, 2014; SHI *et al.*, 2011), embora com menor frequência quando comparados à sibutramina.

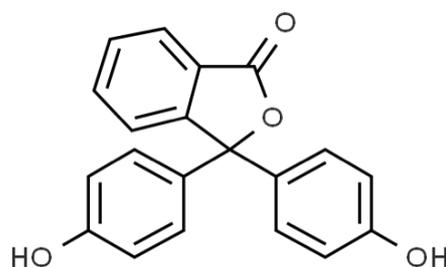
II - 5.4. Laxante

Os laxantes são fármacos que alteram o movimento do trato gastrointestinal por acelerar a passagem do alimento ao longo do intestino (BRUNTON *et al.*, 2012). A fenolftaleína, atualmente utilizada como indicador-ácido base, durante décadas foi utilizada na medicina como laxante. Todavia, foi retirada do mercado em 1997 por ter efeitos carcinogênicos (KHASAN *et al.*, 2014). No Brasil, essa substância foi proibida apenas em 2002 (ANVISA, 2002).

O efeito laxativo da fenolftaleína foi descoberto em 1902, quando a substância foi utilizada como aditivo para a identificação de vinhos artificiais. Durante muitos anos foi um dos laxantes mais utilizados no mundo devido sua eficácia, apresentando poucos efeitos indesejáveis e o sabor aceitável para adultos e crianças. A fenolftaleína exerce seus efeitos farmacológicos por meio da diminuição da absorção de água e eletrólitos no lúmen intestinal, irritação da mucosa gástrica e da constrição da musculatura lisa (ANAND *et al.*, 1994).

Apesar de proibida, a fenolftaleína (Figura 7) continua sendo detectada como adulterante em suplementos alimentares, principalmente associada à sibutramina, por amenizar a constipação causada pela sibutramina (DECONINCK *et al.*, 2016; KHASAN *et al.*, 2014; REEUWIJK *et al.*, 2014; SONG *et al.*, 2014; VAYSSE *et al.*, 2010; BOGUSZ *et al.*, 2006). Além da fenolftaleína, outros laxantes como o bisacodil e picossulfato de sódio foram detectados em suplementos alimentares para emagrecimento (AKAMATSU; MTISUHASHI, 2014; KIM *et al.*, 2014).

Figura 7: Estrutura química da fenolftaleína



Fonte: Chemspider

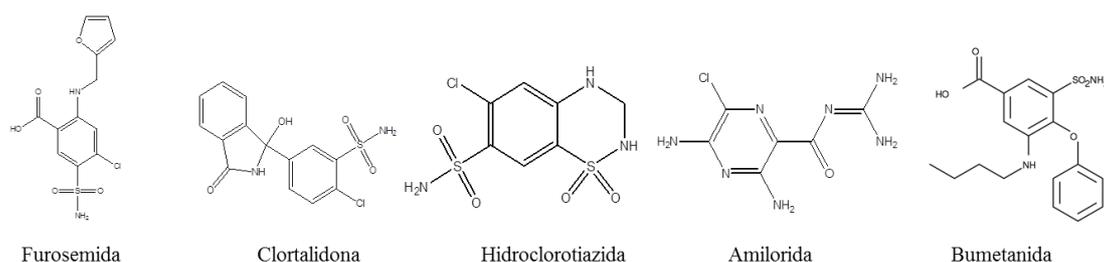
II - 5.5. Diuréticos

Os diuréticos aumentam a excreção de sódio (Na^+) e de água do corpo, sendo utilizados no tratamento de doenças cardíacas como hipertensão e insuficiência cardíaca, bem como

edemas pulmonares, insuficiência renal, síndrome nefrótica, dentre outras (BRUNTON *et al.*, 2012). São utilizados por atletas para diminuir o peso e para mascarar o uso de substâncias proibidas pelo *doping*, por proporcionar maior excreção de líquido do corpo e, conseqüentemente, eliminar substâncias por meio da urina de maneira mais rápida (KHASAN *et al.*, 2014; WOO *et al.*, 2013). Quando usados como adulterantes em suplementos alimentares e em concentrações não controladas são relacionados a diversos efeitos adversos como perda de apetite, visão turva, dores gastrintestinais, fraqueza, tontura e alteração dos níveis de eletrólitos no sangue (WOO *et al.*, 2013).

A bumetanida é o diurético mais reportado como adulterante em suplementos alimentares (BOGUZ *et al.*, 2006, HOGGAN *et al.*, 2007, GUO *et al.*, 2014). Outros diuréticos como furosemida, clortalidona, amilorida e hidroclorotiazida (Figura 8) já foram detectados, especialmente nos suplementos indicados para a perda de peso (BOGUZ *et al.*, 2006; CIANCHINO *et al.*, 2008; DECONINCK *et al.*, 2016; GOTO *et al.*, 2002, WOO *et al.*, 2013).

Figura 8: Estrutura química dos diuréticos



Fonte: BRUNTON *et al.*, 2012

II - 6. DETERMINAÇÃO DE ADULTERANTES EM SUPLEMENTOS ALIMENTARES

II - 6.1. Amostras

Os suplementos alimentares alvos de investigação são, geralmente, aqueles suspeitos de adulteração, tendo sido então apreendidos pelos órgãos de vigilância sanitária ou em abordagens policiais. Considerando a literatura, a maioria das amostras de suplementos alimentares reportados, são aqueles indicados para a perda de peso por serem os suplementos mais frequentemente adulterados. Dessa maneira, a maior parte dos trabalhos publicados não abordam a representatividade amostral dos suplementos consumidos pela população, à relevância em termos legais e de saúde pública, apenas o desenvolvimento de métodos analíticos capazes de determinar uma ampla gama de substâncias (NEVES; MARCHETI; CALDAS, 2015).

Portanto, para estipular a quantidade de suplementos alimentares que fossem representativas para formar o conjunto amostral desse estudo, foi utilizada a equação de Lemeshow *et al.* (1991). Segundo eles, a representatividade amostral é dada por meio da “estimativa amostral de precisão relativa”, especificada pela fórmula Equação 1.

$$n = \frac{z_{1-\alpha/2}^2 (1-p)}{\epsilon^2 p} \quad \text{Equação 1}$$

Onde:

n: tamanho da amostra estimada;

α : nível de confiança assumido em 95%;

z: área da curva z para os diferentes níveis de significância;

p: proporção esperada do evento; na ausência de dados sobre a prevalência de suplementos adulterados com as classes de fármacos em estudo, foi considerada uma estimativa de 50%, com erro relativo relativo(ϵ), de 10 %.

II - 6.2. Métodos de preparo de amostra

II-6.2.1. Extração Sólido-líquido

Um dos métodos mais simples de preparo de amostra para a detecção de adulterantes em amostras de suplementos alimentares são aqueles baseados na extração sólido-líquido, empregando como solvente extrator um solvente orgânico, *e.g.* metanol (MeOH) e acetonitrila (ACN) ou misturas aquosas (Quadro 5). Diclorometano e clorofórmio também já foram reportados como solventes extratores (BOGUSZ *et al.*, 2006; NEVES; CALDAS, 2017b). Na extração sólido-líquido, após a dissolução das substâncias no solvente apropriado, essas suspensões são agitadas, imersas em banho de ultrassom, centrifugadas e filtradas (CAVALCANTE *et al.*, 2013; HE *et al.*, 2014; KIM *et al.*, 2014; LIANG *et al.*, 2006; VAN POUCK *et al.*, 2007; THEVIS *et al.*, 2008; VIANA *et al.*, 2015; WOO *et al.*, 2013; YU *et al.*, 2010).

A extração dos analitos ocorre por meio da dessorção, solvatação e difusão dos compostos orgânicos da amostra sólida, permitindo a transferência para a solvente orgânico. Temperatura e agitação por meio de ultrassom facilitam a transferência dos analitos para a solução. A centrifugação e/ou filtração promove a separação do solvente extrator contendo os analitos da amostra.

Uma ampla gama de compostos orgânicos pode ser extraída de amostra sólida por meio da extração sólido líquido. Dessa maneira, não apenas as substâncias de interesse são extraídas, mas também diversas outras substâncias de diferentes polaridades que podem influenciar na determinação analítica. Para contornar esse efeito, etapas de limpeza do extrato por meio da extração líquido-líquido (LLE), extração em fase sólida (SPE) e/ou *Quechers* (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*), são geralmente utilizadas (LI *et al.*, 2012; ROCHA; AMARAL; OLIVEIRA, 2016; STEPAN; CUHRA; BARSOVA, 2008).

II-6.2.2. *Quechers*

O método *Quechers* foi desenvolvido para detecção de resíduos de praguicidas em alimentos (ANASTASSIADES *et al.*, 2003). É um procedimento baseado na mistura de ACN e água, e subsequentemente, na separação das fases pela adição de sais. A retenção de componentes polares ocorre na fase aquosa, enquanto que a dos compostos mais apolares na fase orgânica. PAIGA *et al.*, 2015 e Vaclavick, Krynitsky, Rader (2014) empregaram esse procedimento na extração de adulterantes, incluindo anorexígenos, estimulantes, laxantes, antidepressivos e ansiolíticos, além de toxinas e seus metabólitos de amostras de suplementos alimentares.

II - 6.3. Técnicas Analíticas utilizadas na determinação de adulterantes em suplementos alimentares

Durante muitos anos a cromatografia gasosa acoplada espectrometria de massa (GC-MS) foi o método de escolha para a análise de adulterantes em suplementos alimentares, especialmente de EAA. Para a detecção dessas substâncias, a etapa de derivatização se faz necessária e o agente derivatizante normalmente utilizado é o n-metil-n-trimetilsililtrifluoroacetamida (MSTFA) (BAUME *et al.*, 2006; CAVALCANTI *et al.*, 2013; HADEF *et al.*, 2008; LI *et al.*, 2012; PARR *et al.*, 2008; PARR *et al.*, 2009; PARR *et al.*, 2011a; PARR *et al.*, 2011b; PELEGRINI *et al.*, 2012; ROCHA; AMARAL; OLIVEIRA, 2016; STEPAN; CUHRA; BARSOVA, 2008).

Para a determinação de molécula apolares não voláteis, principalmente em amostras líquidas, a técnica de GC-MS vem sendo substituída pelas técnicas de cromatografia líquida, em especial pela cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa sequencial (LC-MS/MS), empregando a cromatografia em fase reversa. Além de dispensar a etapa de derivatização dos analitos não voláteis previamente à análise, as técnicas de espectrometria de massas sequenciais oferecem maior detectabilidade e confiabilidade aos resultados, sendo estabelecida pela

comunidade científica como técnica padrão para detecção e quantificação simultânea de substâncias em matrizes complexas (CHO *et al.*, 2014, CHO *et al.*, 2015; GUO *et al.*, 2014; HADEF *et al.*, 2008; HE *et al.*, 2014; KIM *et al.*, 2014; LIANG *et al.*, 2006; MARTELLO; FELLI; CHIAROTTI, 2007, VAN POUCK *et al.* 2007, SHI *et al.* 2011, WOO *et al.* 2013).

Nos últimos anos, análises de suplementos alimentares por meio de LC-MS/MS com analisadores de alta resolução, *i.e* analisador de tempo de voo (TOF) e *Orbitrap* têm sido empregadas na investigação de *designer* esteroides e de adulterantes emergentes. Essas técnicas permitem a identificação de estruturas químicas com alto nível de confiabilidade sem o uso de padrões analíticos (GUO *et al.*, 2014; KIM *et al.*, 2013; ODOARDI *et al.*, 2015).

Técnicas de espectrometria de massa baseadas na ionização ambiente que dispensam a separação prévia por técnicas cromatográficas e, em alguns casos, até mesmo a etapa de preparo de amostras, vêm sendo exploradas para detecção de adulterantes como a sibutramina e fenolftaleína em suplementos nutricionais (GUO *et al.*, 2014; LESIAK *et al.*, 2016; MENS *et al.*, 2013; PROKUDINA *et al.*, 2015; SONG *et al.*, 2014;).

Uma técnica mais acessível à LC-MS/MS é a cromatografia líquida de alta performance acoplada a detector de arranjo de diodos (HPLC-DAD). Essa técnica permite o *screening* e a determinação de várias substâncias em matrizes complexas presentes em concentrações no nível de $\mu\text{g.L}^{-1}$ a mg.L^{-1} , e tem sido utilizada na determinação de adulterantes em suplementos alimentares, como os diuréticos, a sibutramina, a cafeína, a fenolftaleína e os EAA (DECONINCK *et al.*, 2016; GONZALO-LUMBRELAS; IZQUIERDO-HORNILLOS, 2000; GOTO *et al.*, 2002; HOGAN *et al.*, 2007, WOO *et al.*, 2013). As limitações do HPLC-DAD são limites de detecção mais altos, a necessidade de análise confirmatória por técnicas mais específicas como GC/MS ou LC-MS/MS, e não permitir a identificação de análogos ou de novas substâncias ainda não conhecidas (LIU, WOO, KOH, 2001; WOO *et al.*, 2013).

O Quadro 5 resume as técnicas analíticas mais reportadas na literatura para análise de suplementos alimentares, juntamente com os métodos de extração e os adulterantes analitos detectados.

Quadro 5: Métodos de preparo de amostra e técnicas analíticas empregadas na determinação de adulterantes em suplementos alimentares

Analitos	Método de extração	Método de identificação	Referência
Esteroides anabolizantes	N-pentano	HPLC-DAD e GC-MS (confirmação)	COOK <i>et al.</i> , 2001
Sibutramina e análogos	Metanol	HPLC-DAD e LC-MS (confirmação)	HUANG <i>et al.</i> , 2008
Diuréticos	Metanol	HPLC-DAD e LC-MS/MS QQQ	WOO <i>et al.</i> , 2013
Cafeína	Metanol	HPLC-DAD e LC-MS/MS (confirmação)	VIANA <i>et al.</i> , 2018
Sibutramina e fenolftaleína	Metanol	LC-MS	WANG <i>et al.</i> , 2009
Decanoato de testosterona e cafeína	Metanol e diclorometano:isopropanol (9:1)	LC-MS/MS QQQ	BOGUSZ <i>et al.</i> , 2006
Esteroides anabolizantes	Metanol	LC-MS/MS QQQ	VAN POUCK <i>et al.</i> , 2007
Esteroides anabolizantes	Metanol:água (70:30)	LC-MS/MS QQQ	CHO <i>et al.</i> , 2015
Anorexígenos, estimulantes, ansiolíticos, antidepressivos e laxante	Quechers	LC-MS/MS QQQ	PAIGA <i>et al.</i> , 2017
Sibutramina e análogos	Metanol	LC-QTOF (identificação) e LC-MS/MS (quantificação)	ZOU <i>et al.</i> , 2007
Cafeína e sibutramina	Água	LC-QTOF (identificação) e LC-MS/MS (quantificação)	PASCALI <i>et al.</i> , 2018
Sibutramina	Metanol	UHPLC- LQT ORBITRAP (identificação e quantificação)	CHENG <i>et al.</i> , 2017

Esteroides anabolizantes	Metanol	GC-MS	NEVES; CALDAS, 2017a
Cafeína	Clorofórmio:água	GC-MS	NEVES; CALDAS, 2017b
Esteroides anabolizantes	N-pentano	GC-MS	DAHMANIA <i>et al.</i> , 2018
Sibutramina e fenolftaleína	Acetonitrila	Fluxo direto MS/MS (identificação) e LC-MS/MS (quantificação)	SONG <i>et al.</i> , 2014.
Sibutramina e fenolftaleína	Sem preparo de amostra	NMR	HACHEM <i>et al.</i> , 2016
Esteroides anabolizantes	Sem preparo de amostra	NMR e GC-MS (confirmação)	RIBEIRO <i>et al.</i> , 2018
Sibutramina e fenolftaleína	Acetonitrila e água (1:1)	Técnicas espectroscópicas e HPLC-DAD (quantificação)	ROONEY <i>et al.</i> , 2015
Sibutramina e análogos	Metanol	Difração de raios-X, LC-MS TOF e LC-UV	STYPUŁKOWSKA <i>et al.</i> , 2011.
Sibutramina	Sem preparo de amostra	Espectroscopia de infravermelho	DECONINCK <i>et al.</i> , 2014.

Fonte: Autoria própria

II - 7. OBJETIVOS

II - 7.1. Objetivo Geral

O objetivo geral deste trabalho foi estudar a ocorrência no nível de contaminação e adulteração de substâncias farmacologicamente ativas em amostras de suplementos alimentares comercializados no Brasil.

Considerando as informações obtidas na literatura, este trabalho teve como foco os suplementos alimentares mais consumidos no país, a base de proteínas, carboidratos e termogênicos, e a investigação de substâncias com efeitos farmacológicos estimulantes, diuréticos, laxantes e anabolizantes.

II - 7.2. Objetivos Específicos

- Determinar o número de amostras de suplementos alimentares a ser analisado, visando uma amostragem representativa;
- Coletar e analisar amostras de suplementos alimentares comercializados no Brasil quanto à contaminação ou adulteração por substâncias farmacologicamente ativas.
- Avaliar as técnicas do *Quechers* e extração sólido-líquido com precipitação de proteína como método de preparo de amostra para análise de suplementos alimentares.
- Desenvolver um método analítico baseado em HPLC-DAD para a determinação simultânea de substâncias farmacologicamente ativas nas amostras de suplementos alimentares.
- Desenvolver um método analítico baseado em LC-MS/MS para a confirmação de resultados positivos obtidos por HPLC-DAD no propósito deste estudo.
- Empregar um método analítico baseado em LC-MS/MS já estabelecido para a determinação de onze substâncias EAA nas amostras de suplementos alimentares, em parceria com o Hospital Israelita Albert Einstein.
- Avaliar os métodos analíticos propostos por meio dos parâmetros de validação analítica.
- Avaliar a ocorrência de substâncias farmacologicamente ativas em suplementos alimentares comercializados no Brasil;
- Avaliar a prevalência de casos de adulteração de suplementos alimentares no Brasil em comparação com o mundo.

Capítulo III - MATERIAIS E MÉTODOS

III - 1. PARTE EXPERIMENTAL

III - 1.1. Substâncias de interesse

As substâncias de interesse desses estudos foram aquelas relatadas na literatura como adulterantes em potencial de suplementos alimentares, para as quais padrões analíticos certificados e padrões primários foram obtidos para o desenvolvimento e validação do método analítico baseado em HPLC-DAD. A Tabela 1 mostra as substâncias de interesse deste estudo, seus efeitos farmacológicos, dose de efeito farmacológico (DE) e níveis de concentração em suplementos alimentares considerados como contaminação (CC) e como adulteração (CA):

Tabela 1: Substância adulterante, sua classe/efeito, dose de efeito, concentração considerada contaminação e concentração a ser considerada adulteração de efeito

Substância	Classe/Efeito	DE mg.g ⁻¹	CC mg.g ⁻¹	CA mg.g ⁻¹	Referências
Cafeína	Estimulante	10	1	10	ANVISA, 2010
Sibutramina		0,5	0,05	0,5	ANVISA, 1998
Amilorida Bumetamida	Diurético	0,1	0,01	0,1	Brunton <i>et al.</i> , 2012
Hidroclorotiazida, furosemida, clortalidona		1,5	0,15	1,5	Brunton <i>et al.</i> , 2012
Fenolftaleína	Laxante	10	1	10	Brunton <i>et al.</i> , 2012
Androstenediona, DHEA, trembolona, estanozolol, testosterona base, metiltestosterona, propionato de testosterona, decanoato de testosterona e decanoato de nandrolona.	Esteroides Anabolizantes / Ganho de massa muscular	0,1	0,1	1	Brunton <i>et al.</i> , 2012

Fonte: Autoria própria

III - 1.2. Reagentes e Padrões Analíticos

Os solventes utilizados neste estudo foram MeOH, ACN e água ultrapura (Milli-Q® Advantage A10® System – Merck, Darmstadt, Alemanha). MeOH e ACN foram obtidos da Merck (> 99.9%; Darmstadt, Alemanha). Sulfato de Magnésio, Ácido fosfórico, Ácido Fórmico também foram obtidos da Merck (> 99.9%; Darmstadt, Alemanha).

Padrões analíticos certificados da cafeína, difenilamina (Padrão Interno), sibutramina, bumetadina, hidroclorotiazida, furosemida, fenolftaleína e deidroepiandrosterona (DHEA), testosterona nas formas base e metil foram obtidos da Cerilant Corporation, Sigma-Aldrich (Round Rock, Texas, EUA). A amilorida, clortalidona, androstenediona, trembolona, estanozolol, propionato de testosterona, metasterona e oxandrolona foram obtidos da LGC® (Luckenwalde Germany).

Todos os padrões analíticos citados foram adquiridos na forma de solução em MeOH ou ACN, na concentração de 1 mg mL⁻¹. Além desses, o decanoato de testosterona foi obtido pela Australian Government National Measurement Institute e o decanoato de nandrolona da LGC (Luckenwalde Germany), ambos na forma de pó; soluções estoque na concentração de 1 mg mL⁻¹ foram obtidas por meio da dissolução dos respectivos padrões em pó com MeOH, e as soluções de trabalho, por meio da diluição da solução estoque com MeOH, conforme necessário. Todas as soluções estoques dos padrões analíticos foram armazenadas em congelador a -20°C.

Padrões de referência primária na forma de pó (*i.e.*, matéria prima empregada no preparo de formulações farmacêuticas) disponíveis no LAT-USP das substâncias cafeína, testosterona, metiltestosterona, clortalidona, furosemida, hidroclorotiazida e fenolftaleína foram empregadas em ensaios preliminares e em ensaios comparativos, visando a minimização de uso de padrões analíticos certificados. Soluções estoques de cada padrão de referência primário foram preparadas a partir da dissolução com MeOH a 1 mg mL⁻¹ e, posteriormente, foram armazenadas em congelador a -20°C. As soluções de trabalho foram obtidas diluindo a concentração inicial para 100 µg mL⁻¹ com MeOH e mantidas em congelador a -20°C.

Para uso, as soluções eram retiradas do congelador conforme necessário e diluídas com a solução da fase móvel do sistema cromatográfico.

III - 2. AMOSTRAS

As amostras de interesse deste trabalho foram os suplementos alimentares utilizados pela população brasileira de um modo geral, sem qualquer suspeita de adulteração, constituídos por diferentes formulações e indicados para diferentes fins.

III - 2.1. Coleta das amostras

Amostras de suplementos alimentares nas apresentações pó, cápsulas ou tabletes foram obtidas em lojas físicas especializadas em suplementos dos estados de São Paulo, Paraíba e Rio Grande do Norte e em lojas virtuais via internet. Estas amostras foram encaminhadas ao LAT-FCF/USP para o processamento e análise.

III - 2.2. Conjunto amostral

A fim de obter um conjunto amostral representativo dos produtos comercializado no país, estimou-se o número de amostra a ser analisado por meio da “estimativa amostral de precisão relativa”, especificada pela Equação 1. Na ausência de dados sobre a prevalência de suplementos adulterados com as classes de fármacos em estudo, foi considerada uma estimativa de 50%, com erro relativo(ϵ), de 10 %.

III - 3. EQUIPAMENTOS:

III - 3.1. Determinação por HPLC-DAD

Para o desenvolvimento do método analítico empregando HPLC-DAD utilizou-se um cromatógrafo líquido constituído de bomba quaternária, acoplado a detector de arranjo de diodo (Série 2030LC 3D / Shimadzu, Japão). A cromatografia em fase reversa foi realizada empregando coluna analítica Luna C18 (250 mm x 4,6 mm, ID, 5 μ m) (Phenomenex, Torrance, CA), com pré-coluna C18 4,0 x 3,0 mm (Phenomenex, Torrance, CA). Os dados processados foram analisados pelo software Labsolutios® MultiPDA (Shimadzu, Japão).

III - 3.2. Determinação por LC-MS/MS

Os analitos detectados por HPLC-DAD foram confirmados por LC-MS/MS. Para tal, empregou-se um cromatógrafo líquido constituído de bomba quaternária modelo Acquity System, acoplado a analisador triplo quadrupolo *Quattro Premier*, ambos da (Waters Corporation, Milford, MA) e sistema de ionização dos analitos por *eletrospray* (ESI). A

separação cromatográfica dos foi realizada em coluna analítica Acquity UPLC BEH C18 (2,1 mm x 100 mm, ID 1,7 µm) (Waters Corporation, Milford, MA).

O método desenvolvido para determinação dos EAA baseou-se no emprego da técnica LC-MS/MS, utilizando um LC modelo Infinity 1290 Agilent Technologies, Santa Clara, California, EUA), com coluna Kinetex C18 (Phenomenex, Torrance, CA), (100 mm; 3,0 mm; 2,6 µm), acoplado ao espectrômetro de massa triplo quadrupolo com ionização química à pressão atmosférica (*atmospheric pressure chemical ionization* - APCI), ABSciex, pertencente ao Hospital Israelita Albert Einstein – São Paulo.

III - 4. MÉTODOS ANALÍTICOS

III - 4.1. Método de preparo de amostra

Considerando a complexidade da matriz de amostras de suplementos alimentares, foram avaliados diferentes métodos de preparo de amostra no propósito de minimizar a presença de interferentes e de partículas em suspensão. Os métodos *Quechers* e extração sólido-líquido seguido de precipitação de proteína empregando Zn₂SO₄ foram avaliados.

A escolha do método de preparo de amostras foi baseada nos testes de recuperação de extração, o qual foi avaliado no nível da Concentração de Contaminação (Tabela 2), considerando o nível de concentração dos analitos para o qual o efeito matriz torna-se mais evidente.

Tabela 2: Concentrações das substâncias utilizadas nos testes

Analito	Concentração de contaminação (µg.g ⁻¹)
Cafeína e Fenoltaleína	1000
Testosterona e Metiltestosterona	100
Furosemida Hidroclorotiazida	150
Difenilamina (PI)	100

Fonte: Autoria própria

A seguir serão descritos os protocolos adotados para os métodos de preparo de amostra propostos.

III-4.1.1. *Quechers (adaptado)*

O protocolo de *Quechers* proposto baseou-se no método desenvolvido por Anastassiades *et al.* (2003) para determinação de resíduos de pesticidas em alimentos. Uma alíquota de 500 mg de uma amostra de suplemento alimentar foi pesada em um tubo Falcon® com capacidade para 50 mL. Ao suplemento, adicionou-se 1 mL da solução contendo os analitos de interesse para obtenção da concentração da Tabela 2, e adicionados 4 mL de ACN. A solução foi agitada durante 1 minuto em agitador multi-tubo (modelo VX-2500, VWR, EUA). Na etapa de partição (efeito *salting out*), foram adicionados 200 mg de MgSO₄ e 50 mg de NaCl; a solução foi novamente agitada em agitador multi-tubo durante 1 minuto e centrifugada a 4000 rpm, usando centrífuga modelo 5702, Eppendorf, Alemanha, por 10 minutos. Na etapa final de limpeza, denominada extração em fase sólida dispersiva, 1 mL do sobrenadante foi transferido para um tubo de centrífuga de 10 mL, e foram adicionados 150 mg de MgSO₄ e 25 mg de PSA (amina primária secundária). Em seguida, repetiu-se novamente o procedimento de agitação e centrifugação. Por fim, 10 µL do sobrenadante foi coletada e injetada no HPLC-DAD.

III-4.1.2. *Extração sólido-líquido seguida de precipitação de proteína*

Uma alíquota de 500 mg de uma amostra de suplemento nutricional foi pesada utilizando balança analítica em um tubo Falcon® com capacidade para 50 mL. Posteriormente, foram adicionados 1 mL da solução contendo os analitos de interesse (Tabela 2) e 4 mL do solvente extrator (MeOH ou ACN). A solução foi agitada em agitador multi-tubo durante 1 minuto, levada ao banho de ultrassom durante 30 minutos. Após agitação, a solução foi levada à centrifugação a 3000 rpm durante 5 minutos, obtendo-se assim a Solução 1. Após a agitação e a centrifugação, 500 µL da Solução 1 foram transferidos para um tubo Falcon® com capacidade para 15 mL e, em seguida, foram adicionados 50 µL de uma solução de Zn₂SO₄ 100 mg mL⁻¹. A solução foi agitada por 1 minuto em agitador multi-tubo e centrifugada a 3000 rpm durante 5 minutos (Solução 2). A Solução 2 foi retirada e filtrada com filtro de fluoreto de polivilideno (PVDF) de 0,22 µm. Dessa solução, 10 µL foram injetados no HPLC-DAD.

III - 4.2. Métodos cromatográficos para determinação de adulterantes em suplementos alimentares

III-4.2.1. Método cromatográfico baseado em HPLC-DAD

Para a separação cromatográfica por HPLC-DAD utilizou-se como fase móvel uma solução aquosa de ácido fosfórico (0,09%, v/v) como fase aquosa (Solução A) e ACN como fase orgânica (Solução B). A coluna foi mantida a 25 °C e vazão a 1,0 mL.min⁻¹. Um gradiente de eluição cromatográfica foi empregado para a separação das substâncias de interesse: 0 – 1 min, 15% de B; 1 – 7 min, 15 a 50% de B; 7 – 19 min, 50% de B; 19-21 min, 50-98% de B; 21-43 min, 98% de B; 43 – 46 min, 98 – 15% de B; e 46 – 50 min, 15% de B. O tempo total para separação das 17 substâncias e estabilização da coluna analítica foi de 55 minutos.

A detecção por DAD foi realizada entre 190 a 400 nm, sendo que a leitura dos picos cromatográficos foi realizada a 198 nm, 220 nm, 240 nm, 280 nm e 340 nm, considerando todas as substâncias de interesse.

Foram avaliados o MeOH e a ACN como fase orgânica, e água ultrapura, ácido acético 0,1% (pH 2), ácido fórmico 0,1% (pH 2) e ácido fosfórico 0,09% (pH 3) como fase aquosa. A separação cromatográfica foi avaliada mantendo a coluna analítica a 25, 30 e 40°C e empregando diferentes valores para a vazão da fase móvel: 0,5, 0,8 e 1 ml min⁻¹.

III-4.2.2. Método cromatográfico para confirmação de resultados positivos obtidos por HPLC-DAD, baseado em LC-MS/MS

A cromatografia foi realizada empregando como fase móvel uma solução aquosa de ácido fórmico (0,1%, v/v) (Solução A) e como fase orgânica ACN com ácido fórmico (0,1%, v/v) (Solução B). A coluna foi mantida a 40 °C e a vazão 0,4 mL.min⁻¹. O gradiente de eluição cromatográfica utilizado para a separação cromatográfica foi 0 – 1 min, 5% de B; 1 – 3,5 min 5% - 100% de B; 3,5 a 4,5 min, 100% de B; 4,5 – 4,51, 100% - 5% de B; 4,51 – 5,0 min 5% de B.

Com o objetivo de identificar o íon molecular e os íons qualificadores, foi realizada a infusão individual dos padrões analíticos na concentração de 100 ng mL⁻¹ no espectrômetro de massas equipado com a fonte de ionização por *electrospray* com modo de aquisição de varredura por Monitoramento de Reações Múltiplas (MRM). As amostras de suplementos

alimentares processadas e analisadas por HPLC-DAD foram diluídas 1:200 na fase móvel e 20 µL injetados no LC-MS/MS.

III-4.2.3. Método Cromatográfico para determinação de EAA em suplementos alimentares baseado em LC-MS/MS

Para a separação cromatográfica dos EAA utilizou-se um gradiente de eluição cromatográfica empregando água ultrapura (Solução A) e MeOH (Solução B). A coluna foi mantida a 45 °C e a vazão a 0,55 mL.min⁻¹. O gradiente de eluição cromatográfica empregado para separação adequada dos onze EAA foi 0 – 0,1 min, 50% de B; 0,1 – 3 min, 50 a 60% de B; 3,01 – 7,5 min, 60 - 85% de B; 7,51-7,7 min, 85 - 95% de B; 7,71 – 11 min, 95 – 50% de B; 11,01 - 14 min, 50% de B.

