

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM VIGILÂNCIA SANITÁRIA
INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

Julia Rodrigues Martins Pastor dos Santos

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO DE TRIAGEM NA IDENTIFICAÇÃO DE
ANOREXÍGENOS, ESTIMULANTES E DIURÉTICOS NÃO DECLARADOS NA
ROTULAGEM DOS SUPLEMENTOS ALIMENTARES E EMAGRECEDORES
NACIONAIS**

Rio de Janeiro

2017

Julia Rodrigues Martins Pastor dos Santos

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO DE TRIAGEM NA IDENTIFICAÇÃO DE
ANOREXÍGENOS, ESTIMULANTES E DIURÉTICOS NÃO DECLARADOS NA
ROTULAGEM DOS SUPLEMENTOS ALIMENTARES E EMAGRECEDORES
NACIONAIS**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Vigilância Sanitária.

Orientadora: Katia Christina Leandro
Coorientador: André Luís Mazzei Albert

Rio de Janeiro

2017

Catálogo na fonte

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
Biblioteca

Santos, Julia Rodrigues Martins Pastor dos

Desenvolvimento de método de triagem na identificação de anorexígenos, estimulantes e diuréticos não declarados na rotulagem dos suplementos alimentares e emagrecedores nacionais / Julia Rodrigues Martins Pastor dos Santos. – Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2017.

209 f. ; il., tab.

Dissertação (Mestrado em Vigilância Sanitária) – Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz. 2017.

Orientadora: Katia Christina Leandro

Coorientador: André Luís Mazzei Albert

1. Depressores do Apetite. 2. Estimulantes do Apetite. 3. Diuréticos. 4. Suplementos Nutricionais. 5. Fármacos Antiobesidade. 6. Cromatografia Líquida de Alta Pressão. Título.

Development of a screening method for the identification of undeclared anorectics, stimulants and diuretics in the labeling of national dietary supplements and weight loss

Julia Rodrigues Martins Pastor dos Santos

DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO DE TRIAGEM NA IDENTIFICAÇÃO DE ANOREXÍGENOS, ESTIMULANTES E DIURÉTICOS NÃO DECLARADOS NA ROTULAGEM DOS SUPLEMENTOS ALIMENTARES E EMAGRECEDORES NACIONAIS

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Vigilância Sanitária.

Aprovado em ___/___/___

BANCA EXAMINADORA

Bernardete Ferraz Spisso (Doutora)
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Rosângela Sabbatini Capella Lopes (Doutora)
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Lucia Helena Pinto Bastos (Doutor)
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Katia Christina Leandro (Doutor) - Orientadora
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

André Luís Mazzei Albert (Doutor) - Coorientador
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Dedico este trabalho aos meus avós Elizabeth (in memoriam) e Joaquim e aos meus pais Alison e Joana.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela força concedida em mais essa etapa da minha caminhada.

Ao meu pai, Elison pelo cuidado, carinho e suporte.

À minha mãe Joana, pelos momentos dedicados aos cuidados comigo.

Aos meus avós, Joaquim e Elizabeth, pelo carinho.

Aos meus orientadores Katia Leandro e André Mazzei pela orientação, paciência e atenção.

Aos professores que participaram da apresentação no primeiro ano do mestrado e que aceitaram fazer parte da banca, pela disponibilidade e contribuições.

A secretaria de pós-graduação do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde.

Aos amigos do INCQS, Mychelle, Patrícia, Jorge e todos os amigos pelo incentivo.

Não deixe que a saudade sufoque, que a rotina acomode, que o medo impeça de tentar, pois o medo nos afasta das derrotas, mas das vitórias também.

(Autor desconhecido)

RESUMO

No mercado brasileiro existe a comercialização de produtos denominados como suplementos alimentares, alimentos funcionais e nutracêuticos. No entanto, não existe na legislação brasileira um marco regulatório específico para essas categorias. No Brasil, a fabricação e comercialização de produtos, substâncias e serviços de interesse para saúde são competências do Ministério da Saúde, através da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa). Existem diversas promessas relacionadas ao consumo de suplementos alimentares como benefícios à saúde, melhorias no desempenho corporal, combate ao envelhecimento, e, emagrecimento. Um dos riscos que os consumidores de suplementos alimentares estão expostos diz respeito à contaminação dos suplementos por substâncias que podem causar reações adversas ou problemas à saúde. Levando em consideração a variedade de suplementos alimentares disponíveis no mercado nacional e o consumo crescente, os casos de adulteração com substâncias medicamentosas, e ainda, devido aos poucos relatos na literatura de metodologias analíticas para a identificação dessas substâncias nos suplementos alimentares nacionais, especialmente aqueles destinados à perda de peso, faz-se necessário o desenvolvimento de um método de triagem que identifique essas substâncias com ação farmacológica. Portanto, para atender a necessidade do presente trabalho houve a necessidade de se construir um banco de dados das matérias-primas e desenvolver um método de triagem qualitativo para a análise de substâncias com propriedades farmacológicas: estimulantes, anorexígenas e diuréticas em amostras comerciais de suplementos nacionais. As etapas do trabalho consistiram no desenvolvimento que utilizou a centrifugação para extração das substâncias de interesse e pareamento iônico das mesmas com o sal heptanossulfonato de sódio, utilizando-se a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detector UV-VIS com DAD; aplicação do método que consistiu na análise de 15 amostras comerciais de suplementos alimentares destinados à perda de peso. O método mostrou-se adequado para as substâncias estudadas, apresentando uma eficiência de extração entre 70 e 120%, a técnica utilizada proporcionou separação, identificação e detecção das diferentes classes de substâncias monitoradas, fazendo com que o trabalho alcançasse o objetivo proposto. Através das análises constatou-se que a maioria das amostras está em desacordo com o declarado no rótulo.

Palavras-chave: Anorexígenos. Estimulantes. Diuréticos. Suplementos alimentares. HPLC-UV-DAD

ABSTRACT

In the Brazilian market there is the commercialization of products denominated as food supplements, functional foods and nutraceuticals. However, there is no specific regulatory framework for these categories in Brazilian law. In Brazil, the manufacture and marketing of products, substances and services of interest to health are competencies of the Ministry of Health, through the National Agency of Sanitary Surveillance (Anvisa). There are several promises related to the consumption of dietary supplements such as health benefits, improvements in body performance, anti-aging, and weight loss. One of the risks that food supplement consumers are exposed concerns the contamination of supplements with substances that may cause adverse reactions or health problems. Taking into account the variety of food supplements available in the national market and increasing consumption, cases of adulteration with medicinal substances, and also, due to the few reports in the literature of analytical methodologies for the identification of these substances in national food supplements, especially those destined for To weight loss, it is necessary to develop a screening method that identifies these substances with pharmacological action. Therefore, in order to meet the need of the present study, it was necessary to build a database of raw materials and to develop a qualitative screening method for the analysis of substances with pharmacological properties: stimulants, anorexigenics and diuretics in commercial samples of national supplements. The stages of the work consisted in the development that used the centrifugation for extraction of the substances of interest and ionic pairing of the same with the salt sodium heptanosulphonate, using the Liquid Chromatography of High Efficiency with detector UV-VIS with DAD; Application of the method which consisted of the analysis of 15 commercial samples of dietary supplements destined to weight loss. The method was adequate for the studied substances, presenting an extraction efficiency between 70 and 100%, the technique used provided separation, identification and detection of the different classes of monitored substances, making the work reach the proposed objective. Through the analyzes it was verified that the majority of the samples are in disagreement with the declared in the label.

Key-words: Anorexigenics. Stimulants. Diuretics. Food supplements. HPLC-UV-DAD

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Ilustração do termo nutracêutico.....	28
Figura 2 -	Divisão das categorias em alimentos e medicamentos.....	31
Figura 3 -	Classificação dos agonistas adrenérgicos.....	36
Figura 4 -	Estrutura da feniletilamina indicando os sítios de substituição e estrutura das matérias-primas similares a feniletilamina: femproporex, sinefrina, fenilefrina, anfepramona, efedrina, metanfetamina, clenbuterol, fenilpropanolamina, fenfluramina, salbutamol e terbutalina.....	37
Figura 5 -	Estrutura química das substâncias anorexígenas estudadas.....	39
Figura 6 -	Estrutura química dos diuréticos: hidroclorotiazida, clortalidona e furosemida.....	40
Figura 7 -	Equipamento básico de CLAE.....	45
Figura 8 -	Classificação das características de uma amostra.....	46
Figura 9 -	Mecanismos de separação em HPLC.....	46
Figura 10 -	Componentes de um espectrômetro de massas.....	50
Figura 11 -	Mecanismo de ionização da amostra por eletrospray.....	52
Figura 12 -	Desenho esquemático de um analisador do tipo TOF.....	54
Figura 13 -	Esquema do procedimento de extração nas amostras.....	61
Figura 14 -	Esquema da extração nas amostras SCBA, NUTRED e HBCO para avaliação da eficácia da extração.....	62
Figura 15 -	Representação do gradiente de eluição utilizando-se a coluna Phenomenex®.....	64
Figura 16 -	Representação do gradiente de eluição utilizando-se a coluna Ace®	64

- Figura 17 - Cromatograma referente à sobreposição das 17 substâncias analisadas individualmente: t_{R1} = hidroclorotiazida; t_{R2} = sinefrina; t_{R3} = fenilpropranolamina; t_{R4} = salbutamol; t_{R5} = terbutalina; t_{R6} = fenilefrina; t_{R7} = efedrina; t_{R8} = Clortalidona; t_{R9} = metanfetamina; t_{R10} = anfepramona; t_{R11} = femproporex; t_{R12} = clenbuterol; t_{R13} =mazindol; t_{R14} =fenfluramina; t_{R15} =furosemida; t_{R16} =sibutramina; t_{R17} =rimonabanto..... 70
- Figura 18 - (a) Cromatograma referente ao diuente; (b) cromatograma UV da mistura das 17 substâncias: t_{R1} = 14,6 (hidroclorotiazida); t_{R2} = 15,3 (sinefrina); t_{R3} = 16,1 (fenilpropranolamina); t_{R4} = 16,9 (salbutamol); t_{R5} = 17,3 (terbutalina); t_{R6} = 19,1 (fenilefrina); t_{R7} = 19,9 (efedrina); t_{R8} = 20,5 (Clortalidona); t_{R9} = 21,7 (metanfetamina); t_{R10} = 22,1 (anfepramona); t_{R11} = 22,6 (femproporex); t_{R12} = 24,3 (clenbuterol); t_{R13} = 26,5 (mazindol); t_{R14} = 27,0 (fenfluramina); t_{R15} = 27,7 (furosemida); t_{R16} = 28,5 (sibutramina); t_{R17} = 31,1 (rimonabanto); (c) Cromatograma DAD da mistura das substâncias..... 71
- Figura 19 - Cromatograma referente à sobreposição das 17 substâncias, t_{R1} = hidroclorotiazida; t_{R2} = sinefrina; t_{R3} = fenilpropranolamina; t_{R4} = salbutamol; t_{R5} = terbutalina; t_{R6} = fenilefrina; t_{R7} = efedrina; t_{R8} = Clortalidona; t_{R9} = metanfetamina; t_{R10} = anfepramona; t_{R11} = femproporex; t_{R12} = clenbuterol; t_{R13} = mazindol; t_{R14} = fenfluramina; t_{R15} = furosemida; t_{R16} = sibutramina; t_{R17} = rimonabanto..... 73
- Figura 20 - (a) Cromatograma vista normal UV-visível referente à análise do diluente (branco), (b) cromatograma referente à análise da sibutramina; (c) Cromatograma DAD referente à análise da sibutramina..... 74
- Figura 21 - (a) Cromatograma expandido UV-visível referente ao diluente (branco) em comparação a sibutramina (b); (c) Cromatograma DAD referente à análise da sibutramina..... 75
- Figura 22 - (a) Cromatograma do diluente; (b) cromatograma da mistura das 17 substâncias: t_{R1} = 11,613 (hidroclorotiazida); t_{R2} = 12,900 (sinefrina); t_{R3} = 14,450 (fenilpropranolamina); t_{R4} = 15,500 (salbutamol); t_{R5} = 15,890 (terbutalina); t_{R6} = 17,770 (fenilefrina); t_{R7} = 18,680 (efedrina); t_{R8} = 19,300 (Clortalidona); t_{R9} = 20,660 (metanfetamina); t_{R10} = 21,040 (anfepramona); t_{R11} = 21,580 (femproporex); t_{R12} = 23,410 (clenbuterol); t_{R13} = 26,880 (mazindol/furosemida); t_{R14} = 27,470 (fenfluramina); t_{R15} = 28,880 (sibutramina); t_{R16} = 31,080 (rimonabanto); (c) Cromatograma DAD da mistura das

substâncias.....	76
Figura 23 - Cromatograma referente ao salbutamol ($t_{R4}= 15,547$) e a terbutalina ($t_{R5}= 15,890$) na mistura das matérias-primas.....	77
Figura 24 - Cromatograma referente à metanfetamina ($t_{R9}= 20,667$), anfepramona ($t_{R10}= 21,037$) e femproporex ($t_{R11}= 21,580$) na mistura das matérias-primas.....	78
Figura 25 - Gráfico da resolução em função do fator de retenção (k').....	79
Figura 26 - Cromatograma vista real da sobreposição entre o cromatograma da amostra CVAP e o cromatograma da mistura de matérias-primas (hidroclorotiazida, sinefrina, fenilpropanolamina, salbutamol, terbutalina, fenilefrina, efedrina, clortalidona, metanfetamina, anfepramona, femproporex, clenbuterol, mazindol, fenfluramina, furosemida, sibutramina, rimonabanto).....	80
Figura 27 - Cromatograma vista expandida da sobreposição entre o cromatograma da amostra CVAP e o cromatograma da mistura de matérias-primas (hidroclorotiazida, sinefrina, fenilpropanolamina, salbutamol, terbutalina, fenilefrina, efedrina, clortalidona, metanfetamina, anfepramona, femproporex, clenbuterol, mazindol, fenfluramina, furosemida, sibutramina, rimonabanto).....	81
Figura 28 - (a) Cromatograma UV-Vis referente à amostra CVAP mostrando o pico em 274,97 nm da cafeína; (b) cromatograma por DAD referente à amostra CVAP.....	82
Figura 29 - (a) Cromatograma UV-Vis referente à amostra CVAP mostrando o pico em 277,26 nm da EGCG; (b) cromatograma por DAD referente à amostra CVAP.....	83
Figura 30 - (a) Cromatograma Uv/Vis (a); (b) cromatograma DAD referente à amostra TL12767.....	
Figura 31 - Cromatograma referente à sobreposição da mistura das substâncias (hidroclorotiazida, sinefrina, fenilpropanolamina, salbutamol, terbutalina, fenilefrina, efedrina, clortalidona, metanfetamina, anfepramona, femproporex, clenbuterol, mazindol, fenfluramina, furosemida, sibutramina, rimonabanto) e da amostra TL12767.....	85

Figura 32 - (a) Cromatograma UV-Vis; (b) cromatograma DAD referente à amostra TL0040.....	86
Figura 33 - Cromatograma referente à sobreposição da mistura das substâncias (hidroclorotiazida, sinefrina, fenilpropanolamina, salbutamol, terbutalina, fenilefrina, efedrina, clortalidona, metanfetamina, anfepramona, femproporex, clenbuterol, mazindol, fenfluramina, furosemida, sibutramina, rimonabanto) e da amostra TL0040.....	87
Figura 34 - (a) Cromatograma Uv-Vis; (b) cromatograma DAD referente à amostra TL0017.....	88
Figura 35 - Cromatograma referente à sobreposição da mistura das substâncias (hidroclorotiazida, sinefrina, fenilpropanolamina, salbutamol, terbutalina, fenilefrina, efedrina, clortalidona, metanfetamina, anfepramona, femproporex, clenbuterol, mazindol, fenfluramina, furosemida, sibutramina, rimonabanto) e da amostra TL0017.....	88
Figura 36 - (a) Cromatograma Uv-Vis; (b) cromatograma DAD referente à amostra TL0060.....	89
Figura 37 - Cromatograma referente à sobreposição da mistura das substâncias (hidroclorotiazida, sinefrina, fenilpropanolamina, salbutamol, terbutalina, fenilefrina, efedrina, clortalidona, metanfetamina, anfepramona, femproporex, clenbuterol, mazindol, fenfluramina, furosemida, sibutramina, rimonabanto) e da amostra TL0060.....	89
Figura 38 - Sobreposição entre a mistura das substâncias (hidroclorotiazida, sinefrina, fenilpropanolamina, salbutamol, terbutalina, fenilefrina, efedrina, clortalidona, metanfetamina, anfepramona, femproporex, clenbuterol, mazindol, fenfluramina, furosemida, sibutramina, rimonabanto) e a amostra OLB6307.....	91
Figura 39 - (a) Sobreposição dos cromatogramas UV/vis entre o branco e a amostra OLB6307; (b) Cromatograma DAD da amostra OLB6307.....	92
Figura 40 - (a) Cromatograma UV/Vis referente à amostra OLA6191 demonstrando a presença da cafeína; (b) cromatograma DAD.....	93
Figura 41 - (a) Cromatograma UV/Vis referente à amostra OLA6191	

demonstrando a presença da catequina EGCG; (b) cromatograma DAD.....	93
Figura 42 - Sobreposição entre os cromatogramas do branco (diluyente) e da amostra de quitosana 225/13.....	94
Figura 43 - Cromatograma referente à sobreposição entre o cromatograma da mistura das substâncias (hidroclorotiazida, sinefrina, fenilpropanolamina, salbutamol, terbutalina, fenilefrina, efedrina, clortalidona, metanfetamina, anfepramona, femproporex, clenbuterol, mazindol, fenfluramina, furosemida, sibutramina, rimonabanto) e da amostra de quitosana 225/13.....	95
Figura 44 - (a) Cromatograma da mistura das matérias-primas (hidroclorotiazida, sinefrina, fenilpropanolamina, salbutamol, terbutalina, fenilefrina, efedrina, clortalidona, metanfetamina, anfepramona, femproporex, clenbuterol, mazindol, fenfluramina, furosemida, sibutramina, rimonabanto); (b) cromatograma referente à amostra 224/13.....	96
Figura 45 - Espectro ultravioleta da matéria-prima rimonabanto.....	97
Figura 46 (a) Cromatograma do rimonabanto; (b) Espectro de massas de alta resolução do rimonabanto.....	97
Figura 47 - Comparação entre o cromatograma do branco (a) e da amostra SCBA (b).....	98
Figura 48 - (a) Cromatograma do diluyente (branco); (b) Cromatograma da amostra HBCO.....	100
Figura 49 - (a) Cromatograma do picolinato de cromo (III); (b) Espectro de massas do picolinato de cromo (III).....	100
Figura 50 - Cromatograma de íons extraídos na amostra HBCO e espectro de massas dos íons extraídos na amostra.....	102
Figura 51 - Espectro de massas da amostra HBCO.....	103
Figura 52 - Cromatograma referente à sobreposição da mistura das matérias-primas (hidroclorotiazida, sinefrina, fenilpropanolamina, salbutamol, terbutalina, fenilefrina, efedrina, clortalidona, metanfetamina, anfepramona, femproporex, clenbuterol, mazindol, fenfluramina,	

	furosemida, sibutramina, rimonabanto) e da amostra FADUX.....	106
Figura 53 -	Cromatogramas referentes: (a) branco; (b) mistura das matérias-primas (hidroclorotiazida, sinefrina, fenilpropanolamina, salbutamol, terbutalina, fenilefrina, efedrina, clortalidona, metanfetamina, anfepramona, femproporex, clenbuterol, mazindol, fenfluramina, furosemida, sibutramina, rimonabanto); (c) amostra FADUX.....	107
Figura 54 -	(a) Cromatograma UV/Vis referente à amostra FADUX; (b) cromatograma DAD da amostra FADUX.....	107
Figura 55 -	Cromatograma (vista normal) referentes à sobreposição da mistura das matérias-primas (hidroclorotiazida, sinefrina, fenilpropanolamina, salbutamol, terbutalina, fenilefrina, efedrina, clortalidona, metanfetamina, anfepramona, femproporex, clenbuterol, mazindol, fenfluramina, furosemida, sibutramina, rimonabanto) e da amostra CINI.....	108
Figura 56 -	Cromatograma (vista expandida) referente à sobreposição da mistura das matérias-primas (hidroclorotiazida, sinefrina, fenilpropanolamina, salbutamol, terbutalina, fenilefrina, efedrina, clortalidona, metanfetamina, anfepramona, femproporex, clenbuterol, mazindol, fenfluramina, furosemida, sibutramina, rimonabanto) e da amostra CINI.....	109
Figura 57 -	Cromatograma UV/Vis da amostra CINI; (b) cromatograma DAD da amostra CINI.....	110
Figura 58 -	Cromatograma referente à sobreposição do branco (diluyente), da mistura das matérias-primas (hidroclorotiazida, sinefrina, fenilpropanolamina, salbutamol, terbutalina, fenilefrina, efedrina, clortalidona, metanfetamina, anfepramona, femproporex, clenbuterol, mazindol, fenfluramina, furosemida, sibutramina, rimonabanto) e da amostra NUTRED.....	111
Figura 59 -	Cromatograma vista expandida referente à sobreposição do cromatograma da mistura das matérias-primas (hidroclorotiazida, sinefrina, fenilpropanolamina, salbutamol, terbutalina, fenilefrina, efedrina, clortalidona, metanfetamina, anfepramona, femproporex, clenbuterol, mazindol, fenfluramina, furosemida, sibutramina, rimonabanto) com a amostra NUTRED.....	112
Figura 60 -	(a) Cromatograma UV/Vis da amostra NUTRED; (b) cromatograma	

	DAD da amostra NUTRED.....	113
Figura 61 -	Cromatograma vista real referente à sobreposição da mistura das matérias-primas (hidroclorotiazida, sinefrina, fenilpropanolamina, salbutamol, terbutalina, fenilefrina, efedrina, clortalidona, metanfetamina, anfepramona, femproporex, clenbuterol, mazindol, fenfluramina, furosemida, sibutramina, rimonabanto) e da amostra IMCP.....	114
Figura 62 -	Cromatograma vista expandida referente à sobreposição da mistura das matérias-primas (hidroclorotiazida, sinefrina, fenilpropanolamina, salbutamol, terbutalina, fenilefrina, efedrina, clortalidona, metanfetamina, anfepramona, femproporex, clenbuterol, mazindol, fenfluramina, furosemida, sibutramina, rimonabanto) e da amostra IMCP.....	114
Figura 63 -	(a) Cromatograma UV/Vis da amostra IMCP; (b) Cromatograma DAD da amostra IMCP.....	115
Figura 64 -	Espectro de massas da cafeína referente à amostra IMCP.....	115

