UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Programa de Pós-Graduação em Toxicologia e Análises Toxicológicas

Desenvolvimento e aplicação de método analítico para detecção de estimulantes em suplementos nutricionais adulterados

Margarita María Muñoz Henao

Dissertação para obtenção do título de

MESTRE

Orientador: Prof. Dr. Mauricio Yonamine

São Paulo

2017

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Programa de Pós-Graduação em Toxicologia e Análises Toxicológicas

Desenvolvimento e aplicação de método analítico para detecção de estimulantes em suplementos nutricionais adulterados

Margarita María Muñoz Henao

Versão corrigida da Dissertação conforme resolução CoPGr 6018.
O original encontra-se disponível no Serviço de Pós Graduação da FCF/USP

Dissertação para obtenção do título de
MESTRE

Orientador: Prof. Dr. Mauricio Yonamine

São Paulo
2017

Suplementos; estimulantes; anorexígenos; adulterantes; GC-NPD

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Muñoz Henao, Margarita Maria
M967d Desenvolvimento e aplicação de método analítico para detecção de estimulantes em suplementos nutricionais adulterados / Margarita Maria Muñoz Henao. -- São Paulo, 2017.
106p.

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

1. Toxicologia I. T. II. Yonamine, Mauricio, orientador.

615.9 CDD

Margarita Maria Muñoz Henao

Desenvolvimento e aplicação de método analítico para detecção de estimulantes em suplementos nutricionais adulterados

Comissão julgadora da dissertação para obtenção do título de MESTRE

Prof. Dr. Mauricio Yonamine
orientador/presidente

Profa. Dra. Susanne Rath
1° examinador

Prof. Dr. Eduardo Purgatto
2° examinador

Profa. Dra. Elizabeth de Souza Nascimento
3° examinador

São Paulo, 19 de janeiro de 2018

Aos meus pais, Fernando e Leslie, por cultivar em mim a força interior para alcançar os logros propostos apesar da dificuldade que representa ficar longe

APOIO FINANCIERO

CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

CNPq/Anvisa Nº 05/2014 – Pesquisas em Vigilância Sanitária

- Processo n°: 440066/2014-0

Agradecimentos

É primordial expressar minha sincera gratidão ao meu orientador, professor Mauricio Yonamine, por ter me dado a oportunidade de vir da Colômbia em busca de um dos meus maiores sonhos: crescer profissionalmente. Agradeço todos os momentos compartilhados, bem como sua paciência, confiança, colaboração e orientação durante todo este processo.

Agradeço aos meus pais, Fernando e Leslie por sempre acreditarem em mim e nunca duvidar das minhas escolhas. Por terem cultivado em mim a força para enfrentar os medos e lutar pelo que realmente me faz feliz. Aos meus irmãos Pablo Andrés e Julian Esteban por estarem sempre presentes apesar da distância.

Agradeço ao Laboratório de Análises Toxicológicas (LAT-USP), Bia Bismara e aos estagiários Fabi, Carol, Rapha, Vitor e Georg, pela paciência, colaboração e transmissão de conhecimento.

Aos poucos fui entrando no coração da toxicologia e tive a possibilidade de compartilhar os meus dias durante quase três anos com quem hoje é considerada minha família brasileira. É por isso que agradeço especialmente a Gabi, Sarinha, Flá, Idylla, Anax e Tiago por me acolher calorosamente sempre, além dos muitos ensinamentos diários que não param de me enriquecer. A Aninha, portuguesa querida que entrou na minha vida para me mostrar e sempre reforçar que a vida não precisa de muito para ser feliz, nada mais que o esforço e a transparência são suficientes para lutar pelos nossos ideais e que a união realmente faz a força. A Katia, Jefferson, Alexandre e Marcelo por todos os momentos compartilhados durante o tempo vivido.

Agradeço a Flá Pine e a Iolana, pela sua amizade e apoio incondicional, vocês se tornaram fundamentais durante todo este processo de aprendizado, aprendi de vocês que a confiança, dedicação e segurança são grandes pilares para alcançar os nossos objetivos na vida.

Sou grata com a Samantha e o Ângelo, funcionários do departamento, pela sua colaboração incondicional e despreocupada.

Agradeço as minhas amigas Argentina, Brasileira e Colombianas, Mariana, Pricila, Yeimy e Ginneth, pela companhia mesmo nos momentos difíceis, suas palavras, sua presença e sua confiança fizeram que cada situação fosse mais fácil de levar.

Finalmente agradeço à vida por me permitir esta experiência única e maravilhosa, pois sem muito pensar, cheguei num Estado cujo tamanho é o do meu país, com diversidade de cultura, riquezas e uma magia que pouco a pouco foi me envolvendo, pois não somente as pessoas, também a USP e a cidade, com o correr dos dias foi me acolhendo até me sentir como se estivesse em casa, muito obrigada Brasil.

Agradeço a todos pela sua participação para alcançar este grande sonho!

"No es cierto que la gente deja de perseguir sus sueños porque envejecen, envejecen porque dejan de perseguir sus sueños"

Gabriel García Márquez

RESUMO

Henao, M.M.M. **Desenvolvimento e aplicação de método analítico para detecção de estimulantes em suplementos nutricionais adulterados.** 2017. 104f. Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

A adição fraudulenta de ativos farmacêuticos em suplementos nutricionais é um problema mundial. É comum encontrar mensagens sobre perda de peso, aumento da capacidade intelectual e/ou física, e estímulo sexual na embalagem de suplementos adulterados com fármacos sintéticos ocultos em formulações aparentemente inofensivas para os usuários. No Brasil, a disponibilidade de dados sobre a adulteração de suplementos nutricionais é escassa. No presente trabalho, foi desenvolvido e aplicado um método analítico empregando cromatografia gasosa com detector de nitrogênio fósforo (GC-NPD) para a detecção, identificação e quantificação de estimulantes/anorexígenos não declarados nos rótulos de suplementos alimentares, tais como: cafeína, femproporex, anfepramona, fenfluramina, sibutramina, fentermina, efedrina, fenilpropanolamina, pseudoefedrina e 4-metilhexan-2-amina. A técnica de extração/solubilização com metanol foi utilizada, ressaltando a utilização de baixa quantidade de amostra, solvente e padrões de estimulantes. Após o desenvolvimento e validação do método, as análises foram aplicadas em amostras de suplementos nutricionais obtidos em lojas especializadas em suplementos, de diversas partes do estado de São Paulo (n=125). Das 125 amostras de suplemento nutricional analisadas, 38 delas (30%) apresentaram resultado positivo para alguma das substâncias de interesse, dentre elas, sibutramina, cafeína e efedrina mediante a metodologia escolhida. As amostras positivas foram posteriormente analisadas qualitativamente por LC-MS/MS, no propósito de confirmar o resultado positivo obtido. A técnica analítica empregada proporciona seletividade, linearidade, precisão, exatidão, recuperação e limites em conformidade ao objetivo que foram destinadas. Os métodos de preparo de amostra desenvolvidos e validados demonstraram ser simples, práticos, eficientes e diferenciados pelo baixo uso de amostra e solvente.

Palavras-chaves: Suplementos; estimulantes; anorexígenos; adulterantes; GC-NPD

SUMARY

Henao, M.M.M. **The development and application of analytical method for the detection of stimulants in adulterated nutritional supplements**. 2017. 104f. Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

The fraudulent addition of active pharmaceutical compounds in nutritional supplements is, indeed, a worldwide problem. Often, it can be found several advertisements on various supplement packaging assuring weight loss, increased intellectual and/or physical capacity and sexual stimulation. These products may have been 'spiked' with synthetic drugs containing formulations which are apparently harmless to users. In Brazil, the availability of data about adulteration of nutritional supplements is scarce. In the present work, an analytical method using gas chromatography coupled with a nitrogen-phosphorus detector (GC-NPD) was developed and applied for the detection, identification and quantification of undeclared stimulants and/or anorectic agents in food supplement labels, such as: caffeine, fenproporex, amfepramone, fenfluramine, sibutramine, phentermine, ephedrine, phenylpropanolamine, pseudoephedrine e 4-metilhexan -2- amine. The extraction/solubilization with methanol presented satisfactory results, emphasizing the use of low amount of sample, solvent and standards of analytes. After the development and validation, the method was applied in samples of nutritional supplements obtained from specialty stores in various parts of the state of São Paulo (n = 125). From the 125 nutritional supplement samples analyzed, 38 of them (30%) presented positive results for some of the substances of interest, among them sibutramine, caffeine and ephedrine according to the chosen methodology. The positive samples were subsequently analyzed qualitatively by LC-MS / MS, in order to confirm the positive result obtained. The analytical technique employed provides selectivity, linearity, precision, accuracy, recovery and limits in accordance with the intended purpose. The sample preparation methods developed and validated to be simple, practical, efficient and differentiated by the low sample and solvent usage.

Keywords: Supplements; stimulants; anorectics; adulterants; GC-NPD

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química da cafeína.....13

Figura 2. Estrutura química do femproporex 14

Figura 3. Estrutura química da anfepramona 15

Figura 4. Estrutura química da fenfluramina.....15

Figura 5. Estrutura química da sibutramina.....16

Figura 6. Estrutura química da fentermina.....17

Figura 7. Estrutura química da efedrina 18

Figura 8. Estrutura química da pseudoefedrina.....19

Figura 9. Estrutura química da fenilpropanolamina 20

Figura 10. Estrutura química da 4-metil-hexan-2-amina (DMAA).....21

Figura 11. Perfil cromatográfico (GC-NPD) das 11 substâncias de interesse na concentração de 0,5 $\mu g.\mu L^{-1}$ preparados em MeOH. 40

Figura 12. Separação cromatográfica da efedrina, pseudoefedrina e difenilamina (PI) após a derivação com anidrido trifluoroacético. 41

Figura 13. Cromatograma de uma amostra de suplemento fortificada com 11 analitos de interesse (estimulantes) na concentração de 0,5 $\mu g.\mu L^{-1}$ após extração com metanol. 44

Figura 14. Diferença estatística (P < 0,05) quando há uso de agitador automático na extração das substâncias cafeína e sibutramina utilizando o teste t. Os resultados estão expressados como média da área relativa ± desvio padrão. 46

Figura 15. Diferença estatística (P < 0,05) de três tempos de ultrassom na extração dos analitos cafeína e sibutramina utilizando o teste de comparação múltipla de Brown-Forsythe. Os resultados estão expressados como média da área relativa ± desvio padrão. 47

Figura 16. Diferença estatística (P < 0,05) quando avaliado o uso de centrifuga na extração das substâncias cafeína e sibutramina utilizando o teste t. Os resultados estão expressados como média da área relativa ± desvio padrão. 48

Figura 17. Diferença estatística (P < 0,05) entre três massas de uma amostra de suplemento positiva para cafeína e sibutramina extraído com quantidades proporcionais de metanol utilizando o teste de comparação múltipla de Tukey. Os resultados estão expressados com média da área relativa ± desvio padrão. 49

Figura 18. Diferença estatística (P < 0,05) entre a extração com metanol e etanol de uma amostra de suplemento positiva para cafeína e sibutramina utilizando o teste t. Os resultados estão expressados com média da área relativa ± desvio padrão. 51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Doses diárias recomendadas (DDR), mg teórica de cada analito presente em uma porção real de suplemento (30 g), quantidades (mg) de cada analito presentes em uma amostra de 500 mg e concentração de cada estimulante após diluição da amostra em 5 mL de metanol. 32

Tabela 2. Íons utilizados na confirmação dos estimulantes e seus padrões deuterados por GC-MS 37

Tabela 3. Porcentagens de recuperação (%) de cafeína, fenfluramina, femproporex, fenilpropanolamina, anfepramona, sibutramina, efedrina e pseudoefedrina após solubilização com metanol. 45

Tabela 4. Porcentagens de recuperação e precisão dos analitos pesquisados. 53

Tabela 5. Limites de detecção (LoD) e quantificação (LoQ) para os analitos de interesse em amostras de suplementos nutricionais. 54

Tabela 6. Distância de separação absoluta dos analitos de interesse considerando o pico mais próximo, expressada como tempos de retenção (minutos). 55

Tabela 7. Distância de separação absoluta dos isômeros efedrina e pseudoefedrina após procedimento de derivatização, expressada como tempos de retenção (minutos). 55

Tabela 8. Curvas de calibração e coeficientes de correlação linear para os analitos DMAA, fentermina, fenfluramina, fenilpropanolamina, anfepramona, femproporex, cafeína e sibutramina. 56

Tabela 9. Curvas de calibração e coeficientes de correlação linear para os analitos efedrina e pseudoefedrina. 57

Tabela 10. Precisão inter e intra ensaio dos analitos de interesse em três matrizes de suplemento nutricional (proteína, aminoácido e carboidrato) determinada em 3 concentrações (CB, CM e CA). 58

Tabela 11. Exatidão dos analitos de interesse em três matrizes de suplemento nutricional (proteína, aminoácido e carboidrato) determinada em 3 concentrações (CB, CM e CA).....60

Tabela 12. Porcentagem de recuperação dos analitos de interesse em três matrizes de suplemento nutricional (proteína, aminoácido e carboidrato). 62

Tabela 13. Suplementos contendo estimulantes/anorexígenos na sua composição e informação de origem.....63

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOAC	Associação Oficial de Químicos Analíticos, do inglês: *association of official analytical chemists*
ASE	Extração acelerada por solvente, do inglês: *accelerated solvente extraction*
ATFA	Anidrido trifluoroacético
BPF	Boas Práticas de Fabricação
CE-MS/MS	Eletroforese capilar acoplada a espectrometria de massas sequencial
CV	Coeficiente de variação
DDR	Dose Diária Recomendada
DMAA	4-metilhexan-2-amina
DSHEA	Ata de saúde e educação do suplemento nutricional, do inglês: Dietético *Dietary Supplement Health and Education Act*
DSPE	Extração em fase sólida dispersiva, do inglês: *dispersive solid phase extraction*
EC	Parlamento Europeu e Conselho Europeu, do inglês: *European Parliament and European Council*
EEC	Comunidade econômica europeia, do inglês: *European Economic Community*
FDA	Administração de alimentos e medicamentos, do inglês: *Food and Drugs Administration*
G	Força centrífuga
GC-MS	Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas
GC-NPD	Cromatografia gasosa com detector nitrogênio-fósforo
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
HPLC-DAD	Cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos

ICH	Conferência Internacional sobre Harmonização, do inglês: *International Conference on Harmonization*
IDR	Ingestão Diária Recomendada
LC-MS	Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas
LC-MS/MS	Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas sequencial
LoD	Limite de Detecção
LoQ	Limite de Quantificação
OMS	Organização Mundial da Saúde
IPDE-5	Inibidores das fosfodiesterase-5
PI	Padrão Interno
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
RSD	Desvio padrão relativo, do inglês: *relative standard deviation*
SNC	Sistema Nervoso Central
SPE	Extração em fase sólida
TLC	Cromatografia em camada delgada, do inglês: *thin layer chromatography*
UHPLC-MS/MS	Cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial
USFDA	Administração de alimentos e medicamentos dos Estados Unidos, do inglês: *Food and Drugs Administration of the United States*
WADA	Agência mundial antidopagem, do inglês: *World Anti-Doping Agency*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 2
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 5
2.1. Suplementos nutricionais 5
2.2. Estimulantes e/ou anorexígenos como adulterantes em suplementos nutricionais 11
2.2.1. Cafeína 12
2.2.2. Femproporex 13
2.2.3. Anfepramona (Dietilpropiona) 14
2.2.4. Fenfluramina 15
2.2.5. Sibutramina 16
2.2.6. Fentermina 17
2.2.7. Efedrina 17
2.2.8. Pseudoefedrina 18
2.2.9. Fenilpropanolamina 19
2.2.10. 4-Metil-hexan-2-amina (DMAA) 20
2.3. Determinação de estimulantes e/ou anorexígenos em suplementos nutricionais 21
2.3.1. Técnicas analíticas 21
2.3.2. Técnicas de preparo de amostra 22
3. OBJETIVO 24
4. MATERIAL E MÉTODOS 26
4.1. Material 26
4.1.1. Equipamentos e acessórios 26
4.1.2. Reagentes e padrões 26
4.1.3. Amostras 27
4.2. Métodos 27
4.2.1. Solubilização/extração com metanol 27
4.2.2. Preparação de amostra para separação dos isômeros efedrina e pseudoefedrina 28

4.2.3. Condições cromatográficas 28
4.2.4. Otimização do método 29
4.2.5. Validação dos métodos analíticos.....31
4.2.6. Confirmação de amostras positivas 36
4.2.7. Amostragem de suplementos 37
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....40
5.1. Separação cromatográfica de estimulantes/anorexígenos.....40
5.2. Métodos de preparação de amostras 41
5.2.1. Extração ASE seguida da SPE 42
5.2.2. QuEChERS (Método modificado) 42
5.2.3. Extração/solubilização com metanol.....43
5.3. Otimização do método de preparo de amostras.....45
5.3.1. Otimização de parâmetros gerais 45
5.3.2. Definição da quantidade representativa de suplemento e solvente.....48
5.3.3. Escolha do solvente de extração 50
5.3.4. Avaliação da incorporação das substâncias estimulantes/anorexígenos na composição de suplementos nutricionais 51
5.4. Validação dos métodos analíticos 53
5.4.1. Limite de detecção (LoD) e quantificação (LoQ).....53
5.4.2. Seletividade 54
5.4.3. Linearidade 55
5.4.4. Precisão, exatidão e recuperação.....57
5.4.5. Carryover 57
5.5. Análise de amostras reais 63
6. CONCLUSÃO.....68
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 69
ANEXOS 80

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A adição fraudulenta de ativos farmacêuticos em suplementos alimentares é um problema mundial. É comum encontrar mensagens de perda de peso, aumento da capacidade intelectual e/ou física e estímulo sexual na embalagem de suplementos adulterados com fármacos sintéticos ocultos em formulações aparentemente inofensivas para os usuários (DECONINCK et al., 2014; VAYSSE et al., 2010; FRANKOS et al., 2010).

Produtos apresentados em formatos farmacêuticos (cápsulas, tabletes ou outros formatos destinados a serem ingeridos em dose), sejam eles nacionais ou importados, devem ser regulados como medicamento ou alimento de acordo com a sua composição e finalidade de uso. Mesmo quando comercializados como alimentos, esses produtos devem ser registrados junto à Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), conforme determina a Resolução-RDC Nº 27/2010 (ANVISA, 2010).

A ANVISA não define a categoria “suplemento alimentar” na sua regulamentação. Esses produtos, quando comercializados no Brasil, podem ser classificados, por exemplo, como suplemento vitamínico e/ou mineral, alimentos para atletas ou novos alimentos (ANVISA, 2013). Nesse caso o produto é isento da obrigatoriedade de registro. A dispensa de registro, todavia, não exime à empresa de cumprir os requisitos de composição e qualidade estabelecidos pelos respectivos regulamentos técnicos, conforme a Resolução - RDC Nº 18/2010 (ANVISA, 2010).

Em outros países, como os Estados Unidos, através da *Food and Drug Administration* (FDA), suplemento nutricional é definido como um produto destinado à ingestão que contém um "ingrediente dietético" capaz de agregar mais valor nutricional à dieta. Um "ingrediente dietético" pode ser uma, ou qualquer combinação, das seguintes substâncias: vitaminas, minerais, ervas ou outro componente botânico, aminoácidos, concentrados ou extratos (USA, 1994).

A FDA regulamenta os suplementos nutricionais sob um conjunto diferente da normatividade que abrange alimentos "convencionais" e medicamentos (*Dietary Supplement Health and Education Act* - DSHEA), permitindo que uma gama mais ampla de produtos contendo substâncias aprovadas como nova droga, certificadas como antibiótico ou licenciada para uso biológico sejam comercializados como suplementos ou alimento (USA, 1994).

O uso desses produtos tem sido relacionado a danos graves à saúde do consumidor, tais como: dependência, efeitos tóxicos no fígado, insuficiência renal, disfunções metabólicas, alterações cardíacas, alterações do sistema nervoso e, em alguns casos, até a morte (JABBAR e HANLY., 2013; KARNATOVSKAIA et al., 2015; LEIKIN, 2007).

No Brasil, a crise econômica de 2015 e 2016 teve um impacto negativo sobre o mercado de vitaminas e suplementos nutricionais. Apesar disso, espera-se uma taxa de crescimento anual equiparável ao aumento do consumo mundial, atingindo vendas de R$ 5,5 bilhões em 2021 (EUROMONITOR INTERNATIONAL, 2016).

O crescente mercado de suplementos nutricionais está associado ao aumento no seu consumo, o qual é observado tanto entre atletas profissionais como atletas recreacionais (WIENS et al., 2014; DIETZ et al., 2014; SALGADO et al., 2014). Isso se deve à percepção de consumidores de que aos suplementos estão associados a diversos benefícios à saúde, tais como suplementação nutricional quando há deficiências preexistentes, melhora na função do sistema imune e na resistência a doenças, fornecimento de energia aos músculos, crescimento e reparação muscular, dentre outros (MAUGHAN, 2002).