III - 4.3. Avaliação dos Métodos Analíticos propostos para determinação de adulterantes em suplementos alimentares

Os métodos analíticos para determinação de adulterantes em suplementos alimentares foram validados de acordo com o guia nacional da ANVISA, do INMETRO e dos guias internacionais *Guidance for Industry* e *Guidelines for Dietary Supplements and Botanicals*. Os parâmetros de validação estabelecidos foram: seletividade, recuperação, limite de detecção e quantificação, linearidade, exatidão, precisão, efeito matriz e integridade de diluição (ANVISA 2003; AOAC, 2013; FDA, 1996; INMETRO, 2016).

III-4.3.1. Seletividade

É a capacidade que um método tem de medir exatamente a resposta para vários analitos em presença de outros tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz (ANVISA, 2003).

Para o estudo da seletividade optou-se por utilizar todos os tipos de suplementos alimentares que compõe o conjunto amostral obtido. Sendo assim, 10 amostras de suplementos alimentares, sendo 4 amostras de suplementos à base de proteínas do leite, 3 à base de carboidratos e 3 à base de aminoácidos que se mostraram isentas dos analitos de interesse em análise prévia pelo método proposto foram selecionadas para esse ensaio. Os analitos de interesse foram adicionados às amostras após o procedimento de extração sólido-líquido e então injetadas dos cromatógrafos líquidos.

III-4.3.2. Recuperação

A recuperação refere-se à eficiência da extração de um método analítico, dentro dos limites de variabilidade (ANVISA, 2003). A avaliação da recuperação do procedimento de preparo de amostra selecionado foi realizada comparando os resultados obtidos a partir de amostras de suplementos alimentares adicionadas das substâncias de interesse e, posteriormente, submetidos ao procedimento de preparo de amostra (área na matriz pré-extração), com os resultados obtidos a partir da adição dos analitos após o procedimento de preparo de amostra (área na matriz pós-extração) (Equação 2).

$$\text{Rec. (\%)} = \frac{\text{área na matriz pré-extração}}{\text{área na matriz pós extração}} \times 100 \quad \text{Equação 2}$$

O ensaio de recuperação foi realizado pela adição de 5 mg dos analitos na forma de pó a 500 mg de amostra de suplemento alimentar. Os suplementos foram homogeneizados e reservados por 24 horas.

III-4.3.3. Efeito Matriz:

É o efeito dos componentes da matriz na resposta analítica (ANVISA, 2003). A análise desse parâmetro para o método por HPLC-DAD foi avaliado por meio da construção de cinco curvas analíticas, uma preparada na ausência da matriz e as demais na presença de três diferentes matrizes de suplementos alimentares (proteína do leite, carboidrato, aminoácidos), entre 10, 30, 50, 80, 100 e 120 µg/g para os 10 analitos de interesse e de 100 µg/g para o PI. O efeito matriz (aumento ou supressão do sinal) foi calculado de acordo com a Equação 3, por meio da razão entre o coeficiente angular da curva analítica na presença das matrizes (CA_m) e o coeficiente angular da curva analítica com o solvente (CA_s) (ECONOMOU et al., 2009).

$$\text{Efeito Matriz (\%)} = 100 \times \left(1 - \frac{\text{CA}_m}{\text{CA}_s} \right) \quad \text{Equação 3}$$

O estudo do efeito matriz para LC-MS/MS foi realizado observando a supressão ou potencialização iônica dos analitos tanto infundidos diretamente no espectrômetro de massas após adição das matrizes (KUSHNIR, 2011). Para tanto foram utilizadas 10 diferentes matrizes.

III-4.3.4. Precisão

A precisão de um método analítico é expressa em termos de repetitibilidade e precisão intermediária. A repetibilidade, ou precisão intradia, é a concordância entre os resultados dentro de um curto período de tempo, com o mesmo analista e a mesma instrumentação, enquanto a precisão intermediária (precisão interdía) define a habilidade do método em fornecer os mesmos resultados quando as análises são conduzidas no mesmo laboratório, mas em diferentes dias (ANVISA, 2003).

As precisões intra e inter-dia foram avaliadas por meio da determinação do coeficiente de variação (CV%) das áreas relativas (razão entre área absoluta do analito e a área absoluta do padrão interno) exibido entre as replicatas (n=6) preparadas a uma mesma concentração em três dias. Os resultados obtidos foram avaliados pela análise de variância (ANOVA) usando “dia” como variável agrupadora. Foram considerados satisfatórios os valores de coeficiente de variação menor que 20% para controle baixo e 15% para controles médio e alto.

III-4.3.5. Exatidão

A exatidão de um método analítico é a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro (ANVISA 2003). A exatidão do método deve ser determinada após o estabelecimento da linearidade, sendo verificada a partir de no mínimo 9 determinações contemplando o intervalo linear, ou seja, 3 concentrações, baixa, média e alta, com 3 réplicas cada. A exatidão é expressa pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente (ANVISA, 2003).

III-4.3.6. Integridade de diluição

Para avaliar a integridade de diluição das amostras de suplementos alimentares, foram preparadas amostras fortificadas em duas concentrações: 10 mg.g⁻¹ e 100 mg.g⁻¹. A primeira concentração foi diluída em fase móvel na razão 1:10 e a segunda 1:20. As amostras de diluição foram analisadas em seis replicatas e quantificadas por meio da curva de calibração preparada no mesmo dia.

III-4.3.7. Uniformidade amostral

Para avaliar se a alíquota da amostra coletada tem representatividade amostral, 10 porções de 500 mg de uma mesma amostra foram coletadas aleatoriamente de um suplemento alimentar de proteína do leite positivo para cafeína. As 10 alíquotas foram processadas e analisadas. A representatividade amostras foi avaliada em termos do CV (%) entre elas.

III-4.3.8. Limites de Detecção e Quantificação

O limite de detecção (LOD) é a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado, porém não necessariamente quantificado, sob as condições experimentais estabelecidas. O LOD foi estabelecido pelo método empírico, ou seja, por meio da análise de soluções de concentrações conhecidas e decrescentes do analito, até o menor nível detectado (ANVISA 2003, INMETRO 2016). As substâncias foram adicionadas em concentrações decrescentes, em triplicata, até a menor concentração passível de ser detectada. Essa detecção foi baseada pelo pico no tempo de retenção relativo de cada analito e pela visualização do seu espectro de absorção.

O limite de quantificação (LOQ) é a menor quantidade do analito que pode ser quantificada com precisão e exatidão (ANVISA 2003, INMETRO 2016). Esse parâmetro também foi determinado pelo método empírico, com análise das concentrações decrescentes das substâncias até menor valor quantificável com exatidão e precisão.

III-4.3.9. Linearidade

A linearidade é a capacidade de uma metodologia analítica de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado (ANVISA, 2003).

Para avaliar a linearidade do método analítico, as substâncias de interesse foram adicionadas em intervalos espaçados de concentração desde a concentração estabelecida como LOQ até 100% da sua concentração de efeito, considerando cinco níveis de concentrações, com cinco replicatas para cada concentração (soluções preparadas em MeOH). Um coeficiente de determinação (r^2) superior a 0,99 foi considerado (ANVISA 2003; FDA, 1996). O fenômeno da heterossedasticidade avaliada através da distribuição F.

Capítulo IV - RESULTADOS E DISCUSSÃO

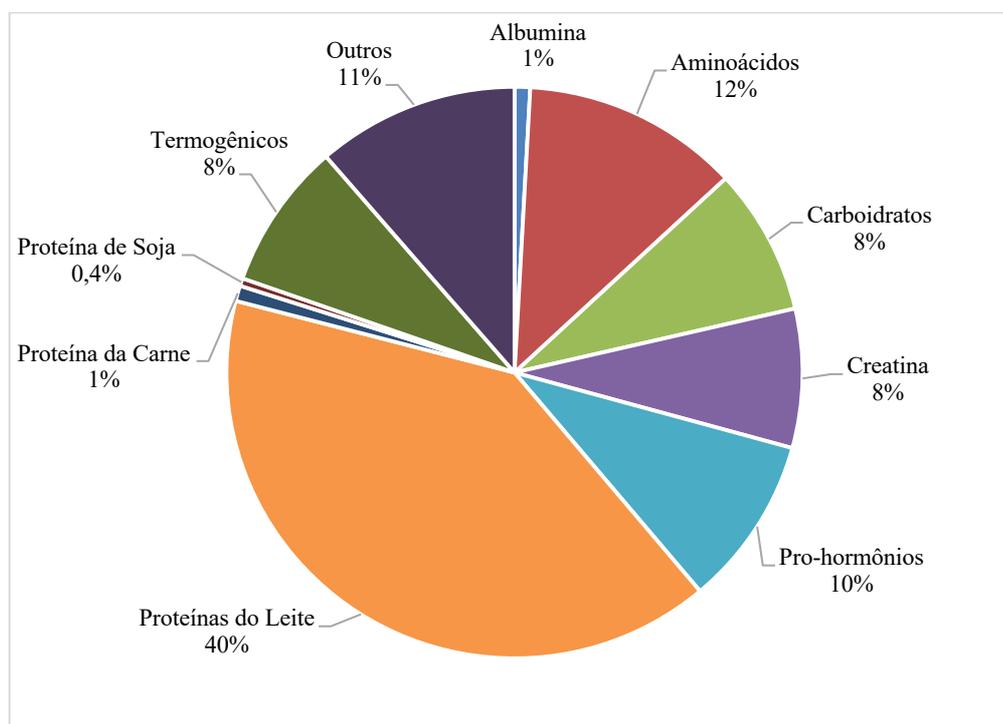
IV - 1. CONJUNTO AMOSTRAL

As amostras foram adquiridas por meio de doações recebidas por usuários de suplementos alimentares praticantes de atividade física regularmente, e pela aquisição de produtos em lojas físicas especializadas em suplementos alimentares de diversas partes do estado de São Paulo, Rio Grande do Norte e Paraíba, além da aquisição de produtos em lojas virtuais. As amostras adquiridas em lojas físicas e virtuais foram selecionadas de acordo com as seguintes indicações de uso: i) ganho de massa muscular, ii) redução de fadiga, iii) emagrecimento e iv) melhora no condicionamento físico.

Ao todo, 230 amostras de suplementos alimentares foram adquiridas, as quais formaram o conjunto amostral de interesse deste estudo. De acordo com a Equação 1, baseando-se na estimativa de 50% de amostras positivas, a quantidade estatisticamente relevante seria de 96 amostras. Portanto, a quantidade de amostras analisadas ultrapassou o valor proposto, representando um conjunto amostral representativo dos suplementos consumidos pela população brasileira.

O conjunto amostral foi constituído de amostras de suplementos alimentares na forma de pó, cápsulas ou tabletes, e de formulações variadas, tais quais: albumina (02), aminoácidos (28), carboidratos (20), creatina (18), outros (26), pró-hormônio (22), proteína da carne (2), proteína do leite (92), proteína vegana (01) e termogênicos (19). As amostras classificadas como “Outros” englobam os produtos à base de trébol, colágeno, óleo de cártamo, multivitamínicos, espirulina e magnésio. A Figura 9 mostra a prevalência de cada tipo de suplemento correspondente ao conjunto amostral a ser estudado.

Figura 9: Prevalência dos tipos dos suplementos alimentares selecionados para estudo

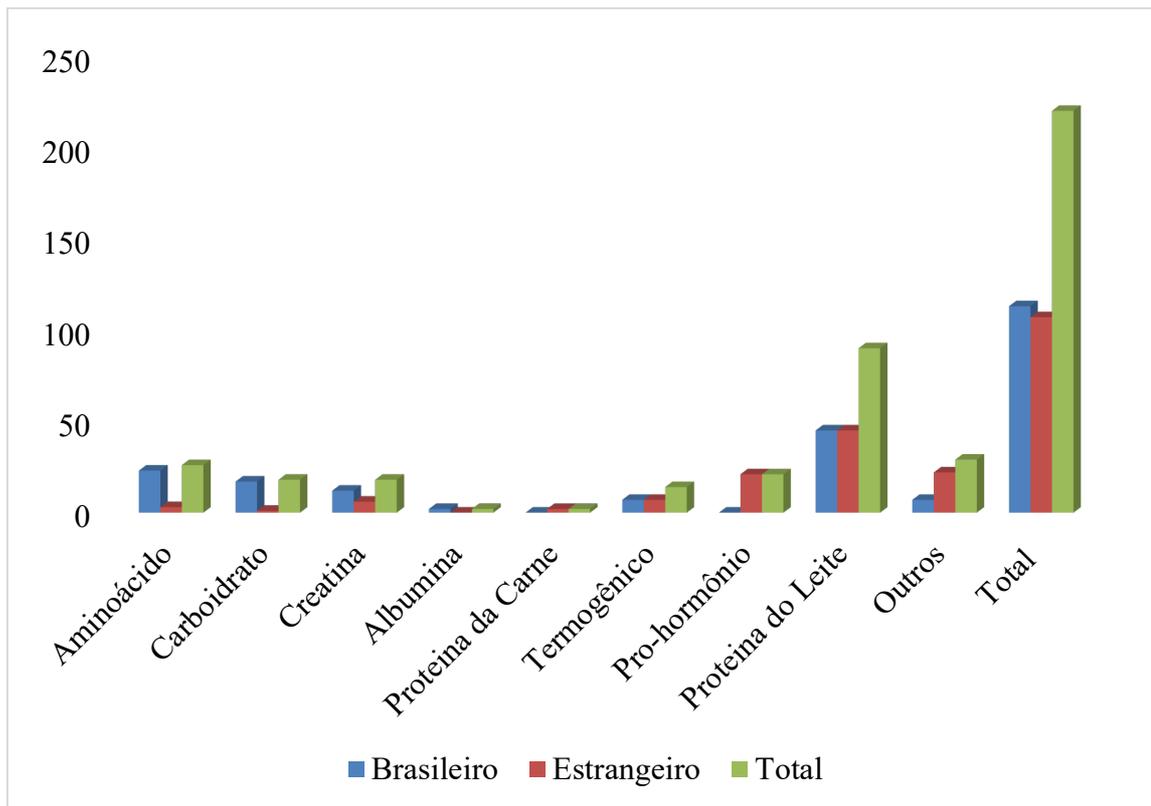


Fonte: Autoria própria

De acordo com o gráfico da Figura 9, a proteína do soro do leite ou *whey protein* foi o suplemento alimentar mais coletado, correspondendo a 40% do total analisado. Esses dados corroboram com os estudos realizados por Scheinder *et al.* (2012) e Bertoleti, Santos e Benetti (2016) para a mesma população em estudo, ou seja, praticantes de atividades físicas, os quais encontraram valores de 40% para a proteína do leite e 56% para proteínas e aminoácidos, respectivamente. De acordo com Rocha, Amaral e Oliveira (2016), os suplementos alimentares mais consumidos pelos frequentadores de academia foram *whey protein*, seguido por aminoácidos e creatina.

Com relação a procedência dos suplementos alimentares analisados, 56% são de origem brasileira (Figura 10), e dos 44% de origem estrangeira, 93% são provenientes dos EUA. Os demais são originários da Austrália, Canadá, Espanha e Alemanha. Dados de apreensões realizados pela Polícia Federal, detectaram menos adulterações em produtos de origem brasileira. Corroborando com esses dados, Neves e Caldas (2017b) analisaram 213 amostras apreendidas das quais apenas 1 era de origem brasileira, as demais originárias dos EUA. O mesmo grupo de pesquisadoras analisou 3676 esteroides anabolizantes adulterados e/ou falsificados, sendo nesse caso aproximadamente 35% de fabricação paraguaia e apenas 14,3% brasileira (NEVES; CALDAS, 2013).

Figura 10: Origem dos suplementos alimentares utilizados nesse estudo



Fonte: Autoria própria

IV - 2. MÉTODO ANALÍTICO BASEADO EM HPLC-DAD E CONFIRMAÇÃO POR LC-MS/MS

A seguir serão apresentados os resultados obtidos no desenvolvimento do método analítico baseado em HPLC-DAD e confirmação por LC-MS/MS para determinação das 19 substâncias farmacologicamente ativas em amostras de suplementos alimentares. Será abordado, ainda, os resultados obtidos para a análise do conjunto amostral de suplementos alimentares comercializados no Brasil, obtidos quanto à contaminação e adulteração por meio das substâncias alvos deste estudo.

IV - 2.1. Desenvolvimento do método analítico por HPLC-DAD

IV-2.1.1. Espectro de UV e seleção do comprimento de onda para identificação das substâncias adulterantes

A identificação do espectro de UV e a seleção do comprimento de onda específico para cada substância de interesse é imprescindível em HPLC-DAD, pois é por meio desses parâmetros que é realizada a identificação de substâncias orgânicas em amostras distintas. Das 19 substâncias analisadas, apenas a metasterona e a oxandrolona não foram identificadas por esse método uma vez que não apresentam grupos cromóforos em suas moléculas. Portanto a Tabela 3 relaciona os 17 analitos analisados juntamente com o PI e seus respectivos comprimento de onda.

Tabela 3. Comprimento de onda dos 17 analitos e Padrão Interno

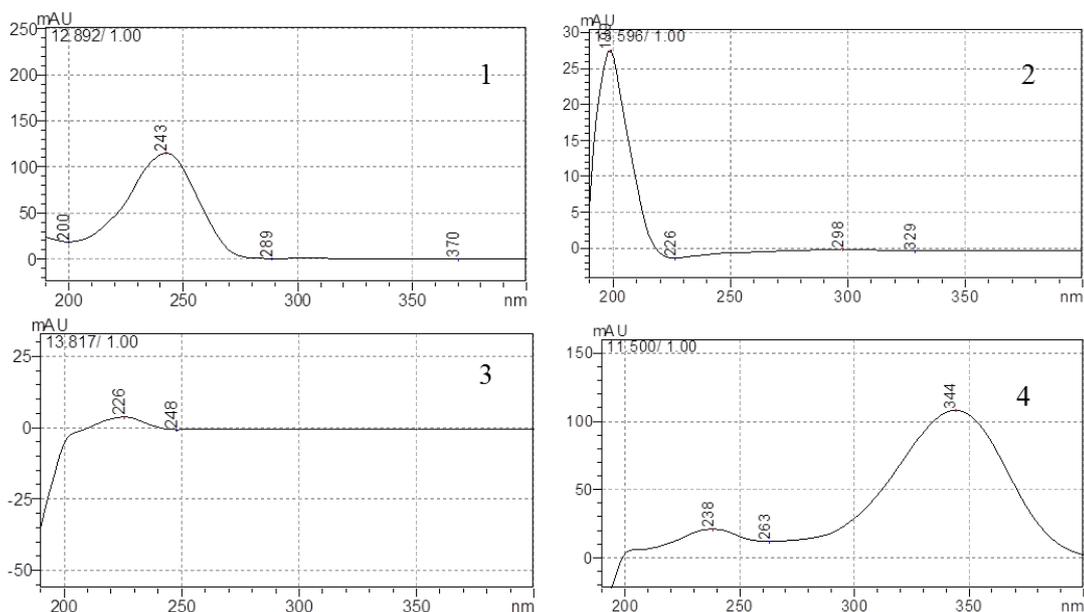
Analito	Comprimento de Onda (nm)
Amilorida	340
Cafeína	280
Hidroclotiazida	220
Clortalidona	220
Estanozolol	240
Sibutramina	220
Furosemida	220
Fenolftaleína	220
Trembolona	340
Testosterona Base	240
Bumetanida	220
Metiltestostetona	240
DHEA	198
Androstenediona	240
Difenilamina (PI)	280
Propionato de Testosterona	240
Decanoato de Testosterona	240
Decanoato de Nandrolona	240

Fonte: Autoria própria

O espectro de UV para cada substância de interesse foi obtido a partir da análise uma solução de padrão analítico a $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ em MeOH de cada adulterante preparada individualmente.

A Figura 11 mostra o espectro de absorção no ultravioleta para as substâncias EAA.

Figura 11: Espectros de absorvância dos esteroides anabolizantes obtidos no intervalo de 200 a 400 nm. 1- Testosterona, metiltestosterona, propionato de testosterona, decanoato de testosterona, decanoato de nandrolona e androstenediona; 2- DHEA; 3- Estanozolol e 4- Trembolona

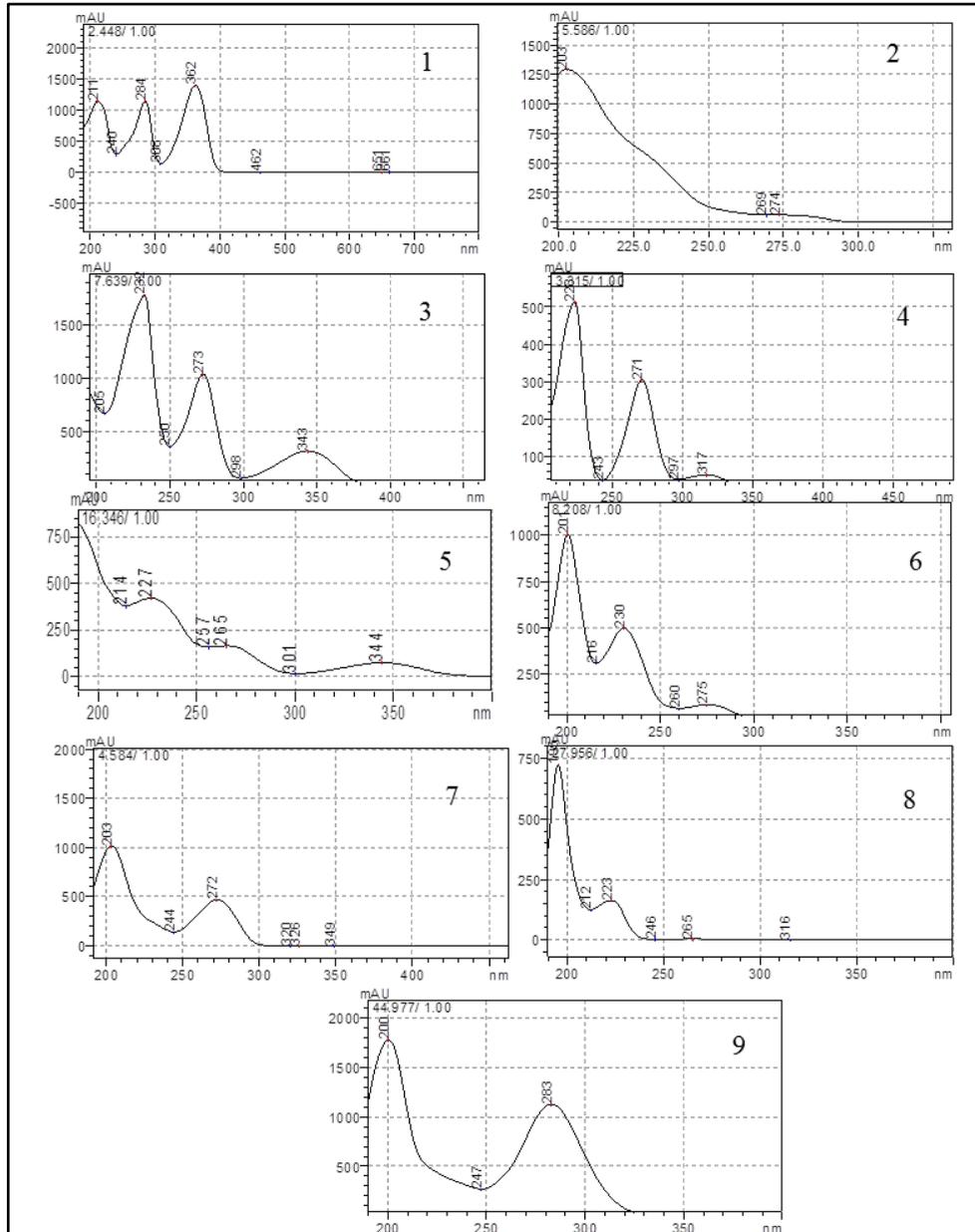


Fonte: Autoria própria

A Figura 11.1 mostra o espectro de UV típico obtido para a maioria dos EAA, cuja absorção máxima ocorre em 240 nm. Exemplo desses EAA são a testosterona, a metiltestosterona, o propionato de testosterona, o decanoato de testosterona, a nandrolona e a androstenediona. Os demais esteroides anabolizantes apresentam picos de absorção máxima em comprimentos de onda distintos: DHEA em 198 nm (Figura 11.2) o estanozolol em 223 nm (Figura 11.3) e a trembolona em 340 nm (Figura 11.4)

A Figura 12 mostra os espectros de absorvância para cafeína, sibutramina, diuréticos (amilorida, bumetanida, clortalidona, furosemida, hidroclorotiazida), fenolftaleína. A Figura 12.9 mostra o espectro de absorção característico para a difenilamina, substância utilizada como padrão interno.

Figura 12: Espectros de absorvância das substâncias obtidos no intervalo de 200 a 400 nm 1- Amilorida; 2- Clortalidona; 3- Furosemida; 4- Hidroclorotiazida; 5- Bumetanida ; 6- Sibutramina ; 7- Cafeína ; 8- Fenolftaleína 9- Difenilamina (PI).



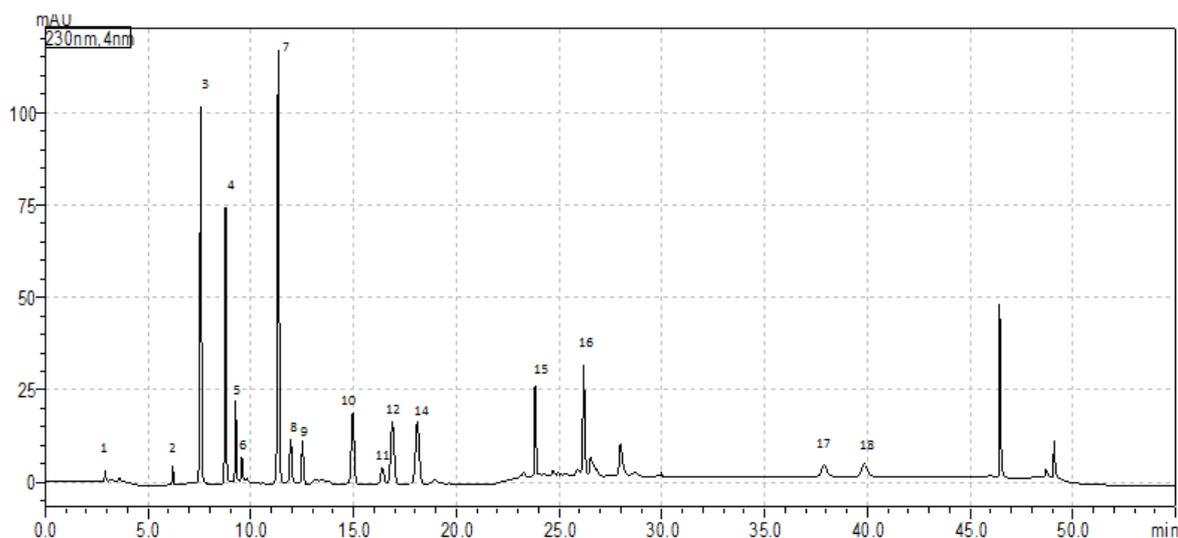
Fonte: Autoria própria

Uma vez selecionado os comprimentos de onda específicos para cada substâncias de interesse, um gradiente de eluição cromatográfico foi otimizado para a determinação simultânea das 17 substâncias por HPLC-DAD.

A otimização do método cromatográfico para a separação analítica das substâncias adulterantes foi baseada na escolha da fase móvel, no gradiente de eluição, na vazão da fase móvel e na temperatura da coluna analítica. A Figura 13 mostra a separação cromatográfica

das 17 substâncias de interesse, detectadas a 230 nm, obtida após o ajuste do gradiente de eluição e das condições cromatográficas

Figura 13. Separação cromatográfica para 1-Amilorida (RT 2.9 min); 2- Cafeína (RT 6.2 min); 3- Hidroclorotiazida (RT 7.5 min); 4- Clortalidona (RT 8.7 min); 5- Estanozolol (RT 9.2 min); 6- Sibutramina (RT 9.5 min); 7- Furosemida (RT 11.3); 8- Fenolftaleína (RT 11.9 min); 9- Trembolona (RT 12.6 min); 10- Testoterona Base (RT 14.9 min); 11 – Bumetanida (RT 16.4); 12- Metiltestosterona (RT 16.9); 14 – Androstenediona (RT 18.0 min); 15 – Difenilamina / DFA (PI) (RT 23.8 min); 16 – Propionato de testosterona (RT 26.2 min); 17- Decanoato de Testosterona (RT 37.8 min); 18 – Decanoato de Nandrolona (RT 39.8 min). Fase móvel A: ácido fosfórico 0,09% e fase móvel B: acetonitrila, a vazão constante de 1mL/min, e 25°C. Volume de injeção 10 µL e detecção em 230 nm. Todos as substâncias estão na faixa de concentração de contaminação e a Difenilamina (PI)

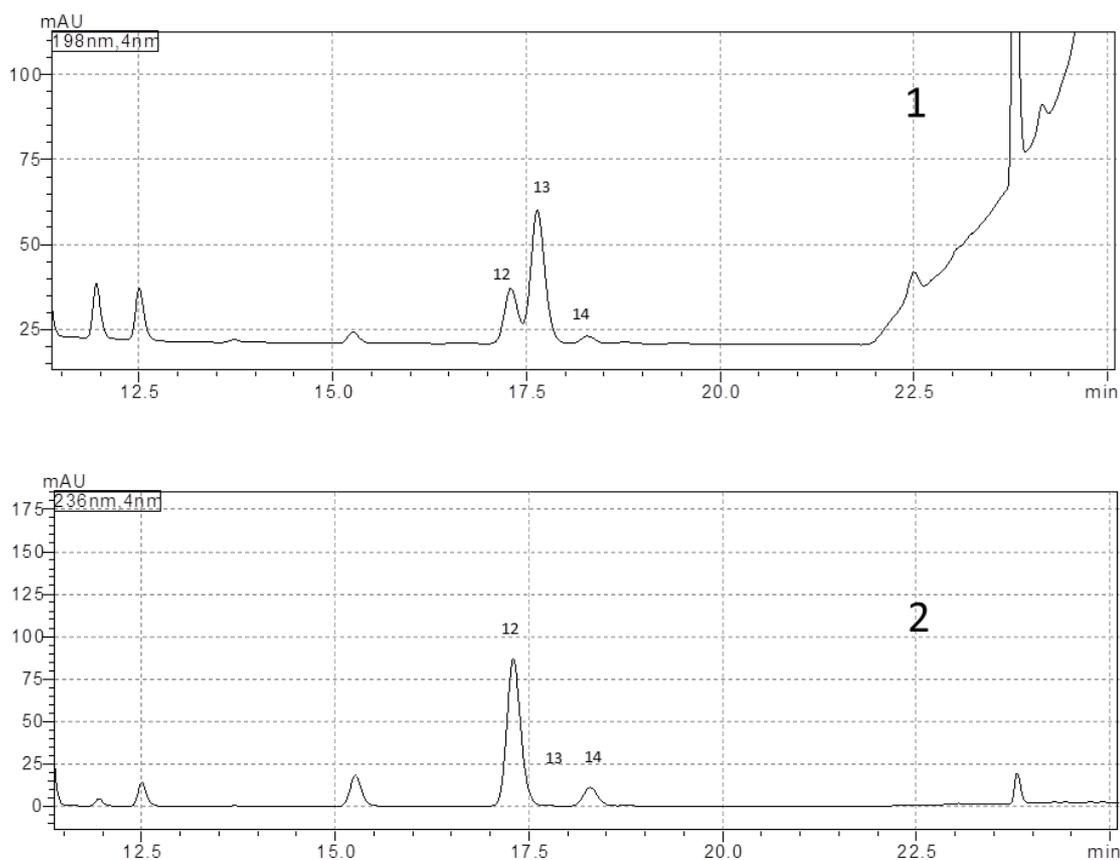


Fonte: Autoria própria

Dentre os parâmetros avaliados, ao se utilizar ACN e ácido fosfórico 0,09% como fase móvel e mantendo a temperatura da coluna e vazão da fase móvel a 25°C e 1 ml min⁻¹, respectivamente, foi possível a separação das 17 substâncias com picos cromatográficos bem resolvidos. Cada pico cromatográfico apresentado na Figura 13, corresponde a uma das substâncias de interesse, as quais foram identificadas de acordo com seu espectro de absorção no ultravioleta.