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 -	Categorias de alimentos funcionais, juntamente com exemplos de alimentos selecionados.....	25
Quadro 2 -	Alimentos com obrigatoriedade de registro sanitário e alimentos isentos de registro sanitário.....	31
Quadro 3 -	Categorias de alimentos, definição legal e exemplos de acordo com a legislação brasileira.....	32
Quadro 4 -	Classe das substâncias descritas usadas no esporte, efeitos desejados e efeitos adversos.....	40
Quadro 5 -	Classificação dos suplementos alimentares analisados com suas respectivas marcas, forma farmacêutica, descrição do conteúdo contido no rótulo e código do laboratório.....	58
	APÊNDICE	
Quadro 6	Técnicas realizadas em casa matéria-prima.....	129

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Resumo dos estudos realizados na análise de adulterantes em suplementos alimentares destinados a perda de peso e metodologias utilizadas.....	42
Tabela 2 -	Gradiente de eluição utilizando-se a coluna Phenomenex®, fase A: solução 0,1% de heptanosulfonato (p/v), fase C: acetonitrila e fluxo: 1mL/min.....	63
Tabela 3 -	Gradiente de eluição utilizando-se a coluna Ace®, fase A: solução 0,1% de heptanosulfonato (p/v) com pH 3,55, fase C: acetonitrila e fluxo: 1mL/min.....	64
Tabela 4 -	Ensaio da eficiência da extração da sinefrina, clortalidona e clenbuterol nas amostras SCBA, NUTRED e HBCO.....	69
Tabela 5 -	Características cromatográficas e espectrais de massa de compostos relacionados com gingerol detectados por LC-ESI-MS em extratos de gengibre.....	103

LISTA DE SIGLAS

ADA	American Dietetic Association
Anvisa	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CAD	Detector de aerossol carregado (<i>Charged Aerosol Detector</i>)
CCDC	Cromatografia em Camada Delgada Comparativa
CGAR	Cromatografia Gasosa de Alta Resolução
CG-EM	Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massa
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLUE	Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência
DAD	Detector de Arranjo de Diodos (<i>Diode Array Detector</i>)
DCT	Detector por Condutividade Térmica
DIC	Detector por Ionização de Chama
DIR	Detector por Índice de Refração
DMAA	Dimetilamilamina
DSHEA	Dietary Supplement Health and Education Act
EGCG	Epigallocatequina-3-galato
EM	Espectrometria de Massa
ESI	Ionização Eletrospray
EUA	Estados Unidos da América
FDA	Food and Drug Administration
Fiocruz	Fundação Oswaldo Cruz
Foshu	Foods For Specified Health Use
GC	Cromatografia Gasosa (<i>Gas Chromatography</i>)
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (<i>High Performance Liquid Chromatography</i>)
HPTLC	Cromatografia em Camada Fina de Alta Eficiência (<i>High Performance Thin Layer Chromatography</i>)
INCQS	Instituto de Controle de Qualidade em Saúde
IVTF	Infravermelho por Transformada de Fourier
LC	Cromatografia Líquida (<i>Liquid Chromatography</i>)
MS	Espectrometria de massas (<i>Mass spectrometry</i>)
OMS	Organização Mundial da Saúde

Q- TOF	Quadrupolo - Tempo de Voo
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
t _R (min)	Tempo de retenção em minutos
UCLAE	Ultra Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
UHPLC	<i>Ultra-High Pressure Liquid Chromatography</i> ou <i>Ultra-High Performance Liquid Chromatography</i>
UPLC	Cromatografia Líquida de Ultra Performance
UV	Ultravioleta
UV/Vis	Ultravioleta visível
WADA	World Anti-Doping Agency

SUMARIO

1 INTRODUÇÃO	22
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	24
2. 1 ALIMENTO FUNCIONAL.....	25
2.2 NUTRACÊUTICOS.....	27
2. 3 SUPLEMENTO ALIMENTAR.....	29
2.3.1 Controle Sanitário dos Suplementos Alimentares.....	29
2.4 AGONISTAS ADRENÉRGICOS.....	35
2.4.1 Estimulante.....	38
2.4.2 Anorexígenos.....	38
2.5 DIURÉTICOS.....	39
2.6 METODOLOGIAS ENCONTRADAS NA LITERATURA.....	41
2.7 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA.....	45
2.7.1 Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência.....	48
2.7.2 Pareamento Iônico.....	48
2.8 ESPECTROMETRIA DE MASSAS.....	49
2.8.1 Fonte de Ionização.....	51
2.8.2 Analisador de Massas.....	52
2.9 TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS.....	54
3 OBJETIVO	56
3.1 Objetivo Geral.....	56
3.2 Objetivos Específicos.....	56
4 METODOLOGIA	57
4.1 AMOSTRAGEM.....	57
4.2. EQUIPAMENTOS, MATERIAIS E REAGENTES.....	59
4.2.1 Equipamentos.....	59
4.2.2 Materiais.....	59
4.2.3 Solventes e Matérias-Primas.....	60
4.2.4 Preparo das Matérias-Primas.....	60
4.2.4.1 <i>Soluções das matérias-primas individuais</i>	60
4.2.4.2 <i>Preparo da mistura das matérias-primas</i>	60

4.2.5 Preparo das amostras.....	60
4.2.6 Teste de extração nas amostras SCBA, NUTRED e HBCO.....	62
4.2.7 Fase móvel.....	62
4.3 DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO ANALÍTICO DE TRIAGEM.....	63
5 RESULTADO E DISCUSSÃO.....	66
5.1 EFICIÊNCIA DA EXTRAÇÃO.....	68
5.2 RESULTADOS UTILIZANDO-SE A COLUNA PHENOMENEX®.....	69
5.3 RESULTADO UTILIZANDO-SE A COLUNA ACE®.....	72
5.4 RESULTADO DAS ANÁLISES DAS AMOSTRAS UTILIZANDO-SE A COLUNA PHENOMENEX®.....	79
5.4.1 RESULTADOS DAS AMOSTRAS DE CHÁ VERDE.....	79
5.4.1.1 Amostras CVAP, TL12767, TL0040, TL0017 e TL0060.....	79
5.4.1.2 Amostras OLB6307 e OLA6191.....	90
5.5 RESULTADOS DAS AMOSTRAS DE QUITOSANA.....	94
5.6 RESULTADO DA AMOSTRA SCBA.....	98
5.7 RESULTADO DA AMOSTRA HBCO.....	99
5.8 RESULTADO DA AMOSTRA FADUX.....	106
5.9 RESULTADO DA AMOSTRA CINI.....	108
5.10 RESULTADO DA AMOSTRA NUTRED.....	110
5.11 RESULTADO DA AMOSTRA IMCP.....	113
6 CONCLUSÃO.....	116
REFERÊNCIAS.....	118
APÊNDICE A - CARACTERIZAÇÃO DAS MATÉRIAS-PRIMAS.....	129

1 INTRODUÇÃO

O segmento de suplementos alimentares, alimentos funcionais e nutracêuticos têm alcançado cada vez mais adeptos no Brasil, uma vez que tem aumentado o interesse dos consumidores brasileiros no uso da alimentação como determinante importante da saúde (IKEDA, 2010; ANJO, 2004; LUIZETTO et al, 2015).

O aumento do poder de consumo do brasileiro, aliado à preocupação com a qualidade de vida, vem consolidando um cenário promissor para o mercado de alimentos, que possui seu faturamento estimado em R\$ 529 bilhões (ABIA, 2014). Uma rápida aceleração desse processo foi observada a partir da década de 1990, com destaque para as mudanças nos hábitos alimentares dos brasileiros a partir da implantação do plano Real (SILVA; PAULA, 2003).

Sousa e colaboradores (2007) distinguem dois grupos de consumidores orientados à saúde, sendo o primeiro utilitarista saudável, que busca componentes para uma vida com qualidade, e o segundo diestético, que busca um corpo perfeito e notou-se que a demanda de alimentos funcionais está presente nas duas práticas alimentares (SOUSA; LIMA-FILHO; ARAÚJO, 2007).

No Brasil, a fabricação e comercialização de produtos, substâncias e serviços de interesse para saúde são competências do Ministério da Saúde, através da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) (ANVISA, 1999a).

Os produtos apresentados em formas farmacêuticas fabricados no país ou importados devem ser regularizados como medicamentos ou alimentos de acordo com sua composição e finalidade de uso (SANTOS; FONTENELE, 2013). Quando comercializados como alimentos, podem ter obrigatoriedade de registro junto à Anvisa ou serem isentos, conforme determina a Resolução-RDC nº. 27/2010 (ANVISA, 2010b).

A legislação brasileira não define termos como suplemento alimentar, nutracêutico e alimento funcional. Os produtos conhecidos como suplementos alimentares são comercializados no Brasil com diferentes classificações levando a um cenário que pode confundir os consumidores (SANTOS; FONTENELE, 2013).

Um dos riscos a que os consumidores de suplementos alimentares estão expostos diz respeito à contaminação dos suplementos por substâncias que podem

causar reações adversas ou problemas à saúde: efeitos tóxicos, especialmente no fígado, disfunções metabólicas, danos cardiovasculares, alterações do sistema nervoso e, em alguns casos, podendo levar até a morte (PARRA; PIERUCCI, 2011).

Levando em consideração a variedade de suplementos alimentares disponíveis no mercado nacional, os casos de adulteração com substâncias medicamentosas, e ainda, devido aos poucos relatos na literatura de metodologias analíticas para a identificação dessas substâncias nos suplementos alimentares nacionais, especialmente aqueles destinados à perda de peso, faz-se necessário o desenvolvimento de um método de triagem que identifique essas substâncias com ação farmacológica, para que se possa garantir a segurança dos suplementos disponíveis para a população. (VAN DER MERWE; GROBBELAAR, 2005; GEYER et al, 2004; CATLIN et al, 2000; BAUME et al, 2006; KAMBER et al, 2001; REBIERE et al, 2012).

Existe também a questão relacionada ao *doping* para os atletas, fazendo com que o rastreamento de substâncias com propriedades farmacológicas e proibidas em suplementos alimentares comercializados como alimentos seja de extrema importância (PARRA; PIERUCCI, 2011).

Portanto, para atender a necessidade do presente trabalho foi necessário construir-se um banco de dados das matérias-primas e desenvolver um método de triagem para a análise de substâncias com propriedades farmacológicas em amostras comerciais de suplementos nacionais utilizando a técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detector UV-VIS com arranjo de diodos (HPLC-UV/VIS-DAD).

Muitos métodos têm sido relatados na literatura científica para detecção de substâncias anorexígenas e emagrecedoras em suplementos alimentares; entretanto, não há relatos de métodos analíticos de triagem para determinação simultânea de 17 substâncias em suplementos alimentares nacionais. Além disso, a HPLC-UV/VIS-DAD é uma técnica com alta sensibilidade e capacidade qualitativa.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

De acordo com o Decreto-Lei nº 986/1969 considera-se alimento “Toda substância ou mistura de substâncias, no estado sólido, líquido, pastoso ou qualquer outra forma adequada, destinada a fornecer ao organismo humano os elementos normais à sua formação, manutenção e desenvolvimento” (BRASIL, 1996).

No Brasil, a regulamentação dos alimentos, desde a sua obtenção até o seu consumo, assim como, a defesa e a proteção da saúde individual ou coletiva são realizadas em todo território nacional pela Anvisa (BRASIL, 1999a).

Historicamente, a utilização de determinados alimentos na prevenção de doenças é considerada há milhares de anos. Há cerca de 2500 anos, Hipócrates já recomendava o uso de alimentos para fins medicamentosos como pode ser observado em uma de suas célebres frases: "Let food be the medicine and medicine be the food", que resumidamente quer dizer: "Faça do alimento o seu medicamento". Porém, somente na década de 90, o interesse pelo assunto aumentou e foi quando o termo “alimento funcional” passou a ser adotado (MONTEIRO; MARIN, 2015).

A indústria tem utilizado termos derivados de alimentos funcionais, que muitas vezes se sobrepõem (LIRA et al, 2009). Frequentemente aparecem nos meios de comunicação termos como suplementos alimentares, nutracêuticos e alimentos funcionais, os quais têm como promessa benefícios à saúde, melhor desempenho corporal e até mesmo o combate ao envelhecimento. Cada vez mais a população brasileira vem procurando ter uma alimentação saudável e, com isso, esses produtos vêm ganhando força no mercado de alimentos (IKEDA, 2010).

Os alimentos funcionais e os nutracêuticos comumente têm sido considerados sinônimos; porém, os alimentos funcionais devem estar na forma de alimento comum, serem consumidos como parte da dieta e produzir benefícios específicos à saúde, tais como a redução do risco de doenças e a manutenção do bem-estar físico e mental (IKEDA, 2010).

Em 1989 foi introduzido o termo nutracêutico, que se refere a alimentos ou parte dos alimentos que apresentam benefícios à saúde, incluindo a prevenção e/ou tratamento de doenças, podendo abranger desde os nutrientes isolados até alimentos processados (ANJO, 2004).

2.1 ALIMENTO FUNCIONAL

O termo alimento funcional surgiu no Japão em torno de 1980, quando o governo japonês deu início a um programa de redução de custos com seguro-saúde e medicamentos, principalmente para a população que estava envelhecendo e procurou incentivar qualquer forma de melhorar a saúde. Foi implantado o programa Foshu (*Foods for Specified Health Use* - comida para uso específico de saúde), no qual se avaliavam alimentos comprovadamente benéficos para saúde da população com funções específicas no organismo (IKEDA, 2010).

De acordo com Franco (2006) ainda não existe um consenso a respeito da definição oficial para alimentos funcionais. A *American Dietetic Association* (ADA), maior organização de alimentos e profissionais de nutrição dos EUA, classifica alimentos funcionais como alimentos convencionais, alimentos modificados (fortificados ou enriquecidos) e alimentos usados em dietas especiais (FRANCO, 2006; POSITION, 2009).

Quadro 1- Categorias de alimentos funcionais, juntamente com exemplos de alimentos selecionados.

Alimento funcional por categoria	Exemplo de alimento funcional
Alimentos convencionais	Alho Nozes Tomate
Alimentos modificados	
Fortificado	Suco de laranja fortificado com cálcio Sal iodado
Enriquecido	Pães enriquecidos com folato
Aprimorado	Barras energéticas, iogurtes, chás e outros alimentos funcionais formulados com componentes bioativos, como a luteína, óleos de peixe, Ginkgo biloba, erva de São João.
Alimentos médicos	Fórmulas livres de fenilalanina para fenilcetonúricos.
Alimentos para uso dietético especiais	Alimentos infantis Alimentos hipoalergênicos, tais como alimentos sem glúten e alimentos sem lactose Alimentos para perda de peso.

Fonte: Adaptado de POSITION (2009).

Nos EUA alimentos funcionais não são oficialmente reconhecidos como uma categoria de regulamentação pela *Food and Drug Administration* (FDA). Já a Comissão Europeia considera um alimento como funcional aquele que, além dos efeitos nutricionais, tem uma ou mais funções benéficas para o organismo relevante para a melhoria do estado de saúde, bem-estar e/ou redução do risco de doença.

Nesse contexto, alimentos funcionais não podem ser encontrados na forma de comprimidos ou cápsulas, mas sim nos alimentos em quantidades que podem ser normalmente consumidos na dieta (CROWE, 2013).

Os alimentos funcionais não curam doenças, como os medicamentos, esses apresentam componentes ativos capazes de prevenir ou reduzir o risco de algumas delas. Dentre os benefícios mais investigados, está a melhoria do sistema imunológico, redução do risco de doenças cardiovasculares, câncer, hipertensão, diabetes, certas afecções reumáticas e mal de Alzheimer (ABCFARMA, 2014).

O Ministério da Saúde, por meio da Anvisa, em 1999, regulamentou alimento funcional através de quatro resoluções (Resoluções n. 16, 17, 18 e 19) e instituiu uma Comissão Técnico-Científica de Assessoramento em Alimentos Funcionais e Novos Alimentos (CTCAF) (ANVISA, 1999c, 1999d, 1999e, 1999f). Essa Comissão tem por finalidade prestar consultoria e assessoramento relacionados a alimentos funcionais e novos alimentos, segurança de consumo e alegações em rótulos (ANVISA, 1999f).

A Resolução nº. 16, de 30 de abril de 1999, aprova o regulamento técnico que estabelece o procedimento para registro de alimentos e/ou novos ingredientes. Por meio dela, o Brasil define novos alimentos/ingredientes como alimentos ou substâncias sem histórico de consumo no País, ou alimentos com substâncias já consumidas, e que, entretanto, venham a ser adicionadas ou utilizadas em níveis muito superiores aos atualmente observados nos alimentos utilizados na dieta regular (ANVISA, 1999c). A Resolução nº. 17 estabelece as diretrizes básicas para avaliação de risco e segurança dos alimentos (ANVISA, 1999d).

A Anvisa estabeleceu diretrizes básicas para análise e comprovação de propriedades funcionais e/ou de saúde alegadas em rotulagem de alimentos (ANVISA, 1999e) e o regulamento de procedimentos para registro de alimentos com alegação de propriedades funcionais e/ou de saúde em sua rotulagem (ANVISA, 1999f).

De acordo com a resolução nº 19, de 30 de abril de 1999, alegação de propriedade funcional é aquela relativa ao papel metabólico ou fisiológico que o nutriente ou não nutriente tem no crescimento, desenvolvimento, manutenção e outras funções normais do organismo humano. A alegação de propriedade de saúde é aquela que afirma, sugere ou implica a existência da relação entre o alimento ou

ingrediente com doença ou condição relacionada à saúde. Não são permitidas alegações que façam referência à cura ou à prevenção de doenças (FRANCO, 2006).

Considerando a possibilidade de efeitos benéficos de nutrientes e de substâncias bioativas dos alimentos e os possíveis efeitos adversos, a curto ou longo prazo, a possibilidade de ocorrência de interações entre as substâncias bioativas e nutrientes ou não nutrientes no organismo, com efeitos indesejáveis à saúde, a Anvisa aprovou o Regulamento Técnico para avaliação de segurança, registro e comercialização de Substâncias Bioativas e Probióticos Isolados com Alegação de Propriedades Funcional e ou de Saúde (ANVISA, 2002).

De acordo com esse regulamento considera-se substância bioativa, além dos nutrientes, os não nutrientes que possuem ação metabólica ou fisiológica específica. A substância bioativa deve estar presente em fontes alimentares, de origem natural ou sintética, desde que comprovada a segurança para o consumo humano. São classificadas em carotenoides; fitoesteróis; flavonoides; fosfolípidos; organosulfurados; polifenóis; probióticos (ANVISA, 2002).

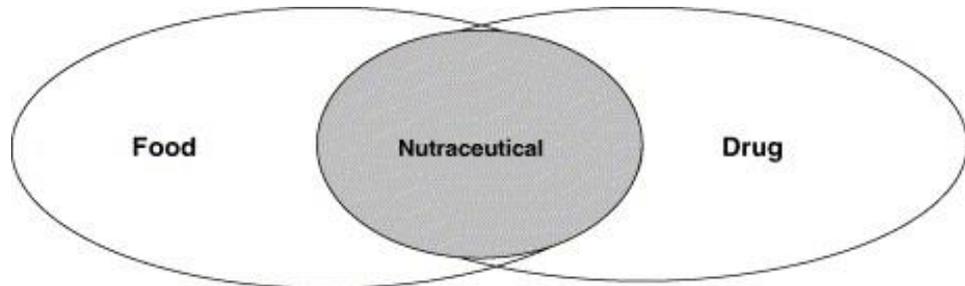
Muitas substâncias bioativas vêm sendo comercializadas na forma de produtos farmacêuticos, como cápsulas, soluções, géis, pós e granulados. Esses produtos não podem ser classificados como alimentos, então o termo híbrido nutracêuticos, de nutrientes e farmacêuticos foi criado pela *Foundation for Innovation in Medicine* dos EUA em 1990 (GULATI; OTTAWAY, 2006).

2.2 NUTRACÊUTICOS

O termo nutracêutico foi originalmente usado por Defelice e definido como: "Um alimento ou partes de alimentos que fornecem benefícios medicinais, incluindo a prevenção e/ou tratamento da doença" (DEFELICE, 1995).

Os nutracêuticos se encontram na interseção de alimentos e medicamentos, como pode-se observar na figura 1 (GULATI; OTTAWAY, 2006).

Figura 1- Ilustração do termo nutracêutico



Fonte: Adaptado de Gulati e Ottaway (2006).

Grande parte do desenvolvimento inicial do conceito e de produtos nutracêuticos foi impulsionado pelos EUA, onde desde a sua introdução em 1994, o *Dietary Supplement and Health Education Act* (DSHEA) permitiu uma considerável flexibilidade dos limites entre os alimentos e medicamentos.

Nos Estados Unidos, o termo nutracêutico não é reconhecido oficialmente. Porém, por suas características, um nutracêutico pode se enquadrar como um suplemento dietético – “Um alimento, na sua forma não convencional, que provê um componente para suplementar a dieta através do aumento total da ingestão diária deste componente” (GULATI; OTTAWAY, 2006).

Dentro da União Europeia o direito à qualificação jurídica de um nutracêutico é, em geral, feito com base nos seus efeitos sobre o organismo. Assim, se a substância contribui apenas para a manutenção da saúde, tecidos e órgãos pode ser considerado um componente alimentar. Se, no entanto, for demonstrado que tem um efeito modificador em um ou mais processos fisiológicos do organismo, pode ser considerado um medicamento (GULATI; OTTAWAY, 2006).

No Brasil, a Anvisa não reconhece o termo nutracêutico. A RDC nº 2, de 2002, é a resolução que mais se aproxima a nutracêuticos, definindo substância bioativa como nutrientes ou não nutrientes que possuem ação metabólica ou fisiológica específica, presente em fontes alimentares, seja de origem natural ou sintética, desde que comprovada a segurança para o uso humano. Não pode ter finalidade medicamentosa ou terapêutica, qualquer que seja a forma de apresentação ou o modo como é administrado (ANVISA, 2002).

2.3 SUPLEMENTO ALIMENTAR

Suplementos nutricionais, dietéticos ou alimentares podem ser definidos como fontes concentradas de nutrientes ou outras substâncias com um efeito nutricional ou fisiológico, comercializados em forma doseada, com o objetivo de complementar a dieta normal (EC, 2002).

No Brasil suplementos alimentares são compostos vitamínicos ou de minerais que servem para complementar a dieta diária de uma pessoa saudável, em casos onde sua ingestão diária a partir da alimentação, seja insuficiente ou quando a dieta requerer suplementação (NEVES; CALDAS, 2015).

Nos EUA, o DSHEA enquadra os suplementos alimentares como alimentos, os quais são regulados de forma menos rigorosa do que medicamentos. De acordo com o DSHEA, suplementos alimentares podem conter vitaminas, minerais, ervas, aminoácido, ou uma substância para suplementar a dieta por aumento da ingestão total, ou um concentrado, metabólito, constituinte, extrato ou combinação de qualquer destes ingredientes. Assim, muitas substâncias com ações farmacológicas podem ser regularmente vendidas como suplementos alimentares nos EUA (NEVES; CALDAS, 2015).

2.3.1 Controle Sanitário dos Suplementos Alimentares

No Brasil o campo da regulamentação e a produção de normas foi ampliado devido ao processo de industrialização. A criação dos centros de pesquisas e dos laboratórios de saúde pública contribuiu para a prática da Vigilância Sanitária. Nos Estados Unidos, por exemplo, a produção industrial de alimentos e de medicamentos cresceu juntamente com muitas denúncias de adulteração e falsificação de produtos e de utilização abusiva de conservantes. As análises laboratoriais disponíveis para o público foram essenciais para a movimentação popular em busca por medidas de proteção à saúde, resultando na ampliação da legislação de controle (MERCOSUL, 2000; ROSENFELD, 2009).