Apesar da realidade do país, os dados sobre o consumo de suplementos nutricionais são escassos. Os estudos disponíveis atualmente avaliam um pequeno número de indivíduos e regiões específicas (GOSTON e CORREIA., 2010). Tendo em vista a falta de pesquisas em detecção de adulterantes em suplementos nutricionais, considera-se importante o desenvolvimento e aplicação de método analítico para identificação de estimulantes/anorexígenos em suplementos nutricionais.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Suplementos nutricionais

Na União Europeia, os alimentos são definidos como qualquer substância ou produto, processado, parcialmente processado ou não processado, destinado para ser ingerido pelos humanos. É claramente indicado no Regulamento (EC) 178/2002 que os alimentos não devem incluir medicamentos (EC, 2002). Os medicamentos são definidos como qualquer substância ou combinação de substâncias que apresentam propriedades para o tratamento ou prevenir doenças em seres humanos (EC, 2004).

Além dessas definições, a legislação da União Europeia também inclui os chamados produtos "*borderline*", referindo-se a produtos que contém substâncias que podem ou não possuírem ativos com ação farmacológica dependendo da sua dosagem (LACHENMEIER et al., 2012; COPPENS et al., 2006).

Esses produtos foram comercializados como medicamentos até 1965, quando a Directiva 65/65/EEC (EEC, 1965) declarou que os dados de qualidade, eficácia e segurança foram suficientes para serem considerados produtos medicinais. Quando esses dados não puderam ser fornecidos para um produto "*borderline*", o fabricante simplesmente mudou seu rótulo de "medicamento" para "suplemento dietético" e continuou a comercializá-lo (LACHENMEIER et al., 2012).

Na União Europeia, compete a cada Estado-Membro decidir se um produto à base de plantas ou botânica se enquadra na definição de um medicamento. Ervas e extratos botânicos podem estar presentes em alimentos funcionais, suplementos nutricionais e também em medicamentos (EC, 2004; EUSSEN et al., 2011; COPPENS et al., 2006). Isto pode levar a uma situação em que um produto contendo um ingrediente bioativo em certa dosagem pode ser considerado um suplemento nutricional em alguns Estados-Membros, mas registrado como medicamento em outros. Também é possível que, num único Estado-Membro, uma determinada erva ou extrato botânico seja vendido tanto como medicamento como suplemento, dependendo da sua dosagem (EUSSEN et al., 2011; COPPENS et al., 2006).

Por outro lado, os Estados Unidos através da *Food and Drug Administration* (FDA), define um suplemento nutricional como um produto destinado à ingestão que contém um "ingrediente dietético" capaz de agregar mais valor nutricional à dieta. Um "ingrediente dietético" pode ser uma, ou qualquer combinação, das seguintes

substâncias: vitaminas, minerais, ervas ou outro componente botânico, aminoácidos, concentrados ou extratos. Os suplementos nutricionais ou dietéticos podem ser encontrados em muitas formas, tais como comprimidos, cápsulas, cápsulas gelatinosas, líquidos ou pós. Alguns suplementos podem ajudar a garantir uma ingestão dietética adequada de nutrientes essenciais, outros podem ajudar a reduzir o risco de doenças (USA, 1994).

A FDA regulamenta os suplementos nutricionais sob um conjunto diferente da normatividade que abrange alimentos "convencionais" e medicamentos (*Dietary Supplement Health and Education Act* - DSHEA), permitindo que uma gama mais ampla de produtos seja comercializada como suplementos ou comida (USA, 1994).

A regulamentação dos Estados Unidos inclui tanto produto final quanto ingredientes. Os fabricantes e distribuidores de suplementos nutricionais e de ingredientes alimentares devem cumprir as normas de formulação e rotulagem, de maneira que todos os constituintes utilizados devem estar expressamente declarados nos rótulos e obedecendo aos limites diários recomendados. Os rótulos de suplementos podem conter alegações de saúde, que devem ser autorizados pela FDA e cumprir um acordo científico significativo, com base em evidências de estudos bem definidos e acordo entre especialistas (USFDA, 2009).

As empresas são responsáveis por avaliar a segurança e rotulagem dos seus produtos antes da comercialização, para garantir todos os requisitos regulamentados pela DSHEA e FDA. A FDA é a agência de fiscalização responsável pela punição das empresas que apresentarem qualquer irregularidade em seus produtos (FDA, 2005).

No Brasil, o panorama não é diferente, pois não há previsão legal para a categoria de "Suplementos Alimentares". Atualmente, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA enquadra esses produtos em quatro categorias de alimentos distintas: alimentos para atletas, alimentos com alegação de propriedade funcional e/ou de saúde, novos alimentos e suplementos vitamínicos e/ou minerais (ANVISA, 2013):

a) Alimentos para atletas: São alimentos destinados a auxiliar o desempenho físico dos atletas, atendendo suas necessidades nutricionais específicas. Os alimentos para atletas são classificados como: hidroeletrolítico para atletas; energético para atletas; proteico para atletas; suplemento para substituição parcial de refeições de atletas; suplemento à base de creatina para atletas e suplemento à base de cafeína para atletas.

b) Alimentos com alegação de propriedade funcional e/ou de saúde: São os alimentos com indicação de papel fisiológico para o crescimento, desenvolvimento, manutenção e outras funções normais do organismo.

c) Novos alimentos: São os alimentos sem histórico de consumo no país, alimentos contendo novos ingredientes, cuja apresentação não é convencional na área de alimentos tais como tabletes, cápsulas, comprimidos, entre outros e alimentos que contenham substâncias conhecidas, porém utilizadas em quantidades muito superiores àqueles encontrados em alimentos para uma dieta regular.

d) Suplementos vitamínicos e/ou minerais: São os alimentos compostos exclusivamente por nutrientes vitamínicos e/ou minerais, que servem para complementar a dieta diária de uma pessoa saudável, em casos em que sua ingestão a partir da alimentação é insuficiente, ou quando a dieta requer alguma suplementação. Estes suplementos não podem substituir os alimentos nem serem considerados dieta exclusiva.

Nenhum dos produtos considerados nas quatro categorias citadas anteriormente pode conter propriedades ou indicações terapêuticas e fármacos na sua composição. Portanto, propagandas e rótulos informativos que indicam o uso de suplementos nutricionais para prevenir, aliviar ou tratar doenças são ilegais. Da mesma maneira, alegações chamativas de ganho de massa muscular, definição corporal, redução de gordura, aceleração do metabolismo ou melhora do desempenho sexual também são proibidos, uma vez que podem contribuir para o uso abusivo desses produtos (ANVISA, 2013).

Enfatiza-se que restrições estabelecidas em norma específica podem ser aplicadas a todas as outras categorias de alimentos. A Portaria N° 32/1998, da ANVISA, por exemplo, estabelece que os suplementos à base de vitaminas e/ou minerais não podem conter mais de 100% da Ingestão Diária Recomendada (IDR) de qualquer vitamina e/ou mineral. A Resolução RDC N° 18/2010 estabelece que alimentos para atletas não devem conter substâncias estimulantes (com exceção da cafeína), hormônios ou outras substâncias consideradas como "doping" pela Agência Mundial Antidopagem (WADA), ou por legislação pertinente (ANVISA, 2010 a,b). Estas e outras restrições declaradas em normas sanitárias são válidas para todos os alimentos, uma vez que são ramificações do declarado no Decreto-Lei 986/1969 que institui normas básicas sobre alimentos (BRASIL,1969).

Produtos fabricados no país ou importados, comercializados como alimentos, geralmente têm obrigatoriedade de registro junto à ANVISA, conforme determina a Resolução RDC N° 27/2010 (dispõe sobre as categorias de alimentos e embalagens isentos e com obrigatoriedade de registro sanitário). Alimentos para atletas e suplementos vitamínicos e/ou minerais, por exemplo, são isentos da obrigatoriedade de registro. Entretanto, a dispensa de registro não exime a empresa de cumprir os requisitos de Boas Práticas de Fabricação (BPF) e controle de qualidade estabelecidos pelos respectivos regulamentos técnicos (ANVISA, 2010b).

As sanções por infrações à legislação sanitária federal adotadas pela ANVISA estão previstas na Lei 6437/77. As infrações sanitárias serão punidas, alternativa ou cumulativamente, com as penalidades de: advertência, multa, apreensão de produto, inutilização de produto, interdição de produto, suspensão de vendas, cancelamento do registro, proibição de propaganda, dentre outras (BRASIL, 1977).

Não obstante a divergência de conceitos e legislações entre países, o mercado mundial de suplementos nutricionais vem sendo impulsionado principalmente pelo aumento da conscientização da população aos cuidados da saúde com foco na prevenção de doenças e aos benefícios do estilo de vida mais saudável, e pelo aumento da disponibilidade de produtos voltados para a suplementação alimentar (CARVALHO-SILVA et al., 2012).

De acordo com o estudo publicado pela *Zion Market Research*, os suplementos nutricionais são classificados dependendo da finalidade de uso como: suplemento adicional, suplemento medicinal e suplemento para nutrição esportiva. Os suplementos com a finalidade adicional foram os mais consumidos pela população mundial no último ano; entretanto os produtos com a finalidade de nutrição esportiva foram os suplementos que apresentaram o maior aumento no consumo. Esse aumento na procura por suplementação entre atletas deve-se ao aumento no número de centros *fitness* e clubes esportivos com foco na saúde (ZION MARKET RESEARCH, 2017).

Durante o último ano, os Estados Unidos registraram um aumento de 5% no consumo de vitaminas e suplementos nutricionais, atingindo aproximadamente US$ 28 bilhões em vendas (EUROMONITOR INTERNATIONAL, 2016).

O crescimento no mercado mundial de suplementos nutricionais tem impulsionado o debate a respeito da pureza dos produtos comercializados, dos benefícios e da eficácia dos suplementos nutricionais à saúde humana. Apesar disso,

para os próximos anos, é esperado um crescimento de 3% ao ano no consumo mundial de suplementos nutricionais, com previsão de alcançar US$ 32 bilhões em vendas em 2021 (EUROMONITOR INTERNATIONAL, 2016).

No Brasil, a crise econômica de 2015 e 2016 teve um impacto negativo sobre o mercado de vitaminas e suplementos nutricionais. Apesar disso, espera-se uma taxa de crescimento anual equiparável ao aumento do consumo mundial, atingindo vendas de R$ 5,5 bilhões em 2021 (EUROMONITOR INTERNATIONAL, 2016).

O crescente mercado de suplementos nutricionais está associado ao aumento no seu consumo, o qual é observado tanto entre atletas profissionais como atletas recreacionais (WIENS et al., 2014; DIETZ et al., 2014; SALGADO et al., 2014). Isso se deve à percepção de consumidores de que suplementos estão associados a diversos benefícios à saúde, tais como suplementação nutricional quando há deficiências preexistentes, melhora na função do sistema imune e na resistência a doenças, fornecimento de energia aos músculos, crescimento e reparação muscular, dentre outros (MAUGHAN, 2002). A decisão de consumir suplementos nutricionais, além de racional, pode ser influenciada por fatores intrínsecos e extrínsecos, tais como idade, sexo, conhecimento do atleta sobre a suplementação, tipo de esporte, treinamento, duração da atividade esportiva, nível de desempenho, patrocinadores, entre outros (DE SILVA et al., 2010; DIEHL et al., 2012; GIANNOPOULOU et al., 2013; KIM et al., 2011).

Por outro lado, consumo de suplementos sem prescrição de nutricionista ou médico têm sido recorrente entre atletas recreativos; esta é uma prática bastante difundida não apenas no Brasil, mas também em outros países, vista como uma solução imediata que pode trazer consequências mais graves. Os motivos da auto-administração são frequentemente associados à estética, aparência ou falta de conhecimento (SILVA e MARINS., 2013; LOCQUET et al., 2016).

No Brasil, os dados sobre o consumo de suplementos nutricionais são escassos. Os estudos disponíveis atualmente avaliam um pequeno número de indivíduos e regiões específicas.

Estudos realizados no estado de Minas Gerais (Belo Horizonte, Alfenas e Viçosa) mostraram que o consumo de suplementos vem aumentando entre frequentadores de academias, passando de 40% em 2010 para 74% em 2013. Mostrou ainda que os homens são os maiores adeptos da suplementação nutricional e que os produtos mais consumidos foram suplementos a base de proteínas, creatina

e aminoácidos (GOSTON e CORREIA., 2010; CARVALHO-SILVA et al., 2012; SILVA e MARINS., 2013).

Embora os dados sobre o consumo de suplementos nutricionais sejam poucos, um problema potencial relacionado é o risco de adulteração, é garantir que os rótulos apresentam informações fidedignas a respeito da composição do produto.

Os suplementos podem ser adulterados involuntariamente devido à contaminação cruzada, ou intencionalmente com ativos farmacêuticos para garantir ou melhorar os resultados do produto. As substâncias relatadas como as mais utilizadas em adulteração de suplementos nutricionais com indicação para perda de peso, estimulo das capacidades intelectuais, aumento do desempenho físico e/ou estímulo sexual são estimulantes, anoréxicos, esteroides e inibidores das fosfodiesterase-5 (NEVES e CALDAS, 2015).

Dessa maneira, a adulteração de produtos voltados para a suplementação alimentar vem sendo reconhecida como um problema de saúde pública em todo o mundo (DE CARVALHO et al., 2012; MOREIRA et al., 2013; KIM et al., 2014; STRANO-ROSSI et al., 2015; VIANA et al., 2016; NEVES e CALDAS., 2017 a,b).

Kim et al. (2014) analisaram 188 produtos comercializados na Coreia do Sul entre 2009 e 2012; em 33% das amostras avaliadas foi observada a adulteração da formulação com sibutramina, fluoxetina, efedrina e/ou pseudoefedrina. Na Holanda, Noortje et al. (2014) encontraram sibutramina e seus derivados (i.e., desmetil-sibutramina, didesmetil-sibutramina), fenolftaleína e sildenafila em 42% das amostras investigadas (n=50). Esses mesmos adulterantes (sibutramina e seus derivados e fenolftaleína) e furosemida foram encontrados em 27% das 447 formulações analisadas por Zeng et al. (2016), na Singapura. Em todos os estudos citados, a sibutramina foi a substância que apresentou maior frequência de detecção.

No Brasil, a disponibilidade de dados sobre a adulteração de suplementos nutricionais é escassa. Entretanto, os dados disponíveis vêm mostrando que a adulteração de suplementos nutricionais também é uma prática no país, inclusive em produtos à base de ervas e fitoterápicos. De acordo com o estudo conduzido por pesquisadores da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) em suplementos a base de ervas coletados em nove estados brasileiros, em aproximadamente 4% (n=106) foi detectada a presença de femproporex ou sibutramina (DE CARVALHO et al., 2012). A investigação de diuréticos e laxativos em 26 suplementos fitoterápicos comercializados em diferentes regiões do Brasil mostrou que mais de 10% (n=3)

continham a hidroclorotiazida, substância que tem baixa incidência de efeitos colaterais, mas está associada a várias complicações metabólicas quando administrada em altas doses (MOREIRA et al., 2013). Pesquisas recentes realizadas na UFSM e USP (Universidade de São Paulo) vêm avaliando a composição de suplementos nutricionais indicados para perda de peso, redução do apetite, queima de gordura e aceleração do metabolismo. Viana et al. (2016) encontraram estimulantes (cafeína, sinefrina, hordenina, octopamina, tiramina, efedrina e salicina) em 52% das amostras analisadas (n=46), enquanto Santos et al. (2016) não detectaram anfetaminas e seus derivados nas 7 amostras avaliadas.

2.2. Estimulantes e/ou anorexígenos como adulterantes em suplementos nutricionais

O consumo de substâncias estimulantes como forma de aumentar a atenção e o desempenho teve início durante a Segunda Guerra Mundial, quando soldados e trabalhadores envolvidos na guerra passaram a consumi-las com o propósito de manter o estado de alerta. Recentemente, o uso dessas substâncias alcançou a área esportiva como recurso ergogênico, utilizado com o objetivo de melhorar o desempenho esportivo e a recuperação após o exercício (KARCH, 1997).

A classe dos estimulantes foi uma das primeiras classes de adulterantes de suplementos a ser proibida pelas federações esportivas internacionais. A introdução de procedimentos de teste de drogas para anfetaminas e outras aminas simpaticomiméticas proporcionaram uma redução no consumo indiscriminado de estimulantes, porém não o eliminou completamente (KARCH, 1997). Segundo a WADA, os atletas podem ter estimulantes em seu corpo por um dos motivos principais: consumo inadvertido por produto adulterado, consumo deliberado como prática recreativa e consumo para melhorar o desempenho (WADA, 2015).

Resultados positivos em exame *antidoping* também têm sido associados ao consumo de suplementos nutricionais adulterados (CHANG et al., 2017; SOLHEIM et al., 2017). Além dos danos morais que um exame de *doping* positivo pode proporcionar aos atletas, o consumo de substâncias estimulantes de maneira indevida e inconsciente pode trazer graves problemas à saúde dos consumidores.

Atualmente, substâncias estimulantes do sistema nervoso central como cafeína, efedrina, pseudoefedrina e 4-metilhexan-2-amina (DMAA) e anorexígenos

utilizados com a finalidade de inibir o apetite como femproporex, anfepramona, sibutramina, fenilpropanolamina, fenfluramina e fentermina, têm sido comumente adicionadas aos suplementos nutricionais. A seguir um breve resumo de cada uma das substâncias e suas estruturas químicas conforme apresentado nas **Figuras 1** até **10**.

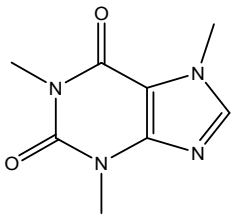
2.2.1. Cafeína

A cafeína é uma metilxantina estimulante do sistema nervoso central (SNC) que aumenta a sensibilidade do centro respiratório medular ao dióxido de carbono e melhora a contração do músculo esquelético (contratilidade diafragmática) (LEIKIN, 2007). Têm ação antagonista dos receptores de adenosina, aumenta os níveis de 3-5-AMP (adenosina 3',5'-monofosfato cíclico) por meio da inibição da fosfodiesterase (LEIKIN, 2007). No organismo, é rapidamente absorvida após a administração oral, apresentando biodisponibilidade de aproximadamente 100% e é amplamente distribuída, atravessando a placenta, entrando no SNC e a saliva e é biotransformada por meio de reações de N-desmetilação, acetilação e oxidação de derivados de ácido úrico. Aproximadamente 85% de uma dose é excretada na urina em 48 horas (MOFFAT et al, 2011).

Diferentes reações adversas envolvendo o SNC, cardiovascular, gastroinstestinal e ocular estão associadas ao consumo de cafeína. Dentre os principais sinais e sintomas encontra-se: insônia, agitação, palpitações, arritmia, gastrite e miose (LEIKIN, 2007). Casos toxicológicos têm sido conhecidos, como foi o acontecimento de overdose fatal em um homem de 39 anos de idade nos Estados Unidos, resultante da ingestão intencional de aproximadamente 12g de cafeína (JABBAR e HANLY., 2013).

De acordo com a ANVISA, no artigo 11 da resolução - RDC N° 18/2010 que dispõe sobre alimentos para atletas, os suplementos de cafeína devem atender ao seguinte requisito: o produto deve fornecer entre 210 e 420 mg de cafeína na porção (ANVISA, 2010a). A WADA incluiu a cafeína no programa de monitoramento para detectar padrões de uso indevido no esporte (WADA, 2015).

Figura 1. Estrutura química da cafeína



Propriedades físico-químicas da cafeína: Cristais brancos e sedosos, ou pó cristalino branco. Quando cristalizado a partir da água, a cafeína contém 1 molécula de água de cristalização, mas é anidra quando cristalizado a partir de etanol, clorofórmio ou éter. É decomposta por soluções fortes de álcalis cáusticos. Livremente solúvel em pirrole, em tetrahidrofurano contendo aprox. 4% de água, solúvel em acetato de etilo, solúvel 1 em 46 de água, 1 em 5,5 de água a 80°, 1 em 1,5 de água fervente, 1 em 66 de álcool, 1 em 22 de álcool a 60°, 1 em 50 de acetona, 1 em 5,5 de clorofórmio, 1 em 530 de éter, 1 em 100 de benzeno, ligeiramente solúvel em éter de petróleo. pKa 10,4 (40°C), 14,0 (25°C). Log P (octanol/água), -0,07 (MOFFAT et al, 2011).

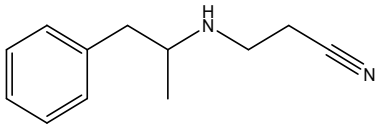
2.2.2. Femproporex

O femproporex é um agente simpaticomimético que se liga aos receptores adrenérgicos e mimetiza os efeitos das catecolaminas noradrenalina e adrenalina (SWEETMAN, 2009). Após ingestão oral é biotransformado levando a produção de anfetamina. Sua eliminação ocorre por via renal (LEIKIN, 2007).

Reações adversas no sistema nervoso central, cardiovascular e gastrointestinal têm sido associadas ao consumo de femproporex, tais como, ansiedade, dor de cabeça, distúrbios do sono, palpitações, taquicardia e xerostomia (LEIKIN, 2007).