A Figura 14 mostra a comparação entre os cromatogramas obtidos ao se monitorar o comprimento de onda 236 e 198 nm (detecção da DHEA).

Figura 14: Comparação dos cromatogramas com comprimento de onda 198nm e 236nm. 12- Metiltestosterona; 13 – DHEA; 14- Androstenediona. Substâncias na CE (Tabela 1).



Fonte: Autoria própria

No cromatograma extraído em 198 nm (Figura 14.1) é possível visualizar um pico intenso em 17.6 min., referente ao DHEA, enquanto que um pico pouco intenso é observado em 16.4 min. No cromatograma extraído em 236 nm (Figura 14.2), observa-se a ausência de pico referente ao DHEA e um pico cromatográfico mais intenso referente a metiltestosterona. A diferença no comprimento de onda de absorção máxima entre o DHEA (198 nm) e a metiltestosterona (240 nm) permitiu a identificação desses dois analitos empregando o método de gradiente de eluição cromatográfico proposto.

IV-2.1.2. Método de preparo de amostra para a determinação de adulterantes por HPLC-DAD

Um dos grandes desafios para desenvolvimento de método para detecção de adulterantes em suplementos alimentares é indisponibilidade de uma amostra padrão para a realização dos ensaios de validação analítica. Os suplementos alimentares não possuem uma composição padrão, cada produto apresenta composição estrutural distinta dependendo do fabricante e do objetivo a ser alcançado, melhora no desempenho, ganho de massa muscular ou perda de peso, por exemplo. Dessa maneira, a seleção adequada de uma amostra que seja representativa do conjunto de amostras de suplementos alimentares para o estudo e validação do método analítica é uma etapa crucial no desempenho do método analítico.

De acordo com Song *et al.* (2014), quando um grande número de diferentes tipos de suplementos alimentares deve ser analisado, é sugerido que os ensaios de otimização e de validação do método analítico seja realizado naquela amostra mais representativa do conjunto amostral obtido.

Os ensaios de otimização e validação do método analítico descritos a seguir foram realizados utilizando amostras de suplementos alimentares à base de proteína do leite (suplemento predominante do conjunto amostral deste estudo), previamente analisados qualitativamente e isentos das substâncias de interesse.

Para escolha do método de preparo de amostra utilizado nesse estudo, foram avaliadas duas técnicas diferentes, o *Quechers* e a extração sólido-líquido com ACN e MeOH. A escolha método foi baseada na eficiência do método de extração. Devido à baixa detectabilidade do método analítico, na ordem de $\mu\text{g g}^{-1}$ para todas as substâncias, os ensaios do preparo de amostra foram avaliados em apenas 6 das substâncias de interesse (*i.e.*, cafeína, hidroclorotiazida, furosemida, fenolftaleína, testosterona e metiltestosterona), para as quais a matéria prima para formulações farmacêuticas encontravam-se disponíveis no LAT-FCF/USP. Apesar de ser menos da metade das substâncias que serão analisadas, pelo menos uma substância de cada classe das substâncias de interesse foi avaliada. A eficiência de extração foi avaliada em termos de recuperação do procedimento de extração no nível de concentração correspondente à CC.

A Tabela 4 mostra os resultados de recuperação (%) da etapa de extração para cada método de preparo de amostra avaliado.

Tabela 4: Resultado dos testes de recuperação (%) para as 3 extrações avaliadas.

Substância	Quechers (adaptado)	Sólido-Líquido Acetonitrila	Sólido-líquido Metanol
Cafeína	101	102	113
Hidroclorotiazida	96	94	101
Furosemida	27	77	93
Testosterona	89	94	90
Metiltestosterona	99	95	90
Fenolftaleína	94	103	99

Fonte: Autoria própria

Pelo método *Quechers*, a recuperação variou dentro dos limites considerados aceitáveis para o nível de concentração avaliado (entre 89 e 101%), corroborando com resultados já obtidos por autores que utilizaram procedimentos de preparo de amostra similares (PAIGA *et al.*, 2015; VACLAVICK; KRYNITSKY; RADER, 2014). A exceção ocorreu apenas para a furosemida que obteve valor de recuperação menor do que 30%. Esse resultado impossibilita o uso desse método de preparo de amostra para detecção da furosemida, entretanto para as demais substâncias analisadas, o método apresentou resultados de recuperação entre 89 e 101%, ou seja, dentro dos limites aceitáveis para o nível de concentração estudado, podendo ser utilizado para a determinação desses adulterantes em amostras de suplementos alimentares.

A extração sólido-líquido empregando MeOH como solvente extrator apresentou os melhores resultados de recuperação, considerando os três procedimentos de preparo de amostra propostos. Os valores de recuperação obtidos ficaram mais próximos a 100% para os 6 analitos estudados (Tabela 4).

A ACN permite a extração de substâncias com faixa de polaridade mais ampla quando comparado com o MeOH, além de agir como um agente precipitante de proteínas nas amostras analisadas (POSON *et al.*, 2003; PRESTES *et al.*, 2009; SOUVERAIN, RUDAZ; VEUTHEY, 2004). Todavia, a ACN interferiu na recuperação da furosemida que apresentou valor de recuperação abaixo de 80%, indo ao encontro do resultado obtido pelo método *Quechers* (adaptado). O resultado obtido com a extração por MeOH corrobora com os dados reportados na literatura, sendo o solvente mais utilizado para extração de adulterantes em

suplementos alimentares (DECONINCK *et al.*, 2016; JUNG; HERMANNNS-CLAUSEN; WEINMANN, 2006; YU *et al.*, 2010).

Uma vez selecionado o método de preparo de amostra baseado em extração sólido-líquido empregando o MeOH como solvente extrator, foi então determinada a proporção do agente precipitante de proteína empregado após a etapa de extração sólido-líquido.

Soluções saturadas de Zn_2SO_4 são utilizadas em laboratórios clínicos para precipitação de proteínas em plasma humano (POSON *et al.*, 2003). Essa metodologia foi avaliada com o mesmo objetivo, uma vez que a grande maioria são produtos ricos em proteínas. Os resultados para a precipitação de proteína, para as três proporções avaliadas, foram similares. A proporção entre amostra: Zn_2SO_4 saturado de 1:0,1 (v:v) foi, então, selecionada por não diluir a amostra, e, conseqüentemente, as substâncias que serão analisadas. A etapa de filtração também foi analisada e não houve interferência no resultado.

A extração com MeOH, seguida de precipitação de proteína com solução de sulfato de zinco $100\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, na razão 1:0,1 e posterior filtração com filtro de PVDF $0,22\ \mu\text{m}$ foi o método de preparo de amostra de escolha para a detecção de adulterantes em suplementos nutricionais, utilizando o HPLC-DAD.

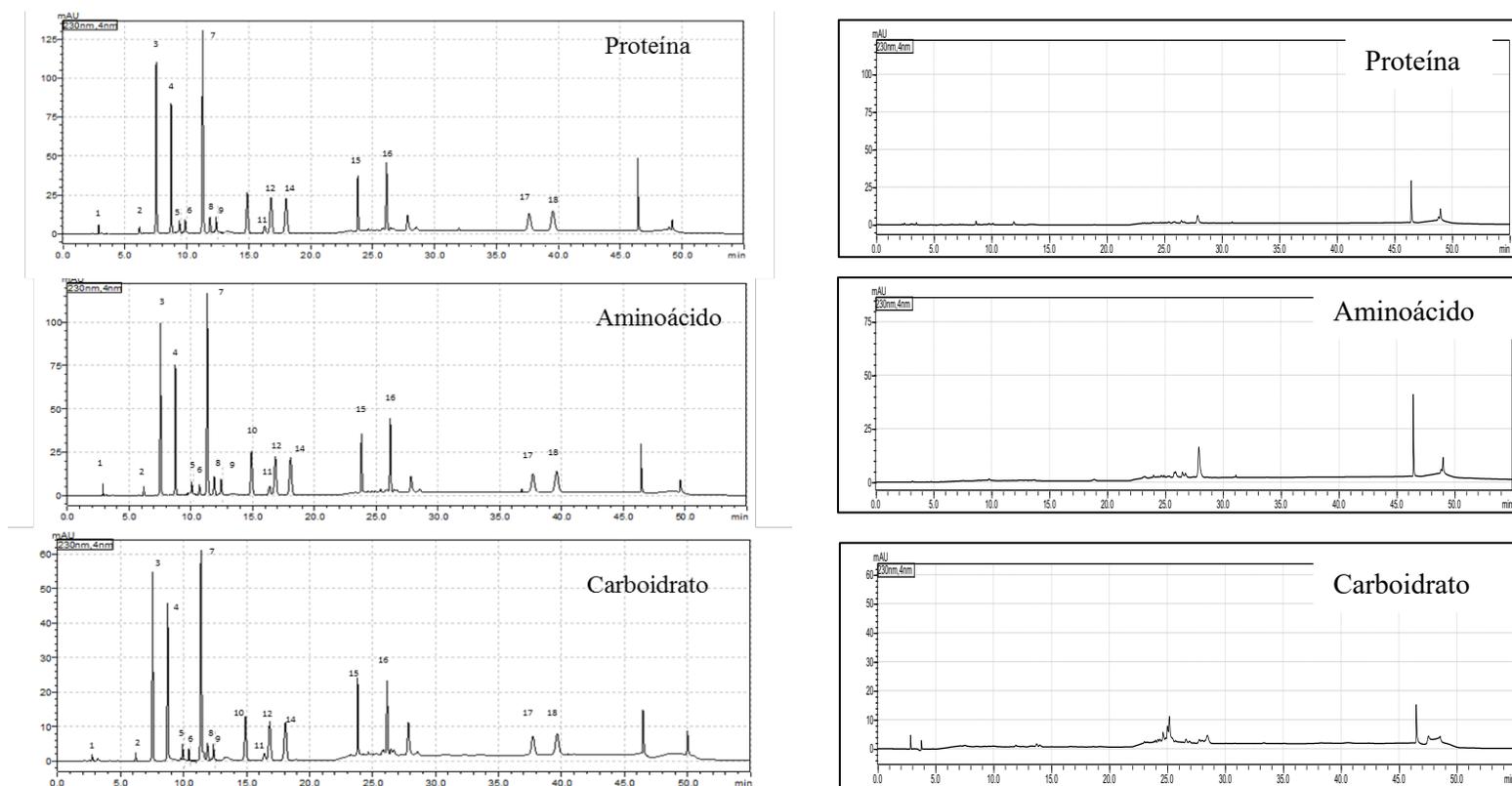
IV - 2.2. Avaliação do método analítico proposto para determinação de substâncias adulterantes em suplementos alimentares por HPLC-DAD

IV-2.2.1. Seletividade

A Figura 15 mostra o cromatograma típico obtido para cada tipo de suplemento em comparação com a mesma concentração dos analitos adicionados. Resultados similares foram obtidos para os demais produtos analisados. O método proposto foi considerado seletivo, pois conseguiu produzir respostas para os 17 analitos, sem interferência no sinal analítico entre eles e sem interferência da matriz.

A substância DHEA, não foi ilustrada na Figura 15 por ser detectada em comprimento de onda 198 nm , mas assim como as outras 17 substâncias de interesse, não houve interferência na resposta.

Figura 15: Cromatogramas à esquerda foram obtidos com a separação das 17 substâncias (exceção do DHEA) e do PI adicionadas às 3 diferentes matrizes: proteína, carboidrato e aminoácido. Cromatogramas à direita representam as três matrizes extraídas sem adição dos analitos.



Fonte: Autoria própria

IV-2.2.2. Limites de Detecção

O método analítico proposto apresentou detectabilidade entre 2 e 10 $\mu\text{g g}^{-1}$, considerando todos os analitos de interesse. Esses valores estão abaixo das concentrações de contaminação consideradas nesse estudo (Tabela 5), o que significa que o método é capaz de detectar a adulteração dos suplementos alimentares em níveis de contaminação.

Considerando a detectabilidade técnica HPLC-DAD para as substâncias de interesse, a validação analítica do método proposto, visando sua aplicação para a quantificação dos analitos demandaria o uso demorado de padrões analíticos. Para 11 das 17 substâncias de interesse (cafeína, sibutramina, fenolftaleína, amilorida, bumetanida, furosemida, clortalidona, hidroclorotiazida, testosterona, metiltestosterona e propionato de testosterona) o LAT-USP dispunha de quantidades suficientes dos respectivos padrões primários para a realização de todo ensaio de validação de método. Para as demais substâncias, incluindo os EAA (androstenediona, DHEA, trembolona, estanozolol, decanoato de nandrolona e decanoato de testosterona), o laboratório não dispunha de quantidades suficientes de padrões analíticos/primários.

Ressalta-se que, na disponibilidade de padrões analíticos, os resultados até então obtidos demonstram a aplicabilidade do método analítico baseado em HPLC-DAD para a determinação de adulterantes de diferentes ações farmacológicas em amostras de suplementos alimentares.

Tabela 5: Valores de Limites de detecção obtidos para as 17 substâncias de interesse

Analito	LOD ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)
Cafeína	5
Sibutramina	10
Amilorida	2
Bumetanida	2
Clortalidona	10
Furosemida	10
Hidroclorotiazida	10
Fenolftaleína	10
Testosterona	10
Metiltestosterona	10
Propionato de testosterona	10
Decanoato de testosterona	10
Androstenediona	10
DHEA	10
Trembolona	10
Estanozolol	10
Decanoato de Nandrolona	10

Fonte: Autoria própria

A seguir serão apresentados os resultados obtidos para a validação das 11 substâncias mencionadas acima. Para as demais substâncias, propõe-se a utilização do método analítico proposto para fins de triagem.

IV-2.2.3. Recuperação

Os resultados obtidos foram satisfatórios apresentando valores de recuperação acima de 80% e CV abaixo de 15% para as 11 substâncias, exceto para amilorida (Tabela 6). A amilorida apresentou baixo percentual de recuperação (40%) e CV (26%), maior que o valor aceitável. Na tentativa de melhorar a eficiência de extração da amilorida, testou-se o emprego de ACN como solvente extrator. Contudo os resultados também foram insatisfatórios com valores de recuperação de 24% e CV 17%, respectivamente, inviabilizando a sua análise para fins quantitativos, apenas com intuito qualitativo.

Tabela 6. Resultado da recuperação e CV (%)

Analito	Recuperação	CV(%)
Amilorida	40	26
Bumetanida	95	3
Sibutramina	108	5
Cafeina	94	7
Fenolftaleína	89	8
Clortalidona	83	4
Furosemida	109	6
Hidroclorotiazida	80	9
Testosterona Base	84	11
Metiltestosterona	93	11
Propionato de testosterona	84	11

Fonte: Autoria própria

IV-2.2.4. Limites de Quantificação

Os valores dos LOQ para os 10 analitos que foram detectados por HPLC-DAD, após exclusão da amilorida, estão na Tabela 7. Os valores de LOQ são inferiores aos valores de contaminação considerados nesse estudo (Tabela 7), permitindo a quantificação dos adulterantes tanto pela adição dolosa quanto pela contaminação cruzada.

Tabela 7. Valores de LOQ para os 10 analitos quantificados por HPLC-DAD

Analito	$\mu\text{g.g}^{-1}$	% CV
Cafeína	10	0,5
Sibutramina	10	12
Testosterona	10	0,7
Metiltestosterona	10	0,8
Propionato de Testosterona	10	3
Bumetanida	5	15
Clortalidona	10	6
Furosemida	10	0,4
Hidroclorotiazida	10	4
Fenolftaleína	10	1,8

Fonte: Autoria própria

IV-2.2.5. Linearidade

As faixas de concentrações para cada curva analítica foram determinadas levando em consideração os limites de quantificação dos analitos os quais apresentaram valores mais baixos que as concentrações de contaminação (10% da concentração de efeito) e os valores de da concentração de adulteração (100% da concentração de efeito). Assim, as faixas de trabalho foram: 5 a 120 $\mu\text{g.g}^{-1}$ para bumetanida; 10 a 6000 $\mu\text{g.g}^{-1}$ para cafeína e fenolftaleína; e 10 a 1000 $\mu\text{g.g}^{-1}$ para testosterona base, metiltestosterona, propionato de testosterona, clortalidona, furosemida, hidroclorotiazida e sibutramina. O método foi considerado linear, apresentando coeficiente de determinação (r^2) maiores que 0,99 para todas as substâncias, conforme Tabela 8 e ilustrado na Figura 16.

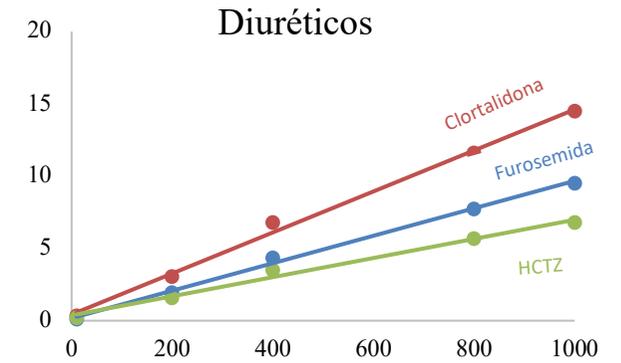
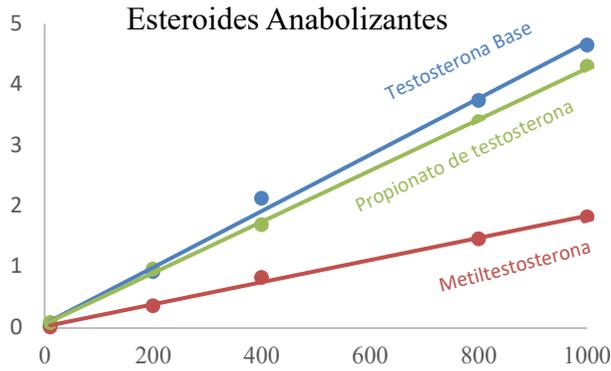
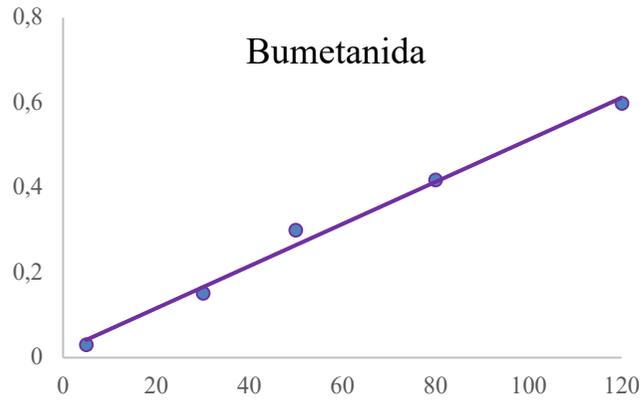
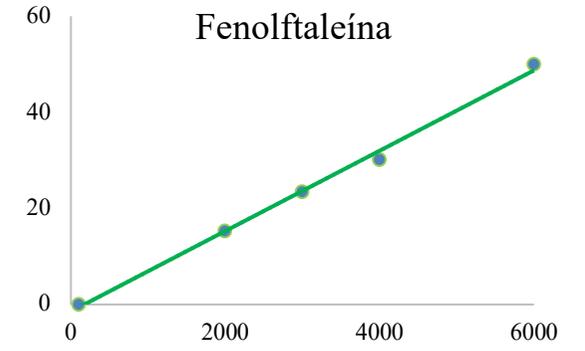
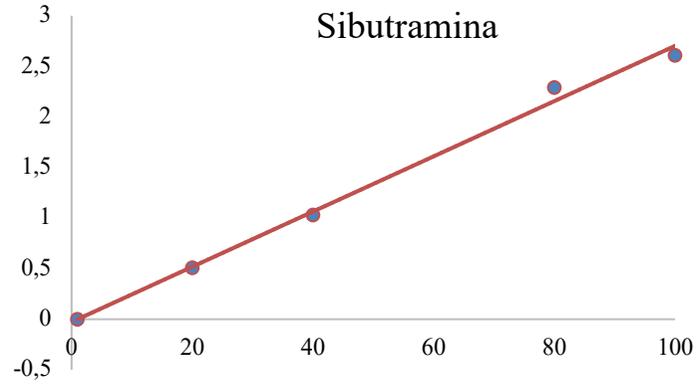
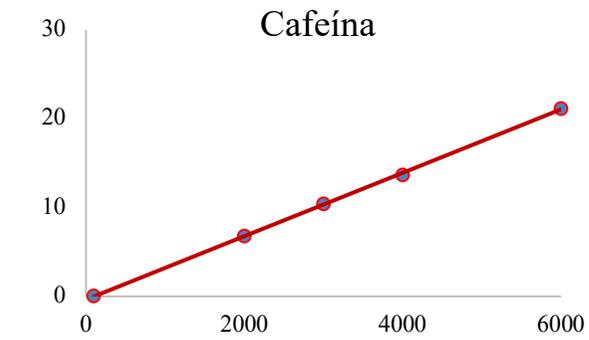
As curvas de calibração dos analitos apresentaram o fenômeno da heterossedasticidade (avaliada através da distribuição F), provavelmente devido à alta faixa de concentração considerada no estudo da linearidade. Portanto, o método de regressão linear dos mínimos quadrados comuns poderia resultar em grandes erros dos cálculos de concentração, especialmente em valores menores.

Tabela 8. Faixa de linearidade, os coeficientes de determinação (r^2) e fator F para os analitos elencados no estudo.

Analito	Equação da reta	r^2	Fator F
Cafeína	$y = 0,0328x + 0,3236$	0,9997	$1/x^2$
Fenolftaleína	$y = 0,0678x + 1,6812$	0,997	$1/x^2$
Sibutramina	$y = 0,0273x - 0,0275$	0,9944	$1/y^2$
Testosterona base	$y = 0,0463x + 0,069$	0,996	$1/y^2$
Metiltestosterona	$y = 0,0182x + 0,0261$	0,996	$1/x^2$
Propionato de Testosterona	$y = 0,042x + 0,0635$	0,998	$1/y^2$
Bumetanida	$y = 0,0496x + 0,017$	0,992	$1/x^2$
Clortalidona	$y = 0,1418x + 0,4303$	0,999	$1/x^2$
Hidroclorotiazida	$y = 0,0661x + 0,3672$	0,992	$1/y^2$
Furosemida	$y = 0,095x + 0,1768$	0,996	$1/x^2$

Fonte: Autoria própria

Figura 16: Curva de linearidade para 10 analitos por HPLC-DAD



Fonte: Autoria própria

IV-2.2.6. Efeito Matriz

As altas concentrações dos analitos na amostras e os LOQ serem na ordem de $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, inviabilizam a determinação da linearidade na matriz tendo em vista o uso demasiado de padrões analíticos. Portanto, foi necessário garantir que a curva analítica feita com adição de padrão no solvente, não iria comprometer a quantificação das substâncias nas diferentes matrizes de suplementos alimentares analisado. Para tanto, foi avaliado o efeito matriz no HPLC-DAD.

Neste trabalho, o efeito matriz foi avaliado com base no método de paralelismo entre curvas de calibração obtidas no solvente e na amostra. O efeito matriz depende da complexidade das amostras, ou seja, do número e da quantidade de substâncias que estão na sua composição e podem interferir na determinação analítica (OSHITA; JARDIM, 2015). Quando as variações nas respostas do detector forem menores que $\pm 20\%$ considera-se que não há efeito matriz significativo. Valores superiores a $\pm 20\%$ apontam que o efeito matriz é significativo e ele pode ser causado por supressão ou acréscimo de sinal. (ECONOMOU *et al.*, 2009; OSHITA; JARDIM, 2015).

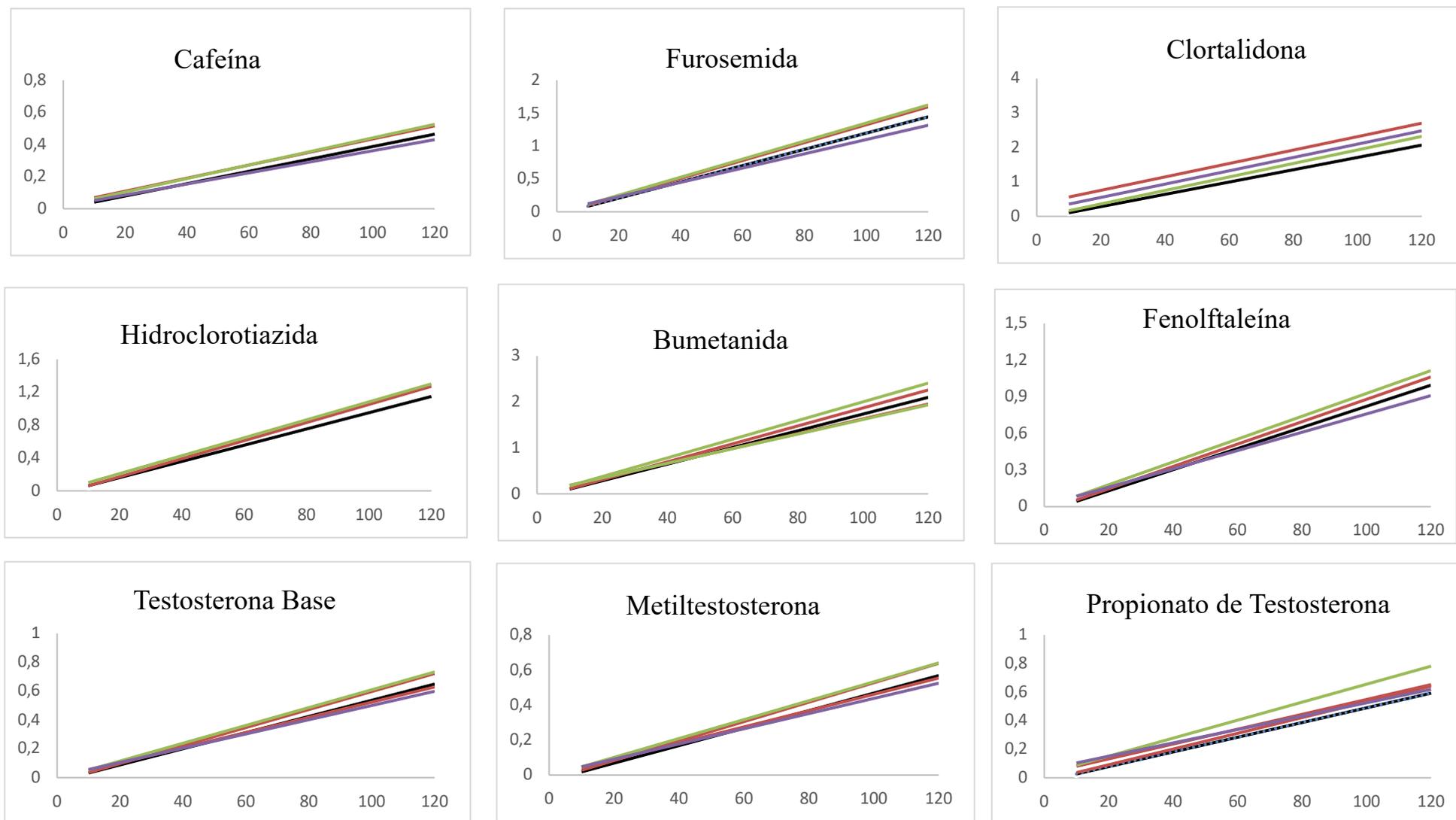
Após plotagem das curvas no solvente e nas três diferentes matrizes (proteína do leite, aminoácido e carboidrato), foi verificado o paralelismo entre as retas, conforme mostra a Figura 17, e a razão entre o coeficiente angular da curva de calibração obtida na matriz e o coeficiente angular da curva de calibração obtida no solvente apresentou valores abaixo de $\pm 20\%$ (Tabela 9).

Tabela 9: Efeito matriz para três matrizes analisadas

Analito	Efeito Matriz (%)		
	Proteína do Leite	Aminoácido	Carboidrato
Cafeína	-6	-10	10
Bumetanida	-7	12	12
Clortalidona	-9	9	7
Furosemida	-10	-11	12
Hidroclorotiazida	11	10	1
Fenolftaleína	-6	8	13
Testosterona Base	-11	10	12
Metiltestosterona	-11	8	13
Propionato de Testosterona	-10	15	7

Fonte: Autoria própria

Figura 17: Análise do efeito matriz por HPLC-DAD



IV-2.2.7. Precisão

As precisões intra e interdia apresentaram valores dentro dos limites aceitáveis de 20% para controle baixo e 15% para controles médio e alto. A Tabela 10 mostra os valores da precisão inter e intradia para o suplemento de proteína do leite.

Tabela 10. Precisão intra e interdia para o suplemento de proteína do leite

Analitos	Controles	Precisão CV (%)	
		Intradia	Interdia
Cafeína	CB (1000 µg.g-)	5	2
	CM (2500 µg.g-)	13	2
	CA (5000 µg.g-)	3	2
Fenolftaleína	CB (1000 µg.g-)	1	2
	CM (2500 µg.g-)	12	3
	CA (5000 µg.g-)	3	2
Sibutramina	CB (100 µg.g-)	4	12
	CM (500 µg.g-)	4	9
	CA (900 µg.g-)	3	1
Bumetanida	CB (20 µg.g-)	7	4
	CM (60 µg.g-)	4	2
	CA (100 µg.g-)	1	3
Clortalidona	CB (100 µg.g-)	11	3
	CM (500 µg.g-)	10	8
	CA (900 µg.g-)	1	6
Furosemida	CB (100 µg.g-)	1	4
	CM (500 µg.g-)	4	4
	CA (900 µg.g-)	13	4
Hidroclorotiazida	CB (100 µg.g-)	7	11
	CM (500 µg.g-)	5	3
	CA (900 µg.g-)	1	3
Testosterona Base	CB (100 µg.g-)	1	5
	CM (500 µg.g-)	5	4
	CA (900 µg.g-)	1	3
Metiltestosterona	CB (100 µg.g-)	1	5
	CM (500 µg.g-)	5	4
	CA (900 µg.g-)	1	3
Propionato de testosterona	CB (100 µg.g-)	9	8
	CM (500 µg.g-)	5	4
	CA (900 µg.g-)	1	3

Fonte: Autoria própria

IV-2.2.8. Exatidão

O ensaio para exatidão do método foi realizado em três concentrações em seis replicatas para cada concentração. Os valores encontrados estão dentro dos limites aceitáveis de 20% para controle baixo e 15% para controles médio e alto. A Tabela 11 mostra os resultados obtidos na exatidão para a proteína do leite.