Segundo a Constituição Federal de 1988, a saúde é um direito de todos e um dever do Estado. E nessa concepção se incluem as ações de Vigilância Sanitária. A Lei nº 8.080, de 19 de setembro de 1990, chamada Lei Orgânica da Saúde, organiza

o Sistema Único de Saúde (SUS) e definiu a Vigilância Sanitária como “um conjunto de ações capaz de eliminar, diminuir, ou prevenir, riscos à saúde e de intervir nos problemas sanitários decorrentes do meio ambiente, da produção e circulação de bens e da prestação de serviços de interesse da Saúde” (BRASIL, 1990; ROSENFELD, 2009).

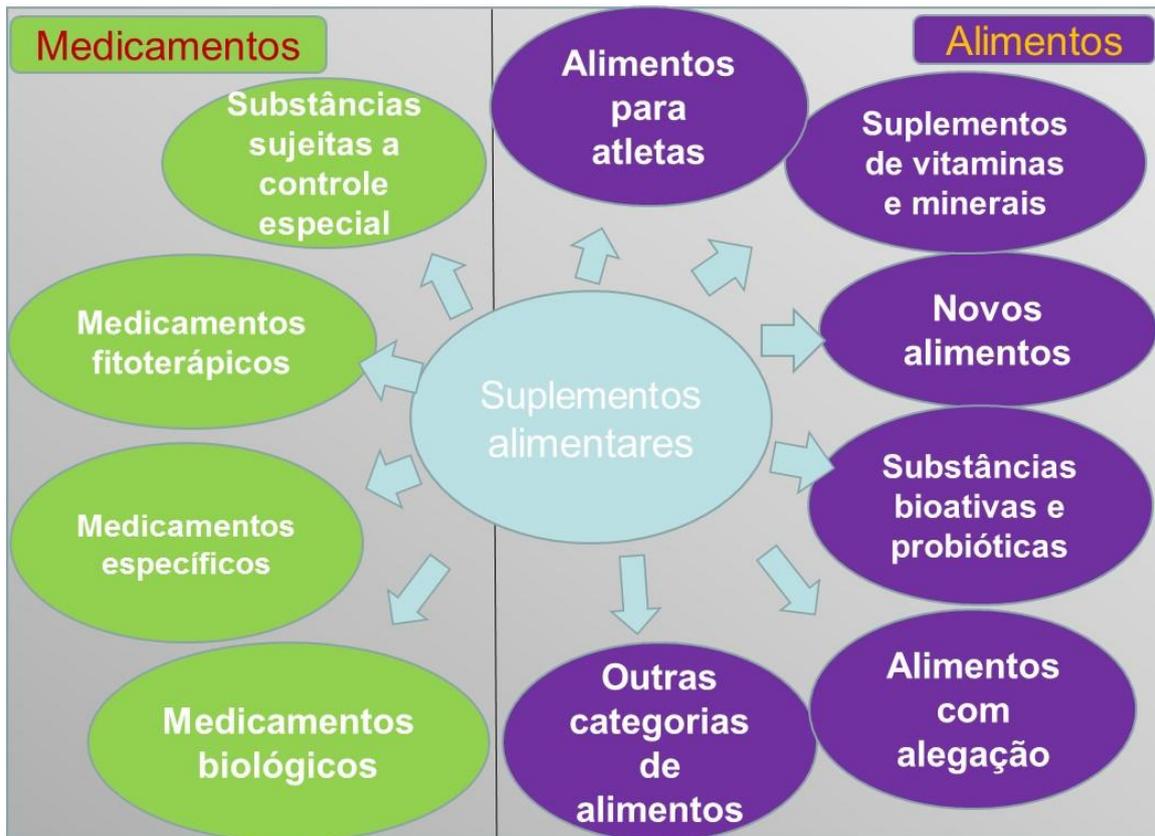
De acordo com a Lei nº 9.782, de 26 de janeiro de 1999, a Anvisa é o órgão brasileiro de fiscalização e controle na área de vigilância sanitária, que através de portarias e resoluções regulamenta os alimentos com alegações funcionais, onde se enquadrariam os suplementos alimentares (BRASIL, 1999a).

Devido a um quadro jurídico menos restritivo, um suplemento alimentar que está disponível livremente nos EUA pode ser considerado um medicamento ou mesmo ser proibido na União Europeia e no Brasil, dando origem a um mercado clandestino (NEVES; CALDAS, 2015).

Existem diversas substâncias que são autorizadas em outros países, mas proibidas no Brasil. A internet possibilita o acesso a diversos produtos de variadas marcas, os quais nem sempre atendem à legislação brasileira, mas são comercializados pela internet e também podem ter sido adquiridos por meio da importação para consumo próprio, mesmo que esses produtos não estejam regularizados na Anvisa. No entanto, esses suplementos não podem ser importados com finalidade de revenda ou conter substâncias sujeitas a controle especial ou proscritas no país, como é o caso da substância dimetilamilamina (DMAA) presente em alguns suplementos alimentares, a qual é um estimulante utilizado, principalmente, no auxílio ao emagrecimento, aumento do rendimento atlético e como droga de abuso e, está associada a relatos de vários países de efeitos adversos (ANVISA, 2012).

A legislação brasileira não define a categoria “suplemento alimentar”. Esses produtos quando comercializados no Brasil, fabricados no país ou importados, devem ser regularizados como medicamentos ou alimentos de acordo com sua composição e finalidade de uso (ANVISA, 1999e). Na figura 2 pode-se observar a divisão das categorias segundo a Anvisa.

Figura 2 – Divisão das categorias em alimentos e medicamentos.



Fonte: Anvisa, 2016.

As diferentes categorias de alimentos podem ser isentas ou não da obrigatoriedade de registro sanitário de acordo com a resolução-RDC nº 27, de 6 de agosto de 2010, e estão descritas no quadro 2 (ANVISA, 2010b).

Quadro 2 - Alimentos com obrigatoriedade de registro sanitário e alimentos isentos de registro sanitário.

Alimentos isentos da obrigatoriedade de registro sanitário

Alimentos para controle de peso;
Alimentos para atletas;
Suplemento vitamínico ou mineral.

Alimentos com obrigatoriedade de registro sanitário

Alimentos com alegações de propriedade funcional e/ou de saúde;
Novos alimentos e novos ingredientes;
Substâncias bioativas e probióticos isolados.

Fonte: Anvisa, 2010.

Um resumo das principais categorias de alimentos que são semelhantes aos suplementos alimentares, suas definições legais e as normas reguladoras estão descritos no quadro 3.

Quadro 3 - Categorias de alimentos, definição legal e exemplos de acordo com a legislação brasileira.

Categoria	Definição legal e exemplos	Legislação
Alimentos para atletas	Especialmente formulados para auxiliar os atletas a atender suas necessidades nutricionais específicas e auxiliar no desempenho do exercício. Exemplos: whey protein, creatina, aminoácidos de cadeia ramificada, cafeína.	RDC 18/2010
Suplementos vitamínicos e/ou minerais	Alimentos que servem para contemplar com vitaminas e / ou minerais a dieta diária de uma pessoa saudável.	Portaria nº 32/1998
Alimentos com alegação de propriedades funcionais e ou de saúde	Alegação de propriedades funcionais: papel metabólico ou fisiológico sobre o crescimento, desenvolvimento, manutenção e outras funções normais do organismo humano. Alegação de propriedade de saúde: é aquela que sugere existência de relação entre o alimento ou ingrediente com doença ou condição relacionada à saúde Exemplos: produtos que contenham fitoesteróis, omega-3, luteína e licopeno, inulina, quitosana.	RDC 18/1999
Novos alimentos e ou novos ingredientes	Alimentos ou substâncias sem histórico de consumo no país, ou alimentos com substâncias já consumidas, e que venham a ser adicionadas ou utilizadas em níveis muito superiores aos atualmente observados nos alimentos utilizados na dieta regular. Exemplos: óleo de peixe, lecitina de soja, extrato de guaraná em cápsulas.	RDC 16/1999
Substâncias Bioativas e Probióticos Isolados com alegação de propriedades funcional e ou de saúde	Substância Bioativa: além dos nutrientes, os não nutrientes que possuem ação metabólica ou fisiológica específica. Probiótico: microrganismos vivos capazes de melhorar o equilíbrio microbiano intestinal, como por exemplo, <i>Bifidobacterium sp.</i>	RDC 02/2002
Alimentos para controle de peso	São os alimentos que apresentam composição definida para suprir parcialmente as necessidades nutricionais do indivíduo e que sejam destinados a propiciar redução, manutenção ou ganho de peso corporal, como por exemplo, os <i>shakes</i> .	Portaria nº 30/1998

Fonte: Anvisa, 1998a, 1998b, 1999c, 1999e, 2010a, 2002.

De acordo com o disposto pela Resolução RDC nº. 18/2010 os Alimentos para Atletas não podem conter substâncias estimulantes, hormônios ou outras consideradas como *doping* contidas na lista de substâncias proibidas pela Agência Mundial Antidoping (WADA) e substâncias com ação terapêutica. Essa restrição é válida para todas as categorias de alimentos (ANVISA, 2010a).

Souza e colaboradores (2014) correlacionaram as categorias em que os produtos foram registrados na Anvisa com a categoria definida pelo fabricante para comercialização em *websites*. As pesquisas mostraram que os produtos comercializados apresentam classificações diferentes das categorias regulamentadas pela Anvisa (SILVA; FERREIRA, 2014).

Identificaram-se cinco categorias com base nas alegações apresentadas nos rótulos:

1) produtos à base de fitoterápicos/alimentos funcionais; 2) produtos à base de vitaminas e minerais; 3) alimentos fontes de energia; 4) produtos para emagrecimento; e 5) produtos para hipertrofia muscular. Essas categorias, porém, são de responsabilidade do fabricante e não são as mesmas da Anvisa (SILVA; FERREIRA, 2014).

Verificou-se que 63% de todos os tipos de suplementos foram comercializados com a finalidade de emagrecimento e hipertrofia muscular. De acordo com o registro na Anvisa, verificou-se que 80% dos produtos foram registrados nas categorias de Alimentos para atletas, Novos alimentos e novos ingredientes e Suplementos Vitamínicos e Minerais. Foi observado também que a categoria “Novos alimentos e novos ingredientes” foi a segunda categoria com maior quantidade de registro no país (SILVA; FERREIRA, 2014).

Para muitos consumidores os produtos que alegam emagrecimento são ditos “suplementos emagrecedores”, provavelmente devido à expansão da oferta de produtos comercializados como suplementos (SILVA; FERREIRA, 2014).

Existem inúmeros relatos da Anvisa e também de órgãos internacionais a respeito da adulteração de suplementos alimentares. De 2007 a 2014, a agência de controle de alimentos e medicamentos dos Estados Unidos, do inglês *Food and Drug Administration* (FDA), relatou 572 casos de adulteração em suplementos no país (NEVES; CALDAS, 2015).

Dados do Sistema de Alerta Rápido da União Europeia para a alimentação humana e animal mostrou 929 adulterações durante o mesmo período, mais de 40% devido a ingredientes não autorizados ou medicamentos não declarados. De 2007 a 2013, o Departamento de Polícia Federal do Brasil apreendeu 5470 produtos de suplemento, 92,2% de origem americana. A análise química qualitativa realizada em 2898 produtos encontrou 180 adulterações, 41,1%, devido a fármacos não declarados (NEVES; CALDAS, 2015).

Alertas sobre recall de alguns produtos não regularizados têm sido emitidos pela Anvisa. Em novembro de 2014 a Anvisa emitiu um alerta sobre a presença de substâncias proibidas no suplemento Mayhem. O motivo do recall foi a detecção, pelo laboratório de análises do FDA, das substâncias medicamentosas dexametasona e ciproheptadina, não declaradas no rótulo do produto. O produto em questão não atende à legislação brasileira, no que diz respeito à avaliação de segurança, mas é comercializado na internet e também pode ser adquirido por meio da importação direta por consumidores (ANVISA, 2014).

Em janeiro de 2015 a Anvisa publicou em seu site um alerta aos consumidores sobre a constatação da presença de medicamentos em suplementos chamados B-Lipo Capsules e Slim-K Capsules. O motivo do recall foi a detecção pelo laboratório de análises do FDA das substâncias medicamentosas lorcaserina (no produto B-Lipo Capsules) e sibutramina, desmetilsibutramina e fenolftaleína (no produto Slim-K Capsules), não declaradas nos rótulos dos produtos. O FDA determinou o recall dos produtos e a empresa suspendeu a distribuição. Os produtos são comercializados nos EUA como “suplementos naturais à base de ervas para emagrecimento” e mesmo não estando regularizados no Brasil, podem ser importados para uso pessoal (ANVISA, 2015).

As substâncias geralmente associadas à adulteração de suplementos alimentares destinados à perda de peso incluem anoréxicos como sibutramina, orlistat, dietilpropiona (amfepramona), rimonabanto, femproporex, fentermina e mazindol, estimulantes (efedrina, norefedrina e sinefrina), ansiolíticos (principalmente benzodiazepínicos como o diazepam), antidepressivos (fluoxetina e sertralina), diuréticos (tais como furosemida e Hidroclorotiazida) e laxantes (fenolftaleína) (CARVALHO et al, 2011).

Levando em consideração os relatos de adulteração, esta dissertação aborda substâncias anorexígenas como: femproporex, metanfetamina, mazindol, sibutramina, anfepramona, fenfluramina e rimonabanto; estimulantes: sinefrina, fenilefrina, efedrina e clenbuterol, salbutamol, terbutalina e fenilpropanolamina; diuréticas: clortalidona, furosemida e hidroclorotiazida (AUTORIDADE BRASILEIRA CONTROLE DE DOPAGEM, 2016).

2.4 AGONISTAS ADRENÉRGICOS

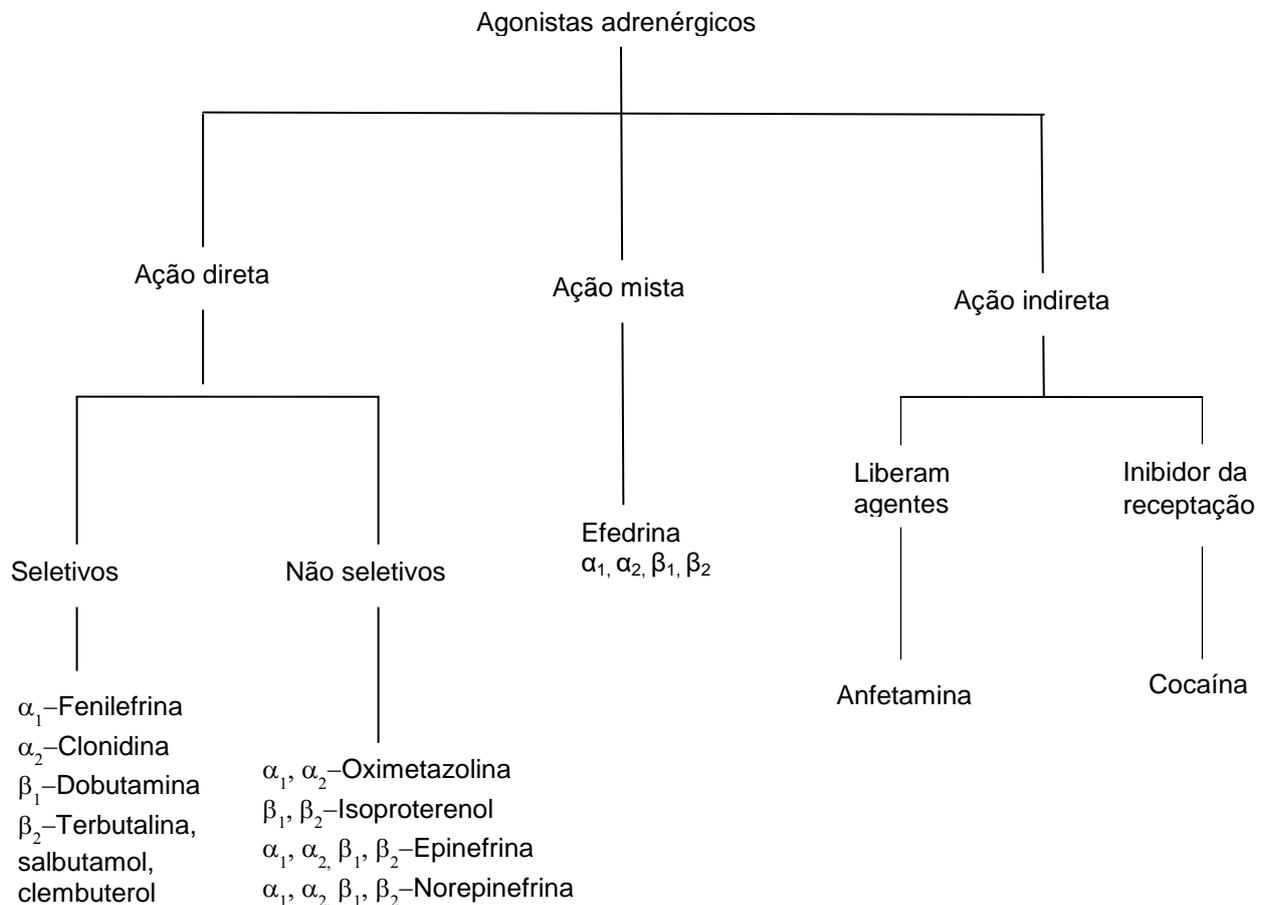
Os receptores adrenérgicos são ativados por seus ligantes endógenos, as catecolaminas: adrenalina e noradrenalina. Os agonistas adrenérgicos são moléculas orgânicas que se ligam à classe de receptores adrenérgicos, os quais são acoplados à proteína G (GOODMAN; GILMAN, 2005).

A ligação de um agonista geralmente causará uma resposta simpática, caracterizada por ações tais como: regulação da frequência cardíaca, aumento da pressão arterial, degradação dos triglicerídeos e ações sobre o sistema nervoso central (SNC) como a redução do apetite (GOODMAN; GILMAN, 2005).

Os agonistas adrenérgicos podem ser classificados de acordo com o tipo de receptor a que se ligam, estimulando ou inibindo diferentes respostas fisiológicas. Desta forma, existem dois grupos de receptores adrenérgicos α e β , os quais apresentam vários subtipos demonstrados na figura 3 (GOODMAN; GILMAN, 2005).

- Os receptores α possuem os subtipos α_1 (um receptor acoplado a uma proteína G_q -estimulatória) e α_2 (um receptor acoplado G_i -inibitória). A fenilefrina é um agonista seletivo do receptor α_1 (GOODMAN; GILMAN, 2005).
- Os receptores β possuem os subtipos β_1 β_2 e β_3 . Todos os três estão ligados às proteínas G_s -estimulatória, sendo o clenbuterol um exemplo de agonista seletivo do receptor β_2 (GOODMAN; GILMAN, 2005).

Figura 3 - Classificação dos agonistas adrenérgicos



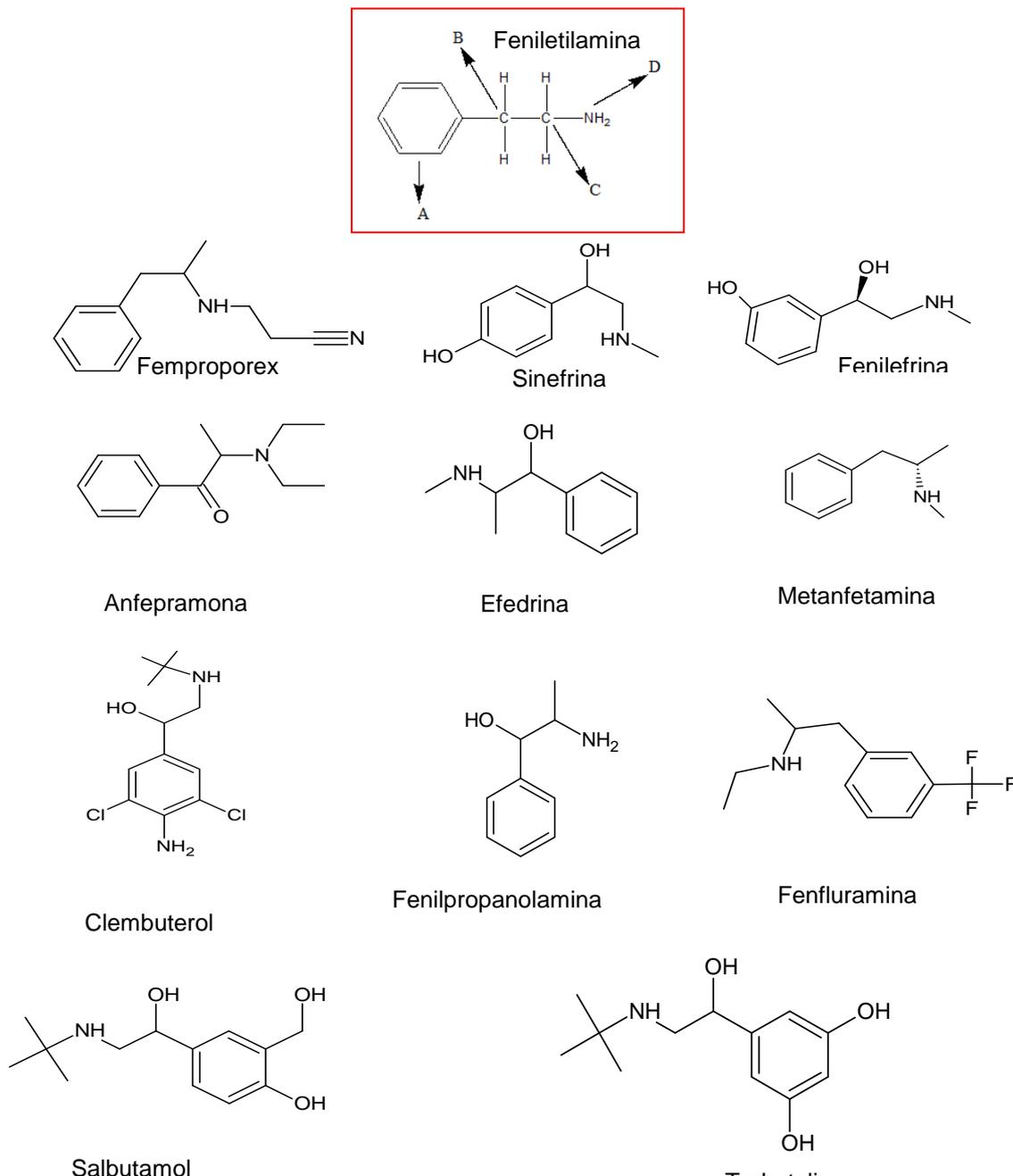
Fonte: GOODMAN; GILMAN, 2005.