De acordo com Anvisa, a resolução - RDC Nº 87/2016 que dispõe sobre a atualização do Anexo I (Listas de Substâncias Entorpecentes, Psicotrópicas, Precursoras e Outras sob Controle Especial) da Portaria SVS/MS Nº 344, de 12 de maio de 1998. Femproporex está incluída na Lista - B2 (Lista das substâncias psicotrópicas anorexígenas) (ANVISA, 2016). A Agência Mundial Antidopagem inclui femproporex na lista de substâncias proibidas (WADA, 2015).

Figura 2. Estrutura química do femproporex



Propriedades físico-químicas do femproporex: Log P (octanol/água), 1.7 (MOFFAT et al, 2011).

2.2.3. Anfepramona (Dietilpropiona)

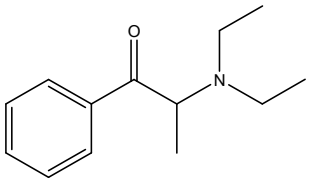
A redução do apetite parece ser secundária aos efeitos do SNC, especificamente à estimulação do hipotálamo para liberar catecolaminas (LEIKIN, 2007).

A anfepramona tem efeitos neurais semelhantes às anfetaminas, melhora a liberação de norepinefrina e dopamina, e inibe a recaptação desses neurotransmissores (DA SILVA e CORDELLINI, 2003; SAMANIN e GARATTINI, 1993). As propriedades anoréxicas da anfepramona parecem estar relacionadas à dopamina e norepinefrina (SAMANIN e GARATTINI, 1993).

A perda de peso pode estar associada ao aumento da atividade física e aos efeitos metabólicos (inibição da lipogênese e aumento da lipólise) (LEIKIN, 2007). No organismo, a anfepramona é facilmente absorvida após administração oral. É metabolizada por N-desalquilação, redução, desaminação e N-hidroxilação principalmente para metabólitos ativos. Cerca de 80 a 90% de uma dose é excretada na urina (MOFFAT et al, 2011). Diferentes reações adversas envolvendo o sistema cardiovascular, SNC, gastrointestinal, ocular e renal estão associadas ao consumo de anfepramona. Dentre os principais sinais e sintomas encontra-se: hipertensão, taquicardia, arritmias, euforia, insônia, psicose, alucinações auditivas, paranoia, náuseas, vômitos, cãibras abdominais, gosto metálico, visão turva, midríase, poliúria (LEIKIN, 2007).

De acordo com ANVISA, a resolução - RDC Nº 87/2016, inclui anfepramona na Lista - B2 (Lista das substâncias psicotrópicas anorexígenas) (ANVISA, 2016). A Agência Mundial Antidopagem inclui anfepramona na lista de substâncias proibidas (WADA, 2015).

Figura 3. Estrutura química da anfepramona



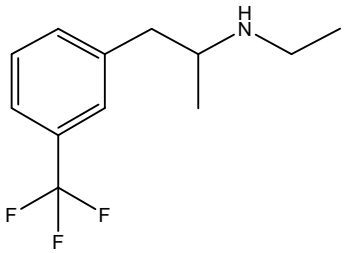
Propriedades físico-químicas da anfepramona: Pó branco, fino e cristalino. Solúvel 1 em 0,5 de água, 1 em 3 de etanol e 1 em 3 de clorofórmio. Praticamente insolúvel em éter. Log P (octanol/água), 3.04 (MOFFAT et al, 2011).

2.2.4. Fenfluramina

Em nível molecular, a fenfluramina aumenta o conteúdo de receptores 5-HT, estimulando a liberação sináptica de serotonina e bloqueando sua reabsorção em terminais pré-sinápticos, atuando como depressor do apetite (XU et al, 2010). No organismo, após administração oral, a fenfluramina é absorvida facilmente e acumulada nos tecidos. A taxa de eliminação é influenciada pelo pH e fluxo urinário. Até 5% de uma dose é eliminada nas fezes como fenfluramina e norfenfluramina (MOFFAT et al, 2011). Reações adversas como grave toxicidade cardiovascular e hipertensão pulmonar estão associadas ao consumo de fenfluramina (SWEETMAN, 2009).

De acordo com Anvisa, a resolução - RDC Nº 87/2016, inclui fenfluramina na Lista - F4 (Outras substâncias), considerada substância precursora da fenilpropanolamina (ANVISA, 2016). A Agência Mundial Antidopagem inclui fenfluramina na lista de substâncias proibidas (WADA, 2015).

Figura 4. Estrutura química da fenfluramina



Propriedades físico-químicas da fenfluramina: Praticamente insolúvel em água, solúvel em clorofórmio. pKa 9.1 (25°C). Log P (octanol/água), 3.4 (MOFFAT et al, 2011).

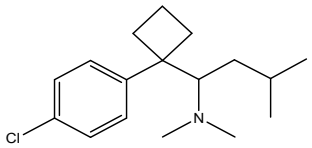
2.2.5. Sibutramina

A sibutramina age inibindo seletivamente a recaptação pré-sináptica de neurotransmissores monoaminérgicos do SNC como serotonina, noradrenalina e em menor medida dopamina, reforçando as ações de supressão do apetite (SWEETMAN, 2009). No organismo, a sibutramina é bem absorvida pelo trato gastrointestinal e sofre extenso metabolismo hepático de primeira passagem, mediado principalmente pela isoenzima CYP3A4 do citocromo P450. A ligação proteica é de 97%, sua eliminação é principalmente na urina e em parte através das fezes (SWEETMAN, 2009).

Reações adversas no sistema cardiovascular, SNC e ocular têm sido associadas ao consumo de sibutramina, tais como, aumento clinicamente significativo da frequência cardíaca e pressão arterial, dor de cabeça, insônia e midríase (SWEETMAN, 2009). A alta frequência de consumo de sibutramina e os efeitos não desejados, têm sido motivo de pesquisa. No Canadá foi realizado um estudo para determinação de sibutramina em suplementos nutricionais, baseado nas múltiplas alertas regulamentarias associado com riscos à saúde (ABE et al., 2015).

De acordo com Anvisa, a resolução – RDC Nº 87/2016, inclui sibutramina na Lista - B2 (Lista das substâncias psicotrópicas anorexígenas) (ANVISA, 2016). A Agência Mundial Antidopagem inclui sibutramina na lista de substâncias proibidas (WADA, 2015).

Figura 5. Estrutura química da sibutramina



Propriedades físico-químicas da sibutramina: Solúvel em água (2,9 mg/mL em pH 5.2). Log P (octanol/água), 5.2 (PUBCHEM, NIH).

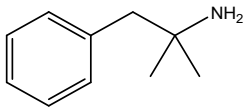
2.2.6. Fentermina

A fentermina estimula o hipotálamo diminuindo o apetite (LEIKIN, 2007). A anorexia induzida pela fentermina, parece ser o resultado da sua capacidade de aumentar a liberação de noradrenalina e/ou dopamina dos terminais nervosos e inibir a sua recaptação (SAMANIN e GARATTINI, 1993).

No organismo, é facilmente absorvida após administração oral. Cerca de 70 a 80% da dose é excretada na urina (MOFFAT et al, 2011). Diferentes reações adversas no sistema cardiovascular, SNC, gastrointestinal, hematológico, neuromuscular e esquelético, ocular e renal estão associadas ao consumo de fentermina, tais como, hipertensão, taquicardia, euforia, insônia, confusão, depressão do SNC, paranoia, cólicas abdominais, discrasias sanguíneas, tremores, mialgia, visão turva, midríase e poliúria (LEIKIN, 2007).

De acordo com Anvisa, a resolução - RDC Nº 87/2016, inclui fentermina na Lista - B2 (Lista das substâncias psicotrópicas anorexígenas) (ANVISA, 2016). A Agência Mundial Antidopagem inclui fentermina na lista de substâncias proibidas (WADA, 2015).

Figura 6. Estrutura química da fentermina



Propriedades físico-químicas da fentermina: Líquido oleoso incolor. Ligeiramente solúvel em água, solúvel em etanol, clorofórmio e éter. pKa 10.1. Log P (octanol/água), 1,9 (MOFFAT et al, 2011).

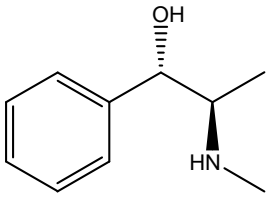
2.2.7. Efedrina

Ativação não seletiva de receptores adrenérgicos β1 é o mecanismo de ação da efedrina (KLAASSEN, 2011). No organismo, é rapidamente absorvida após administração oral. É metabolizada por N-desmetilação para norefedrina (fenilpropanolamina) e por desaminação oxidativa seguida de conjugação. É acumulada no fígado, pulmões, rins, baço e cérebro. Aproximadamente 90% de uma

dose é excretada na urina (MOFFAT et al, 2011). Diferentes reações adversas envolvendo o sistema cardiovascular, SNC, gastrointestinal e neuromusculares estão associadas ao consumo de efedrina, tais como, taquicardia, hipertensão, cardiomiopatia, cardiomegalia, efeitos estimulantes do SNC, ansiedade, psicose, paranoia, excitação, insônia, alucinações auditivas e visuais, hiperatividade, anorexia, tremores e fraqueza (LEIKIN, 2007). Têm sido conhecidos casos toxicológicos associados ao consumo de efedrina. Na Inglaterra, um homem de 36 anos que consumiu suplemento contendo efedrina, apresentou pontuação reduzida de escala de coma de Glasgow, taquicardia, agitação, hipoxemia e sudorese profusa durante a execução de uma meia maratona (RHIDIAN, 2011).

De acordo com Anvisa, a resolução – RDC Nº 87/2016, inclui efedrina na Lista - D1 (Lista de substâncias precursoras de entorpecentes e/ou psicotrópicas) (ANVISA, 2016). A Agência Mundial Antidopagem inclui efedrina na lista de substâncias proibidas (WADA, 2015).

Figura 7. Estrutura química da efedrina



Propriedades físico-químicas da efedrina: Alcaloide obtido de espécies de *Ephedra spp*, ou preparado sinteticamente. Cristais incolores, pó cristalino branco ou grânulos que são descompostos na exposição à luz. Solúvel 1 em 20 de água e 1 em <1 de etanol, solúvel em clorofórmio com turbidez devido à separação de água, solúvel em éter (MOFFAT et al, 2011).

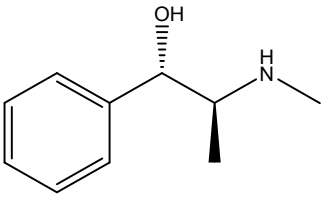
2.2.8. Pseudoefedrina

A pseudoefedrina estimula diretamente os receptores α-adrenérgicos da mucosa respiratória causando vasoconstrição e os receptores β-adrenérgicos que causam relaxamento brônquico, aumentando a frequência cardíaca e contratilidade (LEIKIN, 2007). No organismo, a pseudoefedrina é rápida e completamente absorvida

após administração oral. Dependendo do pH, aproximadamente 90% da dose é excretada na urina (MOFFAT et al, 2011). Reações adversas envolvendo o sistema cardiovascular, SNC, gastrintestinal e neuromuscular têm sido associadas ao consumo de pseudoefedrina. Os principais sinais e sintomas são: taquicardia, arritmias cardíacas, miocárdica, angina, excitação, tonturas, insônia, cefaleia, sonolência, psicose, paranoia, convulsões, náusea, vômito, colite isquêmica e tremores (LEIKIN, 2007).

De acordo com Anvisa, a resolução RDC Nº 87/2016, inclui pseudoefedrina na Lista - D1 (Lista de substâncias precursoras de entorpecentes e/ou psicotrópicas) (ANVISA, 2016). A Agência Mundial Antidopagem inclui pseudoefedrina na lista de substâncias proibidas (WADA, 2015).

Figura 8. Estrutura química da pseudoefedrina



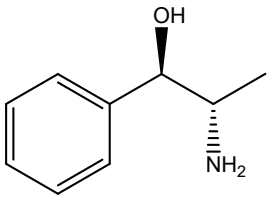
Propriedades físico-químicas da pseudoefedrina: Alcalóide obtido de *Ephedra spp*. É um estereoisómero de efedrina. Fracamente solúvel em agua, livremente solúvel em etanol e éter. pKa 9.8. Log P (octanol/água), 0,9 (MOFFAT et al, 2011).

2.2.9. Fenilpropanolamina

A fenilpropanolamina libera epinefrina dos tecidos e assim produz uma estimulação α e β adrenérgica, causando vasoconstrição e branqueamento da mucosa nasal. No entanto, atua como depressor do apetite (LEIKIN, 2007). No organismo, é absorvida após administração oral. Mais de 90% de uma dose é excretada na urina. A fenilpropanolamina é produto de biotransformação da anfetamina, dietilpropiona e efedrina (MOFFAT et al, 2011). Várias reações adversas no sistema cardiovascular, SNC, urinário e ocular têm sido associadas ao consumo de fenilpropanolamina, tais como, palpitações, bradicardia reflexa, arritmias cardíacas, dor torácica, hipertensão, angina, ansiedade, psicose, cefaleia, insônia, paranoia, incontinência urinária e midríase (LEIKIN, 2007).

De acordo com Anvisa, a resolução - RDC Nº 87/2016, inclui fenilpropanolamina na Lista - F3 (Lista de substâncias precursoras) (ANVISA, 2016). A Agência Mundial Antidopagem inclui fenilpropanolamina no programa de monitoramento para detectar padrões de uso indevido no esporte (WADA, 2015).

Figura 9. Estrutura química da fenilpropanolamina



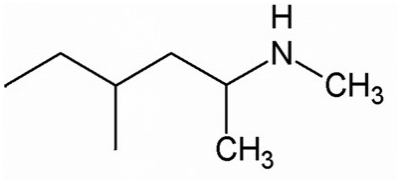
Propriedades físico-químicas da fenilpropanolamina: pKa 9.4 (20°C). Log P (octanol/água), 0.7 (MOFFAT et al, 2011).

2.2.10. 4-Metil-hexan-2-amina (DMAA)

A DMAA é uma amina simpaticomimética indireta com efeito estimulante (KARNATOVSKAIA et al., 2015). Diversas reações adversas têm sido associadas ao consumo de DMAA, tais como, hipertensão, falta de ar, convulsões, derrames, hemorragia cerebral, distúrbios psiquiátricos, ataques cardíacos, cardiomiopatia, arritmias e morte (KARNATOVSKAIA et al., 2015). Casos toxicológicos que envolvem óbito têm sido conhecidos, como por exemplo, a corredora Claire Squires, morreu durante maratona em Londres após consumo de suplemento contendo DMAA. A pesar de ser banido para venda no Reino Unido, o suplemento conhecido como Jack 3D continuou disponível legalmente através de sites no exterior (ARCHER et al., 2014). Nos Estados Unidos foi conhecido outro caso de um jovem de 21 anos que tomou um suplemento proteico contendo DMAA e sofreu uma parada cardíaca (KARNATOVSKAIA et al., 2015).

De acordo com Anvisa, a resolução - RDC Nº 87/2016, inclui DMAA na Lista - F2 (Lista de substâncias psicotrópicas) (ANVISA, 2016). A Agência Mundial Antidopagem inclui DMAA na lista de substâncias proibidas (WADA, 2015).

Figura 10. Estrutura química da 4-metil-hexan-2-amina (DMAA)



Propriedades físico-químicas da DMAA: Líquido com odor de amina. Ligeiramente solúvel em água, muito solúvel em etanol, éter, clorofórmio e ácido diluído. log Kow = 2.16 (PUBCHEM, NIH).

2.3. Determinação de estimulantes e/ou anorexígenos em suplementos nutricionais

2.3.1. Técnicas analíticas

Estudos que abordam o desenvolvimento de métodos analíticos para a determinação de adulterantes em amostras de suplementos nutricionais citam o uso de técnicas menos comuns como cromatografia em camada delgada (TLC), técnica que foi desenvolvida para a determinação e quantificação rápida de cloridrato de sibutramina (Phattanawasin et al., 2012). A eletroforese capilar acoplada a espectrometria de massas sequencial (CE-MS/MS), definida como uma técnica de separação baseada na diferença de migração de compostos iônicos ou ionizáveis na presença de um campo elétrico, foi aplicada na determinação de anfetamina e seus derivados em suplementos nutricionais (SANTOS et al., 2016).

Trabalhos recentes relatam o emprego de cromatografia líquida como uma das técnicas mais utilizadas para determinação de estimulantes, anorexígenos e inibidores das fosfodiesterase-5 (IPDE-5). Para o desenvolvimento destas pesquisas foram utilizados vários detectores, tais como, detector de arranjo de diodos (HPLC-DAD), espectrometria de massas (LC-MS) e espectrometria de massas sequencial (LC-MS/MS) (VIANA et al., 2016; STRANO-ROSSI et al., 2015; CHOI et al., 2015; ZENG et al., 2016. A cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial (UHPLC-MS/MS) também foi utilizada na análise de estimulantes, anorexígenos, ansiolíticos, antidepressivos e laxativos (PAÍGA et al., 2017).

A cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS), foi utilizada na determinação da cafeína e identificação de substâncias não declaradas em suplementos nutricionais como fenolftaleína, anfepramona e femproporex (NEVES e CALDAS., 2017 a) e na detecção de efedrina e cafeína em suplemento nutricional a base de ervas (UEKUSA et al., 2009).

A cromatografia gasosa com detector de nitrogênio-fósforo (GC-NPD) é uma técnica utilizada para analisar substâncias que contem nitrogênio ou fósforo nas suas estruturas químicas. Esta técnica têm sido utilizada principalmente em análises ambientais e agroalimentares. Não há antecedentes do uso desta em análises de adulterantes em suplementos nutricionais, porém estudos demonstram a identificação e detecção de estimulantes em outro tipo de matrizes (LAPACHINSKE et al., 2015; RODRIGUES et al., 2005).

2.3.2. Técnicas de preparo de amostra

Metanol ou misturas de metanol/água têm sido predominantemente utilizados como solventes para solubilização/extração de analitos em determinações de adulterantes em suplementos nutricionais (LEE et al., 2013; VAYSSE et al., 2012; MOREIRA et al., 2013).

Esta técnica de preparo de amostra é simples, no entanto requer um grande volume de solvente. Viana et al. (2016) e Moreira et al. (2013) relataram o uso de 25 mL de metanol, como método de preparo de amostras na determinação de estimulantes em suplementos nutricionais.

OBJETIVOS

3. OBJETIVO

O objetivo deste estudo é o desenvolvimento de método analítico empregando cromatografia gasosa com detector de nitrogênio fósforo (GC-NPD) para determinação das substâncias estimulantes e/ou anorexígenos 4-metil-hexan-2-amina, cafeína, anfepramona, femproporex, fenfluramina, fentermina, sibutramina, efedrina, pseudoefedrina e fenilpropanolamina em amostras de suplementos e aplicar o método de preparo de amostra desenvolvido em amostras de suplementos nutricionais adquiridos no estado de São Paulo.

MATERIAL E MÉTODOS

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Material

4.1.1. Equipamentos e acessórios

- Equipamento de cromatografia em fase gasosa modelo 6890, equipado com detector de nitrogênio-fósforo e injetor automático 7683, Agilent Technologies (Califórnia, EUA) com coluna capilar de sílica fundida HP Ultra-2 (25 m × 0.2 mm × 0.33 µm). Equipamento operado pelo *GC Chemstation*, programa responsável pela integração e processamento dos cromatogramas;

- Equipamento de cromatografia líquida de ultra eficiência (UHPLC) série Nexera X2 Shimadzu (Tóquio, Japão), equipado com duas bombas em modo binário (LC-30AD), um forno para coluna (CTO-30A), um injetor automático (SIL-30AC), controlados por um módulo de comunicação (CBM-20A) e pelo software Labsolutions 5.85 (Shimadzu, Japão). O sistema é integrado a um espectrômetro de massas triplo quadrupolo modelo LC-MS 8060 (Shimadzu, Japão) disponibilizado pela empresa Shimadzu do Brasil;

- Módulo de Aquecimento, DIGI-BLOCK ® Digital Block Heater, Laboratory Devices, INC., USA, BOX 6402, HOLLISTON, MA 01746-6402, USA;

- Vortex-Genie ® 2 modelo G560, Scientific Industries, INC., USA;

- Ultrassom Cristófoli Equipamentos de Biossegurança LTDA;

- Centrifuga 5702, Eppendorf (8 x 15 ml Swing-bucket rotor (A-8-17)).

4.1.2. Reagentes e padrões

- O metanol utilizado como solvente foi obtido da Merck (Darmstadt, Alemanha);

- O agente derivatizante, anidrido trifluoroacético (ATFA) foi adquirido da Sigma - Aldrich (Milwaukee, USA);

- Os padrões de referência analíticos dos estimulantes (cafeína, femproporex, anfepramona, fenfluramina, sibutramina, fentermina, efedrina, fenilpropanolamina, pseudoefedrina, 4-metil-hexan-2-amina e difenilamina (DFA) como padrão interno (PI) foram obtidos da Cerilliant Corporation (Round Rock, Texas, EUA), na forma de solução em metanol na concentração de 1 $mg.mL^{-1}$. O padrão de sinefrina foi obtido da Sigma – Aldrich (Milwaukee, USA). Soluções de trabalho (concentrações) foram preparadas a partir da diluição dos padrões analíticos, utilizando o mesmo solvente de origem (metanol).