Tabela 11. Exatidão para suplemento de proteína do leite

Analitos	Exatidão (%)		
	CB	CM	CA
Cafeína	99	97	85
Fenolftaleína	81	96	110
Sibutramina	104	86	85
Bumetanida	101	92	90
Clortalidona	81	112	91
Furosemida	93	95	90
Hidroclorotiazida	86	97	88
Testosterona Base	91	88	86
Metiltestosterona	81	86	85
Propionato de testosterona	107	92	90

Fonte: Autorial própria

IV-2.2.9. Integridade de diluição

A cafeína apresenta valores de concentrações de efeito que variam 210 e 420 mg por dose (ANVISA, 2010). Esses valores são muito altos para detecção por instrumentação analítica e ademais demanda um gasto demasiado de padrão analítico. Portanto, para que os valores encontrados se encaixem dentro da curva analítica proposta foi necessária uma etapa de diluição. Os resultados apresentaram valores aceitáveis de exatidão e precisão, conforme Tabela 12:

Tabela 12. Integridade de diluição da cafeína

Concentração	Exatidão	CV %
10 mg.g-	100,5	7
20 mg.g -	91	3

Fonte: Autorial própria

IV-2.2.10. Uniformidade amostral

O resultado para as 10 alíquotas coletadas do suplemento alimentar positivo para cafeína foi de 14%. Esse valor é aceitável e indica que independente da área onde vai ser coletada a amostra a variação entre os valores está dentro dos limites aceitáveis ($CV < 15\%$).

IV - 2.3. Método analítico por LC-MS/MS para a confirmação dos resultados obtidos pelo método baseado em HPLC-DAD

Os analitos detectados por HPLC-DAD foram confirmados por uma técnica mais sensível e específica. Todas as amostras, incluindo as negativas, foram submetidas à análise por LC-MS/MS pertencente ao LAT-USP. O método para confirmação por espectrometria de massas não foi submetido ao procedimento de validação, uma vez que o objetivo do estudo foi a detecção e quantificação por HPLC-DAD.

Os analitos confirmados por LC-MS/MS foram a cafeína e a sibutramina. A fenolftaleína e furosemida não foram possíveis de serem identificadas uma vez que o equipamento apresentou problemas técnicos.

A Tabela 13 indica o tempo de retenção, o íon precursor e os dois íons qualificadores da cafeína e sibutramina.

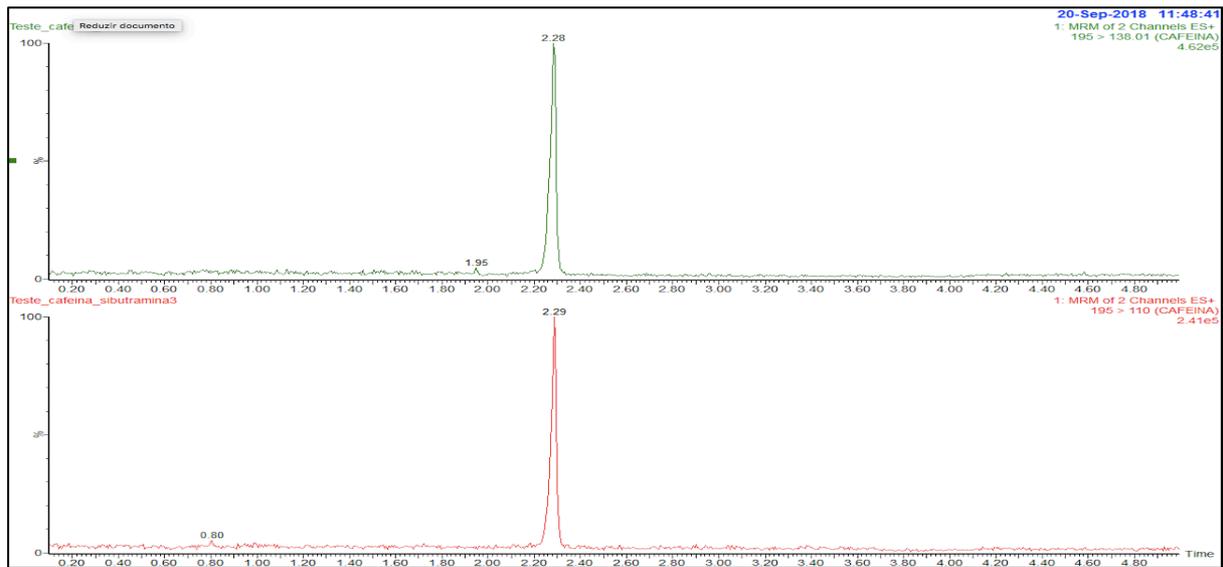
Tabela 13. Tempo de retenção, íon precursor e íons qualificadores Q1 e Q2.

Analito	Tempo de Retenção (min)	Íon Precursor	Q1	Q2
Cafeína	2.23	195	110	138
Sibutramina	2.83	280	124	138

Fonte: Autorial própria

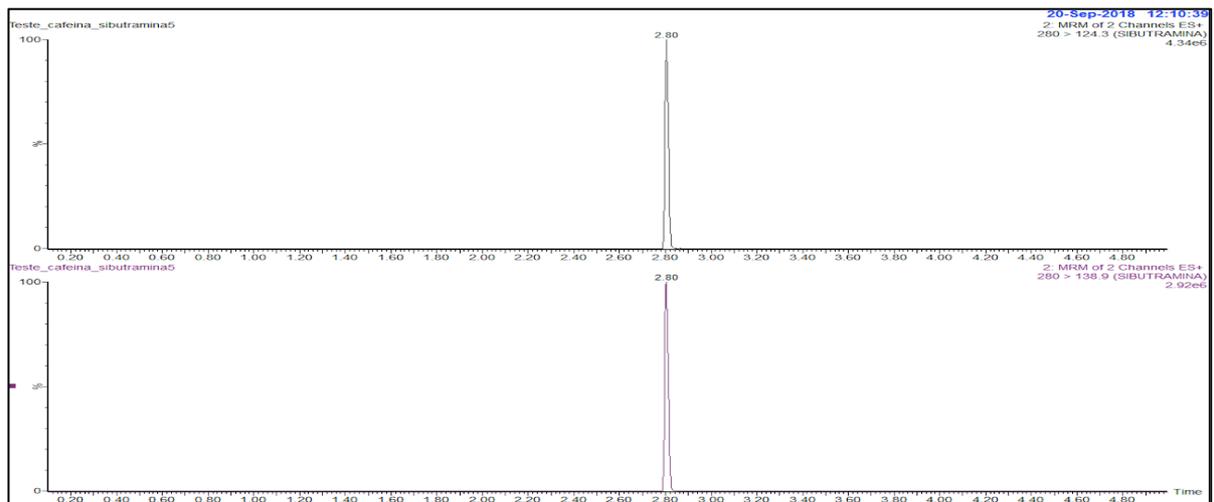
As Figura 19 e Figura 20 ilustram os cromatogramas referentes as duas transições dos padrões de cafeína e de sibutramina, respectivamente.

Figura 18: Cromatograma do padrão de cafeína por LC-MS/MS.



Fonte: Autoria própria

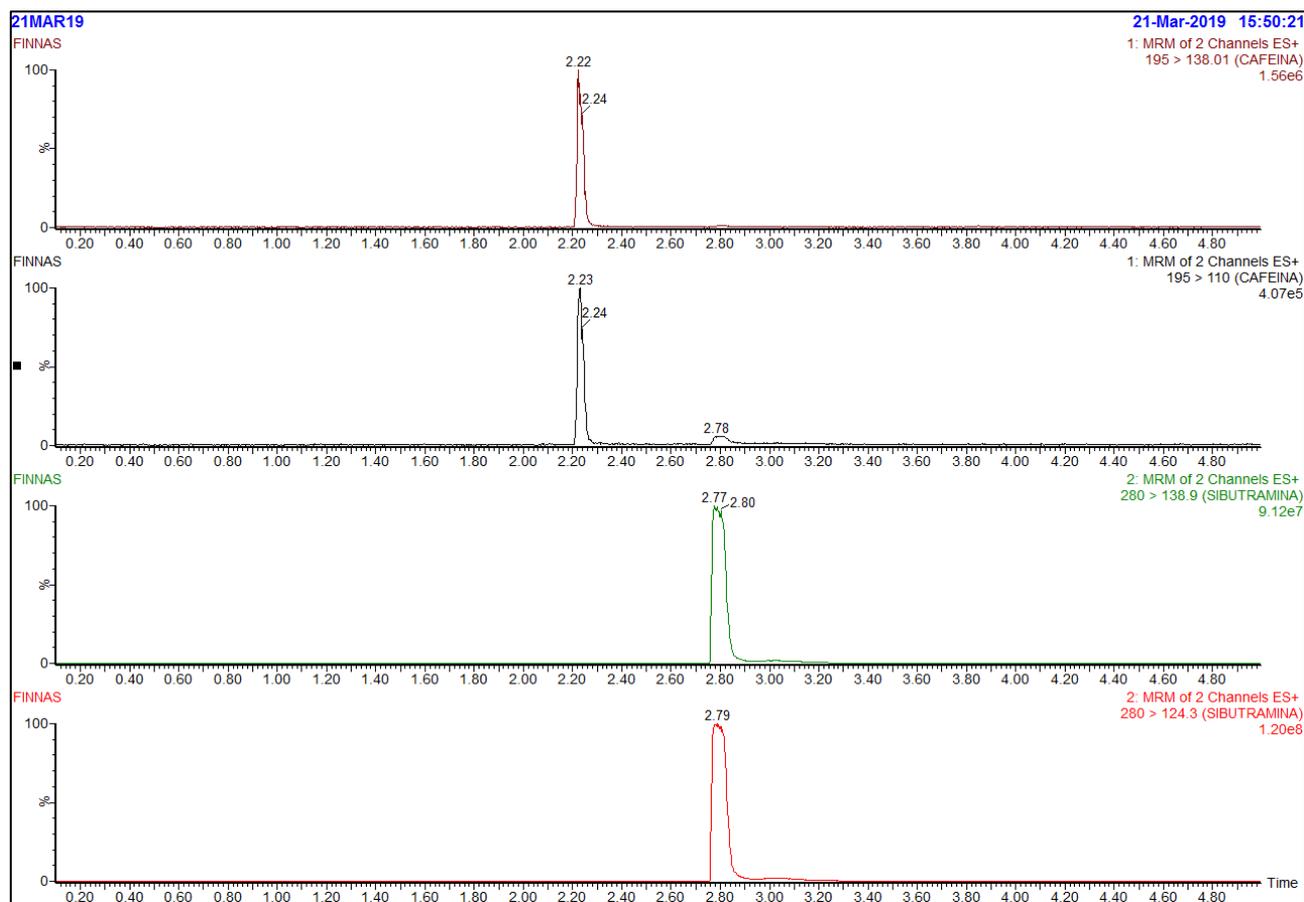
Figura 19: Cromatograma do padrão de sibutramina por LC-MS/MS.



Fonte: Autoria própria

A Figura 20 ilustra os cromatogramas referentes as duas transições de uma amostra positiva para cafeína e sibutramina simultaneamente.

Figura 20: Amostra positiva para associação da cafeína e sibutramina



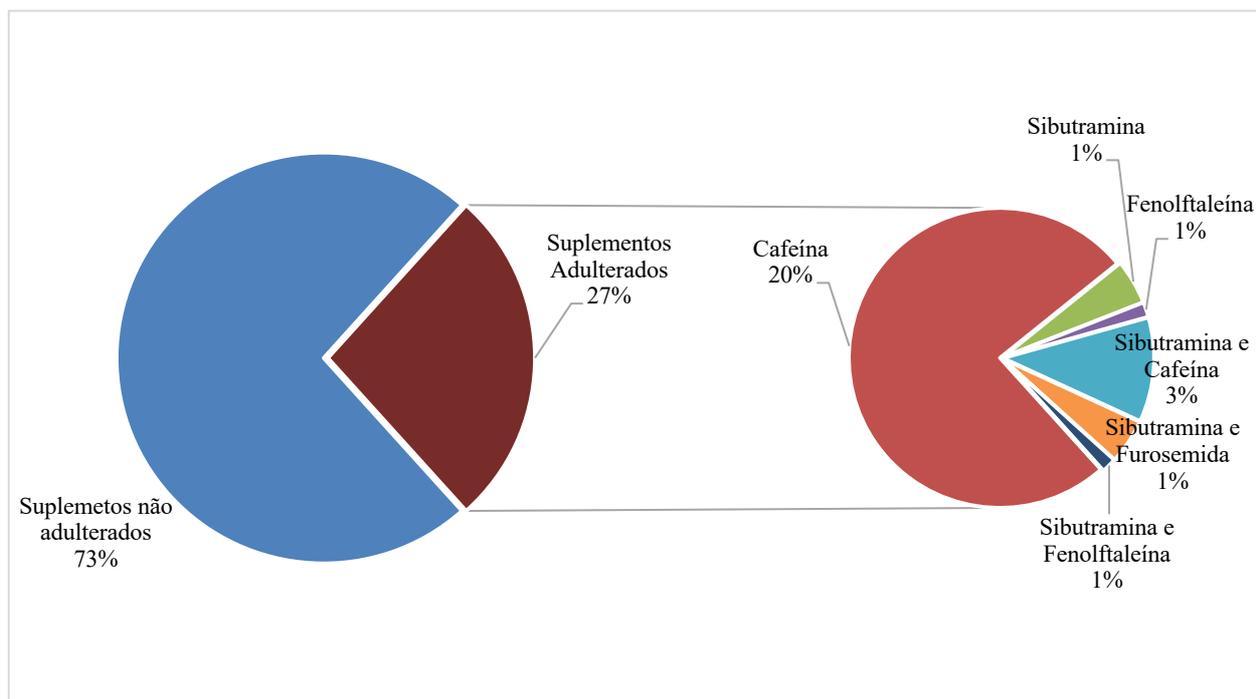
Fonte: Autoria própria

IV - 2.4. Análise de amostras de suplementos alimentares por HPLC-DAD e confirmação por LC-MS/MS

O método de análise por HPLC-DAD foi utilizado como triagem para as 17 substâncias elencadas no estudo e os resultados positivos foram confirmados por LC-MS/MS. Do total de amostras analisadas, 58 obtiveram resultado positivo, das quais 05 foram positivas para cafeína e sibutramina simultaneamente, 03 para sibutramina e furosemida, 01 para sibutramina e fenolftaleína, 43 apenas para cafeína, 05 para sibutramina e 01 para fenolftaleína. A cafeína e a sibutramina foram as substâncias mais detectadas corroborando com os dados reportados na literatura (NEVES; CALDAS, 2017b).

A Figura 21 mostra o percentual dos suplementos alimentares adulterados e a frequência de detecção para as substâncias encontradas nas amostras analisadas, isoladamente e associados entre si.

Figura 21: Porcentagem dos suplementos alimentares adulterados e a porcentagem dos adulterantes detectados



Fonte: Autoria própria

Percentuais semelhantes entre os suplementos alimentares adulterados e não adulterados também foram observados em outros países como Singapura (26%), EUA (25%) e China (25%) (CHENG et al., 2017; ZENG et al., 2016; ZHAO et al., 2018). Entretanto, dois estudos realizados no Brasil apresentaram resultados, que além de contrários a esses dados, são divergentes entre si; enquanto Carvalho *et al.* (2012) detectaram apenas 4% de adulteração em suas amostras, Viana *et al.* (2015) relataram percentuais acima de 50% nos suplementos alimentares analisados. Essa variação no percentual de suplementos adulterados depende da quantidade de produtos avaliados no estudo e da suspeita desses produtos serem adulterados.

Ainda no Brasil, com relação ao percentual dos adulterantes encontrados, Viana *et al.* (2018), detectaram valores de cafeína em 17% dos suplementos. Neves e Caldas (2017b), além da cafeína, detectaram sibutramina e fenolftaleína em 10% das suas amostras. Esses dados assemelham-se aos percentuais encontrados nesse estudo. A associação entre dois adulterantes na mesma amostra de suplemento correspondeu apenas a 7% dos casos, tendo sido reportado no Brasil valores de até 40%.

A seguir, serão discriminados os adulterantes detectados nas amostras positivas, suas respectivas quantidades ingeridas diariamente pelos usuários e efeitos associados ao consumo desses produtos adulterados.

IV-2.4.1. Cafeína

A cafeína foi a substância que apresentou maior frequência de detecção. Das 230 amostras analisadas, 48 foram positivas para cafeína, correspondendo a mais de 20% do conjunto amostral.

A Tabela 14 elenca os suplementos alimentares positivos para cafeína, a descrição do rótulo e as quantidades de cafeína consumidas diariamente.

Tabela 14 Amostras positivas para cafeína e quantidades detectadas por HPLC-DAD

n	Cafeína	Descrição do Rótulo	mg/dia
1	Albumina_01	Carboidratos, Proteínas, Sódio	3,03
2	Aminoácido_04	L-Leucina, L-Isoleucina, L-Valina, Cromo 50, Vitamina C, Vitamina B6	135
3	Aminoácido_05	L-Leucine, L-Isoleucine, L-Valine	0,02
4	Aminoácido_18	Glutamina	0,23
5	Cretina_01	Creatina	0,02
6	Cretina_06	Creatina	90
7	Outros_08	Colágeno hidrolisado, Proteína	2,39
8	Outros_18	Magnésio e Potássio	0,3
9	Outros_27	Não informado	36,31
10	Pro-hormônio_19	4-chloro-17 ^a -methyl-androst-1,4-diene-3b,17b-diol	1,16
11	Pro-hormônio_20	Tribulus	0,07
12	Proteína da Carne_02	Proteína, Carboidratos, Sódio	4,10
13	Proteína do Leite_02	Não informado	2,39
14	Proteína do Leite_04	Não informado	2,16
15	Proteína do Leite_06	Não informado	1,0
16	Proteína do Leite_10	Carboidratos, Proteínas, Açúcares, Gorduras totais, Sódio	2,05
17	Proteína do Leite_11	Carboidrato, Proteínas e Gorduras	6,47
18	Proteína do Leite_13	Carboidratos, Polióis, Proteínas Gorduras totais, Gorduras saturada, Fibra alimentar, Sódio, Cálcio, Ferro, Fósforo, Magnésio	12,01

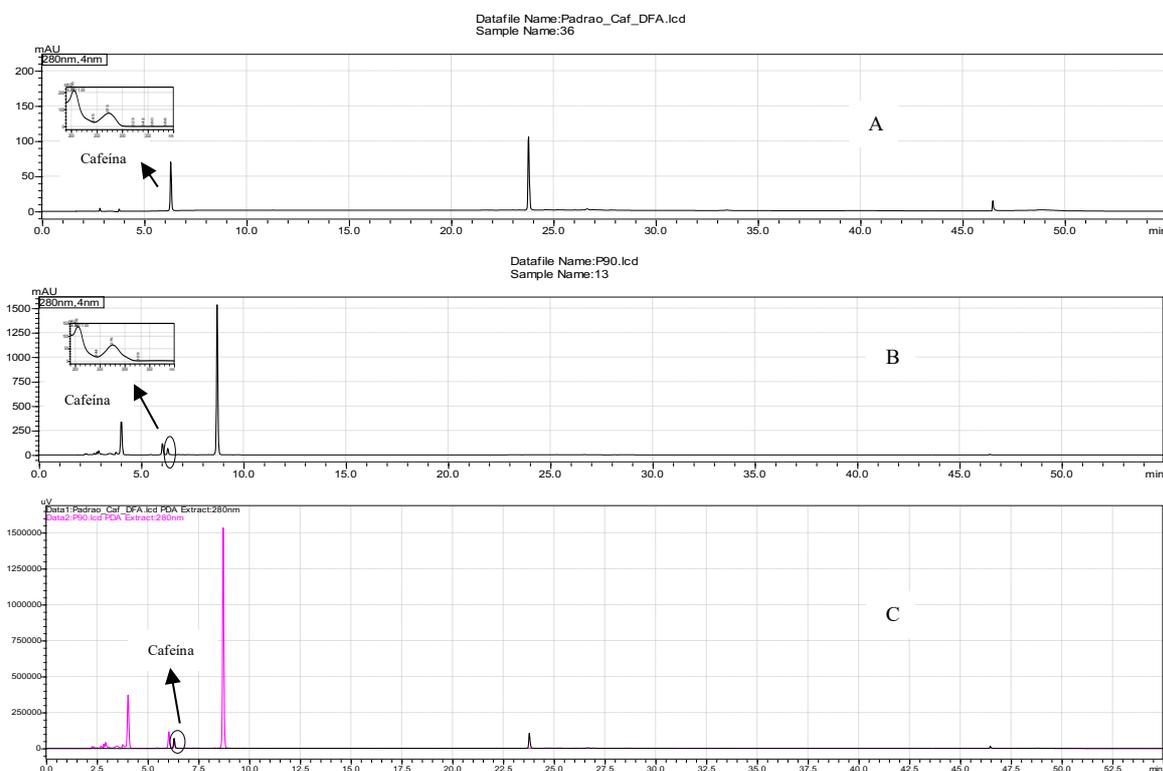
19	Proteína do Leite_15	Carboidratos, Polióis, Proteínas Gorduras totais, Gorduras saturada, Fibra alimentar, Sódio, Cálcio, Ferro, Fósforo, Magnésio	11,27
20	Proteína do Leite_17	Carboidratos, Proteínas, Gorduras totais, Gorduras saturadas Sódio	3,31
21	Proteína do Leite_19	Carboidratos, Proteínas, Gorduras totais, Gorduras saturadas, Gorduras monoinsaturadas, Gorduras polinsaturadas, Colesterol, Cálcio, Sódio.	2,40
22	Proteína do Leite_20	Carboidratos, Proteínas, Gorduras totais, Gorduras saturadas, Sódio, Cálcio, Ferro, Vitaminas	1,92
23	Proteína do Leite_23	Carboidratos, Proteínas, Gorduras totais, Gorduras saturadas, Sódio, Potássio, Ferro.	2,51
24	Proteína do Leite_27	Proteínas, Carboidratos, Gorduras totais, Gorduras saturadas, Sódio, Cálcio.	4,16
26	Proteína do Leite_28	Proteínas, Carboidratos, Amido, Gorduras totais, Gorduras saturadas, Sódio.	5,28
27	Proteína do Leite_32	Proteínas, Carboidratos, Gorduras totais, Gorduras saturadas, aminoácidos.	3,32
28	Proteína do Leite_33	Proteínas, Carboidratos, Sódio	12,86
29	Proteína do Leite_35	Proteínas, Sódio	7,62
30	Proteína do Leite_38	Proteínas, Carboidratos, Sódio Cálcio	3,26
31	Proteína do Leite_41	Carboidratos, Proteínas, Gorduras totais, Gorduras saturadas, Sódio.	39,56
32	Proteína do Leite_43	Carboidratos, Proteínas Gorduras totais, gorduras saturadas Sódio, Potássio, Ferro.	2,70
33	Proteína do Leite_45	Proteínas, Gorduras totais, Gorduras saturadas, Sódio.	2,02
34	Proteína do Leite_46	Proteínas, Gorduras totais, Gorduras saturadas, Sódio.	2,02
35	Proteína do Leite_47	Carboidratos, Proteínas, Gorduras totais, Gorduras saturadas Sódio.	6,11
36	Proteína do Leite_51	Não informado	1,0
37	Proteína do Leite_52	Não informado	0,97
38	Proteína do Leite_56	Proteína e Sódio	0,57
39	Proteína do Leite_66	Proteínas, Gorduras totais, Gorduras saturadas, Sódio.	9,79
40	Proteína do Leite_67	Proteínas, Gorduras totais, Gorduras saturadas, Sódio.	3,74
41	Proteína do Leite_69	Proteínas, Gorduras totais, Gorduras saturadas, Sódio.	106,88

42	Proteína do Leite_74	Carboidrato, proteína, gordura, fibra, cálcio e sodio	6,54
43	Proteína do Leite_81	Carboidrato, açúcar, gorduras, fibras, sodio, calcio, potassio, magnesio e fosforo	4,34
44	Proteína do Leite_90	Carboidratos, Proteinas, Gorduras totais, Gorduras saturadas, Sódio.	2,94
45	Proteína do Leite_91	Carboidratos, Proteinas, Gorduras totais, Gorduras saturadas, Sódio.	4,28
46	Termogênico_1	Gengibre, cúrcuma, café verde, pimenta vermelha e uva	121
47	Termogênico_2	Hibisco, Carqueja, Framboesa Gengibre, Canela, Pimenta Vermelha, Aromatizante Natural de Café Verde.	0,76
48	Termogênico_4	Acido Lipolico, Vitaminas, Zinco, finasterida, Silmarina	5,99

Fonte: Autoria própria

A Figura 22 mostra o cromatograma típico de uma amostra, analisada por HPLC-DAD, positiva para Cafeína, com seu respectivo espectro de UV.

Figura 22: Análise por HPLC-DAD. Cromatograma do Padrão da Cafeína 50 µg.mL-(A); Cromatograma da amostra positiva para Cafeína Proteína_90 (B); Cromatograma da sobreposição dos picos da Cafeína do padrão e da amostra positiva (C).



Os resultados quantitativos mostrados na Tabela 16 demonstram que as quantidades de cafeína encontradas no conjunto amostral estão abaixo da dose diária recomendada pela ANVISA (210 – 420 mg – Quadro 4). Considerando a concentração de cafeína encontrada por g de suplemento e a dose diária do suplemento alimentar recomendada pelo rótulo, os consumidores desses produtos positivos para cafeína estariam ingerindo entre 0,02 a 135 mg de cafeína por dia.

De acordo com os resultados relatados na tabela anterior, apenas para duas amostras (Aminoácido_04 e Proteína do Leite_69), ou menos do que 5% das amostras positivas para cafeína, os valores de cafeína encontrados foram acima de 100 mg de ingestão diária; ou seja, aproximadamente 50% da recomendação mínima ou 25% da recomendação diária máxima para cafeína. Esses valores, embora abaixo da dose de efeito, chamam atenção, pois para casos alérgicos ou para pessoas que ingerem doses elevadas de cafeína, essa ingestão inconsciente pode resultar em um quadro crítico para a saúde do consumidor. As elevadas concentrações de cafeína nesses produtos podem ser justificadas pela presença de aromatizantes que contêm cafeína, conforme indicado pelo rótulo dos produtos: Proteína do Leite_69 apresentava aromatizante natural de café e o Aminoácido_04 de café verde. Embora o rótulo dos produtos indique a presença destes aromatizantes, a lei brasileira exige a descrição quantitativas das substâncias presentes no produto, configurando adulteração por cafeína.

Além dos suplementos alimentares adulterados com cafeína, foram analisados 08 suplementos alimentares os quais apresentavam descrição de cafeína no rótulo. As concentrações detectadas foram comparadas as concentrações descritas nos rótulos de seus produtos, conforme valores descritos na Tabela 15.

Tabela 15. Suplementos alimentares à base de cafeína, valor descrito no rótulo e valor detectado

	Suplemento	Valor de cafeína descrito no rótulo (mg/dose)	Valor de cafeína detectado (mg/dose)
1	Outros_09 Suplemento à base de fibras	15	27,5
2	Carboidrato_05	70	72
3	Carboidrato_06	35	72,7
4	Termogênico_03	140	45
5	Termogênico_05	140	242
6	Termogênico_08	420	330
7	Termogênico_09	70	65,9
8	Outros_19	10	1,2

Fonte: Autoria própria

Dos suplementos à base de cafeína analisados, apenas 02 (Carboidrato_05 e Termogênico_09) condiziam com os valores especificados no rótulo. 03 (Outros_09, Carboidrato_06 e Termogênico_05) apresentavam valores quase duas vezes acima e os demais (Termogênico_03, Termogênico_08 e Outros_19) valores abaixo dos descritos em seus rótulos.

Os resultados dessa análise corroboraram com os resultados obtidos em outros estudos, os quais indicaram uma grande variação dos níveis de cafeína presentes em seus produtos. Andrews *et al.* (2007), detectaram concentrações de cafeína variando de 0,07 a 307 mg/cápsula, com concentrações acima de 173% da quantidade declarada, enquanto Haller *et al.* (2004), encontraram concentrações de cafeína de até 90% menores que o declarado em 80% das amostras. Em um estudo realizado nos suplementos alimentares de origem brasileira foram detectados quantidades de cafeína em concentrações acima do permitido pela ANVISA (máximo de 420 mg por dose), com valores de 437,5 e 631,5 mg por dose, rotulados com 300 e 420 mg por dose respectivamente (INÁCIO; OLIVEIRA; ALVARES, 2013).

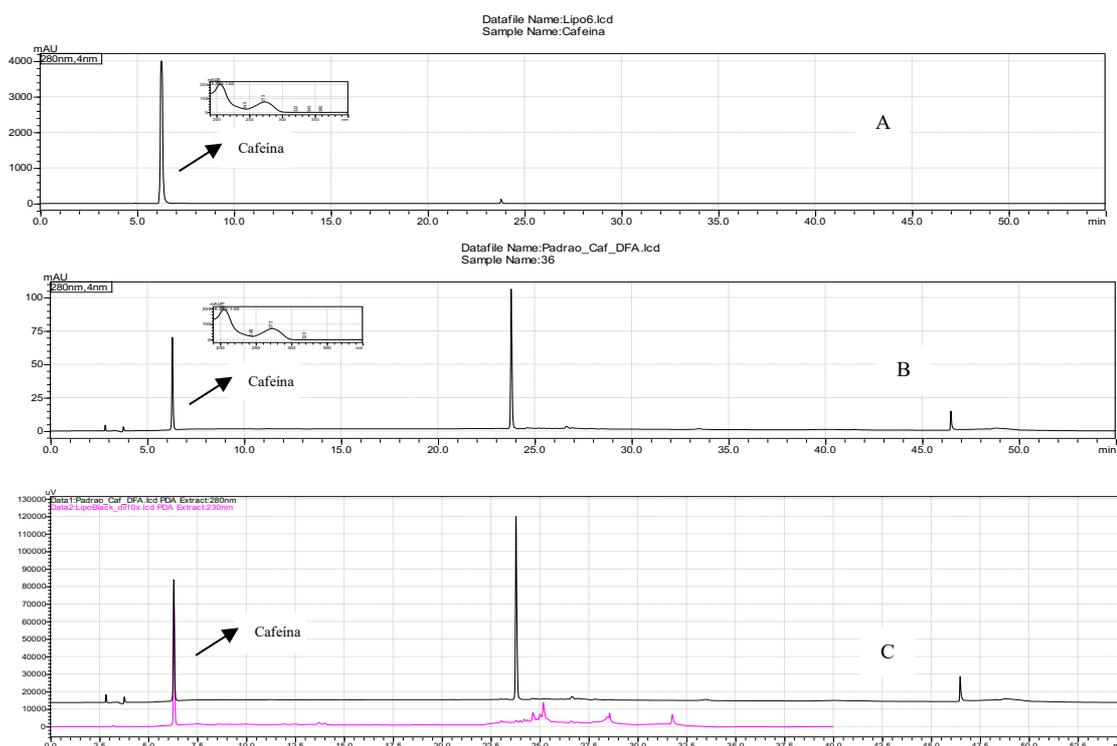
As concentrações de cafeína das amostras analisadas variaram de 12 a 207% de acordo com indicado no rótulo, entretanto nenhum deles apresentou valores acima do permitido pela ANVISA.

O consumo de suplementos alimentares em quantidades acima do anunciado ou sem indicação de sua presença no rótulo, associado à quantidade de cafeína presente na dieta normal, pode exceder a dose diária recomendada, uma vez que um adulto consome em média 200 a 225

mg/dia de cafeína, oriunda de diversas fontes como café, chás, chocolates, dentre outras (NEVES; CALDAS, 2017a). A ingestão de cafeína diária associada ao uso de suplemento alimentar adulterado, seguindo as recomendações rotuladas, já levou um usuário a ingestão de 1476mg de cafeína (VIANA *et al.*, 2015).

A Figura 23 mostra o cromatograma típico de uma amostra de cafeína analisada por HPLC-DAD, o padrão da cafeína com seu respectivo espectro de UV, e a sobreposição dos picos.