De acordo com a seletividade pelo tipo de receptor, os agonistas adrenérgicos também podem ser classificados como agonistas de ação direta, de ação indireta ou de ação mista. Os de ação direta atuam sobre um ou mais dos receptores adrenérgicos. Esses fármacos podem apresentar considerável seletividade para um subtipo específico de receptor como, por exemplo, a fenilefrina para α_1 e salbutamol e clenbuterol para β_2 , ou podem possuir pouca ou nenhuma seletividade, atuando em vários tipos de receptores. Os fármacos denominados de ação indireta aumentam a disponibilidade da noradrenalina ou da adrenalina para estimular os receptores adrenérgicos, como por exemplo as anfetaminas (GOODMAN; GILMAN, 2005).

Os fármacos que liberam noradrenalina indiretamente e também ativam diretamente os receptores são denominados de simpaticomiméticos de ação mista,

como a efedrina (GOODMAN; GILMAN, 2005). Dentre as 17 substâncias estudadas, onze são agonistas adrenérgicas cuja substancia básica é a feniletilamina. Nessa molécula podem ser identificados quatro sítios de substituição: A: núcleo aromático, B: carbono β , C: carbono α e D: grupo amino. Substituições simples ou simultânea em qualquer desses sítios, através da inclusão de diferentes grupos funcionais, permite a obtenção de diversas moléculas derivadas da feniletilamina (figura 4).

Figura 4- Estrutura da feniletilamina indicando os sítios de substituição e estrutura das matérias-primas similares a feniletilamina: femproporex, sinefrina, fenilefrina, anfepramona, efedrina, metanfetamina, clenbuterol, fenilpropanolamina, fenfluramina, salbutamol e terbutalina.



Fonte: National Institute of Standards and Tecnology (NIST, 2016). Terbutalina

2.4.1 Estimulante

No contexto do esporte, a palavra “estimulante” geralmente se refere a agentes estimulantes do sistema nervoso central (SNC), que afetam o humor, estado de alerta, locomoção e apetite, ou que atuam no sistema nervoso simpático causando ações no sistema cardiovascular. A reação de luta ou fuga conhecida por aumentar o fluxo de sangue para o músculo esquelético e mobilizar energia é uma resposta simpática, que pode ser mimetizada por fármacos estimulantes (USADA, 2007).

Os estimulantes podem incluir substâncias que reduzem a fadiga, como a cafeína e a efedrina, ou, como anfetaminas e cocaína que podem afetar o humor e modificar o estado de alerta mental. Podem ter indicações clínicas precisas, tais como narcolepsia, déficit de atenção e supressão do apetite. No entanto, muitos estimulantes têm potencial de abuso. Outros podem atuar em receptores adrenérgicos como é o caso da fenilefrina, fenilpropanolamina e sinefrina (figura 4) (DOCHERT JR, 2008).

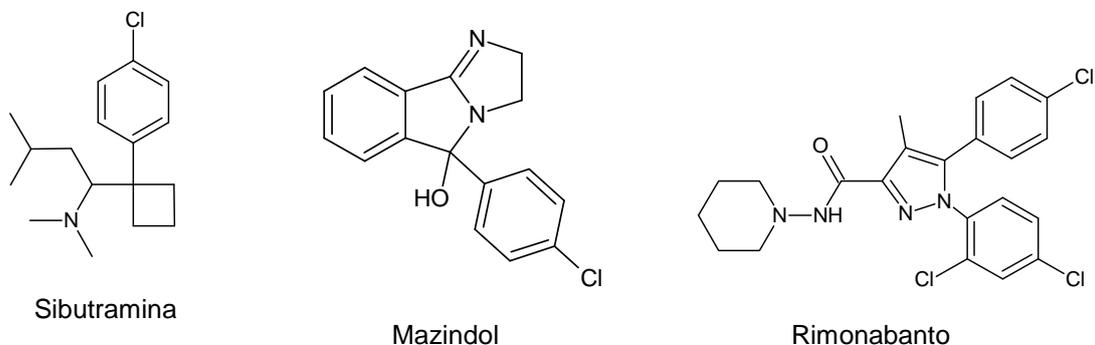
2.4.2 Anorexígenos

Os adulterantes anorexígenos frequentemente encontrados em formulações emagrecedoras incluem anoréxicos derivados de anfetaminas como anfepramona, femproporex (figura 4) e mazindol (este último, embora não apresente estrutura fenetilamínica, compartilha com a anfepramona e o femproporex, os mesmos efeitos secundários e mecanismo de ação); os sacietógenos de duplo mecanismo de ação, catecolaminérgico e serotoninérgico (sibutramina) e o antagonista do receptor canabinóide (rimonabanto) (figura 5) (ROCHA; AMARAL; OLIVEIRA, 2016).

A sibutramina e seus metabólitos inibem a recaptação de noradrenalina e de serotonina. Pelo efeito β -adrenérgico, a sibutramina possui ação no hipotálamo lateral e perifornical, levando a diminuição da fome e, em nível periférico, levando a aumento da termogênese por ativação do sistema nervoso simpático. A inibição da recaptação da serotonina leva ao aumento da transmissão serotoninérgica, que atuando no hipotálamo ventromedial, promove aumento da saciedade (ROCHA; AMARAL; OLIVEIRA, 2016).

O rimonabanto representa o protótipo antagonista seletivo CB1 (figura 5). Estudos demonstraram os efeitos benéficos de rimonabanto na obesidade, na cessação tabágica e na síndrome metabólica, porém está associado a efeitos adversos psiquiátricos severos, como depressão e tentativas de suicídio. No Brasil foi aprovado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) apenas em 2007 e retirado do mercado em outubro de 2008 (CICHERO et al, 2008).

Figura 5- Estrutura química das substâncias anorexígenas estudadas.



Fonte: National Institute of Standards and Technology (NIST, 2016).

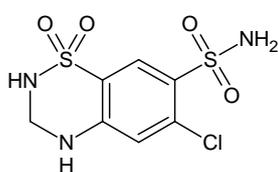
2.5 DIURÉTICOS

Pertencem à classe de fármacos anti-hipertensiva mais utilizada, apresentando diferenças quanto à duração, local de ação no néfron e estrutura química (figura 6). Os diuréticos tiazídicos, como a hidroclorotiazida e clortalidona, agem através da inibição do transporte de sódio e cloro na membrana da parte proximal do túbulo contorcido distal, com consequente eliminação de água do corpo o que pode ocasionar perda de peso, por isso são utilizados por atletas e não atletas que queiram rápida perda de peso. Já a furosemida é um diurético de alça, por atuar na porção ascendente da alça de Henle, inibindo o co-transportador tríplice $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$, sendo mais potente do que os diuréticos tiazídicos (figura 6) (PIMENTA, 2008).

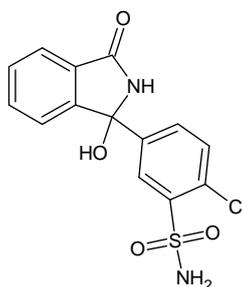
Esses fármacos são comumente utilizados para mascarar a administração de outras substâncias proibidas, ao reduzirem a concentração na urina do composto de interesse, por causa do aumento do volume urinário, dificultando a detecção nas

pesquisas laboratoriais de *doping*, por isso, também são classificados como agentes mascarantes (CADWALLADER; TORRE; BOTRE, 2010). Em consequência da perda excessiva de sais minerais e água o uso indiscriminado dos diuréticos pode causar hipotensão, disfunções cardíacas e musculares (NETO, 2001). O quadro 4 apresenta as classes de substâncias com ação terapêutica descritas na lista da WADA e os efeitos oriundos de sua administração.

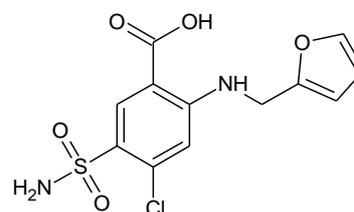
Figura 6- Estrutura química dos diuréticos: hidroclorotiazida, clortalidona e furosemida.



Hidroclorotiazida



Clortalidona



Furosemida

Fonte: National Institute of Standards and Tecnology (NIST, 2016)

Quadro 4 - Classe das substâncias descritas usadas no esporte, efeitos desejados e efeitos adversos.

Classe	Efeito desejado	Efeito colateral
Estimulantes	Aumento do estado de alerta (estimulação mental) Redução da fadiga	Aumento da pressão arterial Dor de cabeça Arritmia Ansiedade Tremores
Alfa-agonistas	Estimulante	Bradycardia Cefaleia hipertensiva
Beta-agonistas	Estimulante (dosagens maiores que as terapêuticas)	Tremores musculares, diminuição da pressão sanguínea, vasodilatação pulmonar; nervosismo.
Diuréticos	Redução de peso	Indefinidos (embora a perda de sais possa ser correlacionada a possíveis problemas cardíacos)

Fonte: WADA, 2017.

2.6 METODOLOGIAS ENCONTRADAS NA LITERATURA

Estudos recentes têm demonstrado que suplementos alimentares destinados à perda de peso são freqüentemente adulterados pela adição ilícita de substâncias sintéticas. Rocha e colaboradores (2016) descreveram diversas técnicas analíticas utilizadas para detectar e identificar diferentes adulterantes em suplementos alimentares e, portanto, também em alimentos, com especial ênfase em suplementos alimentares à base de plantas (Tabela 1).

Carvalho e colaboradores (2011) revisaram os casos de adulteração referentes a formulações fitoterápicas emagrecedoras. Os adulterantes relatados podem ser categorizados principalmente em seis classes farmacológicas: os anoréxicos (sibutramina, orlistat, anfepramona e rimonabanto), os ansiolíticos (principalmente benzodiazepínicos), os antidepressivos (por exemplo, fluoxetina e sertralina), os diuréticos (por exemplo: furosemida, hidroclorotiazida) e os laxantes como a fenolftaleína (CARVALHO et al, 2011; YANO et al, 2008; ANDRIOLO et al, 2012).

Tabela 1-Resumo dos estudos realizados e metodologias utilizadas na análise de adulterantes em suplementos alimentares destinados a perda de peso.

Adulterantes de interesse	Método	Amostras adulteradas/amostras totais	Referência
Sibutramina	HPLC-DAD; CG-MS	1/1	Jung e colaboradores (2006)
Anoréxicos (sibutramina, N-di-desmetilsibutramina, N-mono-desmetilsibutramina e Fenfluramina); fármaco antiobesidade (Orlistat); laxante (Fenolftaleína)	LC-ESI-MS	11/22	Wang e colaboradores (2008)
Triagem não-alvo de adulterantes	DOSY ¹ H-NMR; MS/MS	14/20 ^a	Vaysse e colaboradores (2010)
Anoréxicos (sibutramina e Fenfluramina); estimulantes (Efedrina, norpseudoefedrina); Diurético (clopamida) e outros (laxantes naturais, emodina e crisofanol)	HPLC-ESI-MS/MS	12/12	Shi e colaboradores (2011)
34 Compostos incluindo anoréxicos (amfepramona, fentermina, rimonabanto, 2,4-dinitrofenol, fenfluramina e sibutramina); Estimulantes (anfetamina, cafeína, sinefrina, efedrina e pseudoefedrina); laxante (Fenolftaleína); diuréticos (Altiazida, bumetanida, Furosemida, espironolactona e Triantereno) e antidepressivo (Fluoxetina).	UHPLC-DAD	20/20	Rebiere e colaboradores (2012)
Anoréxicos (amfepramona, sibutramina e femproporex) e antidepressivos (fluoxetina, paroxetina, sertralina, e bupropiona).	Eletroforese capilar	4/106	De Carvalho e colaboradores (2012)
N-desmetilsibutramina	LC-PDA; LC/MS	1/27	Park e colaboradores (2012)
Anoréxicos (sibutramina, N-desmetilsibutramina e N-didesmetilsibutramina); Laxante (fenolftaleína).	FI-MS/MS (confirmação usando LC-MS/MS)	11/17	Song e colaboradores (2014)

Tabela 1- Continuação.

Adulterantes de interesse	Método	Amostras adulteradas/amostras totais	Referência
29 Medicamentos, incluindo anoréxicos (sibutramina, desmetilsibutramina, didesmetilsibutramina, dietilpropiona, fenfluramina, mazindol e fentermina); estimulantes (cafeína, efedrina, pseudoefedrina e fendimetrazina); antidepressivos (bupropiona, fluoxetina, paroxetina e sertralina); laxantes (bisacodil, fenoltaleína e senósidos). Fármaco anoréxico (lorcaserina)	LC-MS/MS	62/188	Kim e colaboradores (2014)
	RMN; MS/MS	1/1	Hachem e colaboradores (2014)
Anoréxicos (sibutramina, desmetilsibutramina, didesmetilsibutramina, e rimonabanto) e laxante (fenoltaleína)	HPLC-DAD-MS/MS	24/50	Reeuwijk e colaboradores (2014)
Sibutramina	HPTLC-UV densitometria; TLC-MS interface	28/52	Mathon e colaboradores (2014)
96 compostos incluindo anoréxicos (fenfluramina, fentermina, rimonabanto, sibutramina e topiramato); estimulantes (anfetamina, β -metilfenetilamina, 1,3-dimetilamilamina, evodiamina, norefedrina, metanfetamina, catine e efedrina); fármaco antiobesidade (orlistat); antidepressivos (fluoxetina e sertralina), ansiolítico (diazepam); diuréticos (hidroflumetiazida, bumetanida, clortalidona, hidroclorotiazida, indapamida, meticlotiazida e metolazona).	UHPLC-Q-orbitrap MS	3/23	Vaclavik e colaboradores (2014)
Anoréxicos (benfluorex, fentermina, fenmetrazina, fendimetrazina, fenfluramina, fencanfamina, mefentermina e sibutramina) e estimulantes (efedrina e cafeína)	LC/HRMS	3/36	Strano-Rossi e colaboradores (2015)

Tabela 1- Continuação

Adulterantes de interesse	Método	Amostras adulteradas/amostras totais	Referência
Anoréxicos (Sibutramina, desmetilsibutramina, didesmetilsibutramina, fenfluramina, fentermina, rimonabanto); diuréticos (bumetanida, furosemida); fármaco antiobesidade (orlistat); laxante (fenolftaleína) e antidepressivo (sertralina)	IMS- Ion mobility spectrometry (espectrometria de mobilidade iônica)	2/11	Dunn e colaboradores (2012).
Estimulantes (bromofeniletilamina, anfetamina, efedrina, fenfluramina, 3,4-metilenedioxianfetamina (MDA), 3,4-etilenedioxietilfanfetamina (MDEA), 3,4-metilenedioximetanfetamina (MDMA), norefedrina, norpseudoefedrina e pseudoefedrina) e estriquinina	LC-MS	2/2	Deventer e colaboradores (2008)
Anorexígenos (anfeparamona, femproporex e sibutramina), ansiolíticos-benzodiazepínicos (clonazepam, flurazepam, aloprazolam, midazolam, medazepam, clordiazepóxido e diazepam), antidepressivos (bupropiona, fluoxetina, sertralina e paroxetina), diuréticos (hidroclorotiazida, furosemida, clortalidona, amilorida e espironolactona) e hipoglicemiantes (glimeperida, clorpropamida e glibenclamida)	Voltametria de micropartículas	15/15	Doménech-Carbó e colaboradores (2013)

Fonte: Adaptado de ROCHA et al, 2016.^a Incluindo suplementos alimentares e ervas medicinais

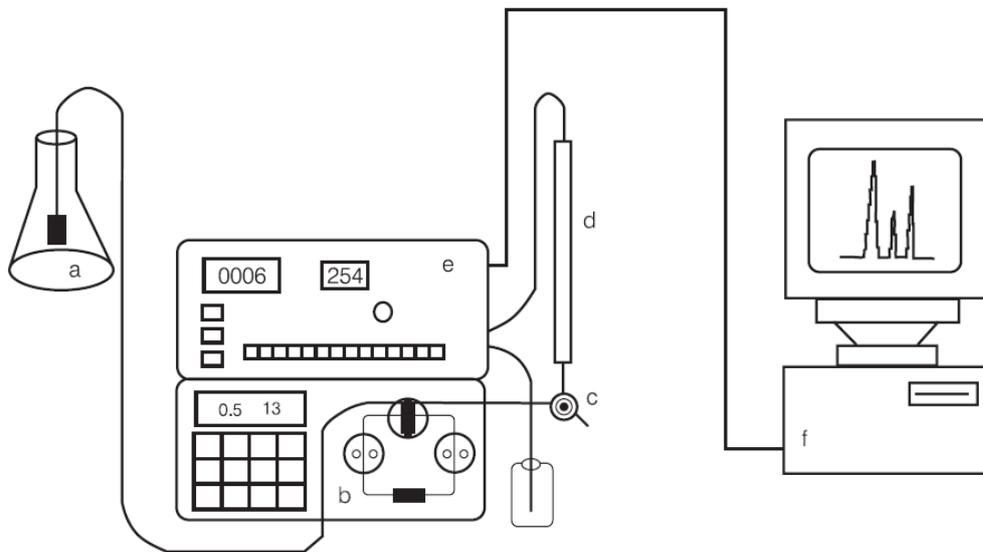
2.7 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA

As técnicas cromatográficas de análise estão entre as principais técnicas de separação, devido, principalmente, à sua capacidade de separação dos componentes presentes nas misturas em função da eficiência e do poder de resolução das colunas que estão cada vez mais modernas (LANÇAS, 2009).

A cromatografia líquida é uma das principais técnicas utilizadas na análise de compostos não voláteis e/ou termicamente instáveis (LANÇAS, 2009).

Um equipamento típico de cromatografia líquida de alta eficiência deve conter: a) reservatório da fase móvel; b) bomba de alta pressão; c) válvula de injeção (injetor); d) coluna; e) detector e f) registrador, demonstrado na figura 7 (DEGANI; CASS; VIEIRA, 1998).

Figura 7 - Equipamento básico de CLAE.

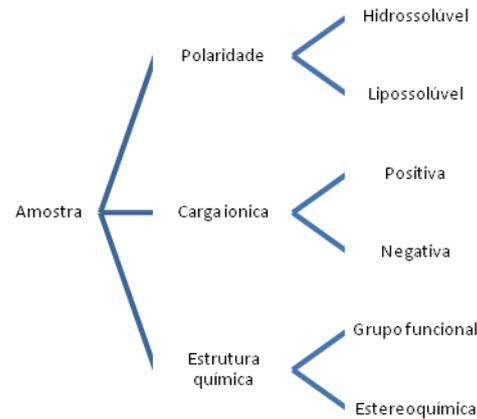


Fonte: DEGANI; CASS; VIEIRA, 1998.

A coluna cromatográfica é onde se dá o processo de separação das substâncias que compõem a amostra, sendo um constituinte bastante importante e crítico de um sistema cromatográfico (DEGANI; CASS; VIEIRA, 1998).

Para escolha de uma coluna é conveniente definir as características da amostra, conforme o esquema apresentado na figura 8 (CHUST, 1990).

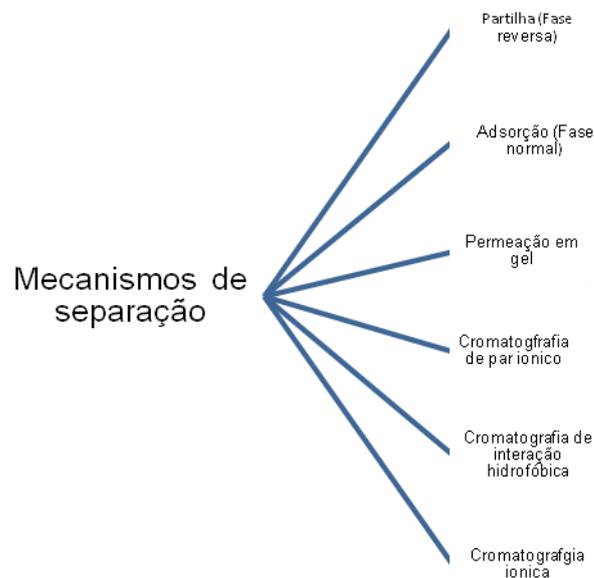
Figura 8 - Classificação das características de uma amostra



Fonte: CHUST, 1990.

Os mecanismos de separação poderão ser escolhidos de acordo com as características das amostras. Na figura 9 estão representados os principais mecanismos de separação de acordo com as colunas de HPLC (CHUST, 1990).

Figura 9 - Mecanismos de separação em HPLC



Fonte: CHUST, 1990.

Na cromatografia em fase normal, a fase estacionária é mais polar que a fase móvel, e em fase reversa, a fase móvel é mais polar (DEGANI; CASS; VIEIRA, 1998; CHUST, 1990).

O mecanismo de fase reversa se baseia na partilha de elétrons entre as nuvens eletrônicas das cadeias moleculares da fase estacionária ligada e da substância a separar, sendo estas interações originadas por ligações por pontes de hidrogénio, forças de London e forças de Van der Waals (CHUST, 1990).

Em relação à fase normal, a fase reversa mostra-se muito mais frequente em referências de aplicação da HPLC. A cromatografia em fase reversa possui custos operativos mais baixos em relação à fase normal, devido ao seu eluente ser constituído na sua maior parte por água, sendo também utilizados o metanol e a acetonitrila, entre outros. Quanto aos grupos funcionais de fase reversa ligada o mais popular é o C18, cujo grupo principal é o grupo octadecilsilano (CHUST, 1990).

Na cromatografia líquida o uso de detectores como ultravioleta, espalhamento de luz, fluorescência e outros, juntamente com o auxílio de softwares, permite a análise quantitativa dos componentes das misturas em baixas concentrações. A utilização da cromatografia líquida como técnica de identificação é limitada. A análise qualitativa está sujeita a erros, pois o uso dos tempos de retenção para a identificação dos analitos não é único, ou seja, vários compostos podem ter o mesmo tempo de retenção nas condições cromatográficas empregadas (LANÇAS, 2009).

O desenvolvimento dos detectores UV-VIS, baseados nos espectrofotômetros, permitiu a obtenção dos espectros completos de um pico cromatográfico nesta região espectral. Porém, os espectros obtidos para uma grande quantidade de picos presentes em amostras complexas eram de pouco auxílio devido à falta de especificidade dos mesmos e a similaridade entre os compostos em análise. O desenvolvimento dos detectores baseados em arranjos de diodos e o desenvolvimento de computadores rápidos, permitiram a geração de espectros tridimensionais e o uso de softwares apropriados para determinação automática da pureza de picos cromatográficos (LANÇAS, 2009).

O uso de partículas de fase estacionária menores que 2 μm , sem o comprometimento do desempenho cromatográfico, se tornou possível com o desenvolvimento da cromatografia líquida de ultra eficiência (CLUE) (MALDANER; JARDIM, 2009).

2.7.1 Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência

Baseia-se nos mesmos princípios da cromatografia líquida de alta eficiência. O uso de fases estacionárias com partículas menores que 2 μm juntamente com as altas velocidades lineares da FM aumentam a resolução e a detectabilidade e diminuem o tempo das análises. Para isto ser possível, uma vez que a instrumentação (bombas, injetores e detectores) disponível para a CLAE não é projetada para trabalhar em altas pressões, foi desenvolvido um novo equipamento, o qual pode operar em pressões acima de 100 Mpa (15000 psi) (MALDANER; JARDIM, 2009).