4.1.3. Amostras

Cento e vinte cinco amostras de suplementos alimentares dentre eles, 21 aminoácidos, 12 carboidratos, 62 proteínas do leite, 1 proteína da albumina, 3 termogênicos, 12 creatinas, 2 derivados da carne e 12 multivitamínicos foram coletadas de diferentes lojas da cidade de São Paulo entre fevereiro de 2015 e março de 2017. O material coletado foi armazenado a temperatura ambiente no laboratório de Análises Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (USP).

4.2. Métodos

4.2.1. Solubilização/extração com metanol

O método foi baseado na análise qualitativa de adulterantes em suplementos para emagrecimento (DUNN et al., 2012).

Foram pesados 50 mg de suplemento de proteína isento dos analitos de interesse em um tubo de centrifuga e posteriormente foram adicionados 500 µL de metanol. A essa solução acrescentou-se 50 µL de solução de padrões incluindo PI em uma concentração de 1 $\mu g.\mu L^{-1}$. A solução foi agitada em *vortex* por 1 minuto, mantida em banho de ultrassom por 30 minutos e, em seguida, centrifugada a 1756 G por 5

minutos (3500 rpm). Uma alíquota de 50 µL de sobrenadante foi transferida para um *insert* e posteriormente, foi injetado 1µL da solução final no equipamento GC-NPD.

4.2.2. Preparação de amostra para separação dos isômeros efedrina e pseudoefedrina

Os ensaios para separação da efedrina e pseudoefedrina utilizando procedimento de derivatização foram realizados com base no método de Rodrigues et al. (2005). Uma alíquota de 500 mg de amostra de suplemento foi pesada em um tubo de centrifuga e posteriormente foram adicionados 5mL de metanol. A solução foi agitada em *vortex* durante 1 minuto, ao banho de ultrassom durante 30 minutos e à centrifugação a 1756 G durante 5 minutos (3500 rpm). Uma alíquota de 20µL foi transferida para um tubo de derivação e adicionaram-se 10 µL de difenilamina (PI) na concentração 0,5 $\mu g.\mu L^{-1}$ e 70µL de metanol, obtendo um volume final de 100µL. O solvente foi evaporado sob fluxo de nitrogênio à temperatura ambiente e o resíduo resultante foi submetido à reação de derivação adicionando-se 50 µL de anidrido trifluoroacético (ATFA) e 50 µL de acetato de etila, a 70ºC por 15 minutos. Após a derivação, o excesso de reagente foi evaporado sob fluxo de nitrogênio e o extrato obtido foi redissolvido em 50 µL de acetato de etila. Após uma hora de repouso, 1 µL foi injetado no GC-NPD.

4.2.3. Condições cromatográficas

As seguintes condições cromatográficas foram aplicadas para a separação das substâncias de interesse. O volume de injeção foi 1 µL realizado em modo *splitless*. Para a corrida cromatográfica foi utilizado nitrogênio ultrapuro como gás de arraste, a uma vazão constante de 0,6 mL/min; a temperatura do injetor foi mantida a 270ºC e a temperatura do detector a 280ºC. Para a separação cromatográfica dos analitos, utilizou-se uma programação de eluição, na qual se variou a temperatura do forno: 120°C (3 min), 10°C/min até 180°C (10 min), 40°C/min até 280°C (2 min). Tempo total de corrida: 23,50 minutos.

4.2.4. Otimização do método

4.2.4.1. Otimização de parâmetros gerais

Foi realizado um estudo de otimização do método de preparo de amostra. Uma alíquota de 500 mg de amostra de suplemento foi pesada em um tubo de centrífuga, posteriormente foram adicionados 5mL de metanol e foram avaliados os seguintes parâmetros:

- Uso de agitador automático (sem agitação ou utilizando 1 minuto de agitação);
- Banho de ultrassom (8, 15 e 32 minutos);
- Centrifugação (1290 G durante 5 minutos (3000 rpm) e 2294 G durante 10 minutos (4000 rpm)).

Uma alíquota de 10µL do sobrenadante da solução resultante foi transferida para um *insert*, e adicionou-se 10µL de difenilamina (PI) na concentração 0,5 $\mu g.\mu L^{-1}$ e 80µL de metanol, obtendo um volume final de 100µL. Posteriormente foi injetado 1µL da solução final no equipamento GC-NPD.

4.2.4.2. Definição da quantidade representativa de suplemento e solvente

Foram realizados ensaios para determinar a quantidade de suplemento e o melhor solvente a ser utilizado. Empregou-se uma amostra de suplemento positiva para cafeína e sibutramina de acordo com análise prévia. Foi comparada a resposta analítica avaliando diferentes quantidades da amostra e solvente.

Foram pesados em tubo *falcon* 50, 500 e 1000 mg da amostra, as quais foram dissolvidas em 500 µL, 5 mL e 10 mL de metanol, respectivamente. A essas soluções acrescentaram-se 25 µL de DFA (PI) a 1 $\mu g.\mu L^{-1}$. As soluções foram agitadas em vortex durante 1 minuto, mantidas em banho de ultrassom por 6 minutos e, em seguida, centrifugadas a 1756 G por 5 minutos (3500 rpm). 50 µL do sobrenadante foram transferidos para um *insert* e posteriormente, foi injetado 1 µL das soluções finais no equipamento GC-NPD. Essas análises foram repetidas seis vezes para cada

quantidade da amostra de suplemento e avaliou-se o coeficiente de variação (CV%) obtido para cada massa de suplemento avaliada.

Após definição da quantidade de suplemento a ser utilizada foram avaliados metanol e etanol como solventes de extração. Foi comparada a resposta analítica avaliando os dois solventes. Foram pesados em tubo *falcon* 500 mg de amostra e foram dissolvidas em 5 mL de metanol e etanol. A essas soluções acrescentaram-se 25 µL de DFA (PI) a 1 $\mu g.\mu L^{-1}$. As soluções foram agitadas em *vortex* durante 1 minuto, mantidas em banho de ultrassom por 6 minutos e, em seguida, centrifugadas a 1756 G por 5 minutos (3500 rpm). 50 µL do sobrenadante foram transferidos para um *insert* e posteriormente, foram injetados 1 µL das soluções finais no equipamento GC-NPD. Essas análises foram repetidas seis vezes para cada quantidade da amostra de suplemento e avaliou-se o coeficiente de variação (CV%) obtido para cada massa de suplemento avaliada.

4.2.4.3. Incorporação das substâncias ativas no suplemento

Para verificar a solubilidade das substâncias de interesse durante o procedimento de extração, foi realizada a avaliação da incorporação das substâncias estimulantes/anorexígenos no suplemento nutricional. Para este teste foi utilizado um suplemento de proteína isento dos analitos de interesse ao qual foram adicionadas quantidades conhecidas das substâncias teste obtendo concentrações finais de 0,4 $\mu g.\mu L^{-1}$, 0,6 $\mu g.\mu L^{-1}$ e 0,8 $\mu g.\mu L^{-1}$ para anfepramona, sibutramina e cafeína respectivamente, 2,4 $\mu g.\mu L^{-1}$ para fenfluramina e fenilpropanolamina, e 2,04 $\mu g.\mu L^{-1}$ para femproporex e sinefrina.

A mistura da amostra com as substâncias foi armazenada em temperatura ambiente no Laboratório de Análises Toxicológicas da USP. As análises foram realizadas em 3 replicatas durante os tempos zero, 24 horas, 4 e 7 dias.

Uma alíquota de 500 mg de amostra de suplemento “fortificado” foi pesada em um tubo *falcon* e posteriormente foram adicionados 5mL de metanol. A solução foi agitada em *vortex* durante 1 minuto, submetida ao banho de ultrassom durante 30 minutos e à centrifugação a 1756 G durante 5 minutos (3500 rpm). Uma alíquota de 10µL foi transferida para um *insert* e adicionaram-se 10µL de difenilamina (PI) e 80µL de metanol, obtendo um volume final de 100µL.

4.2.5. Validação dos métodos analíticos

Após desenvolvimento e otimização, os métodos analíticos foram validados, estabelecendo-se os valores de limite de detecção (LoD), limite de quantificação (LoQ), seletividade, linearidade, precisão intra e interensaio, exatidão, recuperação e *carryover* dos analitos nas amostras de suplementos nutricionais. Os métodos foram validados conforme diretrizes da *Association of Official Analytical Chemists (*AOAC) para desenvolvimento de métodos analíticos em suplementos nutricionais (AOAC, 2013), da FDA para validação de métodos bioanalíticos (FDA, 2001) e guia da *International Conference on Harmonisation* (ICH) para validação de procedimentos analíticos: Texto e metodologia Q2(R1) (ICH, 2005).

Duas validações foram realizadas. Uma para as substâncias DMAA, fentermina, fenfluramina, fenilpropanolamina, femproporex, anfepramona, sibutramina e cafeína e outra utilizando procedimento de derivatização para as substâncias isômeros efedrina e pseudoefedrina.

Para definir os limites de detecção e a faixa de linearidade foi necessário estabelecer o precedente das possíveis quantidades de adulterantes (estimulantes/anorexígenos) que podem ser encontrados nos suplementos nutricionais. Para definir a abordagem de cada substância foi pesquisada a dose diária recomendada (DDR), dose capaz de produzir o efeito teórico desejado. Com base nesse conceito, foram determinadas as porcentagens teóricas de cada analito presentes em uma porção real de suplemento (30 - 32 g) consumida por um usuário. Por exemplo, se um suplemento é adulterado intencionalmente, uma porção de 30 a 32 g deveria ter 400 mg de cafeína (segundo a DDR) para produzir o efeito no organismo. Considerando esses valores, foram calculadas as quantidades de cada analito presentes em uma amostra de 500 mg de suplemento para finalmente calcular a concentração de cada estimulante após a diluição da amostra em 5 mL de metanol, como demostrado na **Tabela 1**.

Tabela 1. Doses diárias recomendadas (DDR), mg teórica de cada analito presente em uma porção real de suplemento (30 g), quantidades (mg) de cada analito presentes em uma amostra de 500 mg e concentração de cada estimulante após diluição da amostra em 5 mL de metanol.

Analitos	DDR (mg)	mg/30g de suplemento	mg analito em 500 mg	Concentração final (µg/µL)
PEF	480	16,0	8,00	1,60
CAF	400	13,3	6,66	1,33
EFE	150	5,0	2,50	0,50
ANF	120	4,0	2,00	0,40
DMAA	75	2,5	1,25	0,25
FEN	60	2,0	1,00	0,20
FNF	60	2,0	1,00	0,20
FNP	60	2,0	1,00	0,20
FEM	50	1,6	0,83	0,17
SIB	15	0,5	0,25	0,05

DMAA - 4-metil-hexan-2-amina, FNT – fentermina, FNF – fenfluramina, FNP – fenilpropanolamina, ANF – anfepramona, FEM – femproporex, CAF – cafeína, SIB – sibutramina, EFE – efedrina, PEF – pseudoefedrina.

4.2.5.1. Limites de detecção (LoD) e quantificação (LoQ)

O limite de detecção (LoD) é a menor quantidade de um analito em uma amostra que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada como um valor exato. Este parâmetro foi determinado pela análise de amostras com concentrações conhecidas de analito, estabelecendo o nível mínimo no qual o analito pode ser detectado de forma confiável. O LoD foi avaliado em sextuplicata e o coeficiente de variação entre as replicatas não deveria ser maior que 20% (ICH 2005).

O limite de quantificação (LoQ) é a menor quantidade de um analito em uma amostra que pode ser determinado quantitativamente com adequada precisão e exatidão. Este parâmetro foi determinado pela análise de amostras com concentrações conhecidas de analito, estabelecendo o nível mínimo no qual o analito poderia ser quantificado com precisão aceitável. O LoQ foi avaliado em sextuplicata e

o coeficiente de variação entre as replicatas não deveria ser maior que 15% (ICH 2005).

4.2.5.2. Seletividade

Seletividade é o grau em que o método pode quantificar o analito alvo na presença de outros analitos, matrizes ou outros materiais potencialmente interferentes. Isso geralmente é alcançado pelo isolamento do analito através da extração seletiva de solvente, separações cromatográficas, entre outros. A técnica de separação mais útil é a cromatografia e o requisito mais importante é a resolução entre o pico desejado e os picos de acompanhamento. A resolução, R_s, é conhecida como a distância de separação absoluta do analito e pico mais próximo, expressada como tempos de retenção (minutos) dos dois picos, t_1 e t_2, e a largura da linha base, W_1 e W_2, também expressos em termos de vezes, como:

$$R_S = 2\,(t_2 - t_1) / (W_1 - W_2)$$

Uma resolução de pelo menos 1,5 geralmente é esperada, mas a separação mínima utilizável foi de 1,0 (AOAC, 2013).

4.2.5.3. Linearidade

A linearidade de um procedimento analítico refere-se à capacidade do método de obter resultados diretamente proporcionais com a concentração da substância pesquisada em uma amostra, enquadrados em uma faixa analítica especificada. A relação matemática entre a resposta medida e a concentração do analito pode ser descrita segundo modelo linear pela equação da reta:

$$y = ax + b$$

Onde:

y = resposta medida (absorbância, área do pico)

x = concentração

a = inclinação da curva de calibração (sensibilidade)

b = intersecção com eixo y, quando x = 0.

Recomenda-se que a linearidade seja determinada pela análise de mínimo 5 concentrações igualmente espaçadas em relação ao intervalo de interesse (FDA, 2001).

Assim, a linearidade foi avaliada em 8 concentrações entre o LoQ e 0,04 $\mu g.\mu L^{-1}$ em sextuplicata para os analitos cafeína, anfepramona, DMAA, fentermina, fenfluramina, fenilpropanolamina, femproporex e sibutramina, e 7 concentrações entre o LoQ e 0,128 $\mu g.\mu L^{-1}$ em triplicata para os analitos efedrina e pseudoefedrina. A faixa de linearidade contempla concentrações abaixo da "dose de efeito", pois a intenção é diferenciar adulteração dolosa de contaminação.

Além disso, realizou-se o estudo da homoscedasticidade, no qual é realizada a comparação do valor de $F_{experimental}$ e $F_{tabelado}$, para posteriormente empregar a regressão dos mínimos quadrados ponderados. Os coeficientes de ponderação (W_i) estudados foram $1/x$, $1/x^2$, $1/x^{1/2}$, $1/y$, $1/y^2$ e $1/y^{1/2}$. A escolha dos W_i foi feita de acordo com a somatória dos erros relativos e o valor do coeficiente de correlação (r^2) o qual deve ser igual ou superior a 0,99.

4.2.5.4. Precisão intra e inter-ensaio

A precisão de um procedimento analítico é normalmente expressa como a variância, o desvio padrão ou o coeficiente de variação de uma série de ensaios independentes, repetidos para uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões em condições definidas. A precisão pode ser considerada em termos de repetibilidade e precisão intermediária (ICH, 2005).

A repetibilidade refere-se ao grau de precisão dos resultados quando as condições são mantidas o mais constante possível com o mesmo analista, reagentes, equipamentos e instrumentos utilizados dentro de um curto período de tempo. A precisão intermediária (precisão inter-dias), define a habilidade do método em fornecer os mesmos resultados quando as análises são conduzidas no mesmo laboratório em diferentes dias, por diferentes analistas e/ou diferentes equipamentos (ICH, 2005).

No estudo de precisão contemplou-se o intervalo linear do método, com um mínimo de 9 determinações, 3 concentrações e 3 repetições de cada uma: baixa,

média e alta (CB, CM e CA respectivamente). O critério de aceitação da precisão foi de 20% para a concentração baixa e de até 15% para as concentrações média e alta. Os cálculos de precisão foram realizados pelo fator único de ANOVA.

4.2.5.5. Exatidão

A exatidão do método analítico descreve a proximidade entre o valor médio obtido de uma série de resultados e o valor de referência aceito como verdadeiro, expresso em porcentagem. Este parâmetro foi avaliado usando um mínimo de 5 determinações por concentração: concentrações baixa, média e alta (CB, CM e CA respectivamente) e 3 repetições de cada uma (FDA, 2001).

Os ensaios de exatidão foram realizados em triplicata, o critério de aceitação foi de 20% para a concentração baixa (80-120%) e de até 15% (85-115%) para as concentrações média e alta. Os cálculos foram realizados pelo fator único de ANOVA.

4.2.5.6. Recuperação

A recuperação é a resposta do método analítico obtido para uma quantidade de substância conhecida, adicionada na matriz e, posteriormente, submetida ao procedimento de extração, em comparação com a resposta do método analítico obtida para a concentração real do padrão autêntico puro. A recuperação do analito não necessariamente deve ser 100%, mas a recuperação de um analito e do padrão interno deve ser precisa e reprodutível. Este parâmetro foi realizado comparando-se os resultados analíticos para amostras extraídas em três concentrações (baixa, média e alta), considerando a faixa de linearidade do método, com padrões não extraídos que representavam 100% de recuperação (FDA, 2001).

4.2.5.7. Carryover

O efeito *carryover* conhecido como a contaminação das amostras após injeção de amostras positivas em alta concentração (AOAC, 2013), foi avaliado pela análise de amostras de suplementos nutricionais negativas subsequente a injeção de uma amostra fortificada com os analitos cafeína, anfepramona, DMAA, fentermina,

fenfluramina, fenilpropanolamina, femproporex e sibutramina na concentração de 0,040 $\mu g.\mu L^{-1}$ e 0,128 $\mu g.\mu L^{-1}$ no caso de efedrina e pseudoefedrina.

4.2.6. Confirmação de amostras positivas

4.2.6.1. Preparação de amostras para confirmação de positivos

As análises confirmatórias foram realizadas utilizando cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a espectrômetro de massas no modo tandem (UHPLC-MS/MS). As amostras positivas para alguma das substâncias pesquisadas após análises em cromatografia gasosa com detector de nitrogênio fósforo (GC-NPD) foram submetidas a confirmação.

Após procedimento de extração (500 mg de amostra de suplemento em 5mL de metanol), foram adicionados 50 µL de extrato em um tubo *eppendorf*, 5 µL de padrão interno (solução de anfetamina-d5 e metanfetamina-d5 na concentração 10 $\mu g.mL^{-1}$) e 945 µL de metanol. A solução foi agitada em *vortex* durante 1 minuto e submetida a centrifugação a 1756 G durante 5 minutos (3500 rpm). Uma alíquota de 100 µL do sobrenadante foi transferido para um *insert* e foram injetados 10 µL no equipamento UHPLC-MS/MS.

4.2.6.2. Condições cromatográficas para confirmação de amostras positivas

Para a confirmação das amostras positivas foram aplicadas as seguintes condições cromatográficas. As análises foram realizadas em modo positivo (ESI+, [M+H]+), utilizando os parâmetros otimizados: *nebulizing gas flow*, 2 L/min; *heating gas flow*, 10 L/min; *drying gas flow*, 10 L/min; *interface temperature*, 300ºC; *heat block temperature*, 400ºC; DL *temperature*, 250ºC; *capillary*, 1 kV. A eluição cromatográfica foi realizada em uma Coluna Raptor bifenil 50 mm x 3 mm, ID, 2.7 µm, (Restek, USA), eluída com um gradiente de tampão acetato de amônio 2 mM com 0,1% de ácido fórmico (Solução A) e acetonitrila (Solução B), a um fluxo de 600 µL/min, 40ºC, nas seguintes condições: 0 – 2 min, 10 – 85 % B; 2 – 2,1 min, 85 – 10 % B; 2,1 – 4 min, 10% B. O tempo total de corrida foi de 5 minutos, as fragmentações utilizadas no MRM são descritas na **Tabela 2**.

Tabela 2. Íons utilizados na confirmação dos estimulantes e seus padrões deuterados por GC-MS

Substância	Modo	Íon Precursor (m/z)	QT (m/z)	QL1 (m/z)	QL2 (m/z)
Metanfetamina	+	155	92	121	93
Metanfetamina d5	+	155	92	121	93
Anfetamina	+	136	91	119	65
Anfetamina d5	+	141	96	124	68
Sibutramina	+	280	125	139	153
Cafeína	+	194	138	42	110
Anfepramona	+	206	105	100	133
Fenilpropanolamina	+	152	134	115	117
Femproporex	+	188	91	119	65
DMAA	+	116	57	41	29
Fenfluramina	+	232	159	109	187
Fentermina	+	150	91	64	133
Pseudoefedrina	+	166	148	115	91
Efedrina	+	166	148	115	117

4.2.7. Amostragem de suplementos

Para estimar o tamanho da amostra, foi utilizada a estimativa amostral de determinação do tamanho da amostra em estudos de saúde pela Organização Mundial da Saúde (OMS) (LEMESHOW, 1991).

$$n_1 = \frac{z^2_{1-\alpha/2}(1-p)}{\varepsilon^2 p}$$ onde:

n_1 = Tamanho da amostra estimada;

α = Nível de confiança;

z = Área da curva z para os diferentes níveis de significância;

p = Proporção esperada do evento;

ε = Precisão relativa.

Como não dispomos de dados sobre a prevalência de suplementos nutricionais adulterados com as classes de substâncias (estimulantes/anorexígenos) em estudo, utilizamos uma estimativa, p, de 50% (porcentagem proposta pela OMS nos casos onde não existe dados de prevalência), com uma precisão relativa, ε, de 10% e nível de confiança, α, de 95%.