Figura 23: Cromatograma da amostra de Cafeína (A) Cromatograma do Padrão da Cafeína 50 μ g.mL⁻¹ (B); Cromatograma da sobreposição dos picos da Cafeína do padrão e da amostra de cafeína (C).

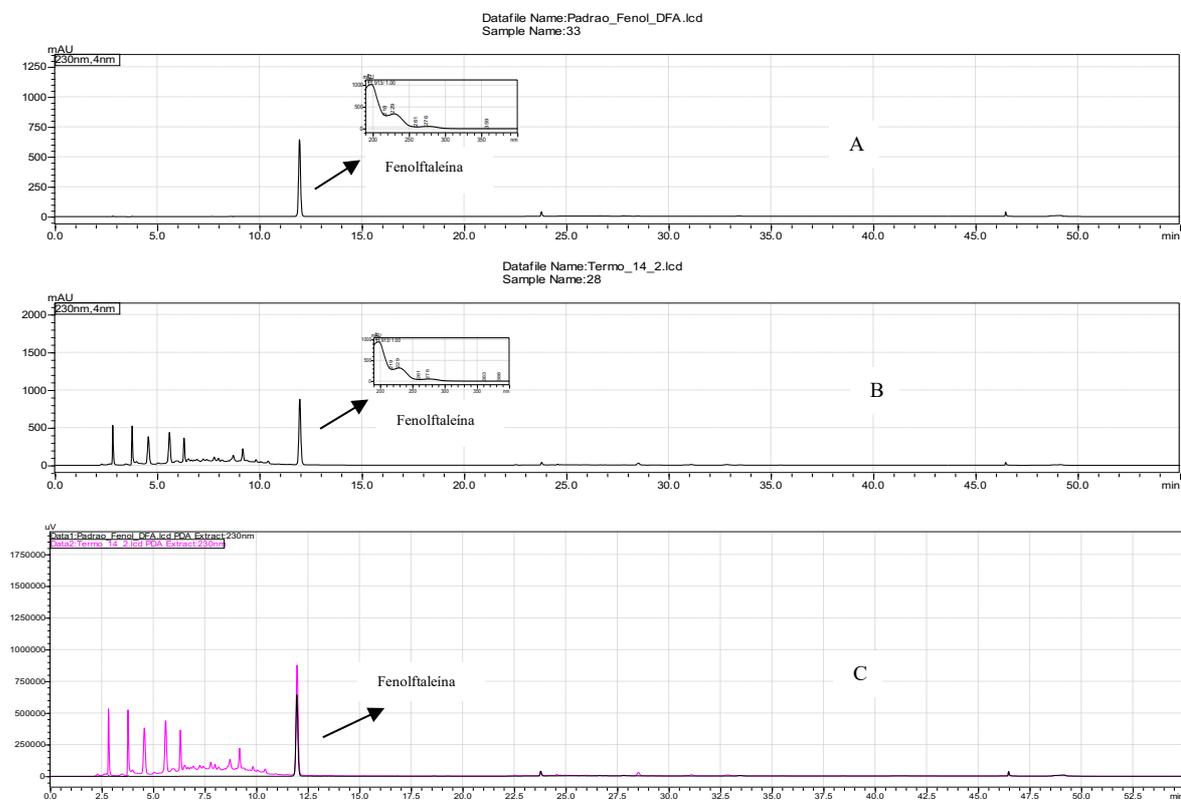


Fonte: Autoria própria

IV-2.4.2. Fenolftaleína

Nesse estudo, as duas amostras de suplementos alimentares positivas para fenolftaleína foram o Termogênico_14 e o Termogênico_15. A Figura 24 mostra o cromatograma da amostra positiva para fenolftaleína (Termogênico_14), o cromatograma do padrão da fenolftaleína e a sobreposição dos dois cromatogramas.

Figura 24: Cromatograma do Padrão de Fenolftaleína 50 µg.mL⁻¹(A); Cromatograma da amostra positiva Termo_14 para Fenolftaleína (B); Cromatograma da sobreposição dos picos da fenolftaleína do padrão e da amostra positiva (C).



Fonte: Autoria própria

IV-2.4.3. Sibutramina

Das 230 amostras analisadas, 14 apresentaram sibutramina em sua composição. Os valores encontrados encontram-se elencados na Tabela 16.

Tabela 16. Amostras positivas para sibutramina e valores encontrados por HPLC-DAD

n	Sibutramina	Substância declarada no rótulo	mg/dia
1	Termogênico_3	Cafeína	0,87
2	Termogênico_10	Cafeína	0,2
3	Termogênico_15	Cafeína	3,9
4	Termogênico_16	Xianxian cao, Jobsters, folha de lotus, laranja amarga, broto de bambu.	0,5
5	Termogênico_18	Xianxian cao, Jobsters, folha de lotus, laranja amarga, broto de bambu.	17
6	Termogênico_19	Sene, gelatina, cáscara sagrada, spirulina, cavalinha, espinheira santa,	0,3
7	Aminoácido_04	Focus, Carqueja doce, L-Leucina, L-Isoleucina, L-Valina, Cromo 50, Vitamina C, Vitamine B6	4,33
8	Carboidrato_05	Carboidrato, taurina, cafeina e cromo	0,96
9	Carboidrato_06	Carboidrato e Cafeína	4,13
10	Creatina_06	Creatina	11
11	Termogênico_11	Cafeína	0,004
12	Outros_06	Cafeína	0,09
13	Outros_25	Kawa-kawa, faseolamina, Chitosan, Cavalinha, Sene, Cromo, Capsiate, Ornitina	28
14	Outros_28	Não informado	17

Fonte: Autoria própria

A dose diária inicial de sibutramina para tratamento de pacientes com sobrepeso é de 10 mg, podendo chegar até 15 mg caso a resposta do paciente seja insuficiente à terapia prescrita (redução de peso menos de 2 kg em quatro semanas). Esta substância é contraindicada para pacientes com histórico de acidente vascular cerebral, doença cardíaca isquêmica, especialmente insuficiência cardíaca e arritmias, hipertensão arterial grave, glaucoma de ângulo fechado, algumas doenças do SNC e distúrbios alimentares. Uso concomitante da sibutramina com inibidores da

monoaminoxidase ou outros medicamentos de ação central para o tratamento de doenças psiquiátricas (antidepressivos, antipsicóticos) também é contraindicado (PLAVIK *et al.*, 2013). Portanto, o uso de sibutramina de forma indiscriminada, sem o devido acompanhamento médico, pode colocar em risco a saúde do usuário.

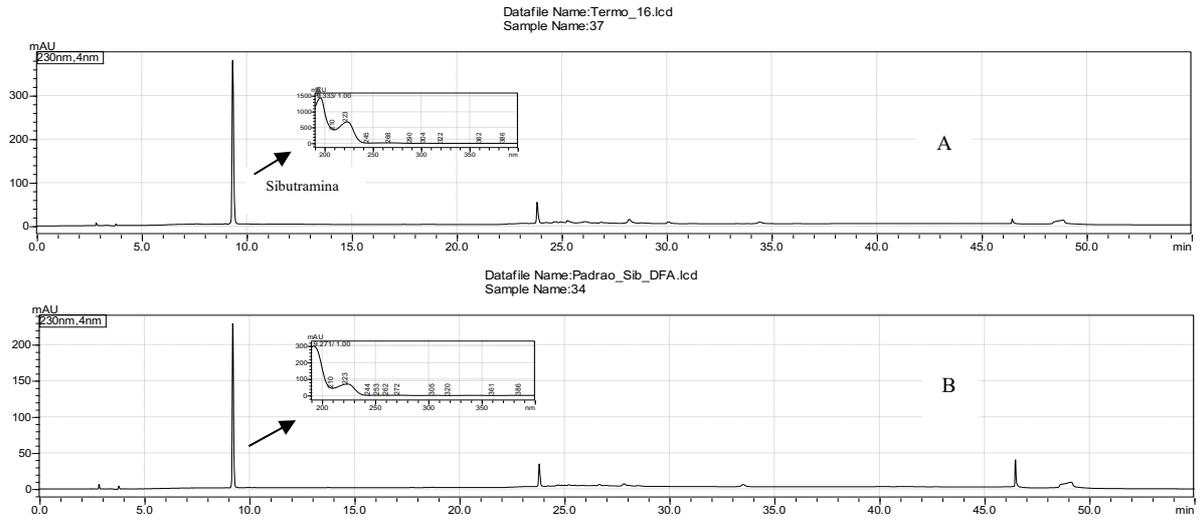
As doses diárias de sibutramina detectadas nos 14 suplementos alimentares adulterados variaram entre 0,004 e 28 mg. Em apenas 3 amostras (Termogênico_18, Creatina_06 e Outros_28), as doses detectadas estavam de acordo com os valores terapêuticos, variando entre 11 e 17 mg.

As amostras Termogênico_15, Aminoácido_04 e Carboidrato_06 apresentaram doses diárias de aproximadamente 4 mg. Pacientes tratados com doses de 5 mg tiveram uma redução de 3,9% do peso corporal (BRAY *et al.*, 1999). Portanto, apesar desses valores estarem abaixo dos valores terapêuticos, já são suficientes para se observar uma ação farmacológica. Carvalho *et al.* (2012) detectaram sibutramina em suplementos alimentares de origem vegetal em concentrações, que apesar de também estarem abaixo dos valores terapêuticos (3 mg por dose), representaram preocupação quanto aos efeitos adversos.

Cebi, Yilmaz, Sagdic (2017), consideraram doses de 0,375 mg de sibutramina em suplementos alimentares como adulteração dolosa por parte do fabricante. Efeitos anorexígenos e adversos relacionados ao uso da sibutramina, como insônia, taquicardia, aumento da pressão arterial e constipação, foram observados em pacientes que fizeram uso de doses diárias de 1mg de sibutramina (BRAY *et al.*, 1999). Portanto, independente da concentração, o uso contínuo de suplementos alimentares adulterados com sibutramina pode acarretar problemas como distúrbios psicomotores e hipercinesia (SHAPIRA *et al.*, 2016).

Dos casos positivos para sibutramina, apenas 5 amostras apresentaram a substância de forma isolada. Nas demais amostras, houve associação com outras substâncias, como cafeína, fenolftaleína e furosemida, as quais também são utilizadas para perda de peso. A Figura 25 ilustra o cromatograma da amostra Termogênico_16 positiva para sibutramina e o padrão da sibutramina.

Figura 25: Cromatograma da amostra positiva para Sibutramina Termo_16 (B); Padrão de Sibutramina 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (B).



Fonte: Autoria própria

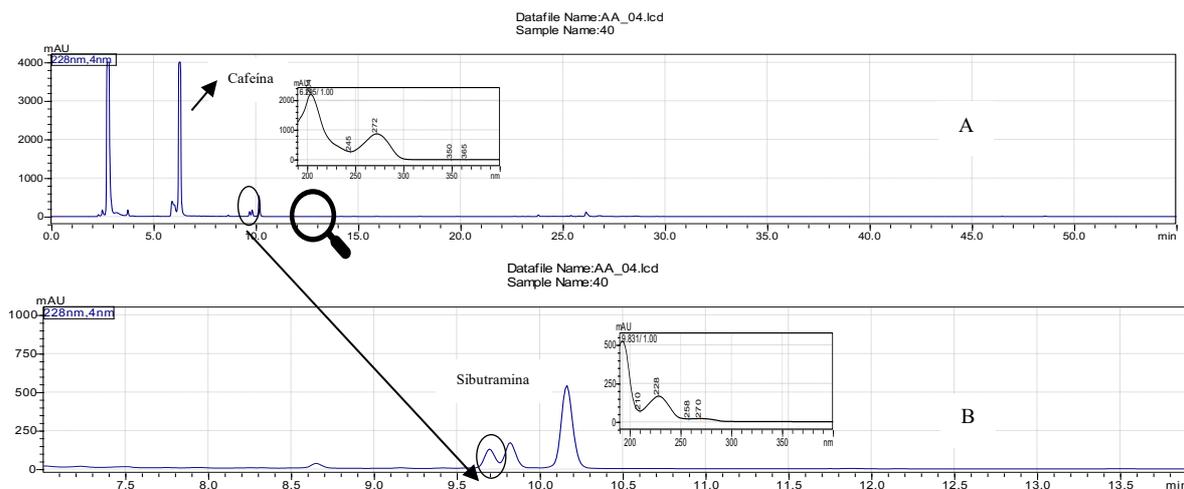
IV-2.4.4. Sibutramina e Cafeína

A associação mais reportada da sibutramina em suplementos alimentares é com a cafeína (NEVES; CALDAS, 2017b; WILSON; MASSE, 2016).

Essa associação foi observada em todos os suplementos positivos para sibutramina. Entretanto, em apenas duas amostras (Aminoácido_04 e Creatina_06), a cafeína foi considerada como adulterante, nas demais, essa substância estava descrita no rótulo desses compostos.

A Figura 26 mostra o cromatograma de uma amostra adulterada (Aminoácido_04) tanto com sibutramina quanto com cafeína.

Figura 26: Cromatograma da amostra do suplemento alimentar (Aminoácido_04) adulterada com cafeína e sibutramina (A); Zoom na região do tempo de retenção da sibutramina (B).



Fonte: Autoria própria

IV-2.4.5. Sibutramina e Fenolftaleína

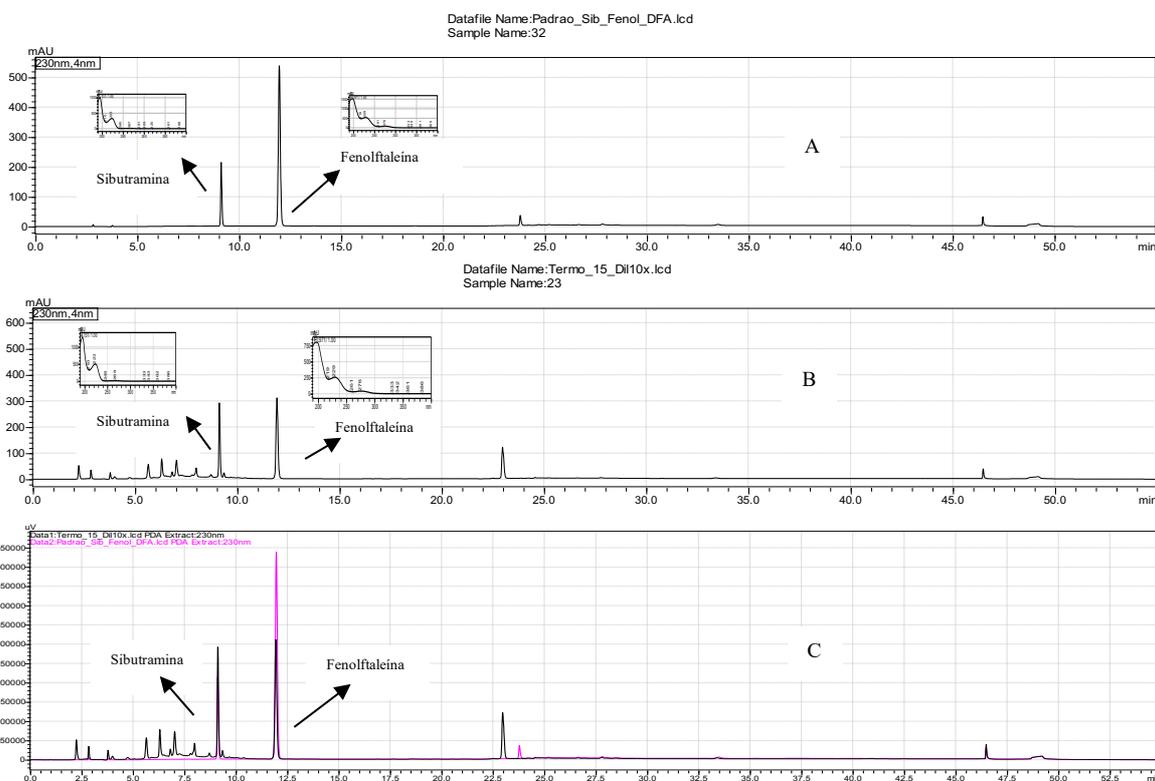
Uma outra substância frequentemente encontrada associada à sibutramina é a fenolftaleína (HACHEM *et al.*, 2016; RONNEY *et al.* 2015; SONG *et al.*, 2010; VAYSSE *et al.*, 2010).

Em 2014, a ANVISA emitiu um alerta de produtos norte-americanos adulterados com essas duas substâncias (ANVISA, 2014). A adição da fenolftaleína à suplementos adulterados pela sibutramina diminui a constipação causada pelo anorexígeno.

Vaysse *et al.* (2010) analisaram 20 suplementos alimentares e detectaram sibutramina (5 a 19,6 mg/cápsula) associada à fenolftaleína (4,4 a 66,1mg/cápsula) em cinco produtos; Song *et al.* (2014) detectaram valores semelhantes aos anteriores variando de 0,3 a 19 mg de sibutramina e 11 a 64 de fenolftaleína em 11 dos 17 produtos analisados; já Jin *et al.* (2017) detectaram 2 produtos contendo a mesma associação com sibutramina variando de 12,4 a 20,3 mg/cápsula, entretanto com quantidades mais baixas de fenolftaleína (2,6 e 5,3 mg). Para a avaliação do efeito farmacológico da fenolftaleína presente nos suplementos alimentares, Reewijk *et al.*, (2014) consideraram que o menor nível de dose de fenolftaleína seria de 6,5 mg de fenolftaleína dia⁻¹.

Apenas 01 suplemento alimentar apresentou resultado positivo para esses dois compostos associados (Termogênico_15). A Figura 27 mostra os cromatogramas da amostra positiva, dos padrões da sibutramina e fenolftaleína e a sobreposição dos mesmos.

Figura 27: Cromatograma do Padrão de Sibutramina e Fenolftaleína (A); Cromatograma da amostra positiva Termo_15 para Sibutramina e Fenolftaleína (B); Cromatograma da sobreposição dos picos de sibutramina e fenolftaleína do padrão e da amostra positiva (C).



Fonte: Autoria própria

As doses de sibutramina e fenolftaleína encontradas no suplemento alimentar Termogênico_15 foram de 3,9 e 2,5 mg, respectivamente. Sintomas relatados ao uso da sibutramina nessa concentração foram de anorexia, constipação, boca seca, náusea, taquicardia, sudorese, dentre outros (BRAY *et al.*, 1999; REEUWIJK *et al.*, 2014). Já os sintomas de uso agudo da fenolftaleína em doses abaixo de 6,2 mg não foram reportados na literatura. Portanto, é provável que a fenolftaleína não tenha exercido o efeito esperado nesse suplemento. Independente da concentração encontrada, essas contaminações representam um perigo a saúde dos usuários uma vez que a fenolftaleína é considerada uma substância carcinogênica e está proibida para uso terapêutico em todo o mundo (NTP, 1996).

IV-2.4.6. Sibutramina e Furosemida

Além da associação com cafeína e fenolftaleína, a sibutramina foi detectada com o diurético furosemida em três amostras de suplementos alimentares. Os diuréticos são comumente reportados

nos suplementos alimentares de origem vegetal, em especial, aqueles que objetivam a perda de peso (DOMÉNECH-CARBÓA *et al.*, 2013; VIANA *et al.*, 2018; ZENG *et al.*, 2017).

As quantidades de furosemida detectadas nas amostras dos suplementos foram de 92 mg (Outros_25), 9 mg (Termogênico_18) e 4,5 mg (Outros_28).

O suplemento alimentar denominado Outros_25 (Figura 28) foi analisado após uma mulher por volta de 30 anos vir a óbito por suspeita de uso desse suplemento. Amigos relataram que a usuária, profissional da área da saúde, adquiriu esse produto em uma farmácia de manipulação por indicação de colegas de trabalho para perda de peso. Dias após o uso, apresentou sintomas de náuseas e tonturas, tendo sido medicada em seu ambiente de trabalho e encaminhada para sua residência. Horas depois, voltou a sentir-se mal e seu marido a levou a outro hospital. Ainda no mesmo dia teve seu estado de saúde agravado, seguido de parada cardíaca e morte. Não houve encaminhamento ao Instituto Médico Legal, nem análises toxicológicas para verificar a causa da morte. A paciente não tinha histórico de doença cardiovascular nem fazia uso de medicamentos.

Figura 28: Rótulo do suplemento alimentar "Outros_25".



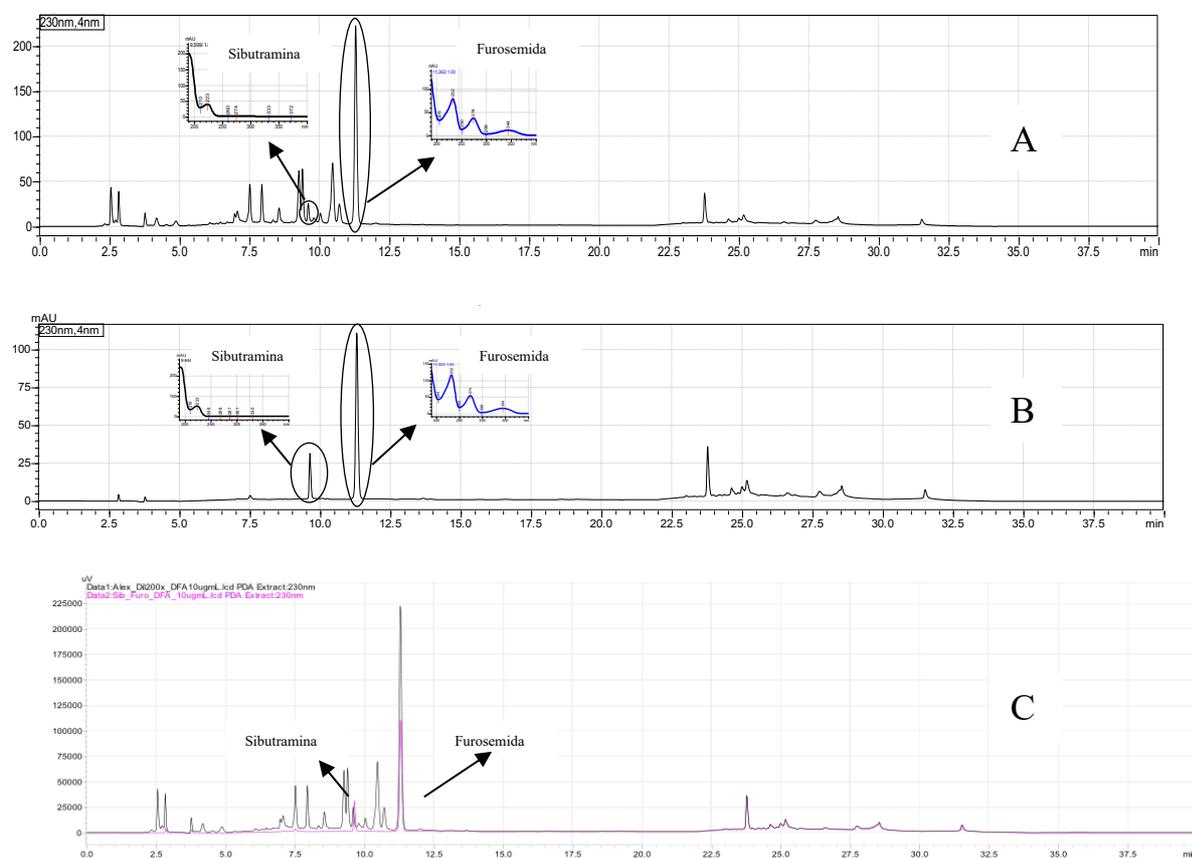
Fonte: Autoria própria

O suplemento alimentar suspeito de ter causado a morte da técnica de enfermagem foi encaminhado ao LAT e em seguida analisado. Após análise por HPLC-DAD, foram detectadas as substâncias sibutramina e furosemida, em quantidades de 7 e 23 mg por cápsula, respectivamente. A posologia contida no rótulo indicava uso oral de duas cápsulas duas vezes ao dia, totalizando 4 cápsulas ao dia (Figura 28). Isso significa que a usuária ingeriu por dia 28 mg de sibutramina e 92 mg de furosemida. As doses usuais de furosemida em pacientes em tratamento para hipertensão variam entre 20 a 40 mg, podendo chegar a 80 mg diários (CARONE *et al.*, 2016) e para

sibutramina, o máximo permitido é 15 mg (ANVISA, 2016). Portanto, além de utilizar medicamentos que precisam de supervisão médica regular, incluindo o acompanhamento contínuo dos níveis séricos de eletrólitos as quantidades ingeridas pela paciente para ambas as substâncias, estavam acima das doses terapêuticas (CARONE *et al.*, 2016).

A Figura 29 mostra o cromatograma referente ao suplemento analisado por HPLC-DAD indicando os picos de sibutramina e furosemida e seus respectivos espectros de absorção (A) em comparação com os padrões adicionados (B), e a sobreposição dos cromatogramas (preto) da amostra e do padrão (C).

Figura 29: Cromatograma da amostra Outros_24 (A); cromatograma com os padrões de sibutramina e furosemida 10 μ g.g-1 (B); sobreposição dos cromatogramas A e B (C).



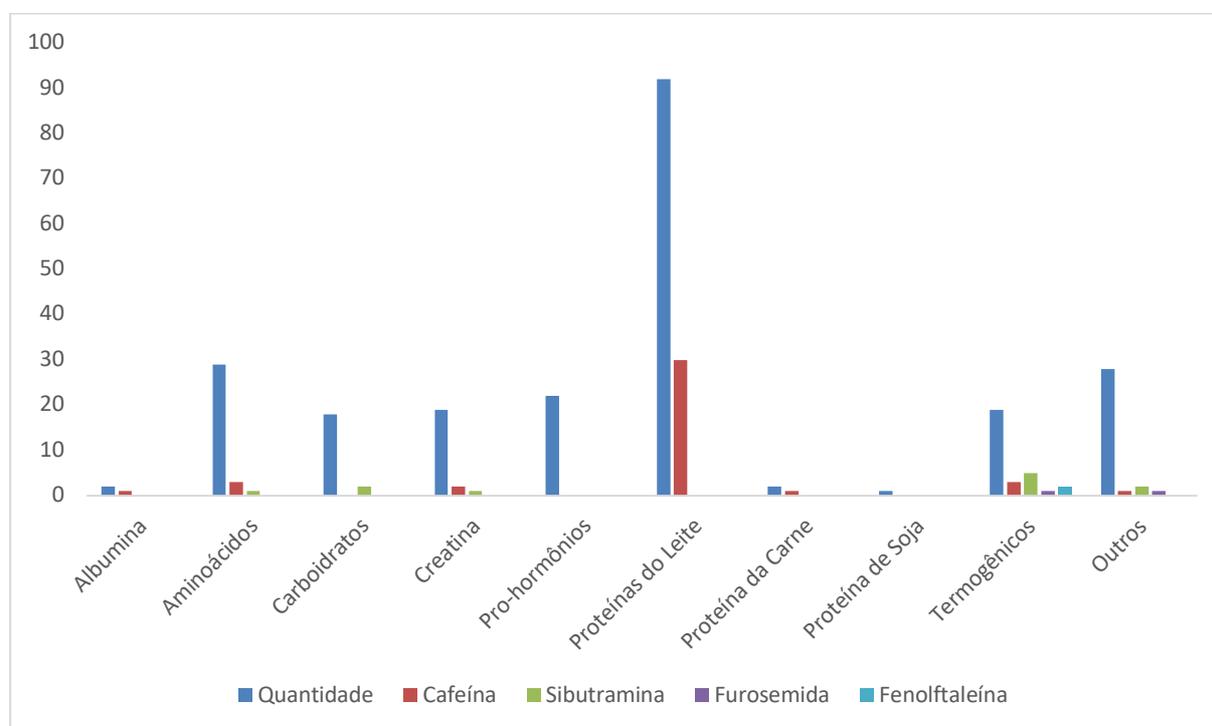
Fonte: Autoria própria

A diferença entre um suplemento alimentar adulterado por contaminação cruzada ou por adição dolosa por parte do fabricante está na dose detectada. Neves e Caldas (2017a), consideraram valores entre 0,5 e 0,7 mg por dose de cafeína como contaminação cruzada e acima de 18 mg como

adição dolosa. Reeuwijk *et al.* (2014), consideraram valores de sibutramina e fenolftaleína, abaixo de 0,1 mg e 6,5 mg, respectivamente, como casos de contaminação cruzada. Não foram identificados estudos a respeito da furosemida, nesse caso, por se tratar de um medicamento, foi considerado o mesmo valor dado a sibutramina, no caso 0,1 mg para casos de contaminação cruzada. Dos 58 suplementos alimentares adulterados, apenas 11 podem ser considerados adulterados por contaminação cruzada. Os demais, são consideradas adições dolosas por parte dos fabricantes com objetivo de melhorar a eficiência dos seus produtos.

Com relação ao tipo de suplemento e a substância presente como adulterante, a Figura 30 mostra um resumo dos resultados obtidos.

Figura 30: Tipos de suplementos e seus adulterantes



Fonte: Autoria própria

Os resultados obtidos demonstraram que 33% das amostras de proteína do leite estavam adulteradas com cafeína (1,0 a 106,8 mg por dose diária), sendo a única substância encontrada nesse tipo de suplemento. Os termogênicos, por outro lado, foi a classe de suplementos alimentares que apresentou maior percentual de amostras adulteradas (57,8%) e o maior número de substâncias adulterantes detectadas (três). Dos 19 termogênicos analisados, 11 continham substâncias adulterantes em sua composição (Cafeína, sibutramina e furosemida). Independente da concentração encontrada, duas dessas substâncias são consideradas medicamentos, os quais devem

ser somente prescritos por profissionais habilitados e sob acompanhamento contínuo. A presença desses adulterantes, em especial os anorexígenos e diuréticos, é explicada pela falsa ilusão que esses produtos aceleram o emagrecimento e a perda de gordura de forma natural. As demais classes de suplementos alimentares apresentaram percentuais baixos de adulteração quando comparados à proteína do leite e aos termogênicos.