Algumas das vantagens de um sistema CLUE para o CLAE são: capacidade de trabalhar a pressões muito altas (100 MPa), melhoramento no sistema de controle e de dados, colunas resistentes capazes de trabalhar em altas pressões e com baixo volume morto, injetores com precisão na faixa de volumes pequenos (MALDANER; JARDIM, 2009).

2.7.2 Pareamento Iônico

Esse tipo de cromatografia pode ser realizado tanto em fase normal quanto em fase reversa. Consiste na adição de um reagente de pareamento iônico, ou seja, um contra-íon de carga oposta à da amostra a ser analisada, o qual formará “complexos” com diferentes polaridades do composto original alterando, desta forma, o tempo de retenção do composto. Essa técnica permite separação relativamente rápida de misturas complexas, em uma única corrida cromatográfica, sem prévio tratamento ou derivatização da amostra (VARVARA et al, 2009; SNYDER, KIRKLAND, 1979).

Ácidos e bases não interagem facilmente com a superfície hidrofóbica das colunas de fase reversa, devido à carga associada a estas espécies. Os reagentes de pareamento iônico geralmente utilizado para bases são os da série dos sulfonatos, na forma de sal sódico, como o hexano, heptano e octanossulfonato de sódio. Com a adição à fase móvel do sal referido, de carga contrária a das moléculas da amostra, permite-se que as mesmas e o sal reagente formem um par eletronicamente neutro, podendo então interagir com a fase estacionária por um mecanismo de partilha (VARVARA ET AL, 2009; SNYDER, KIRKLAND, 1979).

O comprimento da cadeia dos ácidos alquilssulfônicos é um fator a ser considerado, pois quanto maior a cadeia, maior a retenção, sendo desta forma um fator de controle da separação. Outros fatores que podem ainda influenciar a separação são a concentração do sal reagente, o pH da fase móvel e o tipo de concentração do tampão a utilizar (VARVARA et al, 2009; SNYDER, KIRKLAND, 1979).

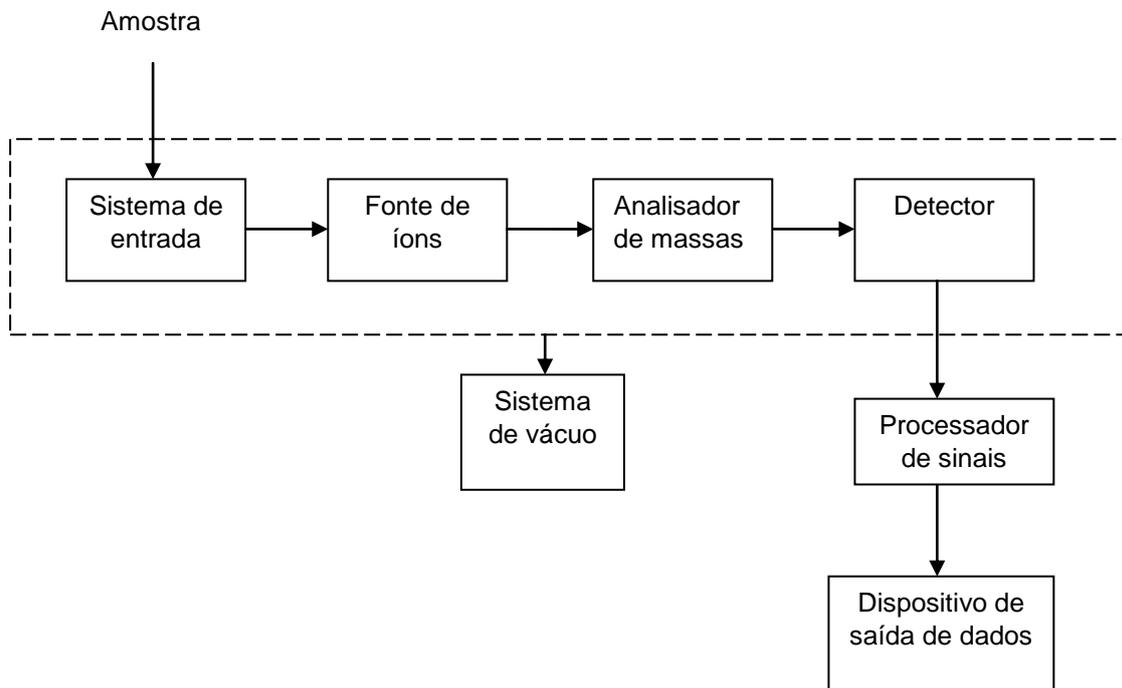
Neste trabalho optou-se pela utilização do heptano-1 sulfonato de sódio como reagente de pareamento iônico, capaz de se ligar às aminas, diminuindo assim, a interação das aminas com os silanóis (VARVARA et al, 2009; SNYDER, KIRKLAND, 1979).

2.8 ESPECTROMETRIA DE MASSAS

A espectrometria de massas é uma técnica utilizada para identificação e determinação quantitativa de um ou mais elementos em uma amostra por meio da relação massa/carga (m/z) de íons, podendo ser positivo ou negativo. Com o desenvolvimento de novos métodos para produzir íons a partir de moléculas termicamente lábeis a espectrometria de massas também pode ser aplicada na área biológica, como na determinação de estruturas de polipeptídeos, proteínas e outros biopolímeros com altas massas moleculares (SKOOG, 2009).

O diagrama de blocos na figura 10 mostra os principais componentes dos espectrômetros de massas.

Figura 10 - Componentes de um espectrômetro de massas



Fonte: SKOOG, 2009.

No sistema de entrada é introduzida uma pequena quantidade da amostra no espectrômetro de massas, onde seus componentes são convertidos em íons gasosos. Geralmente o sistema de entrada contém um meio para volatilizar as amostras sólidas ou líquidas (SKOOG, 2009).

As fontes de íons convertem os componentes de uma amostra em íons. As principais diferenças entre os equipamentos de massas se dão na fonte de ionização e no analisador, que conferem a cada equipamento características específicas com diferentes capacidades de resolução, sensibilidade e aplicação. Em muitos casos, o sistema de entrada e a fonte de íons são combinados em um componente único. Em todos os casos, a saída é um feixe de íons positivos ou negativos que são, então, acelerados para o analisador de massas. No analisador de massas os íons são dispersos com base nas razões massas/carga dos íons dos analitos. Os espectrômetros de massas possuem várias categorias, de acordo com a natureza do analisador de massas. Um espectrômetro de massas contém um transdutor (para íons) que converte o feixe de íons em um sinal elétrico que pode ser, então, processado, armazenado na memória de um computador e apresentado ou registrado de várias maneiras (SKOOG, 2009).

O espectrômetro de massas tem a necessidade de um sistema de vácuo para criar baixas pressões (10^{-4} a 10^{-8} torr) em todos os componentes do instrumento, com exceção do processador e o dispositivo de saída de dados (SKOOG, 2009).

2.8.1 Fonte de Ionização

Uma análise espectrométrica de massas parte da formação de íons gasosos do analito. O escopo e a utilidade dos métodos espectrométricos de massas são ditados pelo processo de ionização. O aspecto do espectro de massas vai depender do método usado para a formação de íons. Esses métodos dividem-se em duas categorias principais: fontes de fase gasosa e fontes de dessorção (SKOOG, 2009).

As fontes de fase gasosa podem ser por impacto de elétrons (EI), ionização química (CE) e ionização por campo (FI). As fontes de dessorção incluem dessorção por campo (FD), ionização por eletronebulização (ESI), dessorção-ionização assistida por matriz (MALDI), dessorção por plasma (PD), bombardeamento com átomos rápidos (FAB), espectrometria de massas de íons secundários (SIMS) e ionização por termonebulização (TS) (SKOOG, 2009).

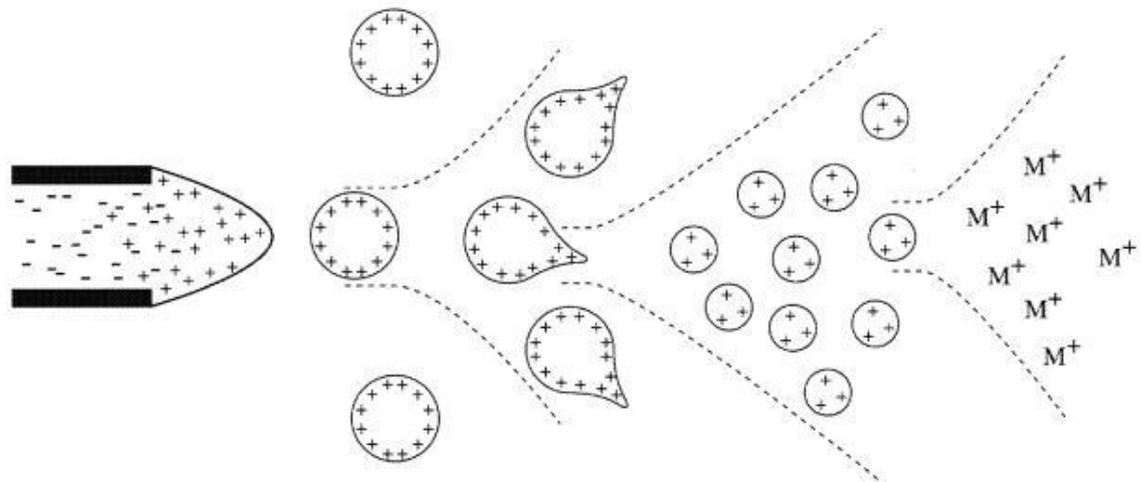
Na fonte de fase gasosa, a amostra é primeiramente vaporizada e, então, ionizada. Com a fonte de dessorção, a amostra no estado sólido ou líquido é convertida diretamente nos íons gasosos. As fontes de dessorção podem ser aplicadas a amostras não voláteis e instáveis termicamente, já as fontes de fase gasosa são geralmente restritas à ionização de compostos estáveis termicamente, que possuem ponto de ebulição menores que $500\text{ }^{\circ}\text{C}$ limitando, na maioria dos casos, as fontes gasosas a compostos com massas moleculares menores do que aproximadamente 10^3 Da, enquanto que as fontes de dessorção são aplicáveis a analitos que possuem massas moleculares de até 10^5 Da (SKOOG, 2009).

Entre as fontes de ionização existentes a ionização por eletronebulização (ESI) é uma das mais utilizadas no acoplamento LC-MS (SKOOG, 2009).

A ionização por ESI ocorre a pressões e temperaturas atmosféricas. O processo de ionização por ESI ocorre quando uma solução da amostra é bombeada através de uma agulha capilar de aço inoxidável a uma vazão de poucos microlitros por segundo. A agulha é mantida a vários quilovolts com relação ao eletrodo que a circunda. A nuvem carregada resultante, composta de finas gotículas, passa, então, através de um capilar de dessolvatação, onde ocorre a evaporação do solvente e a

ligação da carga às moléculas do analito. À medida que as gotículas diminuem, por causa da evaporação do solvente, suas densidades de cargas tornam-se maiores até que, em um ponto denominado *limite de Rayleigh*, a tensão superficial não consegue mais suportar a carga, ocorrendo a *explosão Coulombica*, e a gota divide-se em gotículas menores. Estas pequenas gotas podem repetir o processo até que todo o solvente seja removido do analito, resultando em uma molécula do analito com carga múltipla. A figura 11 demonstra o mecanismo de ionização da amostra por eletrospray (SKOOG, 2009; HO et al, 1989).

Figura 11 - Mecanismo de ionização da amostra por eletrospray



Fonte: HO et al, 2003.

2.8.2 Analisador de massa

Para a separação dos íons por suas diferenças de m/z , foram desenvolvidas diferentes formas para controlar a trajetória desses íons através do espectrômetro, que são realizadas por campos elétricos e magnéticos, chamados de analisadores de massas, e são quase tão diversificados quanto as fontes de íons (SKOOG, 2009).

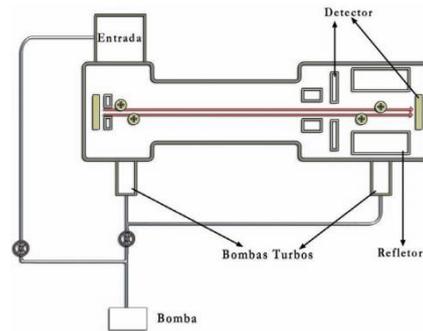
O analisador utilizado no presente trabalho foi do tipo Q-TOF (quadrupolo-tempo de voo). Esse equipamento possui elevada resolução, boa sensibilidade e velocidade de varredura muito rápida. Sua aplicação é bastante ampla, especialmente quando alta resolução é necessária (LANÇAS, 2009; SKOOG, 2009).

O analisador de massa quadripolar é o tipo mais comum em espectrômetro de massas. Esse instrumento é mais compacto, de menor custo e mais robusto do que os outros espectrômetros de massas (SKOOG, 2009).

Um instrumento quadripolar consiste em quatro barras cilíndricas e paralelas que atuam como eletrodos. As barras opostas são conectadas eletricamente, sendo um par ligado ao lado positivo de uma fonte variável dc e outro par ligado ao terminal negativo. Potenciais ac de radiofrequência variável também são aplicados a cada par de barras. A fim de obter um espectro de massas com este dispositivo, os íons são acelerados para o espaço entre as barras por uma diferença de potencial de 5 a 10 V. Enquanto isso, as voltagens ac e dc nas barras aumentam simultaneamente, mantendo sua razão constante. Em um dado momento, todos os íons, exceto, aqueles que possuem um valor determinado de m/z , atingem as barras e são convertidos em moléculas neutras. Sendo assim, apenas os íons que possuem valores de m/z em um intervalo limitado alcançam o transdutor (SKOOG, 2009).

Nos instrumentos tipo tempo de voo (TOF, do inglês, *time-of-flight*), os íons positivos são produzidos pelo bombardeamento da amostra com breves pulsos de elétrons, íons secundários ou fótons gerados por um *laser*. Os íons produzidos são acelerados por um pulso de campo elétrico de 10^3 a 10^4 V, que possui a mesma frequência que o pulso de ionização, mas que está atrasado em relação a ele. As partículas aceleradas passam por um *tubo de deriva*, livre de campo. A velocidade alcançada pelo íon acelerado é inversamente proporcional à massa, logo, as partículas mais leves chegam ao detector antes das partículas mais pesadas. De forma análoga, o tempo necessário para um íon atravessar o tubo é proporcional à massa. A figura 12 ilustra um analisador do tipo TOF (LANÇAS, 2009; SKOOG, 2009).

Figura 12 - Desenho esquemático de um analisador do tipo TOF



Fonte: LANÇAS, 2009.

2.9 TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS

A espectroscopia de absorção molecular na região ultravioleta/visível (UV/Vis) é uma das técnicas utilizadas para identificação e caracterização de compostos químicos. Nesta técnica são medidas a absorbância, propriedade que representa a fração de luz absorvida pela amostra, ou transmitância que é a fração de luz que atravessa a amostra. Tanto absorbância como transmitância estão relacionadas com a absorção de energia eletromagnética pelo composto a ser analisado. A região ultravioleta do espectro é geralmente considerada na faixa de 200 a 400 nm, e a região do visível entre 400 a 800 nm. As energias obtidas nessas regiões apresentam magnitudes que correspondem, muitas vezes, à diferença entre estados eletrônicos de muitas moléculas (SKOOG, 2009).

Análises espectrofotométricas na região UV/Vis são úteis para identificação e caracterização qualitativa de grupos cromóforos. Para isso, geralmente os espectros de absorção gerados são comparados com espectros de substâncias conhecidas que contenham grupos cromóforos característicos ou tabelas de correlação. Porém, a identificação de grupos cromóforos pode algumas vezes tornar-se equivocada, devido à possível sobreposição de bandas, quando aplicada a misturas ou devido a alguma interação analito/solução. Contudo, conclusões qualitativas sobre os tipos de transições eletrônicas responsáveis pelas bandas de absorção podem ser, em alguns casos, obtidas a partir de considerações teóricas sobre os orbitais moleculares envolvidos (SKOOG, 2009).

Outra técnica de caracterização de substâncias é a espectroscopia no infravermelho (IV), uma ferramenta que investiga as frequências relacionadas às vibrações dos átomos e moléculas, sendo geralmente usada a radiação na região do infravermelho devido à interação energética desse tipo de radiação com os modos vibracionais das moléculas (SKOOG, 2009).

Os espectros na região do IV são amplamente utilizados para identificação e caracterização de moléculas tanto orgânicas como inorgânicas por meio da análise das regiões de frequência de grupos e impressão digital, o que possibilita a determinação da presença de ligações químicas características. Para isso, são utilizadas tabelas de correlação e comparação com outros espectros de bancos de dados (SKOOG, 2009).

Os instrumentos utilizados para obtenção do espectro de absorção na região do infravermelho de um composto são chamados de espectrômetros de infravermelho. Esses instrumentos são constituídos basicamente por uma fonte de radiação infravermelha, um recipiente para amostra, um seletor de comprimento de onda e um detector. Os espectrômetros de infravermelho de transformada de Fourier (IV-TF) são os mais empregados por produzirem o espectro rapidamente e com uma alta resolução em comparação a outros instrumentos com a mesma finalidade (SKOOG, 2009).

Outra técnica de espectroscopia utilizada para caracterização é a Ressonância Magnética Nuclear (RMN), um fenômeno que ocorre quando pulsos de radiofrequência são aplicados sobre uma amostra que está imersa em um campo magnético bastante intenso. Na presença desse campo magnético, núcleos ativos à RMN (tais como ^1H ou ^{13}C) absorvem radiação eletromagnética a uma frequência característica do isótopo (SKOOG, 2009).

Atualmente praticamente todos os espectrômetros de RMN disponíveis trabalham com a técnica pulsada. Nessa técnica, os núcleos sob ação de um campo magnético são submetidos periodicamente a pulsos muito curtos de radiação de radiofrequência intensa. Uma vez que o pulso tenha terminado, os núcleos começam a relaxar e retornar às suas posições de equilíbrio. O intervalo entre pulsos é de um a vários segundos, durante o qual um sinal de radiofrequência no domínio do tempo, chamado de sinal de decaimento livre de indução (FID), é emitido pelos núcleos à medida que eles relaxam e são então detectados (SKOOG, 2009).

3 OBJETIVO

3.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver um método analítico de triagem para verificação da presença de substâncias anorexígenas, estimulantes e diuréticas destinadas à perda de peso e não declaradas na rotulagem dos suplementos alimentares nacionais.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Elaborar um banco de dados espectrais utilizando as seguintes técnicas analíticas: espectroscopia de absorção molecular nas regiões UV e Infravermelho por Transformada de Fourier (IVTF), espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e espectrometria de massas de alta resolução das substâncias: femproporex, sinefrina, sibutramina, anfepramona, fenilefrina, metanfetamina, efedrina, salbutamol, terbutalina, fenilpropanolamina, clortalidona, furosemida, hidroclorotiazida, mazindol, clenbuterol, fenfluramina e rimonabanto;
- Desenvolver um método de triagem para as substâncias citadas acima através da cromatografia líquida de alta eficiência com detector UV-VIS com arranjo de diodos;
- Avaliar amostras nacionais comercializadas no município do Rio de Janeiro, quanto à presença dessas substâncias.

4 METODOLOGIA

4.1 AMOSTRAGEM

Através da visita de lojas físicas e da busca em sítios eletrônicos de vendas de suplementos alimentares pôde-se chegar às marcas nacionais comercializadas no município do Rio de Janeiro utilizadas neste estudo. Os suplementos alimentares foram comprados pelo Laboratório de Alimentos do Departamento de Química do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde. A escolha dos produtos selecionados para análise, descritos no quadro 5 de acordo com a ordem de análise, foi baseado nas alegações feitas pelos fabricantes como perda de peso e redução de medidas.

Quadro 5 - Classificação dos suplementos alimentares analisados com suas respectivas marcas, forma farmacêutica, descrição do conteúdo contido no rótulo e código do laboratório.

Produto	Marca	Classificação	Forma Farmacêutica	Rótulo	Código do Laboratório
Chá verde 1	A	Chá	Sachê	Chá Verde (Camellia Sinensis)	CVAP
Chá verde 2	B	Novos Alimentos ou Ingredientes	Cápsula	Chá Verde (Camellia Sinensis)	TL12767
Chá verde 2	B	Novos Alimentos ou Ingredientes	Cápsula	Chá Verde (Camellia Sinensis)	TL0040
Chá verde 2	B	Novos Alimentos ou Ingredientes	Cápsula	Chá Verde (Camellia Sinensis)	TL0017
Chá verde 2	B	Novos Alimentos ou Ingredientes	Cápsula	Chá Verde (Camellia Sinensis)	TL0060
Chá verde 3	C	Novos Alimentos ou Ingredientes	Cápsula	Chá Verde (Camellia Sinensis), vitamina c, zinco, manganês, vitamina E, cobre quelado e vitamina B12	OLB6307
Chá verde 3	C	Novos Alimentos ou Ingredientes	Cápsula	Chá Verde (Camellia Sinensis), vitamina c, zinco, manganês, vitamina E, cobre quelado e vitamina B12	OLA6191
Quitosana 1	D	Novos Alimentos ou Ingredientes	Cápsula	Quitosana	225/13
Quitosana 2	D	Novos Alimentos ou Ingredientes	Cápsula	Quitosana	224/13
Seca barriga	E	Novos Alimentos ou Ingredientes	Comprimido	Chá verde, alcachofra, berinjela, chia, laranja, maracujá, gengibre, psyllium, maca peruana, ágar-ágar.	SCBA
Hibisco com gengibre	F	Novos Alimentos ou Ingredientes	Comprimido	Hibisco, gengibre e picolinato de cromo.	HBCO
Emagrecedor 1	F	Novos Alimentos ou Ingredientes	Cápsula	Ágar-ágar, berinjela, psyllium, spirulina	FADUX
Noz da Índia	G	Novos Alimentos ou Ingredientes	Comprimido	Noz da Índia (<i>Aleuries moluccana</i>)	CINI
Emagrecedor 2	H	Novos Alimentos ou Ingredientes	Cápsula	Fibras de Maçã, quitosana e psyllium	NUTRED
Redutor de medidas	I	Suplemento de cafeína para atletas	Cápsula	Cafeína, óleo de cártamo, óleo de uva, óleo de gergelim, lecitina de soja, cera de abelha	IMCP

4.2 EQUIPAMENTOS, MATERIAIS E REAGENTES

4.2.1 Equipamentos

Balança analítica com resolução de 0,01 mg, fabricante OHAUS, modelo AV264CP;

Cromatógrafo Líquido de Ultra Eficiência Ultimate[®]3000 fabricante Thermo Scientific Dionex com detector UV-VIS com Arranjo de Diodos (CLUE/UV-VIS-DAD);

Cromatógrafo líquido de ultra eficiência Infinity 1200 acoplado a espectrômetro de massas de alta resolução 6530 Quadrupolo (Q) – Tempo de voo (TOF) (Agilent);

Banho ultrassônico, fabricante Unique modelo UltraSonic Cleaner;

Sistema de purificação de água Milli-Q, fabricante Milipore modelo Direct-Q; pHmetro, fabricante Micronal modelo B – 474.