O número amostral total, n_1, é de 96 suplementos. Os parâmetros utilizados para o cálculo do tamanho amostral permitem que sejam obtidas estimativas confiáveis a respeito da qualidade dos suplementos alimentares comercializados em São Paulo.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

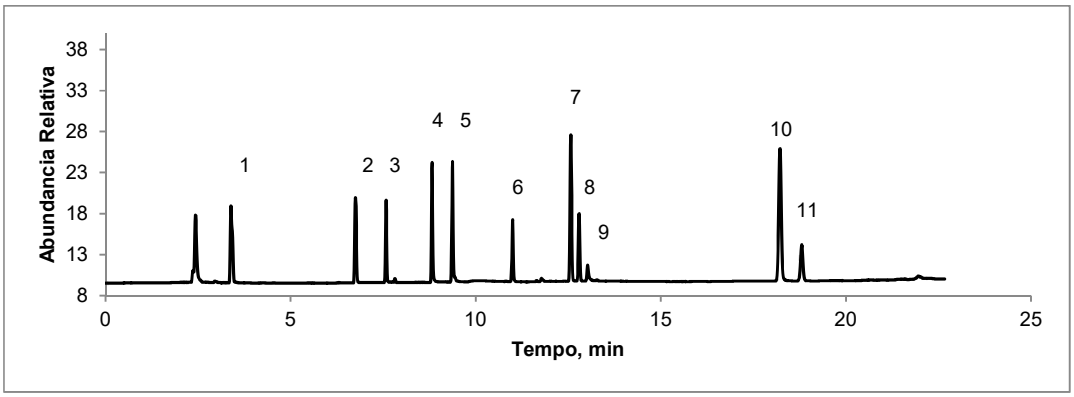
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Separação cromatográfica de estimulantes/anorexígenos

A GC-NPD foi a técnica escolhida para fins práticos, por ser considerada “mais barata” e promissora para a detecção de estimulantes/anorexígenos em suplementos nutricionais, devido ao fato de que os detectores NPD são altamente seletivos e apresentam uma resposta sensível para compostos com nitrogênio e fósforo com limites de detecção em baixas concentrações (WANG et al*.,* 2016). A LC-MS foi a técnica utilizada para realizar as confirmações das amostras com resultado positivo para algumas das substâncias pesquisadas.

Na **Figura 11** é apresentado o perfil cromatográfico (GC-NPD) após injeção direta de 1 µL de uma solução contendo os padrões analíticos de interesse incluindo PI, na concentração de 0,5 $\mu g.\mu L^{-1}$.

Figura 11. Perfil cromatográfico (GC-NPD) das 11 substâncias de interesse na concentração de 0,5 $\mu g.\mu L^{-1}$ preparados em MeOH.

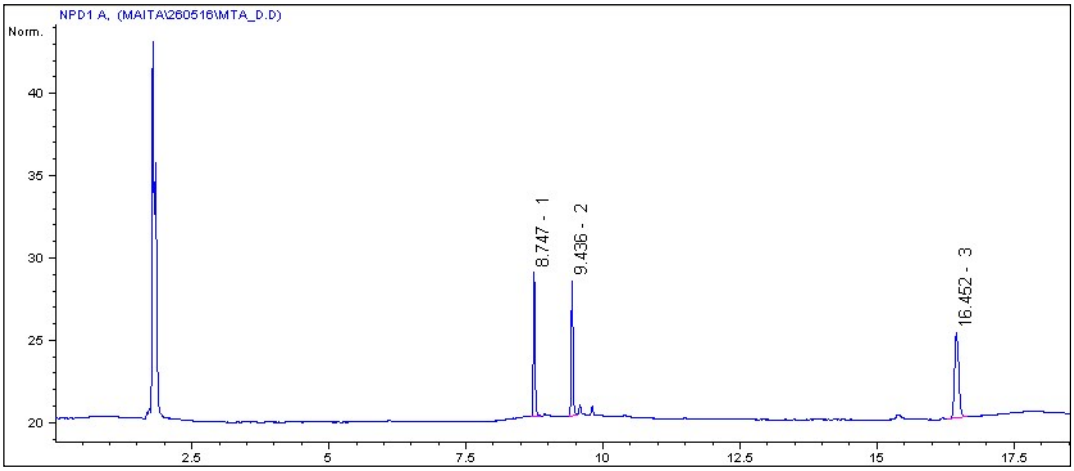


1. DMAA (T.R= 3,388 min), 2. Fentermina (T.R= 6,745 min), 3. Fenfluramina (T.R= 7,573 min), 4. Fenilpropanolamina (T.R= 8,812 min), 5. Efedrina/Pseudoefedrina (T.R= 9,362 min), 6. Anfepramona (T.R= 10,991 min), 7. Femproporex (T.R= 12,567 min), 8. Difenilamina (PI) (T.R= 12,790 min), 9. Sinefrina (T.R= 13,008 min), 10. Cafeína (T.R= 18,211 min), 11. Sibutramina (T.R= 18,805 min).

Observa-se que a separação cromatográfica dos analitos de interesse não apresentou sobreposição de picos, exceto para os isômeros efedrina e pseudoefedrina.

Na **Figura 12** é apresentado o perfil cromatográfico (GC-NPD) dos isómeros efedrina e pseudoefedrina após procedimento de derivatização com anidrido trifluoroacético, utilizando difenilamina como PI, na concentração de 0,5 µg.µL^{-1}.

Figura 12. Separação cromatográfica da efedrina, pseudoefedrina e difenilamina (PI) após a derivação com anidrido trifluoroacético.



1. Efedrina; 2. Pseudoefedrina; 3. Difenilamina (PI).

Embora o método cromatográfico não permita a separação direta dos isômeros efedrina e pseudoefedrina, o procedimento de derivatização, proporciona a separação, permitindo a identificação fidedigna do isômero da efedrina presente na amostra. No caso da detecção de pico cromatográfico referente a essas substâncias, a mesma amostra será analisada novamente após o procedimento de derivatização, para correta identificação e quantificação da substância.

5.2. Métodos de preparação de amostras

Como foi previamente dito neste trabalho, o método de preparação de amostra empregando metanol têm sido predominantemente utilizado para extração/solubilização de analitos em determinações de adulterantes em suplementos nutricionais, porém foram avaliados mais dois métodos de extração como potencial alternativa: Extração Acelerada por Solvente (ASE) seguida de Extração em Fase Sólida (SPE) e QuEChERS. Nenhuma das duas técnicas alternas têm sido aplicadas nas análises toxicológicas de suplementos nutricionais.

5.2.1. Extração ASE seguida da SPE

A ASE têm sido utilizada no preparo de amostras sólidas e semissólidas na área de alimentos e poluentes ambientais (DING et al., 2010); (LI et al., 2012).

Esta técnica de preparo de amostra faz uso de solventes sob condições de alta pressão e temperatura (50-200°C) de forma automatizada. A associação com SPE têm sido frequentemente utilizada, tornando o método mais preciso (MANTOVANI et al., 2014).

A extração ASE seguida da SPE foi considerado um método promissório para fins deste trabalho, principalmente pelo uso de água como solvente de extração, pois pressões e temperaturas elevadas proporcionam alterações nas suas propriedades físico-químicas, especialmente em sua constante dielétrica (ε), aumentando a sua aplicabilidade como um solvente de extração de compostos orgânicos (DAWIDOWICZ et al., 2009). Porém, a avaliação deste método demonstrou que não houve eluição completa das substâncias submetidas à análise, além disso as porcentagens de recuperação obtidas para as substâncias extraídas foram inferiores ao 69%.

Apesar do método de extração ser utilizado em diferentes aplicações, evidenciou-se que não foi efetivo na extração dos estimulantes/anorexígenos propostos para ser determinados em suplementos nutricionais.

5.2.2. QuEChERS (Método modificado)

A QuEChERS é um procedimento considerado simples, rápido, barato e não requer equipamento ou vidraria especial. O procedimento de preparo de amostras consiste na extração de compostos em solvente orgânico, seguida de uma etapa de extração/partição pela adição de um sal (*salting-out*) e, posteriormente, de uma fase de limpeza (*clean-up*), utilizando extração em fase sólida dispersiva (DSPE - *dispersive solid phase extraction*). A técnica pode ser facilmente adaptada para diferentes matrizes e analitos, utilizando o solvente apropriado e os compostos adequados nas etapas de extração/partição e limpeza (PRESTES et al., 2009).

Sendo uma técnica promissora, foi avaliado o seu uso em suplementos nutricionais. Observou-se que o sinal analítico referente à acetonitrila presente no extrato da amostra interfere no sinal analítico da substância DMAA. Contudo, mesmo

com a sobreposição do pico da DMAA pela acetonitrila, as porcentagens de recuperação para as substâncias de interesse estão entre 72 e 109%.

Com a finalidade de minimizar a interferência do sinal da acetonitrila, foi realizada a secagem e ressuspensão do extrato trás extração utilizando QuEChERS. O sinal produzido anteriormente pela acetonitrila foi substituído pelo sinal do metanol o qual não interfere na eluição das substâncias analisadas, porém as porcentagens de recuperação obtidas estão entre 10 e 25%, mostrando que a ressuspensão com metanol não contribuiu para a melhora da eficiência da extração por QuEChERS.

Apesar da extração por QuEChERS ter apresentado recuperação entre 72 e 109% para todos os analitos de interesse, a interferência do pico de acetonitrila sobre o pico da DMAA pode interferir na determinação deste analito no nível de contaminação.

Tendo isso em vista, avaliou-se um terceiro procedimento de extração, empregando dissolução da amostra com metanol, para o propósito deste trabalho.

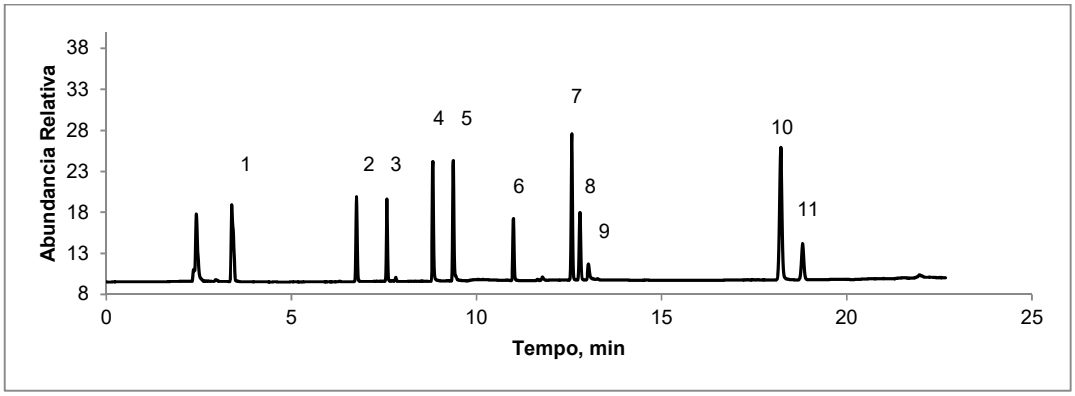
5.2.3. Extração/solubilização com metanol

Como foi supracitado neste trabalho, a extração/solubilização com metanol têm sido predominantemente utilizada para determinações de adulterantes em suplementos nutricionais (LEE et al., 2013; VAYSSE et al., 2012; MOREIRA et al., 2013). Porém, esta abordagem requer um grande volume de solvente. Viana et al. (2016) e Moreira et al. (2013) relataram o uso de 25 mL de metanol, como método de preparo de amostras na determinação de estimulantes em suplementos.

Com base no trabalho desenvolvido por Dunn et al., (2012), foram realizados ensaios para a extração/solubilização de estimulantes/anorexígenos, avaliando a possibilidade de usar quantidades menores de solvente.

A **Figura 13** apresenta o cromatograma obtido a partir da análise de uma amostra de suplemento com a adição dos analitos de interesse na concentração de 0,5 $\mu g.\mu L^{-1}$ (incluindo o PI), após realização do procedimento de extração/solubilização descrito no item **4.2.1.**

Figura 13. Cromatograma de uma amostra de suplemento fortificada com 11 analitos de interesse (estimulantes) na concentração de 0,5 µg.µL^{-1} após extração com metanol.



1. DMAA (T.R= 3,388 min), 2. Fentermina (T.R= 6,745 min), 3. Fenfluramina (T.R= 7,573 min), 4. Fenilpropanolamina (T.R= 8,812 min), 5. Efedrina/Pseudoefedrina (T.R= 9,362 min), 6. Anfepramona (T.R= 10,991 min), 7. Femproporex (T.R= 12,567 min), 8. Difenilamina (PI) (T.R= 12,790 min), 9. Sinefrina (T.R= 13,008 min), 10. Cafeína (T.R= 18,211 min), 11. Sibutramina (T.R= 18,805 min).

Os resultados das porcentagens de recuperação das substâncias após extração/solubilização com metanol quando comparadas com padrões preparados nas mesmas concentrações 0,5 µg.µL^{-1} são apresentados na **Tabela 3**. Para este teste foi utilizado um suplemento de proteína isento dos analitos de interesse ao qual foram adicionadas as substâncias teste (sólidas) e o PI (difenilamina). A análise foi realizada em 6 replicatas.

Tabela 3. Porcentagens de recuperação (%) de cafeína, fenfluramina, femproporex, fenilpropanolamina, anfepramona, sibutramina, efedrina e pseudoefedrina após solubilização com metanol.

Substância	Porcentagens de recuperação (%)
Cafeína	107,3
Fenfluramina	103,4
Femproporex	100,9
Fenilpropanolamina	101,5
Anfepramona	106,6
Sibutramina	106,8
Sinefrina	95,1
Efedrina	95,7
Pseudoefedrina	101,6

Foram avaliadas 9 das 11 substâncias de interesse. As duas substâncias não disponíveis em forma sólida, DMAA e fentermina disponibilizadas em ampola pela Cerilliant, apresentam solubilidade completa em metanol segundo o material de referência certificado.

As substâncias teste foram utilizadas em forma sólida para demonstrar que sua solubilidade é completa, o qual é demonstrado quando a porcentagem de recuperação está próxima de 100%. Com base nos resultados obtidos na recuperação (95 – 107%), este método de preparo de amostra foi selecionado para a preparação e extração dos estimulantes/anorexígenos de interesse em amostras de suplementos.

5.3. Otimização do método de preparo de amostras

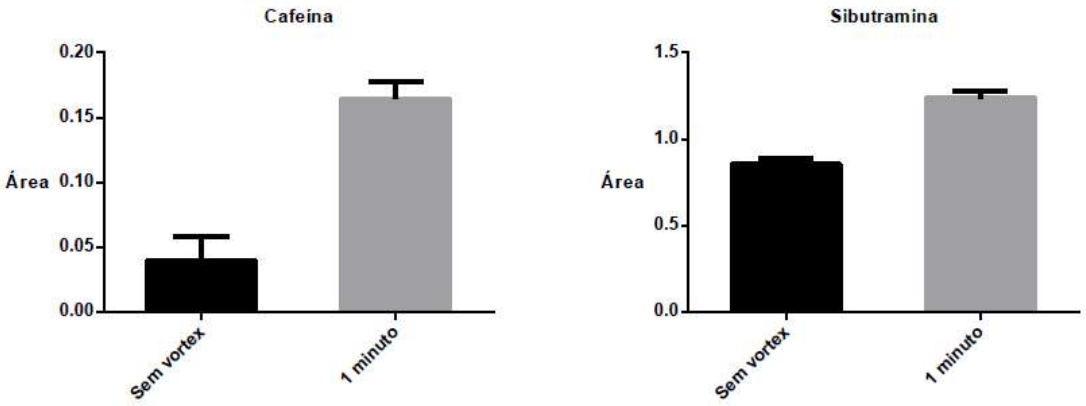
5.3.1. Otimização de parâmetros gerais

Após definição do método de preparo de amostra para extração/solubilização de estimulantes/anorexígenos, foram otimizados os parâmetros gerais, tais como, uso de agitador automático, banho de ultrassom e centrifugação.

5.3.1.1. Estudo de uso de agitador automático

O uso de agitador automático não é uma constante nos procedimentos de extração de adulterantes em suplementos nutricionais. Zeng et al. (2016) e Choi et al. (2015) não incluem esta etapa na preparação de amostras. Entretanto, Paíga et al. (2017) e Santos et al. (2016) fazem uso de agitação durante 1 minuto. Visando garantir a melhor extração foi avaliado seu uso. A **Figura 14** mostra os resultados obtidos a partir do teste de comparação t (ANOVA). As análises foram realizadas em 6 replicatas para cada condição avaliada. Os resultados obtidos para as substâncias cafeína e sibutramina foram avaliados.

Figura 14. Diferença estatística (P < 0,05) quando há uso de agitador automático na extração das substâncias cafeína e sibutramina utilizando o teste t. Os resultados estão expressados como média da área relativa ± desvio padrão.



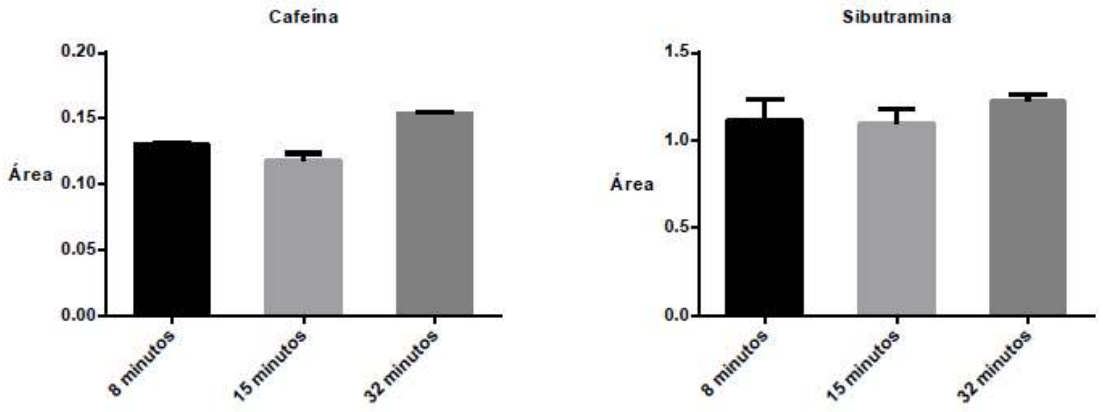
Como indicado na figura acima, existe diferença significativa na resposta analítica da cafeína e sibutramina ($P_{cafeína}$ = 0,0007 e $P_{sibutramina}$ = 0,0002) quando verificada a influência da inclusão da etapa de agitação no procedimento de extração. O uso de agitação melhora a extração dos analitos, considerando 1 minuto como a melhor opção.

5.3.1.2. Estudo do uso de ultrassom

Durante o procedimento de extração, a amostra passa por uma fase de uso de ultrassom para promover a solubilização/extração das substâncias ativas. As amostras diluídas em metanol foram submetidas a ultrassom durante 8, 15 e 32 minutos. Os tempos foram escolhidos na procura por otimizar o método de extração,

após achar informação variável na literatura. Vários autores mencionam o uso de ultrassom durante um tempo próximo a 30 minutos (KIM et al., 2014; DIYA et al., 2015). Entretanto, Neves e Caldas (2017a) cita o uso de 10 minutos nesta etapa do procedimento de extração. A **Figura 15** exibe os resultados obtidos a partir do teste de comparação múltipla de Brown-Forsythe (ANOVA). A análise foi realizada em 6 replicatas para cada condição avaliada. Os resultados obtidos para as substâncias cafeína e sibutramina foram avaliados.

Figura 15. Diferença estatística (P < 0,05) de três tempos de ultrassom na extração dos analitos cafeína e sibutramina utilizando o teste de comparação múltipla de Brown-Forsythe. Os resultados estão expressados como média da área relativa ± desvio padrão.



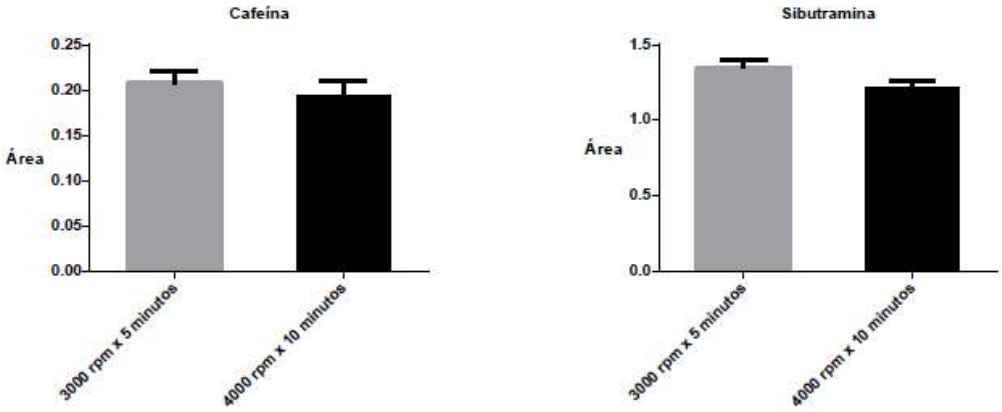
De acordo aos resultados apresentados acima, há diferença significativa na resposta analítica para cafeína (P = < 0,0001), tendo uma melhor resposta em 32 minutos, enquanto não há diferença na resposta analítica para sibutramina (P = 0,2404). Contudo, 32 minutos foi o tempo escolhido para submeter as amostras a ultrassom durante o procedimento de extração baseado no melhor valor de desvio padrão.