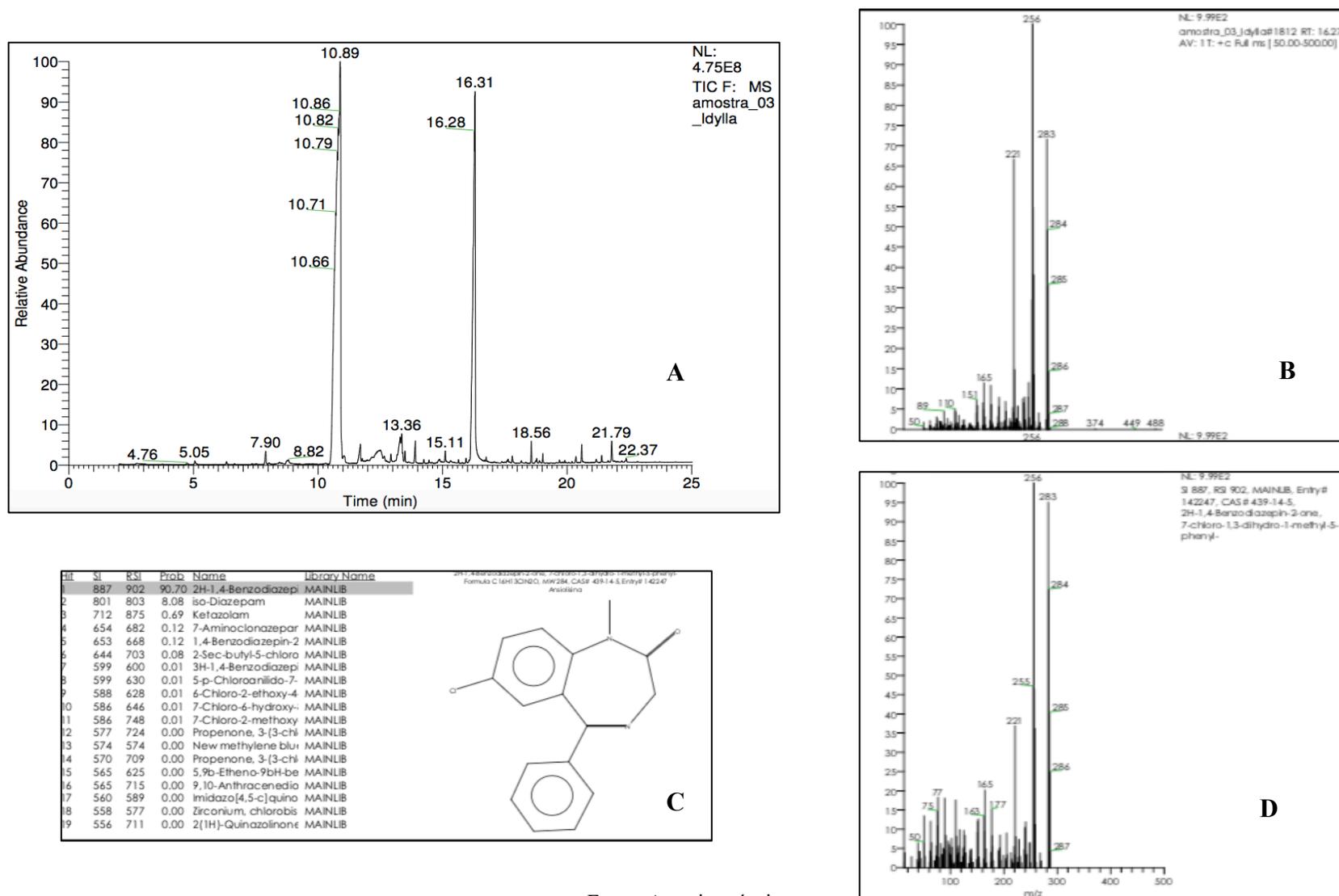
IV-2.4.7. Estudo de caso: investigação de Diazepam nas amostras positivas para anorexígenos

Na amostra Termogênico_18, além da associação da sibutramina com furosemida e cafeína, foi detectado, também o diazepam. O diazepam é um benzodiazepínico com ação ansiolítica e hipnótica. Uma vez que os ansiolíticos são utilizados no tratamento da overdose de sibutramina (BUCARETI *et al.*, 2015; GUNAYDIN *et al.*, 2015), são frequentemente encontrados associados em produtos contendo anorexígenos, para diminuir os efeitos da ansiedade causados por eles. Todavia, além da redução da ansiedade, o uso de benzodiazepínicos causa sedação e indução do sono, redução do tônus muscular e da coordenação motora, confusão mental e amnésia anterógrada (bloqueio da memória enquanto estão sob influência da substância). Ademais, o uso concomitante com outros depressores do sistema nervoso central, principalmente o etanol, pode causar depressão respiratória severa (BRUTTON *et al.*, 2012).

O diazepam foi detectado por um método de triagem por GC-MS desenvolvido e validado pelo LAT. Não foi feita a quantificação, apenas a identificação dessa substância. No Brasil, anorexígenos como anfepramona e femproporex também foram detectados associados ao diazepam e outros ansiolíticos em produtos considerados “100% naturais” (CARVALHO *et al.*, 2010).

A Figura 31 mostra o cromatograma obtido por GC-MS RT 16,27 minutos (A), espectro de massas da amostra do Termogênico_18 (Amostra 03) (B), espectro obtido da biblioteca GC-MS (C) e substância identificada pela biblioteca do GC-MS (D).

Figura 31: Detecção de diazepam através da triagem por GC-MS.



Fonte: Autoria própria

IV - 3. MÉTODO ANALÍTICO PARA DETERMINAÇÃO DE ESTEROIDES ANDRÓGENOS ANABOLIZANTES EM SUPLEMENTOS ALIMENTARES POR LC-MS/MS

A determinação de EAA em suplementos alimentares por HPLC-DAD é limitada pela estrutura molecular dessa classe de compostos, que não apresenta grupos cromóforos (*i.e.* oxandrolona e metasterona) ou que apresenta grupos cromóforos de baixa energia (a maioria dos derivados da testosterona). Por consequência, a técnica HPLC-DAD ofereceu limites de detecção que inviabilizou o emprego da técnica para fins quantitativos, devido à necessidade de uso de grandes quantidades de padrões analíticos ausentes no laboratório. Sendo uma classe de compostos de alto risco à saúde humana por influenciar no sistema endócrino e ser amplamente utilizado como adulterante em suplementos alimentares, optou-se por desenvolver um método quantitativo, empregando a técnica LC-MS/MS. Essa técnica, além apresentar maior especificidade na identificação de compostos orgânicos, oferece maior detectabilidade analítica, exigindo, assim quantidade de padrões analíticos muito menores. Frente à técnica por GC-MS, a LC-MS/MS apresenta a vantagem da não necessidade de etapa de derivatização para aumentar a volatilidade dos EAA, etapa que torna a análise mais custosa, demorada e passível de erros.

O emprego de um método analítico baseado em LC-MS/MS buscou a determinação das onze substâncias EAA de interesse deste trabalho, incluindo a oxandrolona e metasterona, as quais não foram detectados por HPLC-DAD, por não apresentarem grupos cromóforos em sua estrutura molecular (testosterona base, metiltestosterona, propionato de testosterona, androstenediona deidroepiandrosterona, estanozolol, trembolona, decanoato de testosterona e decanoato de nandrolona, oxandrolona e metasterona).

IV - 3.1. Método de preparo de amostra

O método de preparo da amostra para determinação das onze substâncias EAA por LC-MS/MS foi o mesmo descrito para a determinação de adulterantes por HPLC-DAD. Contudo, uma vez que a técnica LC-MS/MS apresenta sensibilidade na ordem de ng L^{-1} , foi necessário adicionar uma etapa de diluição do extrato da amostra. A etapa de diluição além de preservar e aumentar o tempo de vida útil do equipamento, economiza o uso de padrões analíticos.

A proporção de diluição 1:10.000 foi estabelecida com base na concentração de efeito e nos limites de detecção do equipamento. Como diluente foi empregada uma solução 1:1, metanol:água, v/v. Após diluição, 30 µL foram injetados no LC-MS/MS.

IV - 3.2. Determinação de EAA por LC-MS/MS

A análise das amostras de suplementos alimentares quanto à presença de EAA se deu em parceria com o Hospital Israelita Albert Einstein/(HIAE) localizado na cidade de São Paulo, por meio de um convênio entre as partes interessadas.

O método por LC-MS/MS utilizado nesta etapa baseou-se no método desenvolvido e aplicado pelo HIES na determinação de oito das onze substâncias de interesse deste trabalho em amostras de plasma humano. Para o propionato de testosterona, decanoato de nandrolona e decanoato de testosterona, as quais não faziam parte do rol de identificação do laboratório. Não houve otimização do método cromatográfico, apenas aumento do tempo de eluição uma vez que as substâncias adicionadas apresentaram forte interação pela coluna de fase reversa.

A Tabela 17 elenca os analitos analisados juntamente com o padrão interno utilizado, a 17-hidroxiprogesterona-d8 (PI), seus respectivos tempos de retenção, íons precursores, quantificadores e qualificadores.

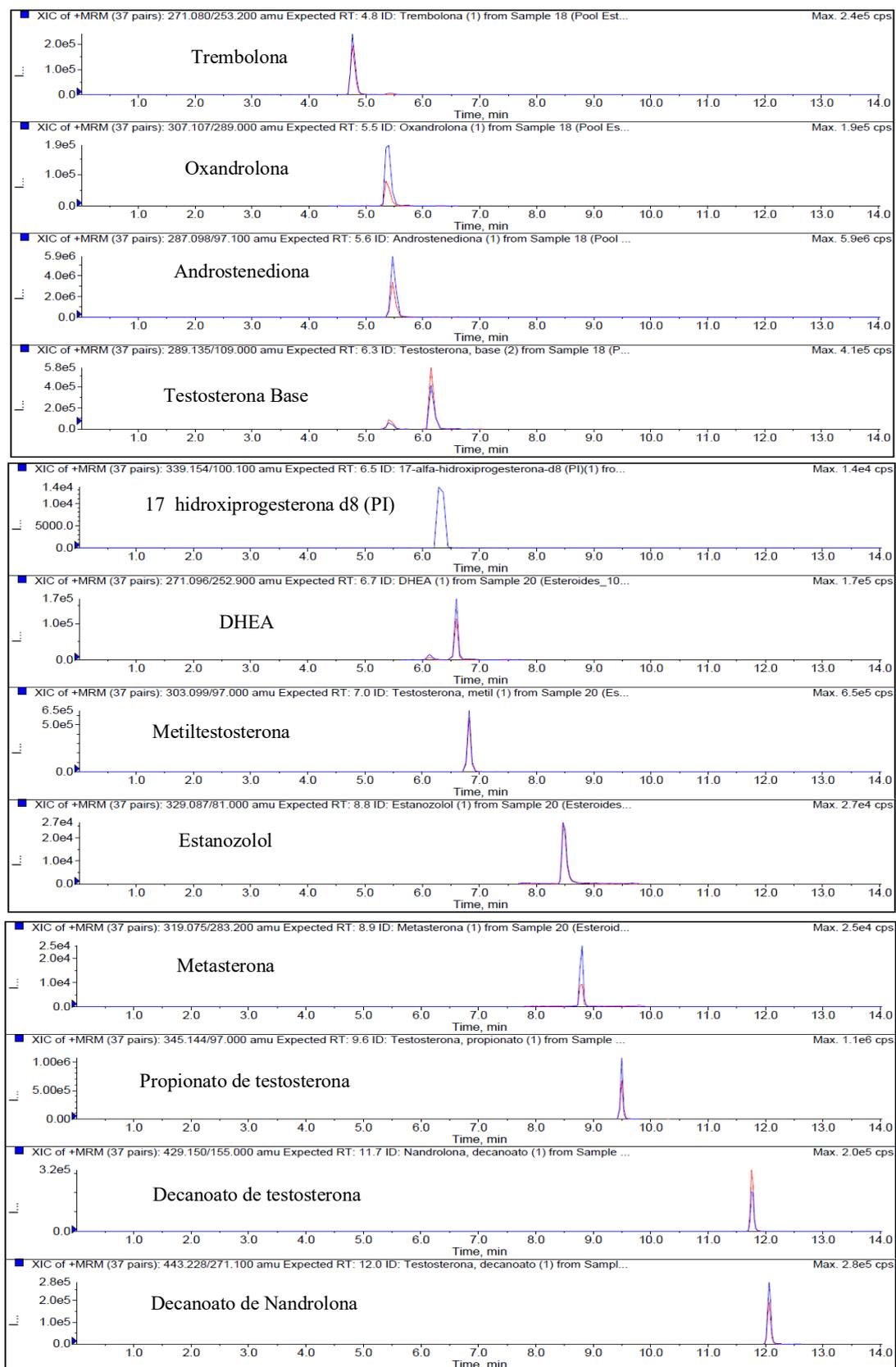
Tabela 17. Tempo de retenção, íon precursor, íon quantificador (QT) e íons qualificadores Q1 e Q2 para os EEA.

Analito	Tempo de Retenção (min)	Íon Precursor	QT	Q1	Q2
Trembolona	5,2	271	253	199	183
Oxandrolona	5,5	307	289	271	229
Androstenediona	5,8	287	97	109	123
Testosterona Base	6,4	289	109	97	121
17 α hidroxiprogesterona d8 (PI)	6,5	339	100	-	-
DHEA	7,0	271	252	213	197
Metiltestosterona	7,1	303	97	109	107
Estanozolol	8,6	329	81	121	109
Metastetona	8,9	319	283	301	229
Propionato de Testosterona	9,5	345	97	109	271
Decanoato de Testosterona	11,7	443	271	253	155
Decanoato de Nandrolona	11,9	429	155	257	163

Fonte: Autoria própria

A Figura 32, ilustra os cromatogramas dos 11 EAA obtidos separadamente de acordo com as transições de cada substância.

Figura 32: Cromatogramas obtidos separadamente dos 11 EEA e PI por LC-MS/MS



Fonte: Autoria própria

IV - 3.3. Avaliação do método analítico baseado em LC-MS/MS para determinação de EAA em suplementos alimentares

O método analítico proposto para a determinação de AEE em suplementos alimentares baseado em LC-MS/MS foi avaliado com base nos seguintes parâmetros: efeito matriz, LOQ, linearidade, precisão e exatidão.

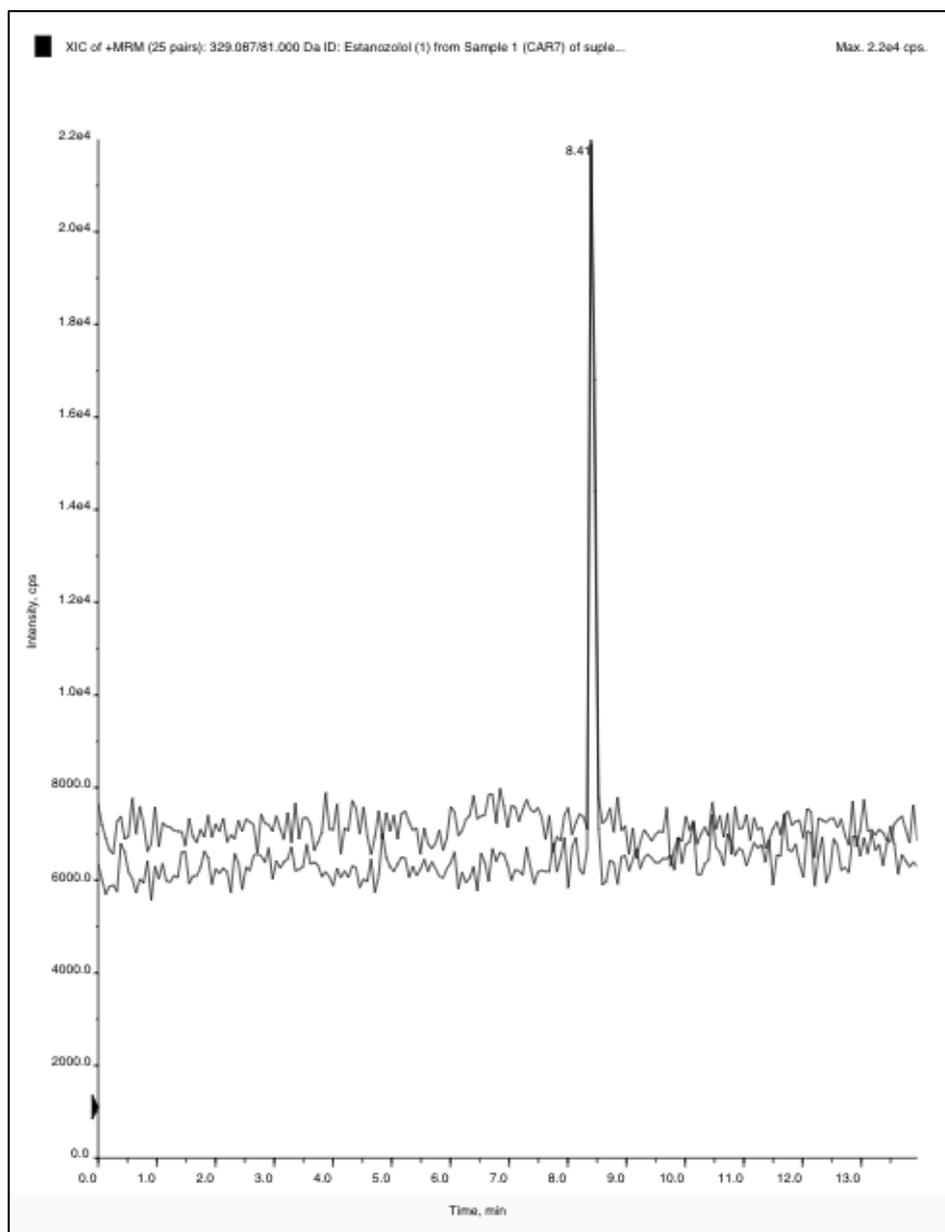
A eficiência do método de preparo de amostra, baseada na recuperação da extração sólido-líquido, foi avaliada para as substâncias testosterona base, metiltestosterona, e propionato de testosterona, por HPLC-DAD; os resultados foram apresentados no item III-4.3.2, pg 88. Para as demais substâncias, por não haver a disponibilidade de padrões primários, os ensaios não foram realizados. No propósito de garantir a confiabilidade do resultado, formulações de suplementos alimentares cujos rótulos dispõem a concentração de EAA foram analisados.

Os demais ensaios de avaliação do método analítico foram realizados por meio da adição de padrão analítico no extrato da matriz, ou sejam, após a etapa de preparo de amostra descrito no item II-4.1.12, pg 85.

IV-3.3.1. Efeito Matriz

O resultado observado após infusão direta das diferentes matrizes no espectrômetro de massas, não apresentou variação iônica significativa dos analitos, portanto não foi considerado o efeito matriz para LC-MS/MS. A Figura 33 representa a intensidade do sinal do estanozolol após infusão de uma amostra extraída de carboidrato. Os demais analitos em todas as amostras infundidas apresentaram resultados semelhantes.

Figura 33: Análise do efeito matriz para estanozolol antes e após infusão da amostra de carboidrato (CAR7)



Fonte: Autoria Própria

IV-3.3.2. Limites de quantificação

Os limites de quantificação encontrados para LC-MS/MS foram considerados satisfatórios, uma vez que todos apresentaram valores de CV % dentro dos limites aceitáveis ($CV < 15\%$) e estão significativamente abaixo dos valores considerados de contaminação (10% da concentração de efeito). Os valores de LOQ foram considerados semelhantes aos reportados na literatura e encontram-se na Tabela 18.

Tabela 18. Limites de quantificação para 11 EAA

Analito	LOQ (ng.g ⁻¹)	CV (%)
Trembolona	50	3
Oxandrolona	10	4
Androstenediona	10	4
Testosterona Base	10	3
DHEA	10	10
Metiltestosterona	10	3
Estanozolol	70	4
Metastetona	10	12
Propionato de Testosterona	10	3
Decanoato de Testosterona	10	4
Decanoato de Nandrolona	10	2

Fonte: Autoria própria

IV-3.3.3. Linearidade

A linearidade do método analítico proposto foi avaliada considerando as concentrações de contaminação e as concentrações de efeito para cada substância.

A Tabela 19 mostra a equação da reta, o fator F e o coeficiente de determinação obtido para as 11 substâncias EAA.

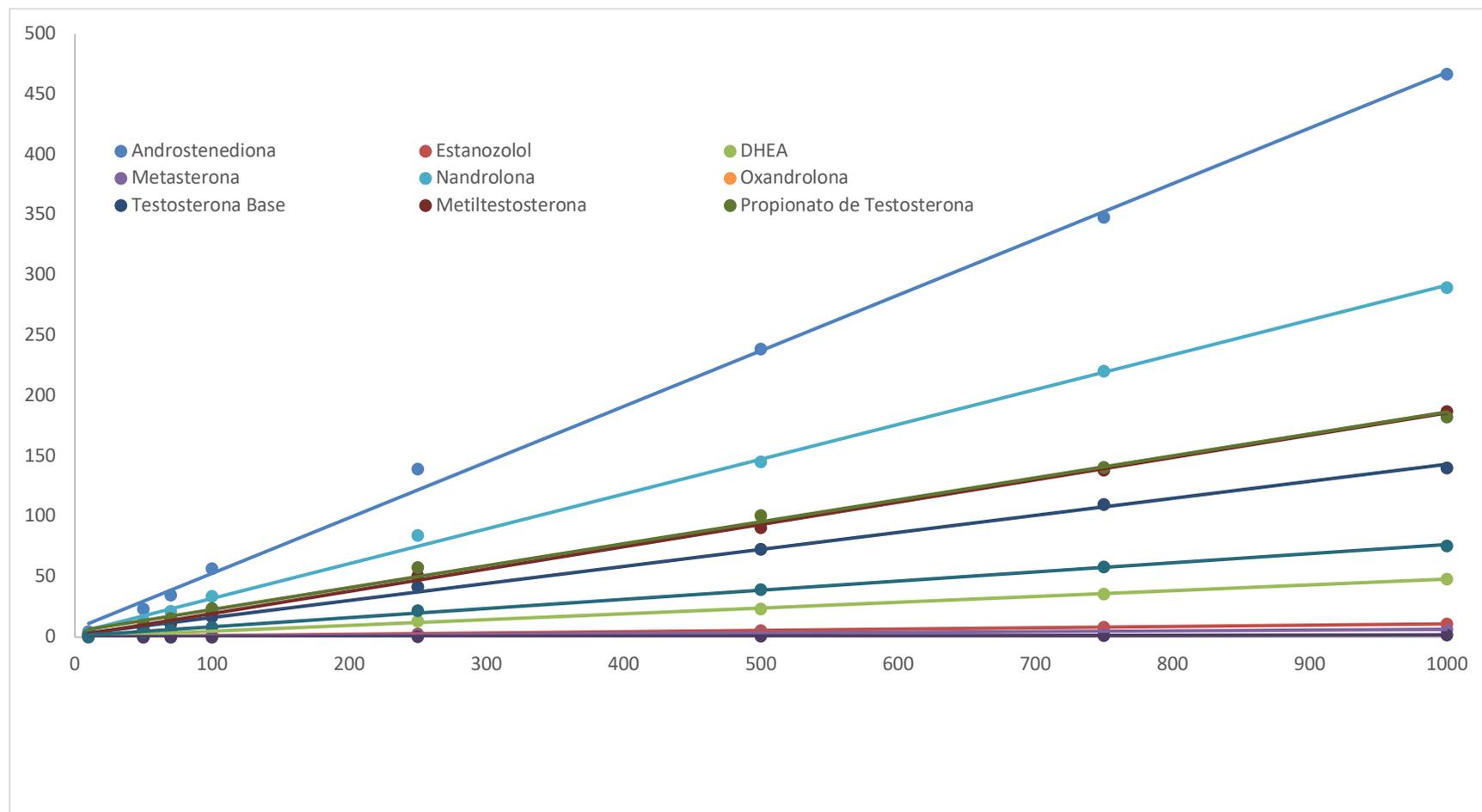
Tabela 19. Equação da reta, fator F e r^2 para os 11 EAA.

Analito	Equação	Fator F	r^2
Trembolona	$y = 0.017791x - 0.01153$	$1/x^2$	0,993
Oxandrolona	$y = 0.469835 - 0.0235$	$1/y^2$	0,996
Androstenediona	$y = 4.8596x - 0.6835$	$1/y^2$	0,996
Testosterona Base	$y = 3.007295x - 0.02308$	$1/y^2$	0,996
DHEA	$y = 0.471433x - 0.02473$	$1/x^2$	0,998
Metiltestosterona	$y = 1.86568x - 0.0929$	$1/y^2$	0,998
Estanozolol	$y = 0.111954x - 0.04329$	$1/y^2$	0,998
Metastetona	$y = 0,065921x - 0,0052$	$1/y^2$	0,996
Propionato de Testosterona	$y = 2.002554x + 0.094662$	$1/x^2$	0,991
Decanoato de Testosterona	$y = 0.795425x - 0.07246$	$1/y^2$	0,996
Decanoato de Nandrolona	$y = 0.614544x - 0.06433$	$1/x^2$	0,997

Fonte: Autoria própria

Considerando todos os analitos, o método apresentou um comportamento linear ($r > 0,99$) entre a concentra do LOQ e 1000 ng g⁻¹. Devido a ampla faixa de concentração considerada na curva de calibração, o fenômeno da heterossedasticidade deve ser considerado para a quantificação das substâncias. As curvas de calibração para os onze analitos encontram-se na Figura 34.

Figura 34: Curvas de Calibração para os onze EAA



Fonte: Autoria própria

IV-3.3.4. Precisão

As precisões inter e intradia em três concentrações, seis replicadas cada, em três dias consecutivos. Os valores obtidos foram avaliados pela análise de variância ANOVA e os resultados descritos na Tabela 20

Tabela 20. Resultado da precisão inter e intradia para os onze EAA por LC-MS/MS.

Analito	Concentração controle	Interdia	Intradia
Trembolona	CB (75 ng.g-)	5	5
	CM (450 ng.g-)	10	5
	CA (900 ng.g-)	13	16
Oxandrolona	CB (75 ng.g-)	18	5
	CM (450 ng.g-)	11	5
	CA (900 ng.g-)	10	3
Androstenediona	CB (75 ng.g-)	11	3
	CM (450 ng.g-)	14	2
	CA (900 ng.g-)	9	2
Testosterona Base	CB (75 ng.g-)	8	5
	CM (450 ng.g-)	11	2
	CA (900 ng.g-)	12	2
DHEA	CB (75 ng.g-)	13	4
	CM (450 ng.g-)	14	4
	CA (900 ng.g-)	13	5
Metiltestosterona	CB (75 ng.g-)	6	5
	CM (450 ng.g-)	11	3
	CA (900 ng.g-)	9	2
Estanozolol	CB (75 ng.g-)	15	3
	CM (450 ng.g-)	14	3
	CA (900 ng.g-)	5	3
Metastetona	CB (75 ng.g-)	12	5
	CM (450 ng.g-)	14	3
	CA (900 ng.g-)	5	4
Propionato de Testosterona	CB (75 ng.g-)	8	4
	CM (450 ng.g-)	15	3
	CA (900 ng.g-)	11	3
Decanoato de Testosterona	CB (75 ng.g-)	12	4
	CM (450 ng.g-)	12	3
	CA (900 ng.g-)	6	3
Decanoato de Nandrolona	CB (75 ng.g-)	14	5
	CM (450 ng.g-)	11	3
	CA (900 ng.g-)	8	4

IV-3.3.5. Exatidão

A exatidão do método foi realizada em três diferentes concentrações e em seis replicatas por concentração. Os valores encontrados estão de acordo com as normas encontradas para validação em que a exatidão do método deve se encontrar acima de 80% para as concentrações baixas e 85% para concentrações média e alta. Os valores para exatidão do método por LC-MS/MS encontram-se na Tabela 21:

Tabela 21: Exatidão para o método proposto para EAA por LC-MS/MS

Analito	Exatidão		
	CB	CM	CA
Trembolona	95	96	108
Oxandrolona	86	98	95
Androstenediona	87	101	98
Testosterona Base	96	102	99
DHEA	99	110	101
Metiltestosterona	91	101	101
Estanozolol	103	102	99
Metastetona	94	101	101
Propionato de Testosterona	94	97	96
Decanoato de Testosterona	90	99	97
Decanoato de Nandrolona	89	98	98

Fonte: Autoria própria

Uma vez que os parâmetros de validação foram determinados a partir dos EAA adicionados às matrizes, fez-se necessária uma etapa adicional para averiguação da eficiência do método proposto. Para isso, dois suplementos alimentares contendo EAA, em que o rótulo constava DHEA 25 mg e Oxandrolona 5 mg por cápsula foram analisados. Os dois produtos conhecidos foram analisados em sextuplicata e as concentrações encontradas estão apresentadas na Tabela 22.

Tabela 22: Valor descrito no rótulo e valor calculado para cápsulas de DHEA e Oxandrolona

Analito	Teor descrito no rótulo (mg/capsula)	Teor médio encontrado (mg/cápsula, n=6)	Exatidão %	CV % (n=6)
DHEA	25	23,3 (17.5 – 38)	93	31
Oxandrolona	5	5,4 (4.3 - 6.6)	108	26

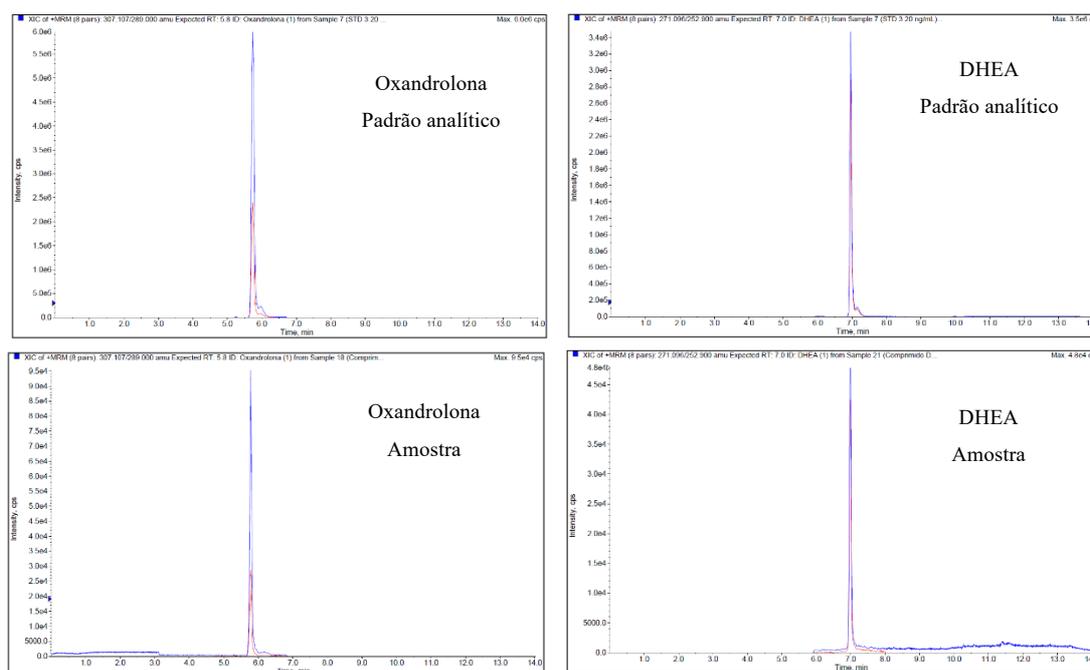
Fonte: Autoria própria

Os resultados obtidos para os suplementos contendo DHEA e Oxandrolona mostrou uma exatidão de 93% para DHEA e de 108% para a Oxandrolona, com relação às concentrações encontradas nos rótulos dos produtos analisados. Contudo, observou-se uma ampla variação nos resultados obtidos entre as cápsulas de um mesmo produto e mesmo lote, conforme mostrado na tabela acima; concentrações entre 70 a 120% (CV= 31%) para a DHEA e entre 86 e 132% (CV = 26 %) para Oxandrolona, com relação às concentrações estipuladas nos rótulos, foram observadas.

Tendo em vista que a precisão do método analítico para os quatro EAA avaliados por HPLC foi de 11%, a variação no teor de DHEA e Oxandrolona observado nas amostras, possivelmente, está associada à variação durante a fabricação das cápsulas. Essa variação, indica o descumprimento das boas práticas de fabricação, o que pode contribuir, ainda, para erros de formulação e contaminação de produtos.

A Figura 35 mostra os cromatogramas dos padrões da Oxandrolona e DHEA e os cromatogramas obtidos após análise das cápsulas.

Figura 35: Cromatograma dos EAA no LC-MS/MS.



Fonte: Autoria própria

IV - 3.4. Análise de suplementos alimentares quanto à presença de EAA por LC-MS/MS

As 230 amostras de suplementos alimentares adquiridas pelo LAT-USP foram submetidas a análise por LC-MS/MS por meio do método proposto. O resultado foi negativo para 100% das amostras analisadas, corroborando com os resultados pelo método do HPLC-DAD.

O resultado negativo dos EAA nos suplementos alimentares adquiridos nesse estudo não significa que não ocorra adulteração desses produtos com essas substâncias. Suplementos alimentares positivos para essa classe são frequentemente apreendidos em operações de fiscalização realizadas tanto pelos órgãos de repressão como pelos órgãos de vigilância sanitária.