Equipamento da marca Thermo Scientific, modelo NICOLET 6700 FT-IR, o qual possui o sistema de análise de amostras por ATR (Attenuated Total Reflectance).

Centrífuga refrigerada 5804R (Eppendorf, EUA);

4.2.2 Materiais

Os materiais utilizados no preparo das amostras e das soluções de trabalho foram: provetas, balões volumétricos, erlenmeyer, pipetas automáticas, ponteiras, tubos de ensaio, microtubos, pipetas Pasteur, vials de 2mL, tampas de rosca para vial e inserts.

Coluna Phenomenex C18 (250 x 4) mm, 5 µm. Fabricante: Phenomenex[®].

Coluna Ace C18 (50 x 2,10) mm, 5 µm. Fabricante: Ace[®].

4.2.3 Solventes e matérias-primas

Todos os solventes utilizados foram grau CLAE. Heptano-1 sulfonato de sódio, marca: VETEC[®], lote: 0603285; Ácido acético, marca: MERCK[®], Lote: K45841563; 2-propanol, marca: MERCK[®], lote: K27802734 021.

As matérias-primas utilizadas foram: cloridrato de femproporex, tartarato de sinefrina, cloridrato de sibutramina, cloridrato de anfepramona, cloridrato de fenilefrina, cloridrato de metanfetamina, cloridrato de efedrina, sulfato de salbutamol, sulfato de terbutalina, cloridrato de fenilpropanolamina, clortalidona, furosemida, hidroclorotiazida, mazindol, clenbuterol, cloridrato de fenfluramina e rimonabanto

4.2.4 Preparo das matérias-primas

4.2.4.1 Soluções das matérias-primas individuais

Foram preparadas soluções a 100 µg/mL de cada matéria-prima. Para isto, as substâncias foram pesadas de acordo com cálculos estequiométricos equivalentes a 5 mg da base livre. Em um tubo falcon de 50 mL foi adicionado 5 mL de H₂O: Isopropanol (50:50 v/v) e em seguida foram adicionadas as quantidades pesadas de acordo com os cálculos realizados das substâncias e completou-se o volume de 50 mL do tubo falcon. A solução resultante foi estocada em geladeira com temperatura inferior a 8 °C.

4.2.4.2 Preparo da mistura das matérias-primas

A mistura das matérias-primas foi preparada a partir de uma alíquota de 100 µL de cada uma das soluções individuais das 17 matérias-primas a 100 µg/mL, as quais foram preparadas conforme descrito em 4.2.4.1.

4.2.5 Preparo das amostras

Foram utilizadas amostras em três formas de apresentação: comprimido, cápsula e sachê (quadro 5). As que se apresentavam em forma de cápsulas foram

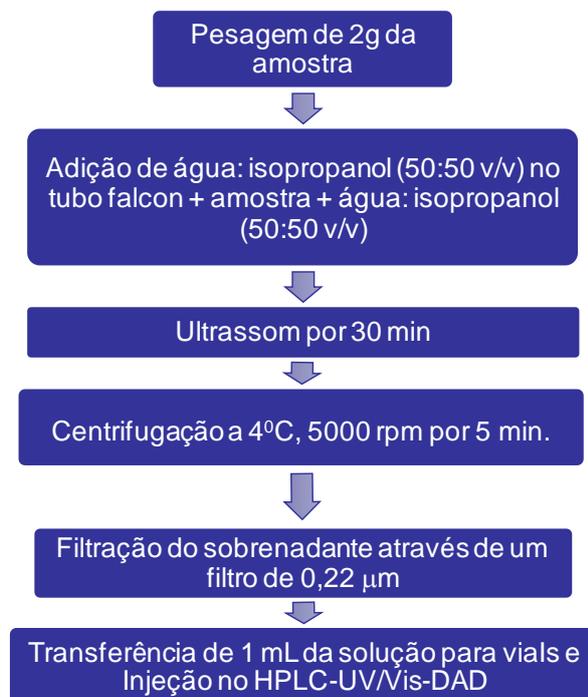
abertas e seu conteúdo foi pesado em balança analítica para quantidade de pó referente à 2g.

As amostras na forma de comprimido foram trituradas com o auxílio de gral e pistilo até um pó homogêneo e também foi pesado o equivalente a 2g de pó.

As cápsulas da amostra IMCP diferem das outras amostras, pois contêm óleos em sua composição, como óleo de cártamo, óleo de uva e óleo de gergelim, e também foi pesado 2g da amostra.

Após a etapa de pesagem de cada uma das amostras foi adicionado em cada tubo falcon de 50 mL aproximadamente 5 mL de H₂O: Isopropanol (50:50 v/v), as quantidades de amostra referentes à 2g e completou-se o volume de 50 mL do tubo falcon com H₂O: Isopropanol (50:50 v/v), esse procedimento foi repetido para cada uma das amostras. Os tubos falcon de 50 mL com as amostras em H₂O: Isopropanol (50:50 v/v) foram para o banho de ultrassom por trinta minutos. Após a retirada das amostras do ultrassom, foram centrifugadas a 4 °C, 5000 rpm por 5 min, filtradas e transferiu-se 1 mL da solução de cada amostra para os *vials* e foram analisadas no HPLC-UV/Vis-DAD conforme o esquema da figura 13.

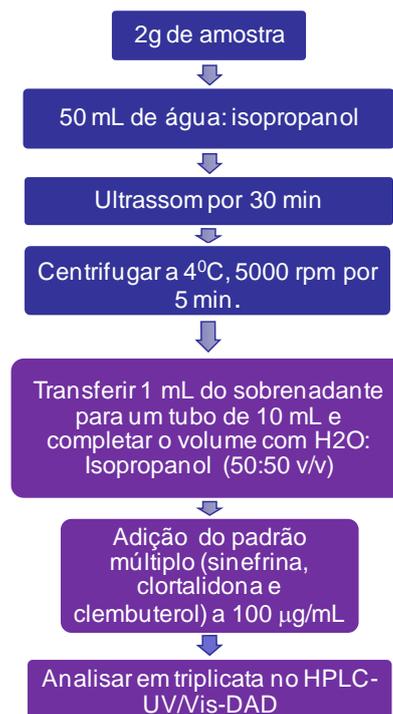
Figura 13- Esquema do procedimento de extração nas amostras.



4.2.6 Teste de extração nas amostras SCBA, NUTRED e HBCO

Foi preparado um padrão múltiplo com sinefrina, clortalidona e clenbuterol a 100 µg/mL em água: isopropanol (50:50 v/v) e analisado em triplicata. Esse padrão múltiplo foi analisado em triplicata nas amostras SCBA, NUTRED e HBCO, para isto, realizou-se a extração descrita em 4.2.5 para as amostras. Após a etapa de centrifugação, 1 mL do sobrenadante foi transferido para um novo tubo de centrifuga, adicionou-se o padrão múltiplo a 100µg/mL, e completou-se o volume para 10 mL com água: isopropanol (50:50 v/v) conforme o esquema da figura 14.

Figura 14- Esquema da extração nas amostras SCBA, NUTRED e HBCO para avaliação da eficácia da extração.



4.2.7 Fase móvel

Em uma proveta de 2 L foram adicionados 2g de heptano 1- sulfonato de sódio e 4 mL de ácido acético anidro completando-se o volume com água Milli-Q, obtendo-se uma solução de heptano 1-sulfonato de sódio 0,1 % (p/v), e verificou-se através do pHmetro que o pH da fase móvel era de 3,55.

4.3 DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO ANALÍTICO DE TRIAGEM

Considerando as matérias-primas como padrão de trabalho tornou-se necessário realizar a caracterização desses materiais para uso como padrão de trabalho qualitativo. As técnicas de caracterização foram: Ressonância Magnética Nuclear (RMN), Infravermelho (IV), Ultravioleta (UV) e Espectrometria de Massas. As análises por RMN e IV foram realizadas no Serviço de Métodos Analíticos do Instituto de Tecnologia em Fármacos - Farmanguinhos/FIOCRUZ, e as demais no Laboratório de Alimentos do Departamento de Química do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde.

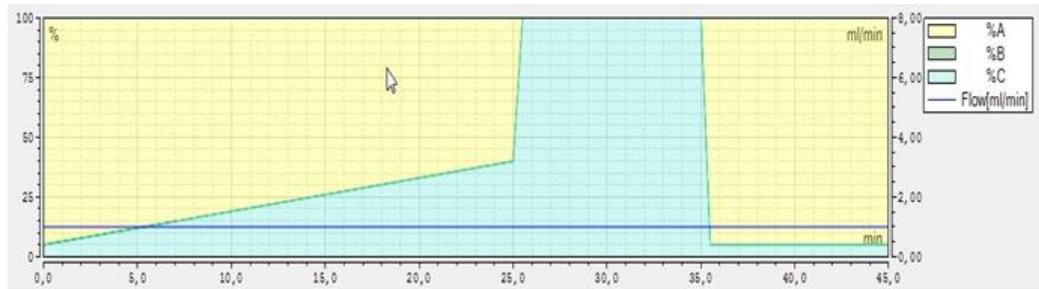
Após a etapa de caracterização das matérias-primas, as soluções de trabalho de cada substância preparadas a 100 µg/mL, a mistura dessas matérias-primas e as amostras foram analisadas no cromatógrafo líquido de alta eficiência com detector UV-VIS com arranjo de diodos para avaliação do perfil cromatográfico e tempo de retenção (t_R), utilizando-se as colunas Phenomenex® e Ace®.

Primeiramente, foram analisadas as matérias-primas individuais com a coluna Phenomenex®, utilizando-se o gradiente de eluição descrito na tabela 2 e representado na figura 15 sendo a fase A uma solução de heptanosulfonato 0,1% (p/v) e a fase C acetonitrila. Em sequência essas mesmas condições foram utilizadas para análise da mistura das substâncias e das amostras

Tabela 2: Gradiente de eluição utilizando-se a coluna **Phenomenex®** C18 (250 x 4)mm, 5 µm, fase A: solução 0,1% de heptanosulfonato (p/v), fase C: acetonitrila e fluxo: 1mL/min.

Tempo (min)	%A	%C
0	95	5
25	60	40
25,5	0	100
35	0	100
35,5	95	5
45	95	5

Figura 15-Representação do gradiente de eluição utilizando-se a coluna Phenomenex®



Condições experimentais: coluna **Phenomenex®** C18 (250 x 4)mm, 5 μ m, fase A: solução 0,1% de heptanosulfonato (p/v), fase C: acetonitrila e fluxo: 1mL/min.

Um segundo experimento de otimização foi realizado, utilizando desta vez a coluna Ace®, a qual possui 15% de carbono ligado, sendo mais polar do que a coluna Phenomenex®, que possui 20% de carbono ligado e foi utilizada no primeiro ensaio. Devido ao fato da coluna Ace® ser mais polar, optou-se por fazer uma pequena modificação no final do gradiente linear, diminuindo em 5% a composição final da fase forte, como pode ser observado na tabela 3 e encontra-se representado na figura 16.

Tabela 3: Gradiente de eluição utilizando-se a coluna **Ace®** C18 (50 x 2,10)mm, fase A: solução 0,1% de heptanosulfonato (p/v) com pH 3,55, fase C: acetonitrila e fluxo: 1mL/min.

Tempo (min)	%A	%C
0	95	5
25	60	40
25,5	5	95
35	5	95
35,5	95	5
45	95	5

Figura 16- Representação do gradiente de eluição utilizando-se a coluna ace®.



Condições experimentais: Coluna **Ace®** C18 (50 x 2,10)mm, 5 μ m, fase A: solução 0,1% de heptanosulfonato (p/v) com pH 3,55, fase C: acetonitrila e fluxo: 1mL/min.

O espectrômetro de massas utilizado para caracterização das matérias-primas foi um quadrupolo tempo de voo (Q-TOF), equipado com a fonte de ionização eletrospray (ESI). O método foi realizado no modo isocrático com inserção direta. O instrumento foi operado em modo de varredura, com taxa de varredura (espectros/segundos) de 2,00, voltagem do capilar: 4000 V, voltagem do fragmentador: 175 V. A temperatura do gás foi 325 °C com fluxo 8 L/min. O volume de injeção da amostra foi 1 μ L com fluxo 0,2 mL/min, a composição do solvente da fase móvel foi 50% de ácido fórmico e 50% de acetonitrila.

Caso alguma amostra apresentasse pico similar a alguma das substâncias estudadas a espectrometria de massas também seria utilizada para confirmação da matéria-prima suspeita.

5 RESULTADO E DISCUSSÃO

A maioria dos métodos descritos são desenvolvidos para o rastreio e a confirmação dos adulterantes com base nos tempos de retenção específicos e algumas informações espectrais adicionais (BOGUSZ et al, 2006; LIANG et al, 2006; KU et al, 1999; WANG, CHEN, YAO, 2008).

A cromatografia líquida (LC), nomeadamente a HPLC e, mais recentemente, a ultra-alta performance LC (UHPLC), é a técnica de separação mais comumente aplicada para a análise de adulterantes farmacêuticos em suplementos alimentares, em particular aqueles utilizados para perda de peso. A utilização de HPLC acoplada ao detector DAD, é reconhecida para a identificação preliminar e rastreio de adulterantes em produtos para perda de peso (DE COCK et al, 2001; CARVALHO et al, 2011; DECONICK et al, 2012; REBIERE et al, 2012, CSUPOR et al, 2013).

Métodos de triagem utilizando banco de dados espectrais têm sido reportados na literatura. Liu e colaboradores (2000) desenvolveram um método de triagem utilizando a técnica HPLC-DAD para substâncias terapêuticas não declaradas em chás tradicionais chineses, para isso montou-se uma biblioteca UV das substâncias estudadas, onde a identificação foi realizada comparando-se os espectros UV e tempos de retenção das substâncias detectadas com os espectros UV e tempos de retenção dos padrões. Foi verificado que das 41 amostras analisadas, uma continha o anti-asmático codeína.

Champagne e Emmel (2011) desenvolveram um método de triagem utilizando a espectroscopia IVTF na detecção de fármacos para disfunção erétil, esteróides e destinados à perda de peso em 84 amostras de suplementos alimentares e, encontraram 7 amostras adulteradas com fármacos para disfunção erétil como sildenafil e vardenafil e o anorexígeno sibutramina.

Nesse contexto, e em se tratando de um método de triagem, no presente estudo qualquer coincidência dos cromatogramas das matérias-primas com o de uma determinada amostra, utilizando os critérios de tempos de retenção e formatos dos picos foram investigados por técnicas auxiliares com potencial de identificação. Por isso, investiu-se na elaboração de um banco de dados espectrais, utilizando as seguintes técnicas analíticas: espectroscopia de absorção molecular nas regiões UV e Infravermelho por Transformada de Fourier (IVTF), espectroscopia de

Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e espectrometria de massas de alta resolução.

Em princípio, elucidaram-se as identificações, somente através de espectros UV e de massas, pois esses detectores estão acoplados a cromatógrafos líquido que permitem a separação prévia dos analitos e em caso de dúvidas em relação a um determinado sinal, este poderia ser confrontado com os espectros IVTF e RMN de ^1H e/ou ^{13}C , os quais só foram possíveis relacionar ao banco de dados espectrais quando disponível massa suficiente de matéria-prima e solventes deuterados compatíveis com as suas solubilidades.

Analisando o conjunto de moléculas sob o conceito de acidez e basicidade, as onze substâncias pertencentes ao grupo das aminas adrenérgicas possuem grupamentos ácidos (OH ligado ao carbono β) e grupamentos amino terminais totalmente substituídos ou não, com características básicas (figura 4). Apenas a furosemida, da classe dos diuréticos de alça (figura 6), tem somente características ácidas. Clortalidona e hidroclorotiazida pertencentes a classe dos diuréticos tiazídicos possuem características básicas em meio aquoso, assim como o anorexígeno sibutramina, que é uma amina pouco nucleofílica. Já o anorexígeno rimonabanto possui características físico-químicas distintas, com um anel pirazol totalmente substituído e uma carboxamida, sendo pouco solúvel em água, mesmo na forma de sal (figura 5).

Devido à presença de várias bases a serem separadas por cromatografia líquida e ao fato das colunas cromatográficas utilizadas serem de base sílica, ou seja, contêm grupamentos do tipo silanol ($\text{pK}_a = 3,5$) optou-se por trabalhar com derivatização através de pareamento iônico com ânions, como os alquilssulfonatos em meio ácido.

Por meio de testes prévios variou-se o tamanho do contraíon, com metanossulfonato, heptanossulfonato e decanossulfonato e elegeu-se o heptanossulfonato, que garantiu simetria aceitável e fator de retenção (k') dentro de parâmetros razoáveis, considerando um volume morto (V_0) estimado para as colunas em torno de 1,8 a 2 mL.

Inicialmente foram testadas duas colunas, Phenomenex® e Ace®, respeitando as condições cromatográficas estabelecidas para cada uma das colunas. Empregando-se ambos os métodos de triagem separadamente foram

obtidos cromatogramas das análises individuais das matérias-primas, da mistura das matérias-primas e das amostras.

Os resultados obtidos para as amostras com a coluna Phenomenex® e Ace® foram comparados e verificou-se que os resultados para as duas colunas foram similares levando às mesmas conclusões. Decidiu-se então apresentar os resultados para as amostras analisadas obtidos com a coluna Phenomenex®.

Foram realizadas comparações entre cada cromatograma das amostras com o cromatograma da mistura de matérias-primas ou com o cromatograma de cada matéria-prima, em busca de coincidências de tempos de retenção e formatos de picos e, em caso positivo ou duvidoso, os formatos dos picos foram analisados quanto à similaridade. Em seguida, com auxílio do detector UV-DAD, o espectro do sinal detectado foi confrontado com o banco de espectros UV.

No caso de não haver semelhança espectral ficou afastada definitivamente a hipótese de identificação positiva e havendo alguma similaridade, o espectro do sinal detectado foi comparado com o banco de espectros de massas de alta resolução, IVTF ou RMN.

5.1 EFICIÊNCIA DA EXTRAÇÃO

A fim de testar a eficiência do método de extração das substâncias estudadas nas amostras analisadas foi preparado um padrão múltiplo com dois estimulantes derivados da feniletilamina (sinefrina e clenbuterol) e uma substância diurética (clortalidona) a 100 µg/mL e, posteriormente o padrão múltiplo foi adicionado nas amostras conforme descrito em 4.2.6. Os resultados das áreas referentes às análises em triplicata do padrão múltiplo sem a amostra e com as amostras SCBA, NUTRED e HBCO, utilizados para determinar a eficiência da extração dos analitos nas amostras estão apresentados na tabela 4. Os valores da eficiência da extração mostraram-se satisfatórios, uma vez que variaram de 72-97% para os adulterantes nas três amostras analisadas (INMETRO,2010).

Tabela 4 - Ensaios da eficiência da extração da sinefrina, clortalidona e clenbuterol nas amostras SCBA, NUTRED e HBCO.

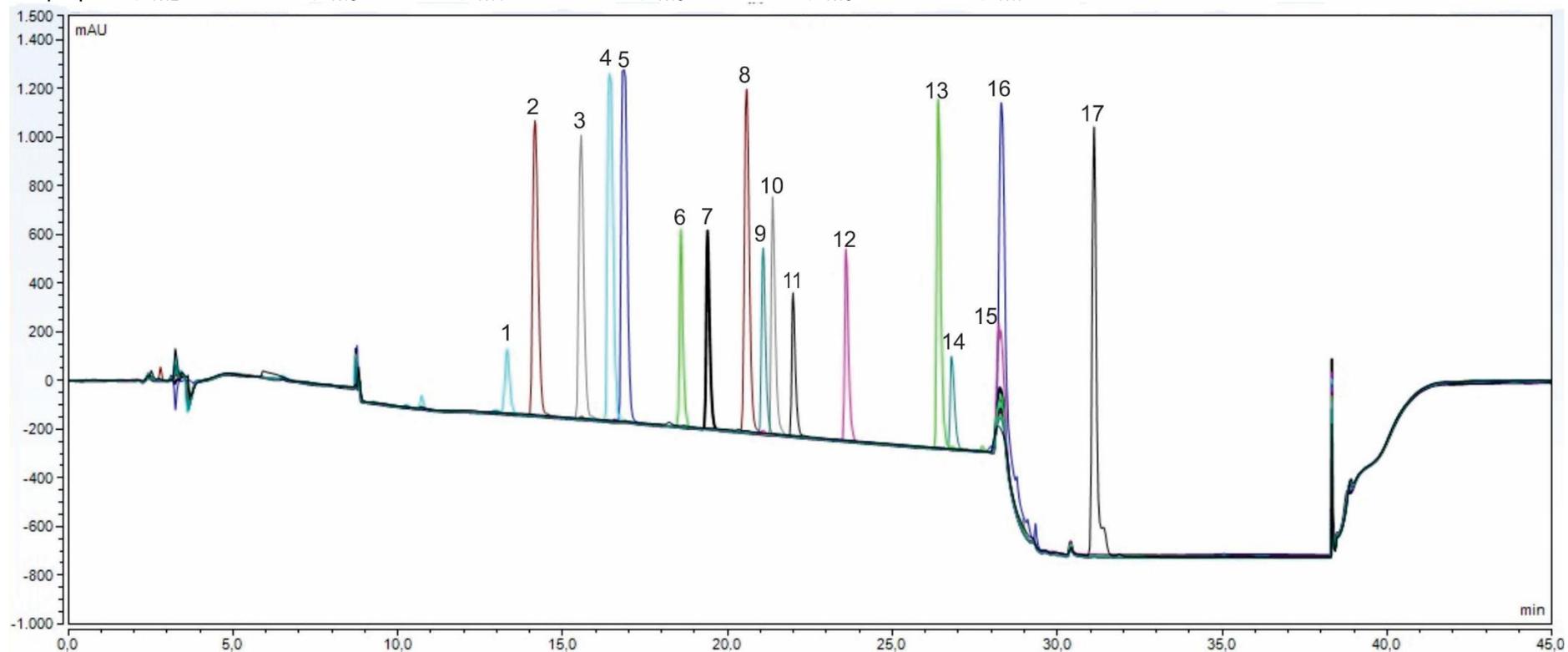
Matéria-prima	Amostra + padrão múltiplo						
	Padrão-múltiplo	Área mAU*min			(% Eficiência da extração)		
		SCBA	NUTRED	HBCO	SCBA	NUTRED	HBCO
Sinefrina	117,57	94,43	95,33	103,76	80,32	81,08	88,25
Clortalidona	98,58	81,75	95,38	83,00	82,93	96,75	84,20
Clenbuterol	46,02	33,30	38,54	43,10	72,36	83,75	93,65

5.2 RESULTADOS UTILIZANDO-SE A COLUNA PHENOMENEX®

Os resultados dos 17 cromatogramas obtidos através das análises individuais das matérias-primas foram sobrepostos com o auxílio do *software* Chromeleon® que permitiu a visualização de um só cromatograma (figura 17). Também foram obtidos cromatogramas da mistura dessas 17 substâncias, tanto por UV, quanto por DAD (figura 18).