5.3.1.3. Estudo do uso de centrifuga

Por último, avaliou-se o uso de centrifuga. Várias condições de centrifugação têm sido utilizadas, desde 1290 G x 5 minutos (3000 rpm) até 2294 G x 10 minutos (4000 rpm) (NEVES e CALDAS., 2017a; STRANO-ROSSI et al., 2015). A **Figura 16** exibe os resultados obtidos a partir do teste de comparação t (ANOVA) entre as duas

condições avaliadas: 1290 G durante 5 minutos e 2294 G durante 10 minutos. As análises foram realizadas em 6 replicatas para cada condição avaliada. Os resultados obtidos para as substâncias cafeína e sibutramina foram avaliados.

Figura 16. Diferença estatística (P < 0,05) quando avaliado o uso de centrifuga na extração das substâncias cafeína e sibutramina utilizando o teste t. Os resultados estão expressados como média da área relativa ± desvio padrão.



A figura acima, demostra que não há diferença significativa na resposta analítica da cafeína (P = 0,3192), enquanto houve diferença significativa na resposta analítica da sibutramina (P = 0,0392). Não obstante, as duas substâncias apresentam uma resposta favorável quando submetidas à condição de 1290 G x 5 minutos (3000 rpm) nesta etapa do procedimento de extração. Visando a otimização do método, considera-se 1290 G x 5 minutos a (3000 rpm) melhor condição.

Após otimização dos parâmetros gerais, foi definida a quantidade representativa de suplemento e de solvente na extração de estimulantes/anorexígenos.

5.3.2. Definição da quantidade representativa de suplemento e solvente

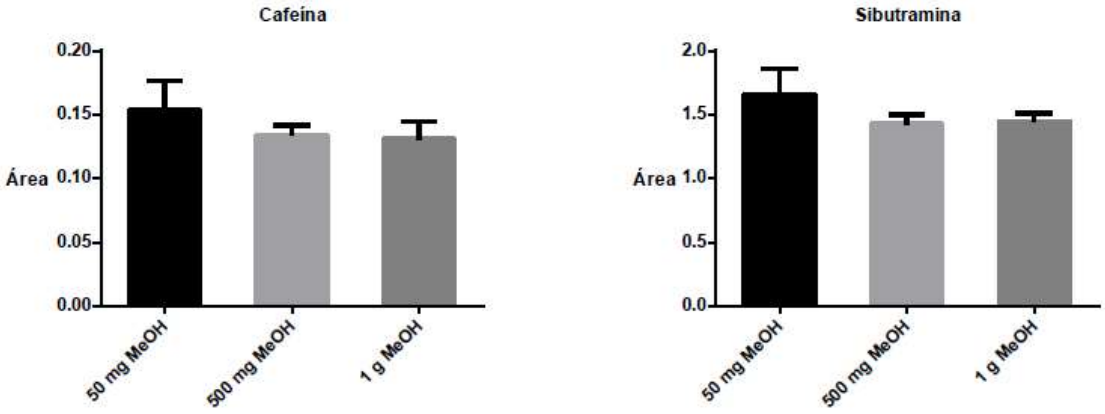
Segundo procedimentos de preparação de amostras descritos na literatura, grandes quantidades de suplemento e solvente têm sido utilizadas durante as análises. Santos et al. (2016) e Choi et al. (2015), utilizaram 10 g e 1 g de suplemento em 10 e 50 mL de metanol respectivamente.

Apontando a minimização de consumo de suplemento e consequentemente diminuição no uso de solvente, foram avaliadas quantidades menores de suplemento e solvente durante o desenvolvimento do método.

Para este teste, empregou-se uma amostra de suplemento positiva para cafeína e sibutramina, de acordo com análise prévia, a fim de avaliar a eficiência de cada etapa na extração de estimulantes/anorexígenos presentes na composição do suplemento.

A quantidade de suplemento e solvente a ser utilizada durante as análises foi avaliada empregando três massas diferentes de uma mesma amostra de suplemento positiva para cafeína e sibutramina: 50 mg, 500 mg e 1 g foram diluídos em volumes proporcionais: 0,5, 5 e 10 mL de metanol respectivamente. A **Figura 17** mostra os resultados obtidos a partir do teste de comparação múltipla de Tukey (ANOVA). A análise foi realizada em 6 replicatas para cada massa de suplemento avaliada. Os resultados obtidos para as substâncias cafeína e sibutramina foram avaliados.

Figura 17. Diferença estatística ($P < 0,05$) entre três massas de uma amostra de suplemento positiva para cafeína e sibutramina extraído com quantidades proporcionais de metanol utilizando o teste de comparação múltipla de Tukey. Os resultados estão expressados com média da área relativa ± desvio padrão.



Barra preta: 50 mg de suplemento extraídos com 0,5 mL de metanol. Barra cinza clara: 500 mg de suplemento extraídos com 5 mL de metanol. Barra cinza escura: 1 g de suplemento extraídos com 10 mL de metanol. Modo de preparação das amostras: 1 minuto de vortex, 5 minutos de ultrassom e 1290 G durante 5 minutos (3000 rpm) de centrifugação.

De acordo aos resultados apresentados na figura 17, observa-se que não há diferença estatística significativa entre a análise de 500 mg e 1g de suplemento ($P_{cafeína}$ = 0,6652/$P_{sibutramina}$ = 0,6415), extraídos com volume proporcional de metanol. Porém, comparando os resultados obtidos entre a análise de 50 mg e 500 mg de suplemento, observa-se diferencia significativa ($P_{cafeína}$ = 0,0786/$P_{sibutramina}$ = 0,0226), valores similares quando comparados os resultados obtidos entre a análise de 50 mg e 1 g de suplemento ($P_{cafeína}$ = 0,0686/$P_{sibutramina}$ = 0,0306).

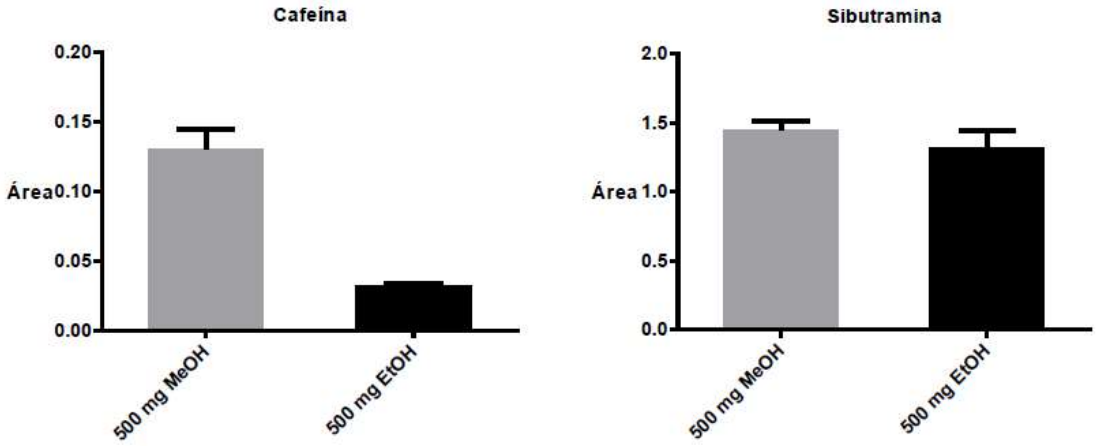
Baseando-se nos resultados alcançados e visando a utilização mínima de suplemento e solvente foi determinado o uso de uma massa de 500 mg e 5 mL de solvente como o procedimento mais adequado.

Posteriormente avaliou-se a representatividade de 500mg, considerando que as apresentações comerciais de suplementos nutricionais estão disponíveis em quantidades de 30 g até 1 Kg. Para este teste, empregou-se a mesma amostra de suplemento positiva para cafeína e sibutramina. Foram realizadas 10 extrações utilizando 500 mg de suplemento e 5 mL de metanol, e posteriormente foi avaliado o coeficiente de variação (C.V.) das 10 replicatas, obtendo resultados de 4,9 e 4,5% para cafeína e sibutramina respectivamente. O resultado obtido garante que 500 mg de suplemento é uma quantidade representativa e confiável para ser utilizada na determinação de adulterantes nesta matriz.

5.3.3. Escolha do solvente de extração

Normalmente, metanol é utilizado como solvente na extração de adulterantes de suplementos nutricionais (ZENG et al., 2016; VIANA et al., 2016). Após definir o volume de solvente que será utilizado nas extrações, foi avaliado o uso de etanol como alternativa, pela sua baixa toxicidade (TOXNET, Toxicology Data Network). A **Figura 18** exibe os resultados obtidos a partir do teste de comparação t (ANOVA). As análises foram realizadas em 6 replicatas para cada solvente orgânico avaliado. Os resultados obtidos para as substâncias cafeína e sibutramina foram avaliados.

Figura 18. Diferença estatística (P < 0,05) entre a extração com metanol e etanol de uma amostra de suplemento positiva para cafeína e sibutramina utilizando o teste t. Os resultados estão expressados com média da área relativa ± desvio padrão.



Barra cinza: 500 mg de suplemento extraídos com 5 mL de metanol. Barra preta: 500 mg de suplemento extraídos com 5 mL de etanol. Modo de preparação das amostras: 1 minuto de vortex, 5 minutos de ultrassom e 1290 G durante 5 minutos (3000 rpm) de centrifugação.

Segundo resultados apresentados, existe diferença significativa na resposta analítica da cafeína e sibutramina quando comparada a extração com mesmo volume de metanol e etanol, $P_{cafeína}$ = < 0,0001 e $P_{sibutramina}$ = 0,0469. Desta forma a escolha de metanol como solvente de extração mostrou-se adequada ao propósito do trabalho proporcionando ótimos resultados na extração.

5.3.4. Avaliação da incorporação das substâncias estimulantes/anorexígenos na composição de suplementos nutricionais

Após definição do solvente de extração, foi realizada a avaliação da incorporação das substâncias estimulantes/anorexígenos no suplemento nutricional, para verificar a solubilidade das substâncias de interesse durante o procedimento de extração.

Testou-se a incorporação das substâncias estimulantes/anorexígenos no suplemento nutricional. Para esta avaliação foi utilizado um suplemento de proteína isento dos analitos de interesse ao qual foram adicionadas quantidades conhecidas das substâncias de interesse, a análise foi realizada em tempo zero, 24 horas, 4 e 7 dias, foi adicionado padrão interno e foram realizadas 3 replicatas. A metodologia

utilizada foi cromatografia em fase gasosa com detector de nitrogênio-fósforo (CG-DNP).

Na **Tabela 3** é apresentado o resultado obtido após análise comparativa das áreas relativas nos tempos avaliados (zero, 24 horas, 4 e 7 dias). O coeficiente de variância (C.V) das substâncias fenfluramina, fenilpropanolamina, anfepramona, femproporex, efedrina, pseudoefedrina, cafeína e sibutramina apresentaram resultados inferiores a 16%, em quanto a substância sinefrina apresentou resultado fora de tendência devido à falta de resposta analítica nos tempos 4 e 7 dias.

Tabela 3. Descrição da média, desvio padrão relativo (D.P) e coeficiente de variância (C.V) após incorporação dos analitos pesquisados no suplemento nutricional.

	Área Relativa								
Tempo	FNF	FNP	ANF	FEM	SIN	EFE	PEF	CAF	SIB
Zero	2,0343	2,5670	0,3893	3,8690	0,3978	0,5423	0,9001	1,5485	0,5251
24 h	2,0136	2,6908	0,3709	3,8768	0,5330	0,5105	0,9927	1,3642	0,5256
4 dias	1,8622	2,2579	0,2950	3,6078	0,0000	0,5423	0,8295	1,3562	0,5186
7 dias	1,9619	2,5756	0,2864	3,7918	0,0000	0,5472	0,8764	1,2431	0,4836
Média	1,9680	2,5228	0,3354	3,7864	0,2327	0,5356	0,8997	1,3780	0,5132
D.P	0,08	0,19	0,05	0,1	0,3	0,02	0,07	0,1	0,02
C.V	3,9	7,3	15,6	3,3	117,9	3,1	7,6	9,2	3,9

FNF – fenfluramina, FNP – fenilpropanolamina, ANF – anfepramona, FEM – femproporex, SIN – sinefrina, CAF – cafeína, SIB – sibutramina, EFE – efedrina, PEF – pseudoefedrina.

A **Tabela 4** apresenta dados de porcentagens de recuperação e precisão dos analitos pesquisados. As substâncias fenfluramina, fenilpropanolamina, anfepramona, femproporex, efedrina, pseudoefedrina, cafeína e sibutramina apresentaram porcentagens de recuperação entre 94 - 117% e precisão entre 3,8 - 7,4% em todos os tempos avaliados quando comparados com soluções padrão preparada no dia da análise. A substância sinefrina apresentou porcentagens de recuperação de 51,6% e precisão de 28,6%.

Tabela 4. Porcentagens de recuperação e precisão dos analitos pesquisados.

Substância	FNF	FNP	ANF	FEM	SIN	EFE	PEF	CAF	SIB
% Recup.	100,4	101,0	97,0	116,1	51,6	98,5	94,9	101,1	112,0
Precisão (%)	7,4	5,7	7,2	4,1	28,6	4,2	3,8	6,2	3,8

FNF – fenfluramina, FNP – fenilpropanolamina, ANF – anfepramona, FEM – femproporex, SIN – sinefrina, EFE – efedrina, PEF – pseudoefedrina, CAF – cafeína, SIB – sibutramina.

Após avaliação dos resultados, a substância sinefrina foi excluída do grupo de substâncias de interesse por inviabilidade de análise.

5.4. Validação dos métodos analíticos

Como descrito neste trabalho, foram realizadas duas validações. Uma validação abrange os analitos DMAA, fentermina, fenfluramina, fenilpropanolamina, femproporex, anfepramona, cafeína e sibutramina. A outra validação envolve procedimento de derivatização para separar os isómeros efedrina e pseudoefedrina. A seguir os resultados dos parâmetros de validação avaliados para os dois métodos analíticos desenvolvidos.

5.4.1. Limite de detecção (LoD) e quantificação (LoQ)

Dentre as várias abordagens existentes para a determinação dos limites de detecção (LoD) e quantificação (LoQ), neste trabalho, a abordagem escolhida leva em conta a análise de amostras com concentrações conhecidas de analito, estabelecendo o nível mínimo no qual o analito pode ser detectado e quantificado de forma confiável.

Os limites de detecção e quantificação obtidos no método estão na faixa de 10 a 1300 vezes abaixo das DDR. Os valores de LoD e LoQ são apresentados na **Tabela 5.**

Tabela 5. Limites de detecção (LoD) e quantificação (LoQ) para os analitos de interesse em amostras de suplementos nutricionais.

Analitos	LoD ($\mu g.\mu L^{-1}$)	LoQ ($\mu g.\mu L^{-1}$)
DMAA	0,005	0,005
FNT	0,001	0,001
FNF	0,001	0,001
FNP	0,002	0,005
ANF	0,001	0,001
FEM	0,001	0,001
CAF	0,001	0,005
SIB	0,005	0,005
EFE	0,002	0,002
PEF	0,002	0,002

DMAA - 4-metil-hexan-2-amina, FNT – fentermina, FNF – fenfluramina, FNP – fenilpropanolamina, ANF – anfepramona, FEM – femproporex, CAF – cafeína, SIB – sibutramina, EFE – efedrina, PEF – pseudoefedrina.

Quando comparados aos métodos descritos na literatura, os LoDs e LoQs aqui apresentados mostram-se sensíveis para a detecção de estimulantes/anorexígenos em suplementos.

5.4.2. Seletividade

Na avaliação da seletividade, os analitos de interesse e os interferentes contidos nas três matrizes avaliadas (proteínas, carboidratos e aminoácidos) apresentaram resolução menor a 1,5. Além disso, nenhum interferente foi encontrado nos tempos de retenção das substâncias de interesse. Na **Tabela 6** e **7** são apresentados os resultados obtidos.

Tabela 6. Distância de separação absoluta dos analitos de interesse considerando o pico mais próximo, expressada como tempos de retenção (minutos).

Analitos	Resolução (Rs)		
	Proteínas	Carboidratos	Aminoácidos
DMAA	-	-	-
FNT	48,7	47,1	48,1
FNF	14,1	13,5	13,8
FNP	21,2	20,4	20,9
ANF	26,8	26,0	26,4
FEM	23,4	23,2	22,9
DFA (PI)	3,1	2,9	3,0
CAF	49,4	49,1	48,9
SIB	4,7	4,6	4,5

DMAA - 4-metil-hexan-2-amina, FNT – fentermina, FNF – fenfluramina, FNP – fenilpropanolamina, ANF – anfepramona, FEM – femproporex, DFA – difenilamina, CAF – cafeína, SIB – sibutramina.

Tabela 7. Distância de separação absoluta dos isômeros efedrina e pseudoefedrina após procedimento de derivatização, expressada como tempos de retenção (minutos).

Substâncias	Resolução (Rs)		
	Proteínas	Carboidratos	Aminoácidos
EFE	-	-	-
PEF	11,0	10,8	10,7
DFA (PI)	69,3	69,1	68,9

EFE – efedrina, PEF – pseudoefedrina, DFA – difenilamina.

Os métodos mostraram-se seletivos para a análise dos analitos estudados segundo os resultados obtidos.

5.4.3. Linearidade

Uma ampla faixa de concentrações foi avaliada no estudo de linearidade, considerando concentrações desde 0,001 $\mu g.\mu L^{-1}$ até 0,04 $\mu g.\mu L^{-1}$. Visto que a amplitude das concentrações da linearidade excede uma ordem de magnitude, o estudo da homoscedasticidade foi realizado. Avaliou-se o valor de $F_{exp.}$, e tendo em vista que este foi inferior ao $F_{tabelado.}$, conclui-se que o método em questão é

homoscedástico para DMAA, fenfluramina, fenilpropanolamina, anfepramona, femproporex, cafeína e sibutramina. Porém, foi necessário o emprego da regressão dos mínimos quadrados ponderados (1/Y^2) para a substância fentermina. Na **Tabela 8** são apresentados os coeficientes de correlação e as equações da reta obtidos para as substâncias avaliadas.

Tabela 8. Curvas de calibração e coeficientes de correlação linear para os analitos DMAA, fentermina, fenfluramina, fenilpropanolamina, anfepramona, femproporex, cafeína e sibutramina.

Analito	Curva de calibração	Coeficiente de correlação linear (R^2)
DMAA	y = 77,672x - 0,1884	0,9957
FNT	y = 55,262x - 0,1232	0,9942
FNF	y = 40,823x - 0,0409	0,9950
FNP	y = 84,918x - 0,2602	0,9901
ANF	y = 34,522x - 0,0437	0,9965
FEM	y = 79,473x - 0,1567	0,9926
CAF	y = 141,12x - 0,2266	0,9961
SIB	y = 29,489x - 0,0543	0,9950

DMAA - 4-metil-hexan-2-amina, FNT – fentermina, FNF – fenfluramina, FNP – fenilpropanolamina, ANF – anfepramona, FEM – femproporex, CAF – cafeína, SIB – sibutramina.

A faixa de concentrações avaliada no estudo de linearidade para os isómeros efedrina e pseudoefedrina, contempla concentrações desde 0,002 $\mu g.\mu L^{-1}$ até 0,128 $\mu g.\mu L^{-1}$. As faixas de linearidade avaliadas no presente trabalho são similares as anteriormente estudadas (VIANA et al., 2016; PAÍGA et al., 2017). O estudo da homoscedasticidade foi realizado. Avaliou-se o valor de $F_{exp.}$, e tendo em vista que este foi inferior ao $F_{tabelado.}$, conclui-se que o método em questão é homoscedástico para as duas substâncias. Na **Tabela 9** são apresentados os coeficientes de correlação e as equações da reta obtidos.

Tabela 9. Curvas de calibração e coeficientes de correlação linear para os analitos efedrina e pseudoefedrina.

Analito	Curva de calibração	Coeficiente de correlação linear (R^2)
EFE	y = 11,247x - 0,0106	0,9992
PEF	y = 15,262x - 0,0272	0,9987

Como observado nas tabelas 8 e 9, os métodos foram lineares para todos os analitos estudados nas faixas propostas.

5.4.4. Precisão, exatidão e recuperação

Os resultados obtidos para os analitos de interesse dos ensaios de precisão inter e intra ensaio, exatidão e recuperação são apresentados nas **Tabelas 10**, **11** e **12** respectivamente. Estes parâmetros foram avaliados em três matrizes de suplemento nutricional (proteínas, aminoácidos e carboidratos).

Os três parâmetros avaliados encontram-se dentro de especificações. A precisão inter e intra ensaio foi realizada em 3 concentrações (CB, CM e CA). Todos os valores obtidos nas três concentrações atendem aos critérios de aceitação, 20% para CB e 15% para CM e CA. A exatidão apresentou uma variação aceitável de 80 a 120% para CB e 85 a 115% para CM e CA. Os valores de recuperação obtidos encontram-se todos próximos de 100%. Por tanto, o método é considerado preciso e exato.