Na Itália, diversos produtos apreendidos pela Agência Italiana Anti-adulteração e Segurança relataram a presença de EAA em suplementos alimentares. Esses produtos eram suspeitos de serem adulterados e falsificados (ABATTE *et al.*, 2015; PELEGRINI *et al.*, 2012). Na Alemanha, autoridades de vigilância de medicamentos confiscaram comprimidos de vitamina C, multivitamínicos e magnésio contaminados com EAA que foram produzidos pelo mesmo fabricante na mesma linha de produção dentro do mesmo intervalo de tempo entre os produtos de esteroides anabolizantes (GEYER *et al.*, 2008). Na Bélgica, autoridades

interceptaram 19 amostras de suplementos que continham pro-hormônios em vez de EAA relatados em seus rótulos (VAN POUCKE *et al.*, 2007). E no Brasil, dados obtidos por meio do Instituto Nacional de Criminalística da Polícia brasileira – Departamento Federal (DPF) –, identificou diversos casos de adulteração e falsificação com EAA em 3676 produtos (NEVES; CALDAS, 2013).

Além da suspeita de adulteração, outra abordagem considerada para os casos positivos de EAA é a forma farmacêutica do produto. Os EAA são comumente disponíveis na forma de injetáveis por apresentarem melhor biodisponibilidade por via intramuscular. Dos 19 suplementos alimentares obtidos no mercado ou sites na Coreia do Sul, 16 estavam na forma injetável e apenas 3 na forma sólida (CHO, S. *et al.*, 2015). Uma proporção semelhante foi observada na Itália em 13 casos positivos, sendo 11 injeção intramuscular (PELEGRINI, M., *et al.*, 2012). No Brasil, de 328 medicamentos e 17 suplementos alimentares analisados pelo DPF, 241 foram injeções intramusculares (NEVES; CALDAS, 2017).

As amostras analisadas neste estudo diferem dos relatos anteriores, pois todos suplementos analisados estão na forma sólida para administração oral, tendo sido coletadas aleatoriamente de usuários de suplementos alimentares na população brasileira, sem qualquer indicação de falsificação ou adulteração. Além disso, esses produtos não possuíam no rótulo a presença de AAS e pró-hormônios e não tinham indicação para melhorar a massa e força muscular, com exceção de 16 suplementos minerais que visam aumentar os níveis endógenos de testosterona.

Capítulo V - CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos nesse trabalho, concluiu-se que os métodos analíticos desenvolvidos por HPLC-DAD e LC-MS/MS para determinação de adulterantes em suplementos alimentares, apresentaram valores de recuperação, seletividade, efeito matriz, limites, linearidade, precisão e exatidão, dentro dos limites estabelecidos. Aliado a isso, foi desenvolvido um método de preparo de amostras simples e reprodutível.

Das 230 amostras de suplementos alimentares analisadas, 58 apresentaram resultado positivo para uma das substâncias pesquisadas. Destas, apenas 25% foram consideradas adulteradas por contaminação cruzada. As demais, foram consideradas adições dolosas por parte dos fabricantes com objetivo de melhorar a eficiência dos seus produtos. Independente da intenção do fabricante, suplementos alimentares que apresentem em sua composição, substâncias classificadas como medicamentos, são inadmissíveis pelos órgãos de fiscalização e passíveis de punição.

Esses resultados indicam a necessidade de ações mais efetivas por parte das autoridades sanitárias no sentido de fiscalizar com mais eficiência a produção e a comercialização desses produtos e alertar a população para que fiquem atentos à possível adulteração de suplementos alimentares e aos riscos associados ao consumo desses produtos.

Além disso, dos suplementos alimentares adulterados, 48% são de origem brasileira. Esse alto percentual demonstra que apesar da legislação brasileira ser mais restritiva que americana e europeia, o controle e a fiscalização desses produtos ainda são deficientes.

Capítulo VI - REFERÊNCIAS

ABBATE, V. *et al.* Anabolic steroids detected in bodybuilding dietary supplements – a significant risk to public health. **Drug Testing and Analysis**, v. 7, p.609–618, 2015.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. ANVISA. **Portaria nº 344, de 12 de maio de 1998**. Aprova o Regulamento Técnico sobre substâncias e medicamentos sujeitos a controle especial. 1998.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. ANVISA. **Resolução nº 23, de 15 de março de 2000**. Dispõe sobre o manual de procedimentos básicos para registro e dispensa da obrigatoriedade de registro de produtos pertinentes à área de alimentos. 2000.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. ANVISA. **Resolução-RE nº 571, de 5 de abril de 2002**. Suspende a fabricação, comercialização, e venda/dispensação de medicamentos que contendo a substância fenolftaleína. 2002.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. ANVISA. **Resolução – RE nº 899, de 29 de maio de 2003**. Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos. 2003.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. ANVISA. **Resolução da Diretoria Colegiada nº 18, de 27 de abril de 2010**. Dispõe sobre alimentos para atletas. 2010.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. ANVISA. Alerta: Alimento com sibutramina e outros produtos são interditados pela Agência. Publicado em 07 de abril de 2011. Disponível em: < <http://portal.anvisa.gov.br/>>. Acesso: 20 de fevereiro de 2019.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. ANVISA. Alerta: presença não declarada de sibutramina e fenolftaleína em produtos. Publicado em 21 de novembro de 2014. Disponível em: < <http://portal.anvisa.gov.br/>>. Acesso: 20 de fevereiro de 2019.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. ANVISA. **Resolução da Diretoria Colegiada nº 133, de 15 de dezembro de 2016**. Altera a Resolução da Diretoria Colegiada -RDC nº 50, de 25 de setembro de 2014, que dispõe sobre as medidas de controle

de comercialização, prescrição e dispensação de medicamentos que contenham as substâncias anfepramona, femproporex, mazindol e sibutramina, seus sais e isômeros, bem como intermediários e dá outras providências. 2016.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. ANVISA. **Resolução da Diretoria Colegiada nº 239, de 26 de julho de 2018.** Estabelece os aditivos alimentares e coadjuvantes de tecnologia autorizados para uso em suplementos alimentares. 2018a.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. ANVISA. **Resolução da Diretoria Colegiada nº 240, de 26 de julho de 2018.** Altera a Resolução - RDC nº 27, de 6 de agosto de 2010, que dispõe sobre as categorias de alimentos e embalagens isentos e com obrigatoriedade de registro sanitário. 2018b.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. ANVISA. **Resolução da Diretoria Colegiada nº 241, de 26 de julho de 2018.** Dispõe sobre os requisitos para comprovação da segurança e dos benefícios à saúde dos probióticos para uso em alimentos. 2018c.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. ANVISA. **Resolução da Diretoria Colegiada nº 242, de 26 de julho de 2018.** Altera a Resolução - RDC nº 24, de 14 de junho de 2011, a Resolução - RDC nº 107, de 5 de setembro de 2016, a Instrução Normativa - IN nº 11, de 29 de setembro de 2016 e a Resolução - RDC nº 71, de 22 de dezembro de 2009 e regulamenta o registro de vitaminas, minerais, aminoácidos e proteínas de uso oral, classificados como medicamentos específicos. 2018d.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. ANVISA. **Resolução da Diretoria Colegiada nº 243, de 26 de julho de 2018.** Dispõe sobre os requisitos sanitários dos suplementos alimentares. 2018e.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. ANVISA INSTRUÇÃO NORMATIVA - IN Nº 28, DE 26 DE JULHO DE 2018. Estabelece as listas de constituintes, de limites de uso, de alegações e de rotulagem complementar dos suplementos alimentares. 2018f.

AKAMATSU, S.; MITSUHASHI, T. Simultaneous determination of pharmaceutical components in dietary supplements for weight loss by capillary electrophoresis tandem mass spectrometry. **Drug Testing and Analysis**, v. 6, p. 426–433, 2014.

ALBUQUERQUE, M. M. Evaluation of the use of dietary supplements in academies from Guara-DF. **Revista Brasileira de Nutrição Esportiva**, vol. 6, no. 32, 2012, p. 112, 2012.

AMARAL, Lidiane. **Consumo de suplementos alimentares por frequentadores de uma academia de Palhoça-SC**. 19 páginas. Trabalho de Conclusão de Curso de graduação da Universidade do Sul de Santa Catarina. 2017.

ANAND, B. S. *et al.* Comparative assessment of phenolphthalein and phenolhtalein glucuronide: is phenolphthalein glucuronide a better laxative?. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, v. 8, p. 559-562, 1994.

ANASTASSIADES M. *et al.* Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and "dispersive solid-phase extraction" for the determination of pesticide residues in produce. **Journal of AOAC international**, v. 86, n. 2, p.412-31, 2003.

ANDREWS, K.W. *et al.* The caffeine contents of dietary supplements commonly purchased in the US: analysis of 53 products with caffeine-containing ingredients. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 389, n. 1, p. 231–239, 2007.

ARAÚJO, A. C. M.; SOARES, Y. N. G. Pattern of utilization of protein supplements in academies in Belém, Pará. **Revista de Nutrição**, v. 12, n. 1, p. 5-19, 1999.

ARAÚJO, L. R.; ANDREOLO, J.; SILVA, M. S. Use of alimentary supplement and anabolizante for apprentices of muscular activity in the academies of Goiânia-GO. **Revista Brasileira de Ciências e Movimento**, v.10, n. 3, p. 13-18, 2002.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. AOAC. Guidelines for Dietary Supplements and Botanicals. Part I: AOAC Guidelines for Single-Laboratory Validation of Chemical Methods for Dietary Supplements and Botanicals. 2013.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS EMPRESAS DE PRODUTOS NUTRICIONAIS. ABENUTRI. Disponível em: <<http://www.abenutri.org/suplementos-os-brasileiros-adoram/>>. Acesso em 25 de janeiro de 2017. 15:50.

AZEVEDO R. *et al.* Effects of caffeine ingestion on endurance performance in mentally fatigued individuals **European Journal of Applied Physiology**, v. 116, p. 2293–2303. 2016.

BAILEY, R. L. *et al.* F. Dietary Supplement Use in the United States, 2003-2006. **The Journal of Nutrition**, 141, p. 261–266, 2011.

BAUME, N. *et al.* Research of stimulants and anabolic steroids in dietary supplements. **Scandinavian Journal of Medicine and Science in Sports**, v. 16, p 41–48. 2006.

BERTOLETTI, A. C., SANTOS, A. C.; BENETTI, F. Consumo de suplementos alimentares por praticantes de musculação e sua relação com o acompanhamento nutricional individualizado. **Revista Brasileira de Nutrição Esportiva**, v. 10, n. 58, p.371-380, 2016.

BIANCO, A. *et al.* Protein supplementation in strength and conditioning adepts: knowledge, dietary behavior and practice in Palermo, Italy. **Journal of the International Society of Sports Nutrition**, v. 8, n. 25, p. 1-6, 2011.

BOGUSZ, M.J. *et al.* Application of LC–ESI–MS–MS for detection of synthetic adulterants in herbal remedies. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 41, p. 554–564, 2006.

BRAUN, H. *et al.* Dietary supplement use among elite young German athletes. **International Journal of Sport Nutrition and Exercise Metabolism**. v. 1, p. 97-109, 2009.

BRAY, G. A. *et al.* Sibutramine Produces Dose-Related Weight Loss. **Obesity research**, v. 7, n. 2, p.189-198, 1999.

BRITO, D. F.; LIBERALI, R. Perfil do consumo de suplemento nutricional por praticantes de exercício físico nas academias da cidade de Vitória da Conquista - BA **Revista Brasileira de Nutrição Esportiva**, v. 6, n. 31, p. 66-75, 2012.

BRUNTON, L.L, *et al.* **Goodman & Gilman: As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 12ª edição. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2012.

BUCARETCHI, F. *et al.* Serotonin syndrome following sibutramine poisoning in a child, with sequential quantification of sibutramine and its primary and secondary amine metabolites in plasma. *Clinical toxicology*, v. 47, p. 598 – 601, 2009.

CARDOSO, R. P. Q.; VARGAS, S. V. S.; LOPES, W. C. Consumo de suplementos alimentares dos praticantes de atividade física em academias. **Revista Brasileira de Nutrição Esportiva**, v. 11, n. 65, p.584-592, 2017.

CARONE, L. *et al.* Therapeutic Reviews: Furosemide. **Journal of Pain and Symptom Management**, v. 52, p. 144-150, 2016.

CARVALHO, L. M. *et al.* New method for the simultaneous determination of 1,4-benzodiazepines and amfepramone as adulterants in phytotherapeutic formulations by voltammetry. **Forensic Science International**, v. 202, p. 75–81, 2010.

CARVALHO, L. M. *et al.* Presence of synthetic pharmaceuticals as adulterants in slimming phytotherapeutic formulations and their analytical determination. **Forensic Science International**, v. 204, p. 6–12, 2011.

CARVALHO, L. M. *et al.* A new approach to determining pharmacologic adulteration of herbal weight loss products. **Food Additives & Contaminants: Part A**, v. 29, n. 11, 1661–1667, 2012.

CAVALCANTI, G. A. *et al.* Detection of designer steroid methylstenbolone in “nutritional supplement” using gas chromatography and tandem mass spectrometry: Elucidation of its urinary metabolites. **Steroids**, v. 78, p. 228–233, 2013.

CEBI, N.; YILMAZ, M. T.; SAGDIC, O. A rapid ATR-FTIR spectroscopic method for detection of sibutramine adulteration in tea and coffee based on hierarchical cluster and principal component analyses. **Food Chemistry**, v. 229, p. 517–526, 2017.

CHAMPAGNE, A. B.; EMMEL, K. V. Rapid screening test for adulteration in raw materials of dietary supplements. **Vibrational Spectroscopy**, v. 55, p. 216–223, 2011.

CHANG, S.; SHEN, W.W. Stimulants, Wakefulness-promoting Agents, and Nonstimulant Attention Deficit Hyperactivity Disorder Medications. **Journal of Experimental and Clinical Medicine**, v. 5, n. 6, p. 210-216, 2013.

CHENG, Q. *et al.* Application of ultra-high-performance liquid chromatography coupled with LTQ-Orbitrap mass spectrometry for identification, confirmation and quantitation of illegal adulterated weight-loss drugs in plant dietary supplements. **Journal of Chromatography B**, v. 1064, p. 92–99. 2017.

CHO, S. *et al.* Monitoring of 35 illegally added steroid compounds in foods and dietary supplements. **Food Additives & Contaminants: Part A**, v. 31, n. 9, p. 1470–1475, 2014.

CHO, S. *et al.* Determination of anabolic–androgenic steroid adulterants in counterfeit drugs by UHPLC–MS/MS. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 111, p. 138–146, 2015.

CIANCHINO, V. *et al.* Analysis of potential adulteration in herbal medicines and dietary supplements for the weight control by capillary electrophoresis. **Food Chemistry**, v. 108, p. 1075–1081, 2008.

COCK, K. J. S. *et al.* Detection and determination of anabolic steroids in nutritional supplements. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 25, p. 843–852, 2001.

COHEN, P.A. DMAA as a dietary supplement ingredient. **Archives of Internal Medicine**, v. 172, p. 1038 - 1039. 2012.

COOPMAN, V.; CORDONNIER, J. Counterfeit drugs and pharmaceutical preparations seized from the black market among bodybuilders. **Annales de Toxicologie Analytique**, v. 24, n. 2, p. 73-80, 2012.

CORRÊA, D. B.; NAVARRO, A. C. Distribuição de respostas dos praticantes de atividade física com relação à utilização de suplementos alimentares e o acompanhamento nutricional numa academia de Natal/RN. **Revista Brasileira de Nutrição Esportiva**, v. 8, n. 43, p.35-51, 2014.

COSTA, D. C.; ROCHA, N. C. A.; QUINTÃO, D. F. Prevalência do uso de suplementos alimentares entre praticantes de atividade física em academias de duas cidades do Vale do Aço/MG: fatores associados. **Revista Brasileira de Nutrição Esportiva**, v. 7, n. 41, p.287-29, 2013.

CSUPOR, D. *et al.* Rapid identification of sibutramine in dietary supplements using a stepwise approach. **Pharmazie**, v. 68, p.15–18, 2013.

CUNHA, T. S. *et al.* Esteróides anabólicos androgênicos e sua relação com a prática desportiva. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 40, n. 2, p. 165 – 179, 2004.

DAHMANIA, H. *et al.* Development of an extraction method for anabolic androgenic steroids in dietary supplements and analysis by gas chromatography-mass spectrometry: Application for doping-control. **Steroids**, v. 138, p. 134–160, 2018.

DCI. Diário de Comércio, Indústria e Serviços. Mercado de suplementos inova na oferta e deve crescer 8,5% em 2018. Disponível em: < <https://www.dci.com.br/industria/mercado-de-suplementos-inova-na-oferta-e-deve-crescer-8-5-em-2018-1.755482>>. 2018. Acesso em: 08 de maio de 2019.

DECONINCK, E. *et al.* A validated ultra high pressure liquid chromatographic method for the characterisation of confiscated illegal slimming products containing anorexics. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**. v. 59, p. 38– 43, 2012.

DECONINCK, E. *et al.* Detection of sibutramine in adulterated dietary supplements using attenuated total reflectance-infrared spectroscopy. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 100, p. 279–283, 2014.

DECONINCK, W. *et al.* Comparison of three development approaches for Stationary Phase Optimised Selectivity Liquid Chromatography based screening methods Part I: A heterogeneous group of molecules (slimming agents in food supplements). **Talanta**, v. 14, p. 518–528, 2016.

DE ROSE, E.H. *et al.* Referred use of medication and dietary supplements in athletes selected for doping control in the South-American games. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 12, p. 239 – 242, 2006.

DEVENTER, K. *et al.* Detection of selected stimulants as contaminants in solid nutritional supplements by liquid chromatography–mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 103, p. 1508–1513, 2007.

DIEHL, K. *et al.* Elite Adolescent Athletes' Use of Dietary Supplements: Characteristics, Opinions, and Sources of Supply and Information. **International Journal of Sport Nutrition and Exercise Metabolism**, v. 22, p. 165 – 174, 2012.

DOMENEGHINI, J. *et al.* Avaliação do uso de suplementos alimentares por frequentadores de cinco academias de Francisco Beltrão-PR. **Revista Brasileira de Nutrição Esportiva**, v. 12, n. 75, p. 884-892, 2018.

ECONOMOU, A. *et al.* Determination of multi-class pesticides in wines by solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, p. 5856–5867, 2009.

EENOO, P. V.; DELBEKE, F. T. Metabolism and excretion of anabolic steroids in doping control—New steroids and new insights. **Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology**, v. 101, p. 161–178, 2006.

ESPÍNOLA, H. H. F.; COSTA, M. A. R. A.; NAVARRO, F. Consumo de suplementos por usuários de academias de ginástica da cidade de João Pessoa – PB. **Revista Brasileira de Nutrição Esportiva**, v. 1, n. 7, p. 01-10, 2008.

ETZEL, M. R. Manufacture and use of dairy protein fractions. *The Journal of Nutrition*, v. 134, n. 4, p.996-1002, 2004.

EUDY, A. E. *et al.* Efficacy and safety of ingredients found in pre workout supplements. **American Society of Health-System Pharmacists**, v. 70, p. 577 – 588. 2013.

EUROPEAN COUNCIL. The Community code relating to medicinal products for human use DIRECTIVE 2001/83/EC OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL. 2001.

FAYH, A. P. T. *et al.* Consumption of nutritional supplements among individuals in Porto Alegre's fitness centers. **Revista Brasileira de Ciência e Esporte**, v. 35, n. 1, p. 27-37, 2013.

FINLEY, W. J.; ELLWOOD. K; HOADLEY, J. Launching a New Food Product or Dietary Supplement in the United States: Industrial, Regulatory, and Nutritional Considerations. **Annual Review of Nutrition**, 34, p. 421-447, 2014.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. FDA. Dietary supplement health and education act (DSHEA) of 1994. 1995.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. FDA. Guidance for Industry. Q2B Validation of Analytical Procedures: Methodology. 1996.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. FDA. Tainted Supplements. CDER. 2015.

FREITAS, J. M. *et al.* A simple and fast-portable method for the screening of the appetite- T suppressant drug sibutramine in natural products and multivitamins supplements, **Sensors & Actuators: B. Chemical**, v. 282, p. 449–456. 2019.

GEYER, H. *et al.* Nutritional supplements cross-contaminated and faked with doping substances. **Journal of mass spectrometry**, v. 43, p. 892–902, 2008.

GILARD, V. *et al.* Detection, identification and quantification by ¹H NMR of adulterants in 150 herbal dietary supplements marketed for improving sexual performance. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 102, p. 476–493, 2015.

GOMES, G. S. *et al.* Caracterização do consumo de suplementos nutricionais em praticantes de atividade física em academias. **Medicina (Ribeirão Preto)**, v. 41, n.3, p.327-31, 2008.

GOMES, A. M. *et al.* Consumo de suplementos alimentares por praticantes de atividades físicas de uma academia de Cananéia – SP. **Revista Saúde em Foco**, v. 9, p. 335, 2017.

GONZALO-LUMBRERAS, R.; IZQUIERDO-HORNILLOS, R. High-performance liquid chromatographic optimization study for the separation of natural and synthetic anabolic steroids. Application to urine and pharmaceutical samples. **Journal of Chromatography B**, v. 742, p. 1–11, 2000.

GOSTON, J. L.; CORREIA, M. I. T. D. Intake of Nutritional Supplements among people exercising in gyms and influencing factors. **Nutrition**, v. 26, p. 604-611, 2010.

GOTO, T. *et al.* Simultaneous analysis of four diuretic drugs by HPLC and its application to health food supplements advertising weight reduction. **Report of Aichi Prefectural Institute of Public Health**, v. 43, p. 95-98, 2002.

GREENWAY, F. L. The safety and efficacy of pharmaceutical and herbal caffeine and ephedrine use as a weight loss agent. **Obesity Reviews**, v. 2, p. 199-211, 2001.

GUERRA, I.; SOARES, E. A.; BURINI, R. C. Aspectos nutricionais do futebol de competição. **Revista Brasileira de Nutrição Esportiva**, v. 7, n. 6, p. 200-206, 2001.

GUNAYDIN, G. *et al.* Herbal weight loss pill overdose: sibutramine hidden in pepper pill. **Case Reports in Emergency Medicine**, v. 2015, p. 1-4, 2015.

GUO, C. *et al.* Simultaneous identification, confirmation and quantitation of illegal adulterated antidiabetics in herbal medicines and dietary supplements using high-resolution benchtop Quadrupole-Orbitrap mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 967, p. 174-182, 2014.

GUO, C. *et al.* Wide-scope screening of illegal adulterants in dietary and herbal supplements via rapid polarity-switching and multistage accurate mass confirmation using an LC-IT/TOF hybrid instrument. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 63, p. 6954–6967, 2015.

GURLEY, B. J.; STEELMAN, S. C.; THOMAS, S. L. Multi-ingredient, Caffeine containing dietary supplements: History, Safety, and Efficacy. **Clinical Therapeutics**, v. 37, n. 2, p. 275-301, 2015.

HADEF, Y. *et al.* Multivariate optimization of a derivatisation procedure for the simultaneous determination of nine anabolic steroids by gas chromatography coupled with mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1190, p. 278–285, 2008.

HACHEM, R. *et al.* Proton NMR for detection, identification and quantification of adulterants in 160 herbal food supplements marketed for weight loss. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v. 124, p. 34–47, 2016.

HALLER, C. A. *et al.* Concentrations of ephedra alkaloids and caffeine in commercial dietary supplements. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 3, p. 145-51. 2004.

HARAGUCHI, F. K.; ABREU, W. C.; PAULA, H. Whey protein: composition, nutritional properties, applications in sports and benefits for human health. **Revista de Nutrição**, v. 19, n. 4, p. 479-488, 2006.

HARISSON, R. A. *et al.* Are those in need taking dietary supplements? A survey of 21 923 adults. **British Journal of Nutrition**, v. 91, p. 617–623, 2004.

HE, X. *et al.* Simultaneous determination of 30 hormones illegally added to anti-ageing functional foods using UPLC-MS/MS coupled with SPE clean-up. **Food Additives & Contaminants: Part A**, v. 31, p. 1625–1638. 2014.

HIRSCHBRUCH, M. D.; FISBERG, M.; MOCHIZUKI, L. Supplement use amongst young individuals in São Paulo's Fitness Centers. **Revista Brasileira de Medicina no Esporte**, v. 14, n. 6, p. 539 -543, 2008.

HOGGAN, A. *et al.* Detection of Bumetanide in an Over the Counter Dietary Supplement. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 31, p. 601-604, 2007.

HUANG, Z. *et al.* Simultaneous Determination of Sibutramine and N-Di-desmethylsibutramine in Dietary Supplements for Weight Control by HPLC–ESI-MS. **Journal of Chromatographic Science**, v. 46, p. 707 – 71. 2008.

INÁCIO, S.G.; OLIVEIRA, G. V.; ALVARES, T. S. Caffeine and Creatine Content of Dietary Supplements Consumed by Brazilian Soccer Players. **International Journal of Sport Nutrition and Exercise Metabolism**, v. 26, p. 323 -329, 2013.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL. INMETRO. Orientação sobre validação de métodos analíticos. 2016.

JACOBSON, I. G. *et al.* Bodybuilding, Energy, and Weight-Loss Supplements Are Associated With Deployment and Physical Activity in U.S. Military Personnel. **Annals of Epidemiology**, v. 22, n. 5, p. 318 – 330. 2012.

JIN R. *et al.* A graphene tip coupled with liquid chromatography tandem mass spectrometry for the determination of four synthetic adulterants in slimming supplements. **Food Chemistry**, v. 224, p. 329–334, 2017.

JOST, P. A.; POLL, F. A. Food supplements intake among practitioners of physical activity in gyms at Santa Cruz do Sul – RS. **Cinergis**, v. 15, n. 1, p. 10-17, 2014.

JUNG, J.; HERMANN-CLAUSEN, M.; WEINMANN, W. Anorectic sibutramine detected in a Chinese herbal drug for weight loss. **Forensic Science International**, v. 161, p. 221–222, 2006.

KHAZAN, M. *et al.* Identification and determination of synthetic pharmaceuticals as adulterants in eight common herbal weight loss supplements. **Iranian Red Crescent Medical Journal**, v. 16, n. 3, p. 1-6, 2014.

KIELY, M. *et al.* The efficacy and safety of nutritional supplement use in a representative sample of adults in the North/South Ireland Food Consumption Survey. **Public Health Nutrition**, v. 4 n. 5, p. 1089-1097, 2001.

KIM, H. J. *et al.* Determination of non-opioid analgesics in adulterated food and dietary supplements by LCMS/MS. **Food Additives & Contaminants: Part A**, v. 31, n. 6, p. 973–978, 2014.

KRISTIANSEN, M. *et al.* Dietary Supplement Use by Varsity Athletes at a Canadian University. **International Journal of Sport Nutrition and Exercise Metabolism**, v.15, p. 195 – 210, 2005.

KUSHNIR, M. M. *et al.* Liquid chromatography tandem mass spectrometry for analysis of steroids in clinical laboratories. **Clinical Biochemistry**, v. 44, p. 77–88. 2011.

LACHENMEIER, D. W. *et al.* What is a food and what is a medicinal product in the European Union? Use of the benchmark dose (BMD) methodology to define a threshold for “pharmacological action”. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**. v. 64, p. 286–295, 2012.

LAM, P. K. *et al.* Serotonin syndrome following overdose of a non-prescription slimming product containing sibutramine: A case report. **Human and Experimental Toxicology**, v. 31, p. 414–417, 2012.

LEMESHOW, S. K. L. S. *et al.* Sample size determination in health studies. Geneva (Switzerland), **World Health Organization**, p 1-30. 1991.

LESIAK, A. D. *et al.* Direct analysis in real time high resolution mass spectrometry as a tool for rapid characterization of mind-altering plant materials and revelation of supplement adulteration – The case of Kanna. **Forensic Science International**, v. 260, p. 66–73, 2016.

LI, N. *et al.* A rapid and reliable UPLC-MS/MS method for the identification and quantification of fourteen synthetic anti-diabetic drugs in adulterated Chinese proprietary medicines and dietary supplements. **Biomedical Chromatography**, v. 24, p. 1255–1261, 2010.

LI, Y. *et al.* A GC–EI-MS-MS method for simultaneous determination of seven adulterants in slimming functional foods. **Journal of Chromatographic Science**, v. 50, p. 928–933, 2012.

LIANG, Q. *et al.* Rapid and reliable determination of illegal adulterant in herbal medicines and dietary supplements by LC/MS/MS. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 40, p. 305–311, 2006.

LIMA, L. D; MORAES, C. M. B.; KIRSTEN, V. R. Dismorfia muscular e o uso de suplementos ergogênicos em desportistas. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, n. 16, v. 6, p. 427-30, 2010.

LINHARES, T. C.; LIMA, R. M. The use of food supplements by bodybuilders in the gyms of Campos dos Goytacazes/RJ, Brazil. **Vértices**, v. 8, n. 1/3, 2006

LIU, S.; WOO, S.; KOH, H. HPLC and GC–MS screening of Chinese proprietary medicine for undeclared therapeutic substances. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 24: 983–992, 2001.

LOOTENS, L. *et al.* Metabolic studies with promagnon, methylclostebol and methasterone in the uPA+/+-SCID chimeric mice. **Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology**, v. 127, p. 374– 381, 2011.

MANS, D. J. *et al.* Rapid screening and structural elucidation of a novel sibutramine analogue in a weight loss supplement: 11-Desisobutyl-11-benzylsibutramine. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 83, p. 122– 128, 2013.

MARCHEI, E. *et al.* A rapid and simple procedure for the determination of ephedrine alkaloids in dietary supplements by gas chromatography–mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 41, p. 1633–1641. 2006.

MARTELLO, S.; FELLI, M.; CHIAROTTI, M. Survey of nutritional supplements for selected illegal anabolic steroids and ephedrine using LCMS/ MS and GC-MS methods, respectively. **Food Additives and Contaminants**, v. 24, n. 3, p. 258–265, 2007.

MATTILA, V. M. *et al.* Use of dietary supplements and anabolic-androgenic steroids among Finnish adolescents in 1991–2005. **European Journal of Public Health**, v. 20, n. 3, p. 306–311, 2010.

MIARKA, B. *et al.* Características da Suplementação Alimentar por Amostra Representativa de Acadêmicos da Área de Educação Física. **Movimento & Percepção**, v. 8, n. 11, p. 278–288, 2007.

MOLEMA, M. M. *et al.* Caffeine and muscle cramps: a stimulating connection. **The American Journal of Medicine**, v. 120, p. 1-2, 2007.

MOREIRA, A. P. L. *et al.* Determination of diuretics and laxatives as adulterants in herbal formulations for weight loss. **Food Additives and Contaminantes: Part A**, v. 30, p. 1230–1237, 2013.

MOREIRA, A. P. L.; MARTINI M.; CARVALHO L, M. Capillary electrophoretic methods for the screening and determination of pharmacologic adulterants in herbal-based pharmaceutical formulations. **Electrophoresis**, v. 35, p. 3212–3230, 2014.

MOREIRA, N. M.; NAVARRO, A. C.; NAVARRO, F. Consumo de Suplementos alimentares em academias de Cachoeiro de Itapemirim/ES. **Revista Brasileira de Nutrição Esportiva**, v. 8, n. 48, p. 363-372, 2014.

MORRISON, L. J., GIZIS, F.; SHORTER, B. Prevalent use of dietary supplements among people who exercise at a Commercial Gym. **International Journal of Sport Nutrition and Exercise Metabolism**, v.14, p. 481 – 492, 2004.

MÜLLER, D.; WEINMANN, W.; HERMANNNS-CLAUSEN, M. Chinese slimming capsules containing sibutramine sold over the Internet. **Deutsches Ärzteblatt International**, v. 106, n, 13, p.218–22, 2009.