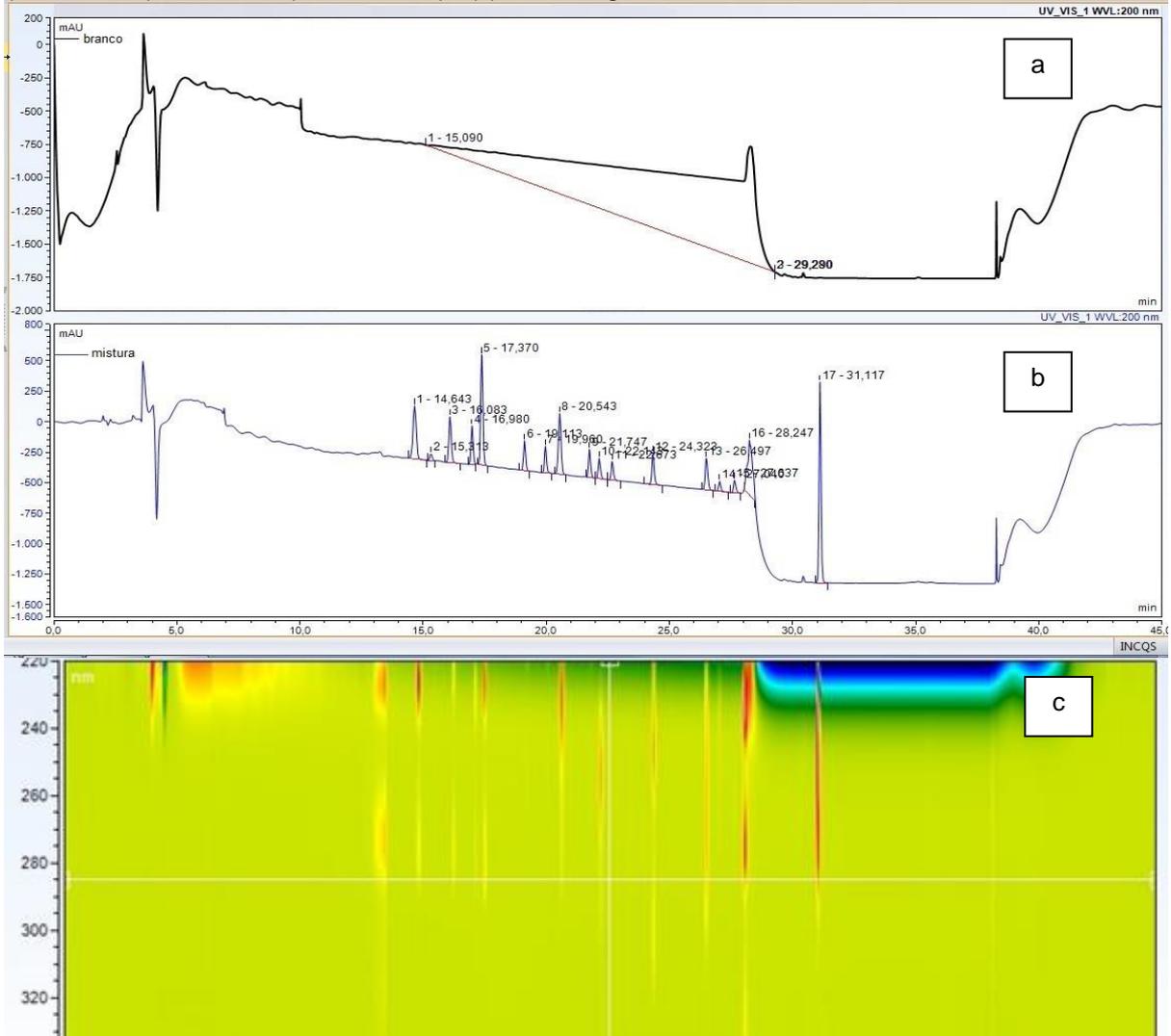
O diluente foi analisado (figura 18), objetivando verificar o perfil do gradiente citado na tabela 3 e possíveis sinais residuais, uma vez que todos os sinais foram monitorados no comprimento de onda de 200 nm, o qual foi selecionado a partir de uma varredura minuciosa das substâncias, com o auxílio do detector UV-DAD e, devido tanto às diversidades entre os comprimentos de onda máximos de absorção, quanto das respectivas absorvidades molares, 200 nm permitiu a visualização de todos os picos cromatográficos na mesma ordem de grandeza de sinal.

Figura 17- Cromatograma referente à sobreposição das 17 substâncias analisadas individualmente: t_{R1} = hidroclorotiazida; t_{R2} = sinefrina; t_{R3} = fenilpropranolamina; t_{R4} = salbutamol; t_{R5} = terbutalina; t_{R6} = fenilefrina; t_{R7} = efedrina; t_{R8} = Clortalidona; t_{R9} = metanfetamina; t_{R10} = anfepramona; t_{R11} = femproporex; t_{R12} = clenbuterol; t_{R13} =mazindol; t_{R14} =fenfluramina; t_{R15} =furosemida; t_{R16} =sibutramina; t_{R17} =rimonabanto.



Condições experimentais: Cromatograma obtido por HPLC UV-Visível, λ : 200nm, coluna **phenomenex**®, fase A: solução 0,1% de heptanosulfonato (p/v) com pH de 3,55, fase C: acetonitrila e fluxo: 1mL/min.

Figura 18- (a) Cromatograma referente ao diluente; (b) cromatograma UV da mistura das 17 substâncias: t_{R1} = 14,6 (hidroclorotiazida); t_{R2} = 15,3 (sinefrina); t_{R3} = 16,1 (fenilpropranolamina); t_{R4} = 16,9 (salbutamol); t_{R5} = 17,3 (terbutalina); t_{R6} = 19,1 (fenilefrina); t_{R7} = 19,9 (efedrina); t_{R8} = 20,5 (Clortalidona); t_{R9} = 21,7 (metanfetamina); t_{R10} = 22,1 (anfepiramina); t_{R11} = 22,6 (femproporex); t_{R12} = 24,3 (clenbuterol); t_{R13} = 26,5 (mazindol); t_{R14} = 27,0 (fenfluramina); t_{R15} = 27,7 (furosemda); t_{R16} = 28,5 (sibutramina); t_{R17} = 31,1 (rimonabanto); (c) Cromatograma DAD da mistura das substâncias.



Condições experimentais: Cromatograma obtido por HPLC UV-Visível, λ : 200nm utilizando-se a coluna **Phenomenex**®, diluente: composto por uma solução de água e isopropanol a 50% (v/v), fase A: solução 0,1% de heptanosulfonato (p/v) com pH=3,55, fase C: acetonitrila e fluxo: 1mL/min.

Comparando-se o cromatograma da figura 17 referente à sobreposição das substâncias analisadas individualmente com o cromatograma da figura 18 correspondente a mistura das soluções de todas as matérias-primas, pode ser observado que a resolução entre a furosemda (t_{R15} = 27,7 min) e a sibutramina (t_{R16} = 28,5 min) aumentou, podendo ser considerada satisfatória.

O fato da resolução entre os picos ter aumentado pode ser atribuído a dois fatores: algum efeito sinérgico com a análise da mistura e o aumento da eficiência dos sinais das substâncias estudadas devido à diluição de 17 vezes. Contudo,

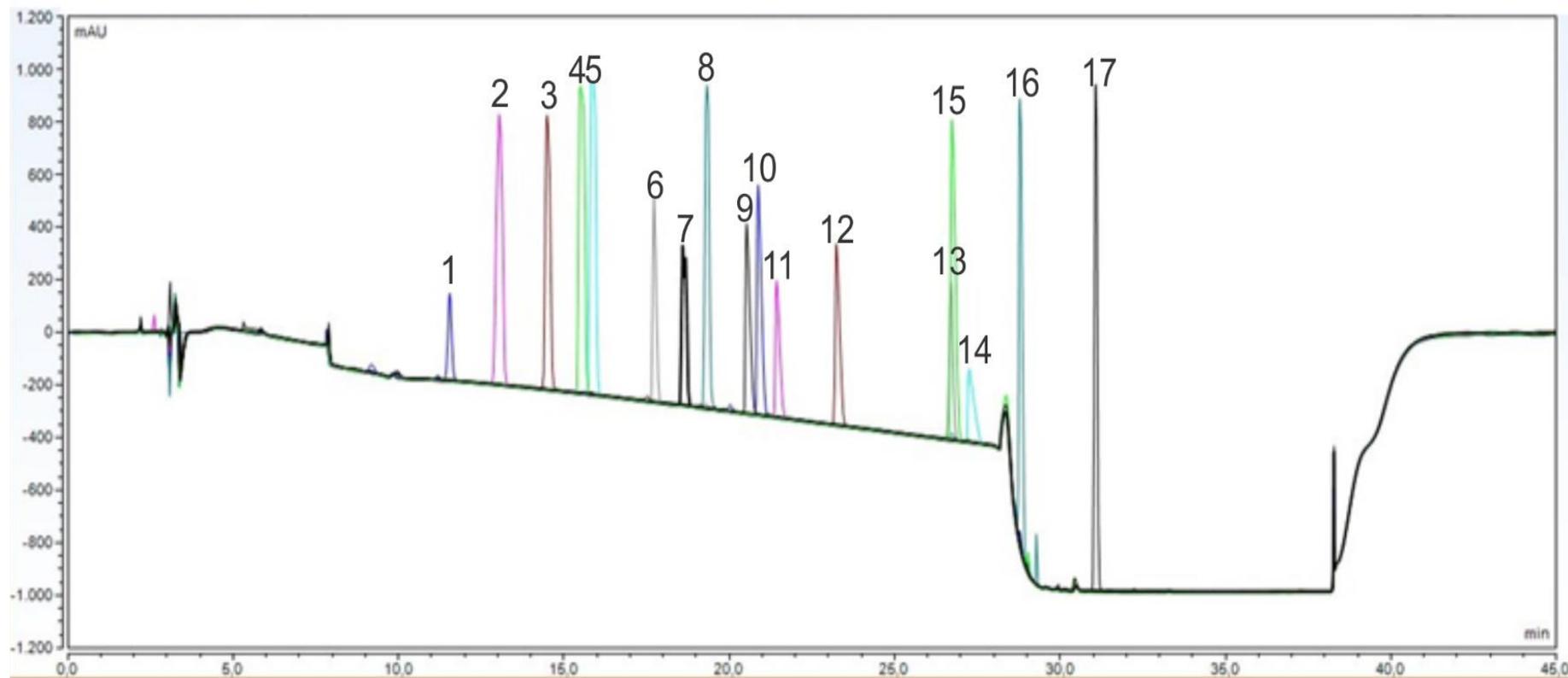
comparando-se o cromatograma do branco com o cromatograma da mistura (figura 18), também pode ser observado que a sibutramina eluiu exatamente na deflexão do “background” do gradiente, em torno de 28,5 minutos, logo após o retorno à composição inicial da fase móvel, com 5% de acetonitrila (tabela 3). Com auxílio do detector DAD, os espectros UV foram comparados em termos de similaridade aos espectros individuais de cada substância (banco de dados espectrais no Apêndice A) estando todos em conformidade.

5.3 RESULTADOS UTILIZANDO-SE A COLUNA ACE®

Assim como foi realizado para a coluna Phenomenex®, realizaram-se análises individuais das 17 matérias-primas, desta vez com a coluna Ace®. Foi obtido um cromatograma referente à sobreposição das análises individuais por meio do *software* Chromeleon® (figura 19). Entretanto, no cromatograma composto pela sobreposição das substâncias analisadas individualmente, foi observado que houve coeluição entre a furosemida (t_{R15}) e o mazindol (t_{R13}), em aproximadamente 26,7 minutos (figura 19).

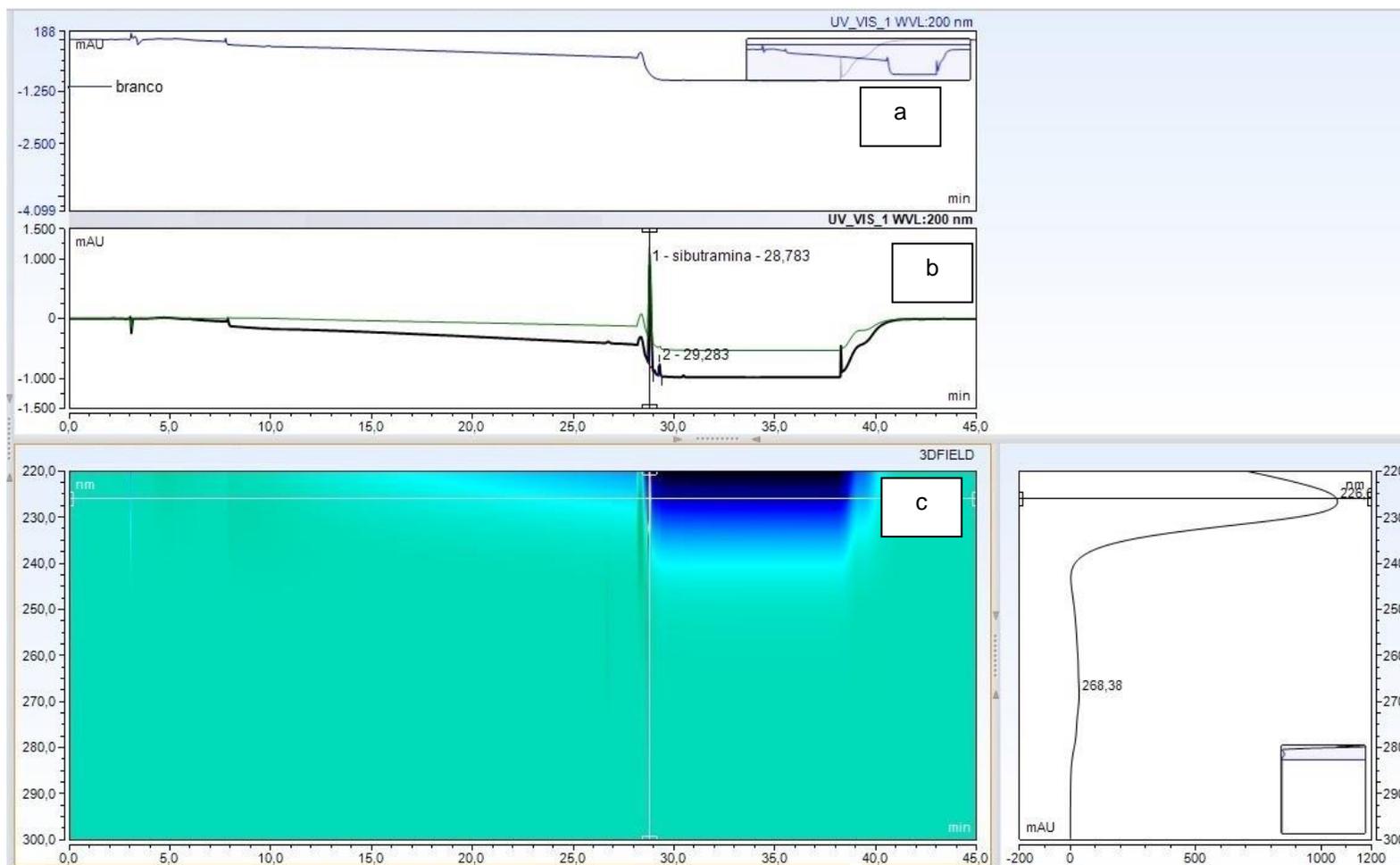
A alteração do gradiente (tabela 4) visou deslocar o sinal da sibutramina da inflexão do “background” e os resultados obtidos para esse objetivo foram considerados satisfatórios, como pode ser observado no cromatograma que compara os espectros do diluente e da matéria-prima sibutramina, vista normal (figura 20) e vista expandida (figura 21).

Figura 19- Cromatograma referente à sobreposição das 17 substâncias, t_{R1} = hidroclorotiazida; t_{R2} = sinefrina; t_{R3} = fenilpropanolamina; t_{R4} = salbutamol; t_{R5} = terbutalina; t_{R6} = fenilefrina; t_{R7} = efedrina; t_{R8} = Clortalidona; t_{R9} = metanfetamina; t_{R10} = anfepramona; t_{R11} = femproporex; t_{R12} = clenbuterol; t_{R13} = mazindol; t_{R14} = fenfluramina; t_{R15} = furosemida; t_{R16} = sibutramina; t_{R17} = rimonabanto.



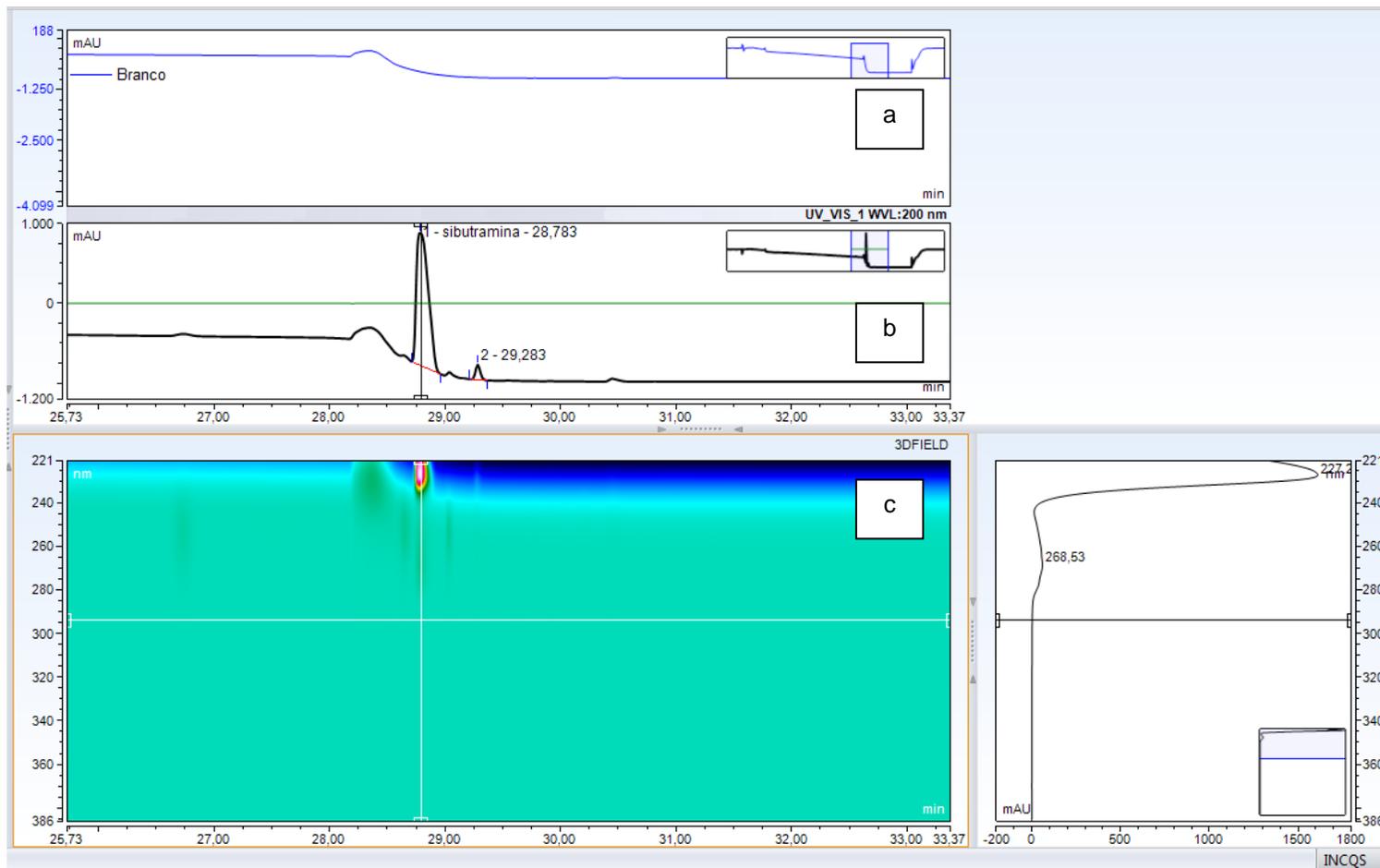
Condições experimentais: Cromatograma obtido através do HPLC-UV-DAD, λ : 200nm, utilizando-se a coluna **Ace®**, fase A: solução 0,1% de heptanosulfonato (p/v) com pH 3,55, fase C: acetonitrila e fluxo: 1mL/min.

Figura 20- (a) Cromatograma vista normal UV-visível referente à análise do diluente (branco), (b) cromatograma referente à análise da sibutramina; (c) Cromatograma DAD referente a análise da sibutramina.



Condições experimentais: Cromatograma s obtidos através do HPLC -UV-DAD, λ : 200nm, utilizando-se a coluna **Ace**®, diluente: composto por uma solução de água e isopropanol a 50% (v/v), fase A: solução 0,1% de heptanosulfonato (p/v) com pH 3,55, fase C: acetonitrila e fluxo: 1mL/min.

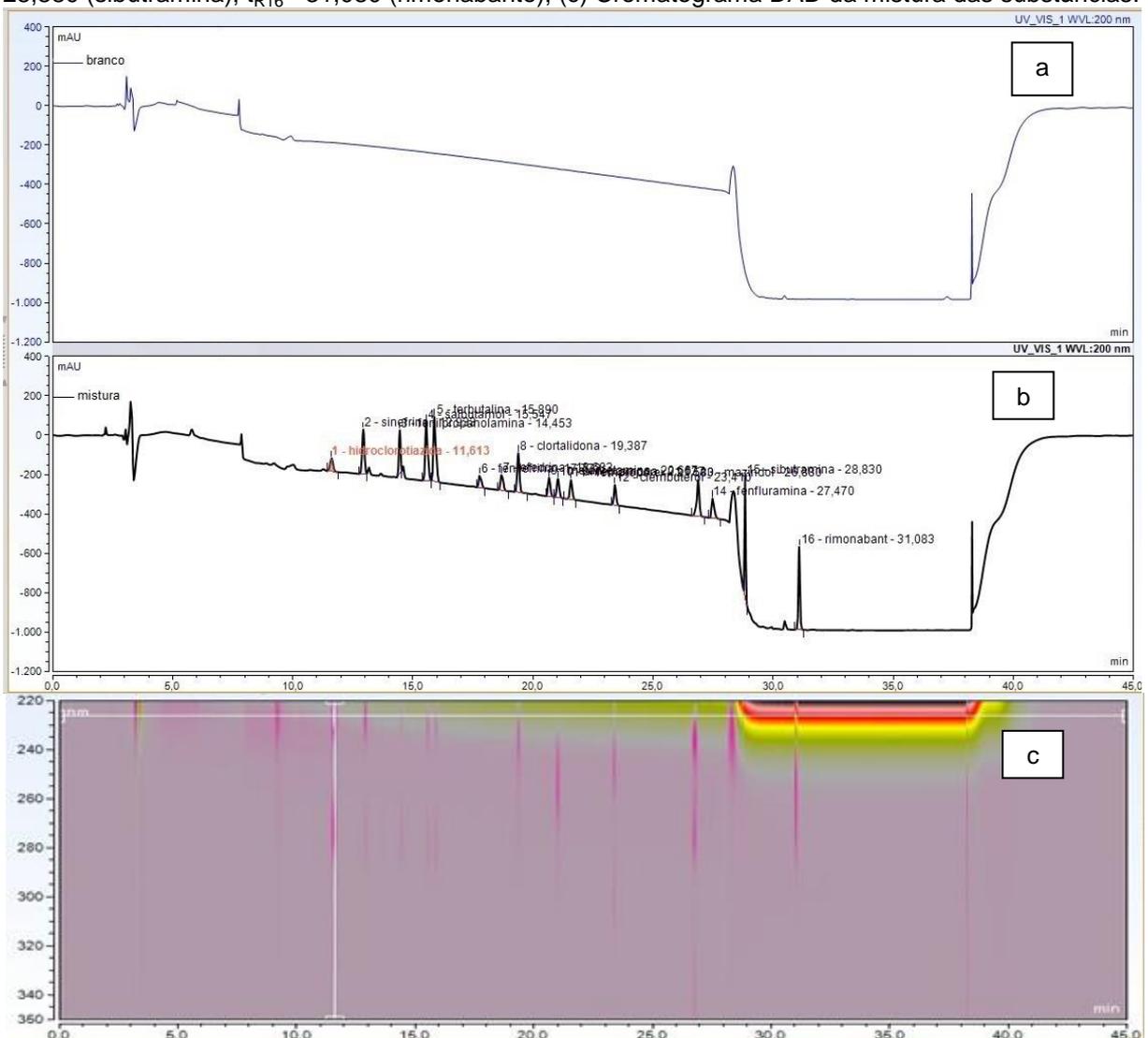
Figura 21- (a) Cromatograma expandido UV-visível referente ao diluente (branco) em comparação a sibutramina (b); (c) Cromatograma DAD referente à análise da sibutramina.