5.4.5. Carryover

As amostras de suplementos nutricionais negativas subsequente a injeção de uma amostra fortificada com os analitos de interesse na concentração de 0,040 $\mu g.\mu L^{-1}$ para as substâncias DMAA, fentermina, fenfluramina, fenilpropanolamina, femproporex, anfepramona, cafeína e sibutramina, e 0,128 $\mu g.\mu L^{-1}$ no caso de efedrina e pseudoefedrina não gerou picos nos tempos de retenção de interesse para nenhuma das três matrizes avaliadas (proteínas, carboidratos, aminoácidos).

Tabela 10. Precisão inter e intra ensaio dos analitos de interesse em três matrizes de suplemento nutricional (proteína, aminoácido e carboidrato) determinada em 3 concentrações (CB, CM e CA).

Analito	Concentração (µg/µL)	Precisão Inter ensaio (%CV)			Precisão Intra ensaio (%CV)		
		Proteínas	Aminoácidos	Carboidratos	Proteínas	Aminoácidos	Carboidratos
DMAA	0,005	6,4	9,7	12,4	5,8	8,7	12,6
	0,021	9,0	7,2	9,3	6,8	8,2	7,9
	0,036	7,9	9,3	7,4	8,5	5,1	7,2
FNT	0,005	9,4	9,8	9,5	8,1	9,4	9,0
	0,021	6,4	10,4	9,3	2,4	12,4	9,4
	0,036	4,5	8,3	8,8	4,2	6,0	7,5
FNF	0,005	6,4	11,5	12,5	7,1	6,8	12,6
	0,021	11,2	12,3	9,5	7,6	9,2	10,8
	0,036	7,2	8,6	7,4	6,0	6,9	6,2
FNP	0,005	16,6	4,2	6,0	4,2	4,8	7,1
	0,021	10,3	6,7	6,8	7,9	5,0	8,0
	0,036	11,5	9,4	10,2	7,6	5,3	7,5
ANF	0,005	7,1	11,0	11,1	5,4	4,1	13,1
	0,021	6,1	10,5	7,1	4,2	6,4	7,0
	0,036	8,3	8,2	6,6	4,1	2,3	2,9
FEM	0,005	7,4	9,6	6,8	5,9	7,8	8,1
	0,021	7,7	13,4	9,1	5,1	4,9	5,3
	0,036	4,7	10,5	9,3	5,1	7,1	6,8

Continuação

Analito	Concentração (µg/µL)	Precisão Inter ensaio (%CV)			Precisão Intra ensaio (%CV)		
	0,005	Proteínas	Aminoácidos	Carboidratos	Proteínas	Aminoácidos	Carboidratos
CAF	0,021	12,5	12,4	7,2	9,9	5,3	4,3
	0,036	8,7	4,3	9,5	4,6	4,3	4,1
SIB	0,005	16,0	6,5	11,5	12,9	6,8	7,9
	0,021	5,3	8,1	7,2	4,9	7,7	5,0
	0,036	4,6	9,3	7,3	5,0	3,5	2,9
EFE	0,02	10,5	11,2	10,1	12,9	10,7	8,8
	0,05	10,9	9,6	8,6	3,3	9,3	9,1
	0,1	12,1	11,5	10,9	6,9	8,2	8,9
PEF	0,02	14,8	9,9	11,3	13,5	9,9	10,2
	0,05	7,3	10,6	9,2	7,2	10,4	10,5
	0,1	14,9	10,2	11,6	7,0	9,2	11,4

DMAA - 4-metil-hexan-2-amina, FNT – fentermina, FNF – fenfluramina, FNP – fenilpropanolamina, ANF – anfepramona, FEM – femproporex, CAF – cafeína, SIB – sibutramina, EFE – efedrina, PEF – pseudoefedrina.

Tabela 11. Exatidão dos analitos de interesse em três matrizes de suplemento nutricional (proteína, aminoácido e carboidrato) determinada em 3 concentrações (CB, CM e CA).

Analito	Concentração (µg/µL)	Exatidão (%)		
		Proteínas	Aminoácidos	Carboidratos
DMAA	0,005	104,1	103,0	104,7
	0,021	97,8	103,0	94,5
	0,036	102,0	104,8	100,3
FNT	0,005	100,3	103,3	107,3
	0,021	93,3	94,3	97,9
	0,036	103,3	103,9	98,7
FNF	0,005	92,8	104,3	107,0
	0,021	92,7	93,2	93,9
	0,036	94,5	93,3	97,1
FNP	0,005	94,7	107,6	103,0
	0,021	102,6	94,0	96,4
	0,036	92,8	94,0	92,6
ANF	0,005	99,6	93,3	104,9
	0,021	92,0	90,8	97,5
	0,036	91,8	97,8	98,3
FEM	0,005	93,5	92,4	93,4
	0,021	96,0	93,0	94,0
	0,036	91,1	93,9	96,1

Continuação

Analito	Concentração (µg/µL)	Exatidão (%)		
		Proteínas	Aminoácidos	Carboidratos
CAF	0,005	94,4	91,2	95,6
	0,021	92,9	99,6	95,6
	0,036	91,0	91,9	92,8
SIB	0,005	93,6	105,5	107,5
	0,021	93,1	91,7	94,7
	0,036	92,2	92,1	101,7
EFE	0,02	92,7	93,4	94,8
	0,05	93,6	92,9	94,9
	0,1	91,9	93,6	96,0
PEF	0,02	92,3	94,1	92,9
	0,05	93,6	95,0	93,7
	0,1	92,8	93,1	91,9

DMAA - 4-metil-hexan-2-amina, FNT – fentermina, FNF – fenfluramina, FNP – fenilpropanolamina, ANF – anfepramona, FEM – femproporex, CAF – cafeína, SIB – sibutramina, EFE – efedrina, PEF – pseudoefedrina.

Tabela 12. Porcentagem de recuperação dos analitos de interesse em três matrizes de suplemento nutricional (proteína, aminoácido e carboidrato).

Analito	Recuperação (%)		
	Proteínas	Aminoácidos	Carboidratos
DMAA	97,8	98,5	94,5
FNT	93,3	94,3	91,7
FNF	93,3	93,3	97,3
FNP	91,0	94,0	102,7
ANF	99,6	97,8	98,3
FEM	93,9	92,7	93,4
CAF	92,9	99,6	95,6
SIB	93,6	92,2	94,4
EFE	103,5	102,2	102,9
PEF	105,0	103,6	104,0

DMAA - 4-metil-hexan-2-amina, FNT – fentermina, FNF – fenfluramina, FNP – fenilpropanolamina, ANF – anfepramona, FEM – femproporex, CAF – cafeína, SIB – sibutramina, EFE – efedrina, PEF – pseudoefedrina.

5.5. Análise de amostras reais

Das 125 amostras de suplemento nutricional analisadas, 38 delas (30%) apresentaram resultado positivo para alguma das substâncias de interesse. As amostras positivas foram posteriormente analisadas qualitativamente por LC-MS/MS, no propósito de confirmar o resultado positivo obtido. Na **Tabela 13** são apresentados o tipo de suplemento, origem e quantidade (mg/porção) de estimulante/anorexígeno encontrado.

Tabela 13. Suplementos contendo estimulantes/anorexígenos na sua composição e informação de origem.

Tipo de suplemento	Origem	Quantidade encontrada (mg/porção)
Proteína de leite	USA	Cafeína < 1,8 Sibutramina = 9,0
Proteína de leite	Brasil	Cafeína < 1,8 Sibutramina = 6,1
Proteína de leite	Brasil	Cafeína < 1,8 Sibutramina = 0,7
Proteína de leite	USA	Cafeína < 1,8 Sibutramina = 7,9
Proteína de leite	USA	Cafeína < 1,8 Sibutramina = 6,1
Proteína de leite	Brasil	Cafeína < 1,8
Proteína de leite	USA	Cafeína < 1,8 Sibutramina = 11,5
Proteína de leite	USA	Cafeína < 1,8 Sibutramina = 16,2
Proteína de leite	USA	Cafeína < 1,8 mg Sibutramina = 7,9
Proteína de leite	Brasil	Efedrina = 5,4
Proteína de leite	USA	Cafeína < 1,8 Sibutramina = 6,1
Proteína de leite	Brasil	Cafeína < 1,8 Sibutramina = 2,2
Proteína de leite	USA	Cafeína < 1,8 Sibutramina = 7,9
Proteína de leite	Brasil	Efedrina = 4,7
Proteína de leite	Brasil	Efedrina < 2,2

Continuação

Tipo de suplemento	Origem	Quantidade encontrada (mg/porção)
Proteína de leite	USA	Cafeína < 1,8 m Sibutramina = 9,0
Proteína de leite	Brasil	Cafeína < 1,8 Sibutramina = 6,8
Proteína de leite	Brasil	Efedrina < 2,2
Proteína de leite	Espanha	Cafeína < 1,8 Sibutramina = 13,3
Proteína de leite	Brasil	Cafeína < 1,8 Sibutramina = 9,0
Proteína de leite	USA	Cafeína < 1,8
Proteína de leite	USA	Cafeína < 1,8 Sibutramina = 14,0
Proteína de leite	USA	Sibutramina = 30,0
Proteína de leite	USA	Cafeína < 1,8 Sibutramina = 15,1
Proteína de leite	USA	Cafeína < 1,8 Sibutramina = 5,4
Proteína de leite	USA	Cafeína < 1,8 Sibutramina = 4,0
Proteína de leite	Brasil	Cafeína < 1,8 Sibutramina = 6,1
Proteína de albumina	Brasil	Cafeína < 1,8
Proteína de carne	USA	Cafeína < 1,8
Aminoácido	Brasil	Cafeína = 144,36
Termogênico	Brasil	Cafeína < 1,8
Termogênico	Brasil	Efedrina < 2,2
Creatina	USA	Cafeína = 57,7
Creatina	USA	Cafeína = 64,9
Multivitamínico	USA	Cafeína < 1,8
Multivitamínico	Canadá	Efedrina = 216
Multivitamínico	Brasil	Efedrina = 250
Multivitamínico	Brasil	Cafeína = 433,1

* Uma porção equivale a 30g de suplemento.

Das amostras positivas, 53% (n=20) foram positivas tanto para sibutramina quanto para cafeína. Das 30 amostras positivas para cafeína, 80% (n=24) foram da

classe proteína, 7% (n=2) creatina, 7% (n=2) multivitamínicos, 3% (n=1) aminoácido e 3% (n=1) termogênico. A totalidade das amostras positivas para sibutramina (n=21) foram classe proteína. Das 7 amostras positivas para efedrina, 57% (n=4) foram classe proteína, 29% (n=2) multivitamínicos e 14% (n=1) termogênico.

Esses resultados corroboram com as pesquisas realizadas visando a investigação de suplementos nutricionais quanto à presença de substâncias não declaradas nos rótulos. A cafeína e a sibutramina foram as substâncias encontradas com maior frequência nos produtos comercializados na Korea do Sul, Singapura e Brasil respectivamente (KIM et al., 2014; ZENG et al., 2016; VIANA et al., 2016). Entretanto, os estudos encontrados na literatura não direcionam a pesquisa para o tipo de suplemento nutricional (proteínas, aminoácidos, carboidratos, dentre outros); enquanto que os resultados aqui apresentados mostram que a presença de substâncias não declaradas nos rótulos ocorre principalmente em suplementos à base de proteína, 80% dos casos para cafeína e 100% dos casos para sibutramina.

Tendo em conta que os suplementos nutricionais podem ser adulterados involuntariamente devido à contaminação cruzada, ou intencionalmente com ativos farmacêuticos para garantir ou melhorar os resultados do produto (NEVES e CALDAS, 2015), foi considerada adulteração quando as quantidades encontradas nos suplementos nutricionais estão próximas a DDR, dose capaz de produzir o efeito teórico desejado. Entretanto, valores baixos, próximos aos limites de detecção e quantificação foram considerados como contaminação.

Assim, 87% das amostras positivas para cafeína, 19% das amostras positivas para sibutramina e 43% das amostras positivas para efedrina são consideradas como contaminação, enquanto 13%, 81% e 57% são consideradas como adulteração dolosa para cafeína, sibutramina e efedrina, respectivamente.

Baixos níveis de cafeína, sibutramina e efedrina, considerados contaminação, já foram anteriormente encontrados por Noortje et al. (2014). A presença de concentrações baixas destes ingredientes farmacologicamente ativos provavelmente está associada à ausência das boas práticas de fabricação, as quais incluem procedimentos de controle de qualidade para cada etapa do processo de fabricação, para garantir que o produto final contenha os ingredientes apropriados na dose certa, sem a presença de

contaminantes, tais como, substâncias consideradas ativos farmacêuticos, toxinas, bactérias, pesticidas, metais pesados ou embalagem e rotulagem inadequada (NEVES e CALDAS, 2015; NOORTJE et al., 2014).

Devido à ausência de dados de adulteração em suplementos nutricionais no Brasil, não é possível fazer uma análise comparativa contra outros estudos. Porém, os resultados aqui obtidos demostram a falta de controle (legislação) tanto para produtos fabricados no país quanto importados. Do total das amostras positivas, 50% foram importados dos Estados Unidos, 6% da Espanha e Canadá e 44% das amostras tiveram origem no Brasil.

CONCLUSÃO

6. CONCLUSÃO

De acordo com os resultados apresentados e discutidos, conclui-se que o emprego de cromatografia gasosa com detector de nitrogênio fósforo (GC-NPD) para determinação das substâncias estimulantes/anorexígenos (4-metil-hexan-2-amina, cafeína, anfepramona, femproporex, fenfluramina, fentermina, sibutramina, efedrina, pseudoefedrina e fenilpropanolamina) proporciona seletividade, linearidade, precisão, exatidão, recuperação e limites em conformidade ao objetivo que foram destinadas.

Os métodos de preparo de amostra desenvolvidos e validados para determinação de estimulantes/anorexígenos em amostras de suplementos nutricionais demonstraram ser simples, práticos, eficientes e diferenciados pelo baixo uso de amostra e solvente.

Por fim, a obtenção de uma porcentagem alta de amostras adulteradas com ativos farmacêuticos, ratifica a problemática social atual e alerta sobre a necessidade de implementação de mecanismos de controle para estes produtos que estão sendo vendidos e importados deliberadamente.

Como resultado à falta de legislação e fiscalização, recentemente a Anvisa está propondo um novo marco regulatório para suplementos alimentares. Para isto, atualmente encontra-se aberta uma consulta pública no portal de Anvisa com número de processo 25351.430571/2010-13. O primeiro passo a seguir será definir esta categoria de produtos, que a pesar de ser amplamente reconhecida pelo consumidor e ser adotada em outros países, não está prevista na legislação sanitária brasileira. A definição proposta considera suplementos alimentares todos os produtos de ingestão oral, apresentado em formas farmacêuticas, destinados a suplementar a alimentação de indivíduos saudáveis com nutrientes, sustâncias bioativas, enzimas ou probióticos, isolados ou combinados. Nesse sentido, a proposta regulatória pretende reunir na categoria de suplementos alimentares os produtos que atualmente se encontram disciplinados em seis categorias de alimentos, além de alguns produtos enquadrados como medicamentos específicos que possuem indicação de suplementação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABE, A. M., HEIN, D. J., GREGORY P. J. 2015. "Regulatory alerts for dietary supplements in Canada and the United States, 2005-13." Am J Health Syst Pharm 72(11): 966-971.

ANVISA (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA), 2010a. Resolução - RDC Nº 18, de 27 de abril de 2010. Dispõe sobre alimentos para atletas.

ANVISA (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA), 2010b. Resolução - RDC Nº 27, de 6 de agosto de 2010. Dispõe sobre as categorias de alimentos e embalagens isentos e com obrigatoriedade de registro sanitário.

ANVISA (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILANCIA SANITARIA), 2013. "Suplemento alimentar." Consumo e saúde.

ANVISA (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA), 2016. Resolução - RDC Nº 87, de 28 de junho de 2016. Dispõe sobre a atualização do Anexo I (Listas de Substâncias Entorpecentes, Psicotrópicas, Precursoras e Outras sob Controle Especial) da Portaria SVS/MS nº 344, de 12 de maio de 1998, e dá outras providências.

AOAC. 2013. Guidelines for dietary supplements and botanicals. Appendix K. Rockville (MD): AOAC Official methods.

ARCHER, J. R., DARGAN, P. I., LOSTIA, A. M., VAN DER WALT, J., HENDERSON, K., DRAKE, N., SHARMA, S., WOOD, D. M., WALKER, C. J., KICMAN, A. T. 2014. Running an unknown risk: a marathon death associated with the use of 1,3-dimethylamylamine (DMAA). Drug Testing and Analysis.

BRAZIL, 1969. Decreto Lei Nº 986, de 21 de outubro de 1969. Institui normas básicas sobre alimentos. Diário Oficial da União, retificação em 24 de agosto de 1977.

BRAZIL, 1977. Lei n. 6437, de 20 de agosto de 1977. Configura infrações à legislação sanitária federal, estabelece as sanções respectivas, e dá outras providências. Diário Oficial da União, p. 8935 retificação em 11 de novembro de 1969, p. 9737.

CARVALHO-SILVA, L. B., BRAGA G. G., LOLLO, P. C. B. 2012. Utilização de recursos ergogênicos e suplementos alimentares por praticantes de musculação. Revista Brasileira Nutrição Clínica. 27 (3): 158-63

CHANG, C. W, HSU, S. Y, HUANG, G. Q, HSU, M. C. 2017. Ephedra alkaloid contents of Chinese herbal formulae sold in Taiwan. Drug Testing and Analysis.

CHOI, J., HEO, S., YOO, G., PARK, S., YOON, C., BAEK, S. 2015. Development and validation of an LC-MS/MS method for the simultaneous analysis of 28 specific narcotic adulterants used in dietary supplements. Food Additives & Contaminants: Part A, 2015 Vol. 32, No. 7, 1029–1039.

COPPENS, P., DELMULLE, L., GULATI, O., RICHARDSON, D., RUTHSATZ, M., SIEVERS, H., SIDANI, S., 2006. Use of botanicals in food supplements. Ann. Nutr. Met. 50, 538 e 554.

DA SILVA, L. B, CORDELLINI S. 2003. Effects of diethylpropion treatment and withdrawal on aorta reactivity, endothelial factors and rat behavior. Toxicol Appl Pharmacol ;190:170–6.

DAWIDOWICZ, A. L.,RADO, E., WIANOWSKA, D. 2009. Static and dynamic superheated water extraction of essential oil components from *Thymus vulgaris L*. Journal of Separation Science, v. 32, p. 3034-3042.

DE CARVALHO, L. M., COHEN, P. A., SILVA, C. V., MOREIRA, A. P. L., FALCÃO, T. M., DAL MOLIN, T. R., ZEMOLIN, G., MARTINI, M. 2012. "A new approach to determining

pharmacologic adulteration of herbal weight loss products." Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess 29(11): 1661-1667.

DECONINCK, E., CAUWENBERGH, T., BOTHY, J. L., CUSTERS, D., COURSELLE, P., DE BEER, J. O. 2014. "Detection of sibutramine in adulterated dietary supplements using attenuated total reflectance-infrared spectroscopy." J Pharm Biomed Anal 100: 279-283.

DE SILVA, A., SAMARASINGHE, Y., SENANAYAKE, D., LANEROLLE, P. 2010. Dietary supplement intake in national-level Sri Lankan athletes. Int J Sport Nutr Exerc Metab. 20(1):15-20.

DIEHL, K., THIEL, A., ZIPFEL, S., MAYER J, SCHNELL A, SCHNEIDER S. 2012. Elite adolescent athletes' use of dietary supplements: Characteristics, opinions, and sources of supply and information. Int J Sport Nutr Exerc Metab. 22(3):165-74.

DIETZ, P., ULRICH, R., NIESS, A., BEST, R., SIMON, P., STRIEGEL, H. 2014. Prediction profiles for nutritional supplement use among young German elite athletes. Int J Sport Nutr Exerc Metab. 24:623-31.

DING, Y., ZHANG, W., GU, C., XAGORARAKI, I., LI, H. 2010. Determination of pharmaceuticals in biosolids using accelerated solvent extraction and liquid chromatography/tandem mass spectrometry. Journal of Chromatography A, 1218. p. 10–16.

DIYA, L., YAN, C., ZIYANG, L., SHUJIN, L., XIAOFEI, C., YIFENG, C., FENG, L. 2015. Rapid on-site detection of ephedrine and its analogues used as adulterants in slimming dietary supplements by TLC-SERS. Anal Bioanal Chem. 407:1313–1325.

DUNN, J. D., GRYNIEWICZ-RUZICKA, C. M., MANS, D. J., MECKER-POGUE, L. C., KAUFFMAN, J. F., WESTENBERGER, B. J., BUHSE, L. F. 2012. "Qualitative

screening for adulterants in weight-loss supplements by ion mobility spectrometry." J Pharm Biomed Anal 71: 18-26.

EC (EUROPEAN PARLIAMENT AND EUROPEAN COUNCIL), 2002. Regulation 178/2002 of the European Parliament and of the Council of 28 January 2002 laying down the general principles and requirements of food law, establishing the European food safety authority and laying down procedures in matters of food safety. Off. J. Eur. Comm. L31, 1e24.