NEVES, D. B. J; MARCHETI, R. G. A.; CALDAS, E. D. Incidence of anabolic steroid counterfeiting in Brazil. **Forensic Science International**, v. 228, p. 81–83. 2013.

NEVES, D. B. J; CALDAS, E. D. Dietary supplements: International legal framework and adulteration profiles, and characteristics of products on the Brazilian clandestine market. **Regulatory Toxicology and Pharmacolog**, v. 73, p. 93-104, 2015.

NEVES, D. B. J; CALDAS, E. D. GC–MS quantitative analysis of black market pharmaceutical products containing anabolic androgenic steroids seized by the Brazilian Federal Police. **Forensic Science International**, v. 275, p. 272–281, 2017a.

NEVES, D. B. J; CALDAS, E. D. Determination of caffeine and identification of undeclared substances in dietary supplements and caffeine dietary exposure assessment. **Food and Chemical Toxicology**, v. 105, p. 194-202, 2017b.

NOGUEIRA, F. R. S.; SOUZA, A. A.; BRITO, A. F. Prevalence of the use and ergogenic resources effects by body builders in Brazilian academies: a systematic review. **Brazilian Journal of Physical Activity and Health**, v.18, p. 16-30, 2013.

NATIONAL TOXICOLOGY PROGRAM. NTP . Toxicology and carcinogenesis studies of Phenolphthalein (CAS No. 77-09-8) in F344/N rats and B6C3FL mice (Feed Studies). 1996.

ODOARDI, S. *et al.* Determination of anabolic agents in dietary supplements by liquid chromatography-high resolution mass spectrometry. **Food Additives & Contaminants: Part A**. v. 32, n. 5, p. 635–647, 2015.

OLIVER, A. S.; LEÓN, M. T. M.; GUERRA-HERNÁNDEZ, E. Prevalence of protein supplement use at gyms. **Nutrición Hospitalaria**, v. 26, n. 5, p. 1168 – 1174, 2011.

OSHITA, D.; JARDIM, I. C. S. F. Comparação de métodos por cromatografia líquida na determinação de multirresíduos de agrotóxicos em morangos. **Química Nova**, v. 38, n. 10, p. 1273-1281, 2015.

PAÍGA, P. *et al.* Analysis of pharmaceutical adulterants in plant food supplements by UHPLC-MS/MS. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 99, p. 219–227, 2017.

PARR, M. K. *et al.* 6a-Methylandrostenedione: gas chromatographic mass spectrometric detection in doping control. **Rapid communications in mass spectrometry**, v. 22, p. 321–329, 2008.

PARR, M. K. *et al.* Identification of steroid isoxazole isomers marketed as designer supplement. **Steroids**, v. 74, p. 322–328, 2009.

PARR, M. K. *et al.* Detection of 6-methyltestosterone in a “dietary supplement” and GC–MS/MS investigations on its urinary metabolism. **Toxicology Letters**, v. 201, p. 101–104, 2011a.

PARR, M. K. *et al.* Endocrine characterization of the designer steroid methyl-1-testosterone: investigations on tissue-specific anabolic-androgenic potency, side effects, and metabolism. **Endocrinology**, v. 152, n. 12, p. 4718–4728, 2011b.

PASCALIA, P. *et al.* Application of HRAM screening and LC–MS/MS confirmation of active pharmaceutical ingredient in “natural” herbal supplements. **Forensic Science International**, v. 286, p. 28–31, 2018.

PEDROSA, O. P. *et al.* Utilização de suplementos nutricionais por praticantes de musculação em academias da cidade de Porto Velho Rondônia. **Semana Educa**, v. 1, n. 1, 2010.

PELLEGRINI, M. *et al.* A simple toxicological analysis of anabolic steroid preparations from the black market. **Annales toxicologie Analytique**, v. 24, n. 2, p. 67-72. 2012.

PERALTA, J.; MARIA, O.; AMANCIO, S. Creatine as an ergogenic supplement for athletes. **Revista de Nutrição**, v. 15, n. 1, p.83-93, 2002.

PEREIRA, B. B. *et al.* The use of food supplements by musculation practicers. **Revista e-ciência**, v. 5, n. 2, p.104-110, 2017.

PEREIRA, C. G. *et al.* Characterization and detection of adulterated whey protein supplements using stationary and time-resolved fluorescence spectroscopy. **LWT - Food Science and Technology**, v. 97, p. 180–186, 2018.

PAVLIK, V. *et al.* The role of sibutramine in weight reduction. **Indexed and abstracted in Science Citation Index Expanded and in Journal Citation Reports/Science Edition**, v. 114, n. 3, p 155-157.

PIMENTA, M. G., LOPES, A. C. Consumo de Suplementos Nutricionais por Praticantes de Atividade Física de Academias de Ginastica de Cascavel – PR. **Revista de nutrição**, 2008.

POLSON, C. *et al.* Optimization of protein precipitation based upon effectiveness of protein removal and ionization effect in liquid chromatography– tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 785, p. 263–275, 2003.

PRESTES, O. D. *et al.* Quechers – um método moderno de preparo de amostra para determinação multirresíduo de pesticidas em alimentos por métodos cromatográficos acoplados à espectrometria de massas. **Química Nova**, v.32, n. 6, p. 1620-1634, 2009

PROKUDINA, E. A. *et al.* Analysis of anabolic androgenic steroids by direct analysis in real time ionization with time-of-flight mass spectrometry. **International Journal of Mass Spectrometry**, v. 392, p. 28–33, 2015.

QUEIROZ S. F. *et al.* Utilização de suplemento alimentar por usuários de academias de ginástica do município de Pau dos Ferros-RN. **Revista Brasileira de Nutrição Esportiva**, v. 3, n. 17, p. 468-477, 2009.

REEUWIJK, N. M. *et al.* Active pharmaceutical ingredients detected in herbal food supplements for weight loss sampled on the Dutch market. **Food Additives & Contaminants: Part A**, v. 31, n. 11, p. 1783–1793, 2014.

RIBEIRO, M. V. M. *et al.* ¹H NMR determination of adulteration of anabolic steroids in seized drugs. **Steroids**, v. 138, p. 47–56, 2018.

ROCHA, L. P.; PEREIRA, M. V. L. Use of nutritional supplements by subjects enrolled in physical fitness programs. **Revista de Nutrição**, v.11, n.1, p.76-82, 1998.

ROCHA, T.; AMARAL, J. S.; OLIVEIRA, M. B. P. P. Adulteration of Dietary Supplements by the Illegal Addition of Synthetic Drugs: A Review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 15, p.43-62. 2016.

ROONEY, J. S. *et al.* Evaluation of vibrational spectroscopic methods to identify and quantify multiple adulterants in herbal medicines. **Talanta**, v. 138, p. 77–85. 2015,

ROVIRA, M. A. *et al.* Dietary Supplement Use and Health-Related Behaviours in a Mediterranean Population. **Journal of Nutrition Education and Behaviour**, v. 45, n. 5, p. 386 – 391. 2013.

SAEEDI, P. *et al.* Nutritional supplement use among fitness club participants in Tehran, Iran. **Appetite**, v. 60, p. 20 – 26, 2013.

SANTOS, M. A. A.; SANTOS, R. P. Uso de suplementos alimentares como forma de melhorar a performance nos programas de atividade física em academias de ginástica. **Revista Paulista de Educação Física**, v. 16, n. 2, p. 174-85, 2002.

SANTOS, H. V. *et al.* Consumo de suplementos alimentares por praticantes de exercício físico em academias de bairros nobres da cidade do Recife. **Revista Brasileira de Nutrição Esportiva**, v. 7, n. 40, p.204-211, 2013.

SANTOS, E. F.; MONTSERRAT, P. M.; OLIVEIRA, G. H. M. Consumption of food supplements by weight training practitioners in a gym of Santo Antônio do Monte - MG. **Revista Brasileira de Nutrição Clínica**, v. 30, n. 3, p. 235-239, 2015.

SANTOS, M. K. *et al.* DART-MS/MS screening for the determination of 1,3-Dimethylamylamine and undeclared stimulants in seized dietary supplements from Brazil. **Forensic Chemistry**, v. 8, p. 134-145. 2018a.

SANTOS, J. F. *et al.* Avaliação do Consumo de Suplementos Alimentares entre Praticantes de Musculação em Academias de Anápolis-GO. **Revista Científica Multidisciplinar Núcleo do Conhecimento**, v. 6, p. 114-125, 2018b.

SCHNEIDER, C. *et al.* Consumo de suplementos nutricionais por praticantes de exercício físico em academias de musculação de balneário camboriú – SC. **Revista Brasileira de Nutrição Esportiva**, São Paulo v. 2, n. 11, p. 307-322, 2008.

SCHWENK, T. L.; COSTLEY, C. D. When Food Becomes A Drug: Nonanabolic Nutritional Supplement Use in Athletes. **American Journal of Sports Medicine**, v. 36, n. 2, p. 250-253, 2002.

SEPKOWITZ, K.A. Energy drinks and caffeine-related adverse effects. **Journal of American Medical Association**, v. 309, p. 243-244, 2013.

SHAPIRA, B. *et al.* A Rare Case of Psychomotor Disturbances Linked to the Use of an Adulterated Dietary Supplement Containing Sibutramine. **Clinical Neuropharmacology**, v. 39, n. 3, p. 154-156, 2016.

SHEPPARD, H. L. *et al.* Use of Creatine and Other Supplements by Members of Civilian and Military Health Clubs: A Cross-Sectional Survey. **International Journal of Sport Nutrition and Exercise Metabolism**, v. 10, p. 245-256, 2000.

SHI, Y. *et al.* Development of a liquid chromatography tandem mass spectrometry method for simultaneous determination of eight adulterants in slimming functional foods. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, p. 7655– 7662, 2011.

SHIMOMURA, Y. *et al.* Exercise Promotes BCAA Catabolism: Effects of BCAA Supplementation on Skeletal Muscle during Exercise1 **The Journal of Nutrition**, v. 134: p.1583-1587, 2004.

SILVA, A. A.; MARINS, J. C. B. Consumption and level of knowledge about nutritional ergogenic resources in athletes. **Bioscience Journal**, v. 29, p. 1038-1048, 2013.

SKEIE, G. *et al.* Use of dietary supplements in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition calibration study. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 63, p. 226-238, 2009.

SONG, F. *et al.* Screening for multiple weight loss and related drugs in dietary supplement materials by flow injection tandem mass spectrometry and their confirmation by liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 88, p.136–143, 2014.

SOUVERAIN, S.; RUDAZ. S.; VEUTHEY, J. L. Protein precipitation for the analysis of a drug cocktail in plasma by LC–ESI–MS. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. p. 35:913–920, 2004.

STEPAN, R.; CUHRA, P.; BARSOVA, S. Comprehensive two-dimensional gas chromatography with time-of-flight mass spectrometric detection for the determination of anabolic steroids and related compounds in nutritional supplements. **Food Additives and Contaminants**, v. 25, n. 5, p. 557–565, 2008.

STYPULKOWSKA, K. *et al.* X-ray powder diffractometry and liquid chromatography studies of sibutramine and its analogues content in herbal dietary supplements. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 56, p. 969–975, 2011.

STRANO-ROSSI, S. *et al.* Liquid chromatography–high resolution mass spectrometry (LC–HRMS) determination of stimulants, anorectic drugs and phosphodiesterase 5 inhibitors (PDE5I) in food supplements. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 106, p. 144–152, 2015.

STRIEGEL, H. *et al.* Contaminated nutritional supplements – legal protection for elite athletes who tested positive: A case report from Germany. **Journal of sports sciences**, v. 23, n. 7, p. 723 – 726, 2005.

THEODORO, H.; RICALDE, S. R.; AMARO, F. S. Avaliação nutricional e autopercepção corporal de praticantes de musculação em academias de Caxias do Sul – RS. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v.15, n. 4, p. 291-294, 2009.

THEVIS, M. *et al.* Analysis of Confiscated Black Market Drugs Using Chromatographic and Mass Spectrometric Approaches. **Journal of analytical toxicology**, v. 32, p. 232 – 240, 2008.

TUCKER, J. *et al.* Unapproved Pharmaceutical Ingredients Included in Dietary Supplements Associated With US Food and Drug Administration Warnings. **JAMA Network Open**, v. 1, b. 6, p. 1-11, 2018.

VAYSSE, J. *et al.* Analysis of adulterated herbal medicines and dietary supplements marketed for weight loss by DOSY 1H-NMR. **Food Additives and Contaminants**, v. 27, n. 7, p. 903–916, 2010.

VACLAVIK L, KRYNITSKY, A, J.; RADER, J. I. Targeted analysis of multiple pharmaceuticals, plant toxins and other secondary metabolites in herbal dietary supplements by ultra-high performance liquid chromatography–quadrupole-orbital ion trap mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 810, p. 45– 60, 2014.

VAN POUCKE, C. *et al.* Determination of anabolic steroids in dietary supplements by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 586, p. 35–42, 2007.

VIANA, C. *et al.* Liquid chromatographic determination of caffeine and adrenergic stimulants in food supplements sold in Brazilian e-commerce for weight loss and physical fitness. **Food Additives & Contaminants: Part A**, v. 33, n. 1, p. 1–9, 2015.

VIANA, C. *et al.* Detection and determination of undeclared synthetic caffeine in weight loss formulations using HPLC-DAD and UHPLC-MS/MS. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 8, p. 366–372, 2018.

VIEIRA, D. M. *et al.* Avaliação do consumo de suplementos alimentares ergogênicos por praticantes de atividade física em academias de ginástica em Manaus, Amazonas. **Revista de Ciências da Saúde do Amazonas**, n. 1, p.29 – 38. 2018

ZENG, Y. *et al.* Analysis of 40 weight loss compounds adulterated in health supplements by liquid chromatography quadrupole linear ion trap mass spectrometry. **Drug Testing and Analysis**, v.8, p. 351–356, 2016.

ZHAO, J. *et al.* Detection and quantification of phenethylamines in sports dietary supplements by NMR approach. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 151, p. 347–355, 2018.

ZHU, Q. *et al.* Rapid on-site TLC–SERS detection of four antidiabetes drugs used as adulterants in botanical dietary supplements. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 406, p. 1877–1884, 2014.

ZOU, P. *et al.* Detection of sibutramine, its two metabolites and one analogue in a herbal product for weight loss by liquid chromatography triple quadrupole mass spectrometry and time-of-flight mass spectrometry. **Rapid communications in mass spectrometry**, v. 21, n. 4, p. 614-618.

WADA. The World Anti-Doping Code. The 2006 Prohibited List International Standard. 2016. Disponível em: <<https://www.wada-ama.org/en/what-we-do/the-code>>. Acesso em 04/03/2017.

WAGNER, M. Avaliação do uso de suplementos nutricionais e outros recursos ergogênicos por praticantes de musculação em academias de um bairro de Florianópolis-SC. **Revista Brasileira de Nutrição Esportiva**, v. 5, n. 26, p. 130-134, 2011.

WANG, J. *et al.* Simultaneous of illegal additives in dietary supplements and traditional medicines by high performance liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 113, p. 227–232, 2009.

WILSON, P.; MASSE, C. Detection of Synthetic Drugs as Adulterants in Natural and Herbal Slimming Products by LC-ESI-MS/MS with Polarity Switching. *Journal of AOAC international*, v. 99, n. 4, 929-940, 2016.

WOO, H. *et al.* Simultaneous analysis of 17 diuretics in dietary supplements by HPLC and LC-MS/MS. **Food Additives & Contaminants: Part A**, v. 30, n. 2, p. 209–217, 2013.

YU, Z. *et al.* A simple and convenient method for simultaneous determination of four major species of illegal additives in slimming health food. **Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies**, v. 33, p. 452–461, 2010.

Capítulo VII - ATIVIDADES CURRICULARES E EXTRACURRICULARES

VII - 1. DISCIPLINAS CURSADAS

Foram cursadas as disciplinas: “Tópicos Avançados em Toxicologia I e II”, “Toxicologia Forense”, “Sistema de Garantia de Qualidade em Laboratório de Ensaaios” “Farmacocinética Avançada” e “Toxicologia dos Praguicidas”, totalizando 22 créditos.

VII - 2. PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS

- “53th Annual Meeting of the International Association of Forensic Toxicologists - TIAFT, 2015”, realizado pela The International Association of Forensic Toxicologists, em Florença, Itália, em agosto de 2015.
- “9th Congress of Toxicology in Developing Countries / XIX Congresso Brasileiro de Toxicologia”, realizado pela Sociedade Brasileira de Toxicologia, em Natal-RN, em novembro de 2015.
- “XII Congresso Regional Latino Americano de Toxicologia Forense – TIAFT 2016”, realizado em San Jose, na Costa Rica em novembro de 2016.
- “55th Annual Meeting of the International Association of Forensic Toxicologists - TIAFT, 2017”, em Boca Raton, Estados Unidos, 2018.
- “56th Annual Meeting of the International Association of Forensic Toxicologists - TIAFT, 2018”, em Ghent, Bélgica, 2018.
- 3º Encontro Nacional de Ciências Forenses e 6º Encontro Nacional de Química Forense. Ribeirão Preto, Brasil, 2018.

VII - 3. TRABALHOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS

- TAVARES, I. S.; YONAMINE, M.; CAMPRESTRINI, I. Development of an analytical method for detection of 16 adulterants in dietary supplements sold in Brazil, using HPLC-DAD. XII Congresso Regional Latino Americano de Toxicologia Forense – TIAFT, 2016. San Jose – Costa Rica.
- TAVARES, I. S.; SANTOS M.F.; YONAMINE, M. Development of an analytical method for the detection of non-declared anabolic steroids in dietary supplements in Brazil. “55th Annual Meeting of the International Association of Forensic Toxicologists - TIAFT, 2017”, em Boca Raton, Estados Unidos, 2018.
- TAVARES, I. S.; SANTOS M.F.; OLIVEIRA, T., YONAMINE, M. Liquid chromatograph-tandem mass spectrometry method for detection of anabolic steroids as adulterants in dietary supplements in Brazil. “56th Annual Meeting of the International Association of Forensic Toxicologists - TIAFT, 2018”, em Ghent, Bélgica, 2018.
- SILVA, J. P.; TAVARES, I. S.; FRANCISCO, R. P. V.; KREBS, V. L. J.; OLIVEIRA, A. M. S. S.; YONAMINE, M. Optimization of Quechers extraction for GC-MS determination of cannabinoids in human umbilical cord tissue. 3º Encontro Nacional de Ciências Forenses e 6º Encontro Nacional de Química Forense. Ribeirão Preto, Brasil, 2018.

VII - 4. PUBLICAÇÃO EM LIVROS

- Novas Substâncias Psicoativas: Canabinoides Sintéticos, Derivados da Triptamina e Derivados da Fenetilamina. Toxicologia Forense. Editora Brucker. 2018.

VII - 4.1. Palestras ministradas

- “Novas Substâncias Psicoativas” no “I Curso de Extensão em Toxicologia Forense” realizado na Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, em Outubro de 2015. Carga horária: 1h.

- “Novas Substâncias Psicoativas” no “Curso toxicologia e suas implicações clínicas e forenses”, realizado na Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo em 22 de julho de 2016. Carga horária: 1h.
- “Drogas Facilitadoras de Crimes” e “Novas Substâncias Psicoativas” no “II Curso de Extensão em Toxicologia Forense” realizado no Instituto de Polícia Científica – IPC-PB, na cidade de Campina Grande, em 21 de maio de 2017. Carga horária: 1h.
- “Toxicologia e Drogas de Abuso”, na VII Escola de Inverno de Toxicologia, VII-EITOX, realizadas na Faculdade Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, em julho, 2018.

VII - 4.2. Mesa Redonda

“Áreas de atuação em toxicologia e o mercado de trabalho” na VII Escola de Inverno de Toxicologia, VII-EITOX, realizadas na Faculdade Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, em julho, 2018.

VII - 4.3. Mini-cursos ministrados:

- “Química e Toxicologia Forense” na LXXXV Semana Acadêmica da Escola de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, agosto 2018. Carga horária: 8h.
- “Química Forense a Serviço da Investigação Criminal” na Universidade Federal de Campina Grande, UFCG, em Campina Grande-PB, setembro de 2018. Carga horária: 4h.
- “Toxicologia Forense: Farmacêutico na Perícia Criminal” realizado na Universidade Potiguar, em Natal-RN, em outubro 2018. Carga horária: 8h.

VII - 4.4. Ficha do aluno

10/05/2019

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação



Universidade de São Paulo
 Faculdade de Ciências Farmacêuticas
 Documento sem validade oficial
 FICHA DO ALUNO

9141 - 9230351/1 - Idylla Silva Tavares

Email: idyllatavares@usp.br
Data de Nascimento: 25/05/1985
Cédula de Identidade: RG - 001.680.403 - RN
Local de Nascimento: Estado do Rio de Janeiro
Nacionalidade: Brasileira
Graduação: Farmacêutico - Universidade Federal do Rio Grande do Norte - Rio Grande do Norte - Brasil - 2007
Mestrado: Mestre em Química - Área: Química (1) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte - Rio Grande do Norte - Brasil - 2011

Curso: Doutorado
Programa: Toxicologia e Análises Toxicológicas
Data de Matrícula: 20/01/2015
Início da Contagem de Prazo: 20/01/2015
Data Limite para o Depósito: 20/05/2019
Orientador: Prof(a). Dr(a). Mauricio Yonamine - 20/01/2015 até o presente. Email: yonamine@usp.br
Proficiência em Línguas: Inglês, Aprovado em 20/01/2015
Prorrogação(ões): 120 dias
 Período de 20/01/2019 até 20/05/2019
Data de Aprovação no Exame de Qualificação: Aprovado em 17/03/2017
Data do Depósito do Trabalho:
Título do Trabalho:
Data Máxima para Aprovação da Banca:
Data de Aprovação da Banca:
Data Máxima para Defesa:
Data da Defesa:
Resultado da Defesa:
Histórico de Ocorrências: Primeira Matrícula em 20/01/2015
 Prorrogação em 21/11/2018

Aluno matriculado no Regimento da Pós-Graduação USP (Resolução nº 6542 em vigor de 20/04/2013 até 28/03/2018).

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 04/02/2019

Impresso em: 10/05/2019 01:17:17

10/05/2019

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação



Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Documento sem validade oficial

FICHA DO ALUNO

9141 - 9230351/1 - Idylla Silva Tavares

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
FBC5802-3/6	Tópicos Avançados em Toxicologia I	03/03/2015	16/09/2015	15	1	90	A	N	Concluída
FBC5803-3/5	Sistemas de Garantia da Qualidade em Laboratórios de Ensaio	24/03/2015	06/04/2015	30	2	100	A	N	Concluída
FBC5747-2/1	Toxicologia Forense	11/05/2015	14/09/2015	60	4	100	A	N	Concluída
FBC5737-3/3	Farmacocinética Avançada	01/10/2015	09/12/2015	120	8	85	A	N	Concluída
FBC5784-3/8	Tópicos Avançados em Toxicologia II	08/03/2016	20/09/2016	15	1	75	A	N	Concluída
FBC5758-3/1	Toxicologia dos Praguicidas	13/09/2016	24/10/2016	90	6	92	A	N	Concluída

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito de tese	
Disciplinas:	0	20	22
Estágios:			
Total:	0	20	22

Créditos Atribuídos à Tese: 167

Observações:

1) Curso com validade nacional, de acordo com o disposto na Portaria nº 1.327, de 18.11.2010.

Conceito a partir de 02/01/1997:

A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência.

Um(1) crédito equivale a 15 horas de atividade programada.

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 04/02/2019

Impresso em: 10/05/2019 01:17:17

VII - 5. CURRICULUM LATTES



Idylla Silva Tavares

Endereço para acessar este CV: <http://lattes.org.br/0015614555625200>

Última atualização do currículo em 06/12/2018

Possui Graduação em Farmácia pela Universidade Federal do Rio Grande do Norte (2007), Especialização em Ciências Forenses pela Faculdade Estácio de Sá/FATERN e Mestrado em Química pela Universidade Federal do Rio Grande do Norte (2011). Atualmente é Perita Química da Polícia Civil da Paraíba e doutoranda do programa de Toxicologia e Análises Toxicológicas da Universidade de São Paulo. *(Texto informado pelo autor)*

Identificação

Nome Idylla Silva Tavares
Nome em citações bibliográficas TAVARES, I. S.

Endereço

Endereço Profissional Polícia Civil do Estado da Paraíba, Instituto de Polícia Científica, Laboratório de Toxicologia, Rua Marechal Deodoro da Fonseca, Centro, 58700550 - Patos, PB - Brasil, Telefone: (83) 34239634

Formação acadêmica/titulação

2015 Doutorado em andamento em Toxicologia e Análises Toxicológicas (Conceito CAPES 5). Universidade de São Paulo, USP, Brasil.
Orientador: Professor Dr. Mauricio Yamamine.

2009 - 2011 Mestrado em PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM QUÍMICA, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, UFRN, Brasil.
Título: Obtenção e caracterização de nanopartículas de quitosana, Ano de Obtenção: 2011.
Orientador: José Luis Cardoso Fonseca.
Coorientador: Ana Lúcia Forpino Fernandes Caroni.
Palavras-chave: nanopartículas; Quitosana.
Grande área: Ciências Exatas e da Terra
Grande Área: Ciências Exatas e da Terra / **Área:** Química / **Subárea:** Química Orgânica / **Especialidade:** Polímeros e Colóides.

2010 - 2012 Especialização em Ciências Forenses. (Carga Horária: 360h). Faculdade Estácio do Rio Grande do Norte, Estácio FATERN, Brasil.
Título: Cocaína e Técnicas de Análises Forense em Sangue.
Orientador: Tereza Cristina Epifânio Diógenes Rago.

2003 - 2007 Graduação em Farmácia. Universidade Federal do Rio Grande do Norte, UFRN, Brasil.
Título: Morfologia, avaliação dos taninos totais, potencial antimicrobiano e poder redutor do infuso das folhas de.
Orientador: Maria Gíllia Ribeiro Dentas de Aguiar.

Atuação Profissional

Polícia Civil da Paraíba, PCPB, Brasil.

Vínculo institucional

2014 - Atual Vínculo: , Enquadramento Funcional: Perito Oficial Químico Legal, Carga horária: 40, Regime: Dedicção exclusiva.

Outras informações

Perito Oficial Químico Legal

Ministério da Saúde (RN), MS/RN, Brasil.

Vínculo institucional

2009 - 2014

Vínculo: Servidor Público, Enquadramento Funcional: Agente Administrativo, Carga horária: 40, Regime: Dedicção exclusiva.

Idiomas

Inglês	Compreende Razoavelmente, Fala Razoavelmente, Lê Razoavelmente, Escreve Razoavelmente.
Espanhol	Compreende Razoavelmente, Fala Pouco, Lê Razoavelmente, Escreve Pouco.
Francês	Compreende Pouco, Fala Pouco, Lê Pouco, Escreve Pouco.

Produções

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

Ordenar por

Ordem Cronológica

1.  **TAVARES, I. S.**; CARONI, A. L. P. F.; PONSECA, J. L. C.; PEREIRA, M. R. . Surface charging and dimensions of chitosan coacervated nanoparticles. *Colloids and Surfaces, B, Biointerfaces (Print)* **101**, v. 90, p. 254, 2012.
Citações: [WEB OF SCIENCE](#) 18 | [SCOPUS](#) 24

Resumos publicados em anais de congressos

1.  **TAVARES, I. S.**. Anti-hipertensivos in teh high risk pregnancy and impact in the costs. In: 5ª CIFARP - Congresso Internacional de Ciências Farmacéuticas, 2005, Ribeirão Preto - SP. Anti-hipertensivos in the high risk pregnancy and impact in the costs, 2005. v. 41, p. 104-104.
2.  **TAVARES, I. S.**. Implementation of the farmaco-vigilance project's in the maternidade escola Januário Cicco. In: 5ª CIFARP - Congresso Internacional de Ciências Farmacéuticas, 2005, Ribeirão Preto - SP. Implementation of the farmaco-vigilance project's in the maternidade escola Januário Cicco, 2005. v. 41, p. 215-215.

Apresentações de Trabalho

1. **TAVARES, I. S.**. Minicurso - Toxicologia Forense: Farmacológico na Perícia Criminal. 2018. (Apresentação de Trabalho/Outra).
2. **TAVARES, I. S.**. Toxicologia e Drogas de Abuso. 2018. (Apresentação de Trabalho/Conferência ou palestra).
3. **TAVARES, I. S.**. Minicurso - Química e Toxicologia Forense. 2018. (Apresentação de Trabalho/Outra).
4. **TAVARES, I. S.**; SANTOS, M. F.; OLIVEIRA, T. F.; YONAMINE, M. . Liquid chromatograph-tandem mass spectrometry method for detection of anabolic steroids as adulterants in dietary supplements in Brazil. 2018. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
5. SILVA, J. P. E.; **TAVARES, I. S.**; R, F.; L. J, K. V.; M, G. A.; YONAMINE, M. . Optimization of Quechers extraction for GC-MS determination of cannabinoids in human umbilical cord tissue. 2018. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
6. **TAVARES, I. S.**. Minicurso - Química Forense a serviço da investigação criminal. 2018. (Apresentação de Trabalho/Outra).
7. **TAVARES, I. S.**. Novas Substâncias Psicoativas. 2017. (Apresentação de Trabalho/Conferência ou palestra).
8. **TAVARES, I. S.**. Drogas Facilitadoras de Crimes. 2017. (Apresentação de Trabalho/Conferência ou palestra).
9. **TAVARES, I. S.**; YONAMINE, M.; SANTOS, M. F. . Development of an analytical method for the detection of non-declared anabolic steroids in dietary supplements in Brazil. 2017. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
10. **TAVARES, I. S.**; YONAMINE, M.; CAMPRESTRINI, I. . DEVELOPMENT OF AN ANALYTICAL METHOD FOR DETECTION OF 16 ADULTERANTS IN DIETARY SUPPLEMENTS SOLD IN BRAZIL, USING HPLC-DAD. 2016. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
11. **TAVARES, I. S.**. NOVAS SUBSTÂNCIAS PSICOATIVAS. 2016. (Apresentação de Trabalho/Outra).
12. **TAVARES, I. S.**. NOVAS SUBSTÂNCIAS PSICOATIVAS. 2015. (Apresentação de Trabalho/Conferência ou palestra).
13.  **TAVARES, I. S.**; Alyne . Inibição da Oxidação e o Poder Redutor do extrato aquoso da "momordica charantia L.". 2007. (Apresentação de Trabalho/Simpósio).

Eventos

Participação em eventos, congressos, exposições e feiras

1. 53rd The International Association of Forensic Toxicologists TIAFT. 2015. (Encontro).
2. IV Encontro Nacional de Química Forense - IV ENQFOR. 2014. (Encontro).
3. EREF - NE Encontro Regional de Estudantes de Farmácia. 2006. (Encontro).
4. 4º Congresso Regional de Análises Clínicas Nordeste. 2005. (Congresso).
5. 4º COPEFARMA - Congresso Pernambucano de Farmacêuticos. 2005. (Congresso).
6. 5º CIFARF - Congresso Internacional de Ciências Farmacêuticas. Anti-hypertensives in the pregnancy of high risk and the impact in hospital costs. 2005. (Congresso).
7. 26º Congresso Brasileiro de Análises Clínicas e 4º Congresso Brasileiro de Citologia Clínica. 2004. (Congresso).
8. I Congresso Norte-Riograndense de Farmácia, VI Semana de Ciências Farmacêuticas-UNP e II Feira Universitária de Farmácia UFRN. 2004. (Congresso).

Página gerada pelo Sistema CuriCulo Lattes em 10/05/2019 às 1:20:57

Imprimir currículo