EC (EUROPEAN PARLIAMENT AND EUROPEAN COUNCIL), 2004. Directive 2004/27/EC of the European Parliament and of the Council of 31 March 2004 amending Directive 2001/83/EC on the community code relating to medicinal products for human use. Off. J. Eur. Comm. L136, 34e57.

EEC (EUROPEAN ECONOMIC COMMUNITY), 1965. Council Directive 65/65/EEC of 26 January 1965 on the approximation of provisions laid down by law, regulation or administrative action relating to medicinal products. Off. J. 022, 0369 e 0373.

EUROMONITOR INTERNATIONAL, 2016. Vitamins and dietary supplements. http://www.euromonitor.com/vitamins-and-dietary-supplements.

EUSSEN, S.R.B.M., VERHAGEN, H., KLUNGEL, O.H., GARSSEN, J., VAN LOVEREN, H., VAN KRANEN, H.J., ROMPELBERG, C.J.M. 2011. Functional foods and dietary supplements: products at the interface between pharma and nutrition. Eur. J. Pharm. 668, S2 e S9.

FDA (FOOD AND DRUG ADMINISTRATION). 2005. Guidance for Industry: A Dietary Supplement Labeling Guide.

FDA (FOOD AND DRUG ADMINISTRATION). 2013. Bioanalytical Method Validation. U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration.

FLANAGAN, R. J., TAYLOR, A., WATSON, I. A., WHELPTON, R. 2007. Fundamentals of analytical toxicology. John Wiley & Sons, Ltd.

FRANKOS, V. H., STREET, D. A., O'NEILL, R. K. 2010. "FDA regulation of dietary supplements and requirements regarding adverse event reporting." Clin Pharmacol Ther 87(2): 239-244.

GARCIA, P. R., YONAMINE, M., MOREAU, R. L. M. 2005. Determinação de efedrinas em urina por cromatografia em fase gasosa (CG/DNP) para o controle da dopagem no esporte. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas. Vol.41 no.3

GIANNOPOULOU, I., NOUTSOS, K., APOSTOLIDIS, N., BAYIOS, I., NASSIS, G, P. 2013. Performance level affects the dietary supplement intake of both individual and team sports athletes. J Sport Sci Med. 12(1):190-6.

GOSTON, J. L., CORREIA, M. I. 2010. "Intake of nutritional supplements among people exercising in gyms and influencing factors." Nutrition 26(6): 604-611.

ICH (2005). Validation of analytical procedures: Text and Methodology Q2 (R1). I. H. T. Guideline, ICH (International Conference on Harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use): 1 - 17.

JABBAR, S. B. and HANLY, M. G. 2013. "Fatal caffeine overdose: a case report and review of literature." Am J Forensic Med Pathol 34(4): 321-324.

KARCH, S. B. 1997. Drug Abuse Handbook. p. 660 - 663.

KARNATOVSKAIA, L. V., LEONI, J. C., FREEMAN, M. L. 2015. Cardiac Arrest in a 21-Year-Old Man After Ingestion of 1,3-DMAA–Containing Workout Supplement. Case report. Clin J Sport Med 25 (1): 23-25.

KLAASSEN, C. D. (Ed.). 2001. Casarett and Doull's Toxicology: The basic science of poisons. 6th ed. p. 614 - 618.

KIM, J., KANG, S., JUNG, H., CHUN, Y., TRILK, J., JUNG, S. H. 2011. Dietary supplementation patterns of Korean olympic athletes participating in the Beijing 2008 Summer Olympic Games. Int J Sport Nutr Exerc Metab. 21(2):166-74.

KIM, J. K., JI, L., HYOUNG, P., SO-HYUN, C., SOOYEUL, C., WOO, K. 2014. Monitoring of 29 weight loss compounds in foods and dietary supplements by LC-MS/MS. Food Additives & Contaminants: Part A, Vol. 31, No. 5, 777–783.

LACHENMEIER, D.W., STEFFEN, C., EL-ATMA, O., MAIXNER, S., LOBELL-BEHRENDS, S., KOHL- HIMMELSEHER, M., 2012. 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”. Regul. Toxicol. Pharmacol. 64, 286e295.

LAPACHINSKE, S. F., OKAI, G. G., DOS SANTOS, A., DE BAIRROS, A. V., YONAMINE, M. 2015. "Analysis of cocaine and its adulterants in drugs for international trafficking seized by the Brazilian Federal Police." Forensic Sci Int 247: 48-53.

LEE, E. S., KIM, J. W., LEE, J. H., HAN, K. M., CHO, S., HWANG, I., HAN, S. Y., CHAE, K., KIM, J. 2013. "Identification of a new tadalafil analogue found in a dietary supplement." Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess 30(4): 621-626.

LEIKIN, J. B., PALOUCEK, F. P. 2007. Poisoning and Toxicology Handbook. Fourth Edition. p 162 - 576.

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

LOCQUET, M., BEAUDART, C., LARBUISSON, R., LECLERCQ, V., BUCKINX, F., KAUX, J. F., REGINSTER, J. Y., BRUYÈRE, O. 2016. Self-Administration of Medicines and Dietary Supplements Among Female Amateur Runners: A Cross-Sectional Analysis. Advances in Therapy. 33(12): 2257–2268.

LI, Z., LI, D., REN, J., WANG, L., YUAN, L., LIU, Y. 2012. Optimization and application of accelerated solvent extraction for rapid quantification of PCBs in food packaging materials using GC-ECD. Food Control 27. 300 e 306.

MANTOVANI, CDE C., LIMA, M. B.,OLIVEIRA, C. D.,MENCK, RDE A.,DINIZ, E. M., YONAMINE, M. 2014. "Development and practical application of accelerated solvent extraction for the isolation of cocaine/crack biomarkers in meconium samples." J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci 957: 14-23.

MAUGHAN R. 2002. The athlete’s diet: Nutritional goals and dietary strategies. Proc Nutr Soc. 61(01):87-96.

MOFFAT, C. A., OSSELTON, M. D., WIDDOP, B. (Ed.). 2011. Clarke's analyses of drugs and poisons. 4th ed. p. 1029 - 1917.

MOREIRA, A. P. L., MOTTA, M. J., DAL MOLIN, T. R., VIANA, C., DE CARVALHO, L. M. 2013. "Determination of diuretics and laxatives as adulterants in herbal formulations for weight loss." Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess 30 (7): 1230-1237.

NEVES, D. B. D. J., CALDAS, E. D. 2015. Dietary supplements: International legal framework and adulteration profiles, and characteristics of products on the Brazilian clandestine market. Regulatory Toxicology and Pharmacology 73. 93 e 104.

NEVES, D. B. D. J., CALDAS, E. D. 2017a. "Determination of caffeine and identification of undeclared substances in dietary supplements and caffeine dietary exposure assessment." Food and Chemical Toxicology 105:194-202.

NEVES, D. B. D. J., CALDAS, E. D. 2017b. GC-MS quantitative analysis of black market pharmaceutical products containing anabolic androgenic steroids seized by the Brazilian Federal Police. Forensic Science International 275:572-281.

NOORTJE, R., BASTIAAN, V., DRIES DE KASTEB., RON, H., IVONNE, R., MARTIJN, M. 2014. Active pharmaceutical ingredients detected in herbal food supplements for weight loss sampled on the Dutch market. Food Additives & Contaminants: Part A, Vol. 31, No. 11, 1783–1793.

PAÍGA, P., RODRIGUES, M. J. E., CORREIA, M., AMARAL, J. S., OLIVEIRA, M. B. P. P., DELERUE-MATOS, C. 2017. Analysis of pharmaceutical adulterants in plant food supplements by UHPLC-MS/MS. European Journal of Pharmaceutical Sciences 99. 219–227.

PHATTANAWASIN, P., SOTANAPHUN, U., SUKWATTANASINIT, T., AKKARAWARANTHORN. J., KITCHAIYA, S. 2012. "Quantitative determination of sibutramine in adulterated herbal slimming formulations by TLC-image analysis method." Forensic Sci Int 219 (1-3): 96-100.

PRESTES, O. D., FRIGGI, C. A., ADAIME, M. B., ZANELLA, R. 2009. "QuEChERS - A modern sample preparation method for pesticide multiresidue determination in food by chromatographic methods coupled to mass spectrometry." Quimica Nova 32(6): 1620-1634.

PUBCHEM, NIH. National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine, 8600 Rockville Pike, Bethesda, MD20894, USA.
https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/7753#section=Information-Sources

RHIDIAN, R. 2011. "Running a risk? Sport supplement toxicity with ephedrine in an amateur marathon runner, with subsequent rhabdomyolysis." BMJ Case Rep 2011.

SALGADO, J. V. V., LOLLO, P. C. B., AMAYA-FARFAN, J., CHACON-MIKAHIL, M. P. T. 2014. Dietary supplement usage and motivation in Brazilian road runners. J Int Soc Sports Nutr. 11(1):41.

SAMANIN, R., GARATTINI, S. 1993. Neurochemical mechanism of action of anorectic drugs. Pharmacol Toxicol;73:63–8.

SANTOS, V. B., DANIEL, DANIELA., SINGH, M., LAGO, C. L. 2016. Amphetamine and derivatives in natural weight loss pills and dietary supplements by capillary electrophoresis-tandem mass spectrometry. Journal of Chromatography B, 1038. 19–25.

SILVA, A. A., MARINS, J. C. B. 2013. Consumo e nível de conhecimento sobre recursos ergonômicos nutricionais em atletas. Bioscience Journal. Vol. 29. N°4.

STRANO-ROSSI, S., ODOARDI, S., CASTRIGNANÒ, E., SERPELLONI, G., CHIAROTTI, M. 2015. "Liquid chromatography-high resolution mass spectrometry (LC-HRMS) determination of stimulants, anorectic drugs and phosphodiesterase 5 inhibitors (PDE5I) in food supplements." J Pharm Biomed Anal 106: 144-152.

SOLHEIM, S. A., NORDSBORG, N. B., RITZ, C., BERGET, J., KRISTENSEN, A. H., MØRKEBERG, J. 2017. Use of nutritional supplements by Danish elite athletes and fitness customers. Scand J Med Sci Sports. 27(8):801-808.

SWEETMAN, S. C. (Ed.) 2009. Martindale - The complete drug reference. 36th ed. p. 2156 - 2164.

TOXNET, Toxicology Data Network.

UEKUSA, K., ONO, T., HAYASHIDA, M., NIHIRA, M., OHNO, Y. 2009. "GC/MS analysis of an herbal dietary supplement containing ephedrine." Leg Med (Tokyo) 11 Suppl 1: S573-575.

USA (UNITED STATES OF AMERICA), 1994. Dietary Supplement Health and Education Act of 1994 (DSHEA). Public Law 103 e 417.

USFDA (U. S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION), 2009. Guidance for Industry: Evidence Based Review System for the Scientific Evaluation of Health Claims - Final.

VAYSSE, J., BALAYSSAC, S., GILARD, V., DESOUBDZANNE, D., MALET-MARTINO, M., MARTINO, R. 2010. "Analysis of adulterated herbal medicines and dietary supplements marketed for weight loss by DOSY 1H-NMR." Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess 27(7): 903-916.

VAYSSE, J., GILARD, V., BALAYSSAC, S., ZEDDE, C., MARTINO, R., MALET-MARTINO, M. 2012. "Identification of a novel sildenafil analogue in an adulterated herbal supplement." J Pharm Biomed Anal 59: 58-66.

VIANA, C., ZEMOLIN, G. M, MÜLLER, L. S., DAL MOLIN, T. R., SEIFFERT, H., DE CARVALHO, L. M. 2016. "Liquid chromatographic determination of caffeine and adrenergic stimulants in food supplements sold in Brazilian e-commerce for weight loss and physical fitness." Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess 33(1): 1-9.

WADA (WORLD ANTI-DOPING AGENCY), 2015. The 2015 monitoring program.

WANG, P., RASHID, M., LIU, J., HU, M., ZHONG, G. 2016. Identification of multi-insecticide residues using GC-NPD and the degradation kinetics of chlorpyrifos in sweet corn and soils. Food Chemistry 212:420-6.

WIENS, K., ERDMAN, K. A., STADNYK, M., PARNELL, J. A. 2014. Dietary supplement usage, motivation, and education in young, Canadian athletes. Int J Sport Nutr Exerc Metab. 24:614-23

XU, Y., JONES, J. E., LAUZON., D, A., ANDERSON., J. G., BALTHASAR, N., HEISLER, H. K., ZINN., A. R., LOWELL, B. B., ELMQUIST, J. K. 2010. "A serotonin and melanocortin circuit mediates D-fenfluramine anorexia." J Neurosci 30(44): 14630-14634.

ZENG, Y., XU, Y., KEE, C. L., LOW, M. Y., GE, X. 2016. Analysis of 40 weight loss compounds adulterated in health supplements by liquid chromatography quadrupole linear ion trap mass spectrometry. Drug Test Analysis. 8, 351–356.

ZION MARKET RESEARCH, 2017. Dietary Supplements Market by Ingredients (Botanicals, Vitamins, Minerals, Amino Acids, Enzymes) for Additional Supplements, Medicinal Supplements, and Sports Nutrition Applications - Global Industry Perspective, Comprehensive Analysis and Forecast, 2016 – 2022. https://www.zionmarketresearch.com/report/dietary-supplements-market.

ANEXOS

Anexo A – Questionário aplicado aos doadores das amostras de suplemento.

NOME DO SUPLEMENTO:

_____

FABRICANTE:

_____

DISTRIBUIDO:

_____

LUGAR DE FABRICAÇÃO:

_____

ORIGEM DOS INGREDIENTES:

_____

SABOR:

_____

DATA DE VALIDADE:

_____

LOTE:

_____

COMPOSIÇÃO:

_____

_____

_____

_____

_____

Anexo B – Histórico escolar

- Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial

FICHA DO ALUNO

9141 - 9179121/1 - Margarita Maria Muñoz Henao

Email:	margarita.maria@usp.br
Data de Nascimento:	21/03/1983
Cédula de Identidade:	RNE - G050638F - DF
Local de Nascimento:	Colômbia
Nacionalidade:	Colombiana
Graduação:	Químico - Universidad Del Quindio - Colômbia - 2005

Curso:	Mestrado
Programa:	Toxicologia e Análises Toxicológicas
Data de Matrícula:	17/12/2014
Início da Contagem de Prazo:	17/12/2014
Data Limite para o Depósito:	16/10/2017
Orientador:	Prof(a). Dr(a). Maurício Yonamine - 17/12/2014 até o presente. Email: yonamine@usp.br
Proficiência em Línguas:	Inglês, Aprovado em 17/12/2014 Português, Aprovado em 06/10/2015
Prorrogação(ões):	120 dias Período de 17/06/2017 até 15/10/2017
Data de Aprovação no Exame de Qualificação:	Aprovado em 05/02/2016
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 17/12/2014 Prorrogação em 29/05/2017

Aluno matriculado no Regimento da Pós-Graduação USP (Resolução nº 6542 em vigor a partir de 20/04/2013).

9141 - 9179121/1 - Margarita Maria Muñoz Henao

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
ICB5721-1/2	Organização Digital para Escrita Científica (Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo)	02/03/2015	12/04/2015	60	4	100	A	N	Concluída
FBA5729-4/2	Nutrição e Metabolismo na Atividade Física	03/03/2015	06/04/2015	75	0	-	-	N	Turma cancelada
FBC5802-3/6	Tópicos Avançados em Toxicologia I	03/03/2015	16/06/2015	15	1	100	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	14/06/2015	60	4	100	A	N	Concluída
FBC5814-6/1	Toxicologia Aplicada aos Alimentos	15/09/2015	05/10/2015	75	0	-	-	N	Matrícula cancelada
FBA5728-4/1	Aprimoramento Pedagógico	03/11/2015	30/11/2015	60	4	97	A	N	Concluída
Atividade do Programa	Participou da Etapa de Estágio Supervisionado em Docência do Programa de Aperfeiçoamento de Ensino junto à Disciplina FBC0426 Toxicologia Social, ministrada aos alunos de graduação do curso de Farmácia e Bioquímica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (1)	01/02/2016	30/06/2016	-	3	-	-	-	-
TNM5801-3/1	Princípios e Aplicações da Espectrometria de Massas (Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares - Universidade de São Paulo)	25/02/2016	18/05/2016	120	0	-	-	N	Matrícula cancelada

FBC5741-6/4	Análise Toxicológica de Fármacos e Drogas que Causam Dependência	02/05/2016	05/06/2016	60	4	100	A	N	Concluída
FBA5729-4/3	Nutrição e Metabolismo na Atividade Física	01/08/2016	04/09/2016	75	5	87	A	N	Concluída
FBC5758-3/1	Toxicologia dos Praguicidas	13/09/2016	24/10/2016	90	6	100	A	N	Concluída

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito da dissertação	
Disciplinas:	0	25	33
Estágios:			
Total:	0	25	33

Créditos Atribuídos à Dissertação: 71

Observações:

1) Créditos atribuídos de acordo com o disposto na Portaria GR-3588 e GR-4391 - PAE, de 31.08.09 e aprovados pela Comissão de Pós-Graduação, em Sessão de 20/10/2016.

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.

Anexo C – Currículo Lattes

Dados pessoais

Nome	Margarita Maria Muñoz Henao
Citações bibliográficas	HENAO, M. M. M.
Nascimento	21/03/1983
Endereço profissional	Universidade de São Paulo Faculdade de Ciências Farmacêuticas Avenida Professor Lineu Prestes, 580 Butantã, São Paulo 05508000, SP – Brasil Telefone: 11 30912194
Endereço eletrônico	maitamh83@gmail.com / margarita.maria@usp.br

Formação acadêmica/titulação

2014 **Mestrado em Toxicologia e Análises Toxicológicas**
Universidade de São Paulo – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, USP - FCF, Brasil
Título: Desenvolvimento e aplicação de método analítico para detecção de estimulantes em suplementos nutricionais adulterados.
Orientador: Prof. Dr. Mauricio Yonamine
Bolsista CNPq **–** Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

2011 **Especialização em Gerência do Meio Ambiente e Prevenção de Desastres**
Universidad Sergio Arboleda (Colômbia)

2005 **Graduação em Química**
Universidad del Quindio (Colômbia)

Experiência profissional

2017 **Aché Laboratórios**
(Setembro - Atualmente)
Principais atividades: Analista sênior de desenvolvimento analítico
Área de degradação forçada

2017 **Lisam Systems**
(Março – Setembro)
Cargo: Regulatory Affairs/Business Consultant

Principais atividades: Implementação de soluções e serviços de software de gerenciamento de conformidade Ambiental, Saúde e Segurança na América Latina.

2014 **Universidade de São Paulo (USP)**
Cargo: Prática profissionalizante
Principais atividades: Determinação de drogas de abuso em amostras de urina, usando LPME, SPME, Quechers e extração acelerada por solvente como técnicas de preparo de amostras e análise por GC-MS.

2010-2014 **Quasfar M&F S.A. (Colômbia)**

Cargo: Coordenadora Área de Estabilidades
Principais atividades: Planejamento experimental mensal da área de Estabilidades (Desenvolvimento e Validação de métodos, cumprimento dos tempos de Estudos de Estabilidades Acelerada e Natural); Avaliação de resultados fora de tendência dos estudos de Estabilidades; Avaliação mensal do cumprimento de entrega de relatórios ao cliente; Atendimento ao cliente como coordenadora responsável pela área de Estabilidades; Supervisão da equipe responsável pelo armazenamento e cuidado das amostras da área de Estabilidades; Elaboração de relatórios financeiros da área de Estabilidades demonstrando o cumprimento de metas e prazos em reuniões gerenciais realizadas mensalmente.

2007-2009 **Quasfar M&F S.A. (Colômbia)**
Cargo: Analista Sênior
Principais atividades: Desenvolvimento e validação de métodos analíticos utilizando cromatografia líquida (HPLC e UPLC); Avaliação de resultados e elaboração de relatórios.

2007 **Departamento de Investigaciones Judiciales de la Policía Nacional, DIJIN (Colômbia)**
Cargo: Perito Químico
Principais atividades: Análises de combustível.

Idiomas

Espanhol: Nativo
Português: Fluente
Inglês: Intermediário

Qualificações e atividades complementares

2016 **Pôster premiado com menção honrosa.**
Desenvolvimento e aplicação de método analítico para detecção de estimulantes em suplementos nutricionais adulterados.
5° ENQFOR (Encontro Nacional de Química Forense) - Congresso, Ribeirão Preto.

2016 **Comissão Organizadora V EITox (Escola de Inverno em Toxicologia)**
Universidade de São Paulo (USP).

2016 **Aula prática: Determinação de estimulantes em amostras de sangue**
V EITox (Escola de inverno em Toxicologia)
Universidade de São Paulo (USP).

2016 **Monitora: Toxicologia Social**
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo (USP).

2016 **Monitora: Toxicologia Forense**
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo (USP).

2015 **Comissão Organizadora I Curso de Toxicologia Forense**
Universidade de São Paulo (USP).

2015 **Palestra: Adulteração de produtos (alimentos/medicamentos)**
I Curso de Toxicologia Forense
Universidade de São Paulo (USP).