Condições experimentais: Cromatogramas obtidos através do HPLC-UV/Vis-DAD, λ : 200nm, utilizando-se a coluna **Ace®**, diluente: composto por uma solução de água e isopropanol a 50% (v/v), fase A: solução 0,1% de heptanosulfonato (p/v) com pH 3,55, fase C: acetonitrila e fluxo: 1 mL/min.

Após as análises individuais das 17 matérias-primas (figura 19), foi analisada a mistura dessas substâncias (figura 22) com a coluna Ace®, sendo esperado, como no ensaio utilizando a coluna Phenomenex®, aumento de resolução, porém o mazindol e a furosemida continuaram coeluído em aproximadamente 26,8 minutos (t_{R13}).

Figura 22- (a) Cromatograma do diluente; (b) cromatograma da mistura das 17 substâncias: t_{R1} = 11,613 (hidroclorotiazida); t_{R2} = 12,900 (sinefrina); t_{R3} = 14,450 (fenilpropranolamina); t_{R4} = 15,500 (salbutamol); t_{R5} = 15,890 (terbutalina); t_{R6} = 17,770 (fenilefrina); t_{R7} = 18,680 (efedrina); t_{R8} = 19,300 (Clortalidona); t_{R9} = 20,660 (metanfetamina); t_{R10} = 21,040 (anfeparamona); t_{R11} = 21,580 (femproporex); t_{R12} = 23,410 (clembuterol); t_{R13} = 26,880 (mazindol/furosemida); t_{R14} = 27,470 (fenfluramina); t_{R15} = 28,880 (sibutramina); t_{R16} = 31,080 (rimonabanto); (c) Cromatograma DAD da mistura das substâncias.

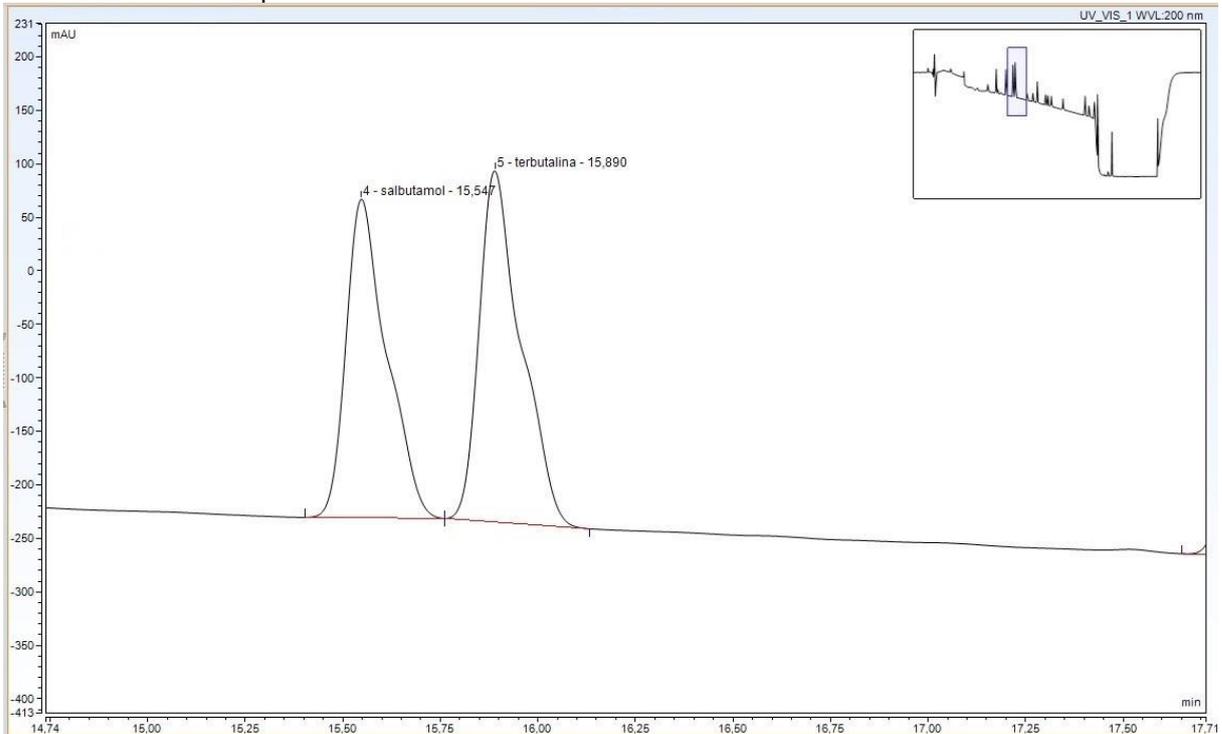


Condições experimentais: Cromatograma obtido através do HPLC -UV-DAD, λ : 200nm, utilizando-se a coluna **Ace®**, diluente: composto por uma solução de água e isopropanol a 50% (v/v), fase A: solução 0,1% de heptanosulfonato (p/v) com pH 3,55, fase C: acetonitrila e fluxo: 1mL/min.

Foi observada uma melhora global nas resoluções, por exemplo, entre o salbutamol: t_{R4} = 15,547 e terbutalina: t_{R5} = 15,890 (figura 23) e entre a

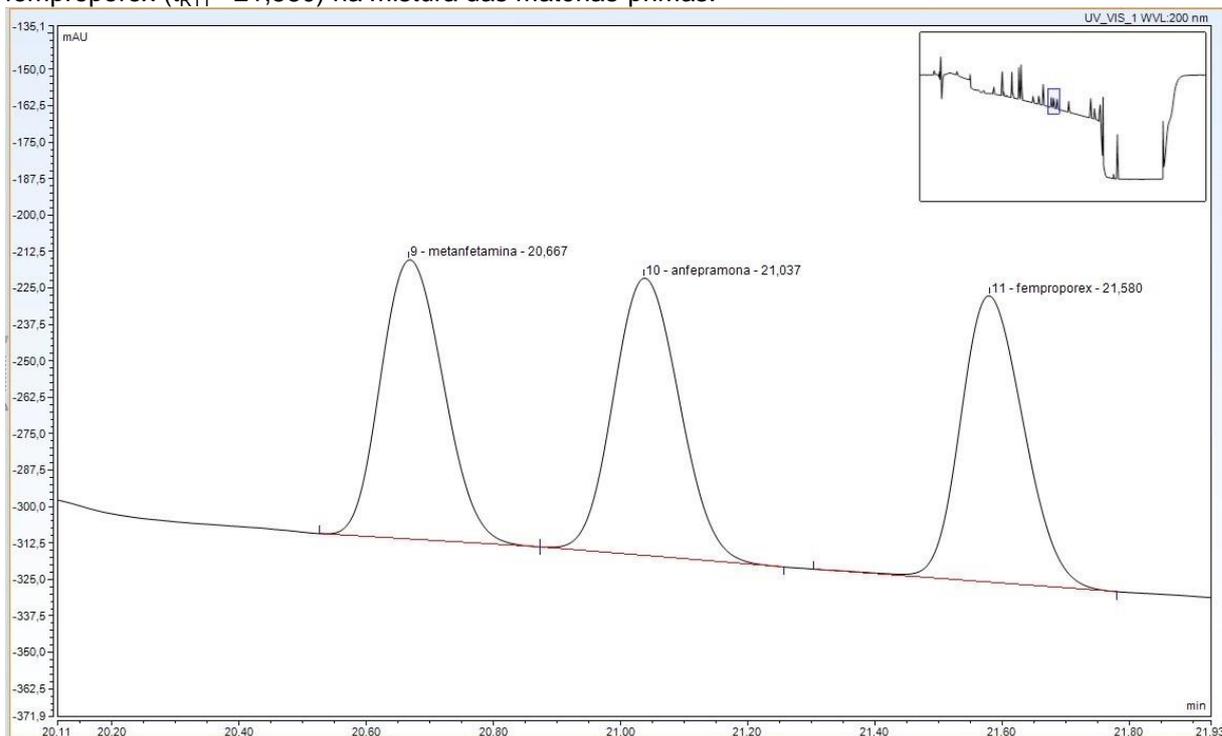
metanfetamina: $t_{R9} = 20,667$, anfepramona: $t_{R10} = 21,037$ e femproporex ($t_{R11} = 21,580$) (figura 24), cujas resoluções calculadas através do *software* Chromeleon® foram, em ambos os casos, em torno de 1,9, ou seja, sem sobreposição.

Figura 23- Cromatograma referente ao salbutamol ($t_{R4} = 15,547$) e a terbutalina ($t_{R5} = 15,890$) na mistura das matérias-primas.



Condições experimentais: Cromatograma UV-Visível referente à análise das 17 substâncias (femproporex, sinefrina, sibutramina, anfepramona, fenilefrina, metanfetamina, efedrina, salbutamol, terbutalina, fenilpropranolamina, clortalidona, furosemida, hidroclorotiazida, mazindol, clenbuterol, fenfluramina e rimonabanto) através do HPLC -UV-DAD, λ : 200nm, utilizando-se a coluna **Ace®**, diluente: composto por uma solução de água e isopropanol a 50% (v/v) , fase A: solução 0,1% de heptanosulfonato (p/v) com pH 3,55, fase C: acetonitrila e fluxo: 1mL/min.

Figura 24- Cromatograma referente à metanfetamina ($t_{R9} = 20,667$), anfepramona ($t_{R10} = 21,037$) e femproporex ($t_{R11} = 21,580$) na mistura das matérias-primas.

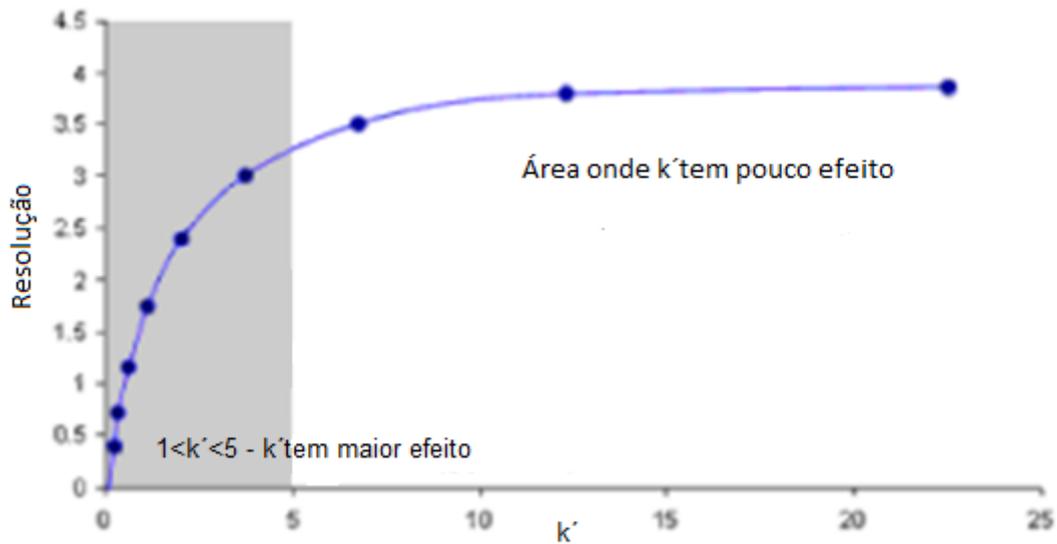


Condições experimentais: Cromatograma UV-Visível referente à análise das 17 substâncias (femproporex, sinefrina, sibutramina, anfepramona, fenilefrina, metanfetamina, efedrina, salbutamol, terbutalina, fenilpropranolamina, clortalidona, furosemida, hidroclorotiazida, mazindol, clenbuterol, fenfluramina e rimonabanto) através do HPLC -UV-DAD, λ : 200nm, utilizando-se a coluna **Ace®**, diluente: composto por uma solução de água e isopropanol a 50% v/v, fase A: solução 0,1% de heptanosulfonato (p/v) com pH 3,55, fase C: acetonitrila e fluxo: 1mL/min.

Os resultados obtidos com as duas colunas, Phenomenex® e Ace® foram considerados satisfatórios e optou-se por não alterar o k' da sibutramina do primeiro experimento, o qual utilizou-se a coluna Phenomenex®, e nem resolver a coeluição entre o mazindol e a furosemida do segundo experimento, em que se utilizou a coluna Ace®, pois se fosse diminuído o teor de acetonitrila para aumentar a resolução, isso implicaria em aumentar os tempos de retenção para a furosemida, mazindol, sibutramina e outras substâncias, que já estão eluindo em cerca de 14 a 15 vezes do V_0 , segundo os cromatogramas (figuras 17 e 19).

Segundo a literatura, provavelmente essa alteração não traria melhora significativa para resolver essas substâncias que estão eluindo em cerca de 12,5 a 14,5 de k' . Isso porque, o gráfico Resolução versus k' demonstra que a partir de cerca de $5k'$ começam a diminuir as chances de aumentar a resolução entre dois picos somente modificando a composição da fase móvel com o objetivo de aumentar o k' (figura 25) (SKOOG, 2009, p. 893).

Figura 25- Gráfico da resolução em função do fator de retenção (k').



Fonte: SKOOG, 2009, p. 893.

5.4 RESULTADO DAS ANÁLISES DAS AMOSTRAS UTILIZANDO-SE A COLUNA PHENOMENEX®

As condições experimentais definidas para as análises de todas as amostras descritas na tabela 3 através do HPLC–UV/Vis-DAD foram: λ : 200nm; coluna: Phenomenex®; fluxo: 1mL/min; diluente: solução de água e isopropanol a 50% (v/v); fase A: solução de heptanossulfonato 0,1% (p/v) com pH 3,55 e fase C: acetonitrila.

5.4.1 RESULTADOS DAS AMOSTRAS DE CHÁ VERDE

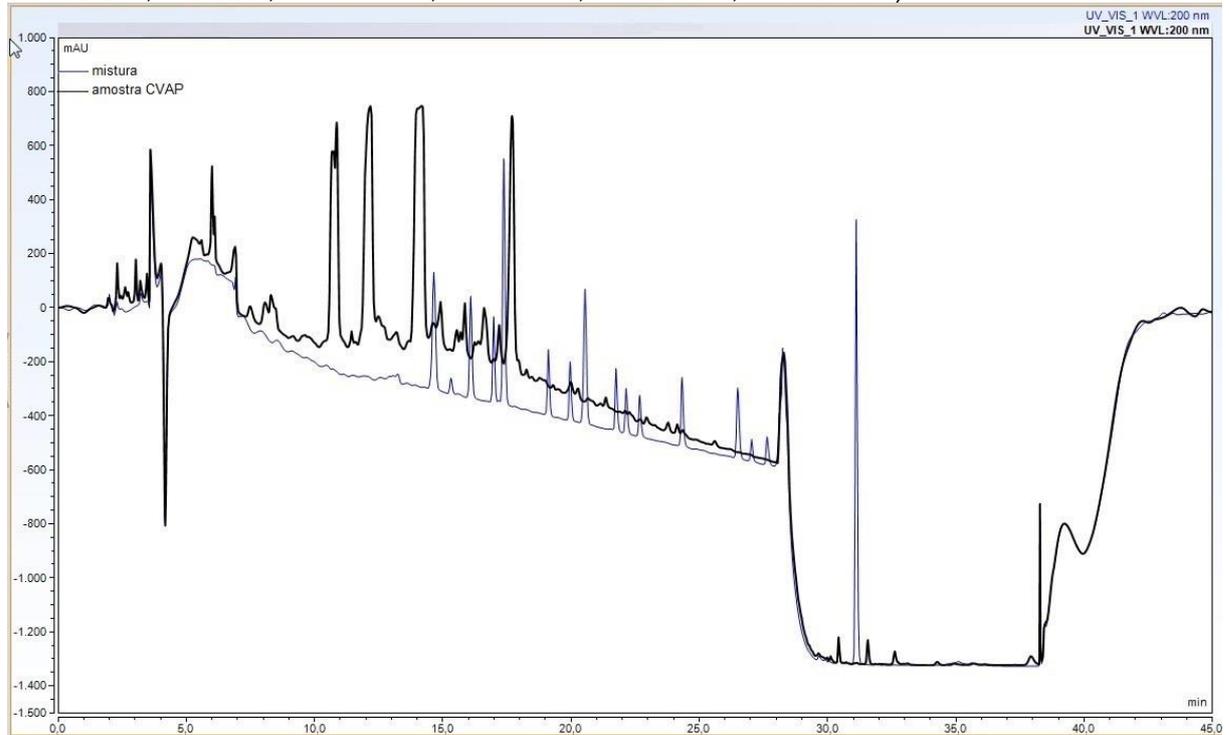
5.4.1.1 Amostras CVAP, TL12767, TL0040, TL0017 e TL0060

Inicialmente foram estudadas as amostras relativas a 3 marcas diferentes de chá verde do mercado nacional (quadro 5), variando-se o lote dessas marcas.

Foi considerado que na sobreposição entre o cromatograma da amostra CVAP e o da mistura das matérias-primas (figura 26 – vista real e figura 27 – vista expandida) não ocorreram sobreposição de sinais (após observação dos espectros UV) com intensidade suficiente para justificar suspeita da presença de alguma das substâncias em estudo em dosagem terapêutica. Essa conclusão foi reforçada

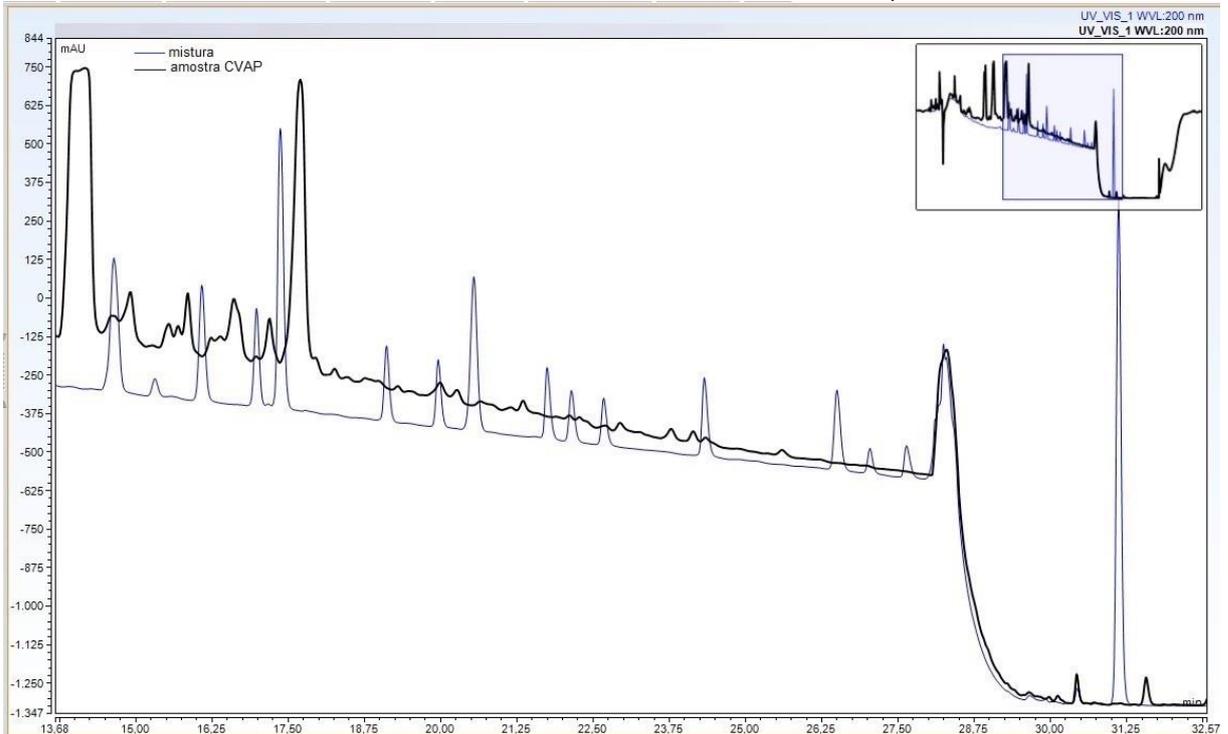
através da comparação dos espectros UV dos picos da amostra e do padrão de k' mais próximos, com auxílio do detector DAD.

Figura 26- Cromatograma vista real da sobreposição entre o cromatograma da amostra CVAP e o cromatograma da mistura de matérias-primas (hidroclorotiazida, sinefrina, fenilpropranolamina, salbutamol, terbutalina, fenilefrina, efedrina, clortalidona, metanfetamina, anfepramona, femproporex, clenbuterol, mazindol, fenfluramina, furosemida, sibutramina, rimonabanto).



Condições experimentais: Cromatograma obtido através do HPLC–UV/Vis-DAD, λ : 200nm, utilizando-se a coluna **Phenomenex**®, diluente: composto por uma solução de água e isopropanol a 50% v/v, fase A: solução 0,1% de heptanosulfonato (p/v) com pH 3,55, fase C: acetonitrila, fluxo: 1mL/min .

Figura 27- Cromatograma vista expandida da sobreposição entre o cromatograma da amostra CVAP e o cromatograma da mistura de matérias-primas (hidroclorotiazida, sinefrina, fenilpropranolamina, salbutamol, terbutalina, fenilefrina, efedrina, clortalidona, metanfetamina, anfepramona, femproporex, clenbuterol, mazindol, fenfluramina, furosemda, sibutramina, rimonabanto).

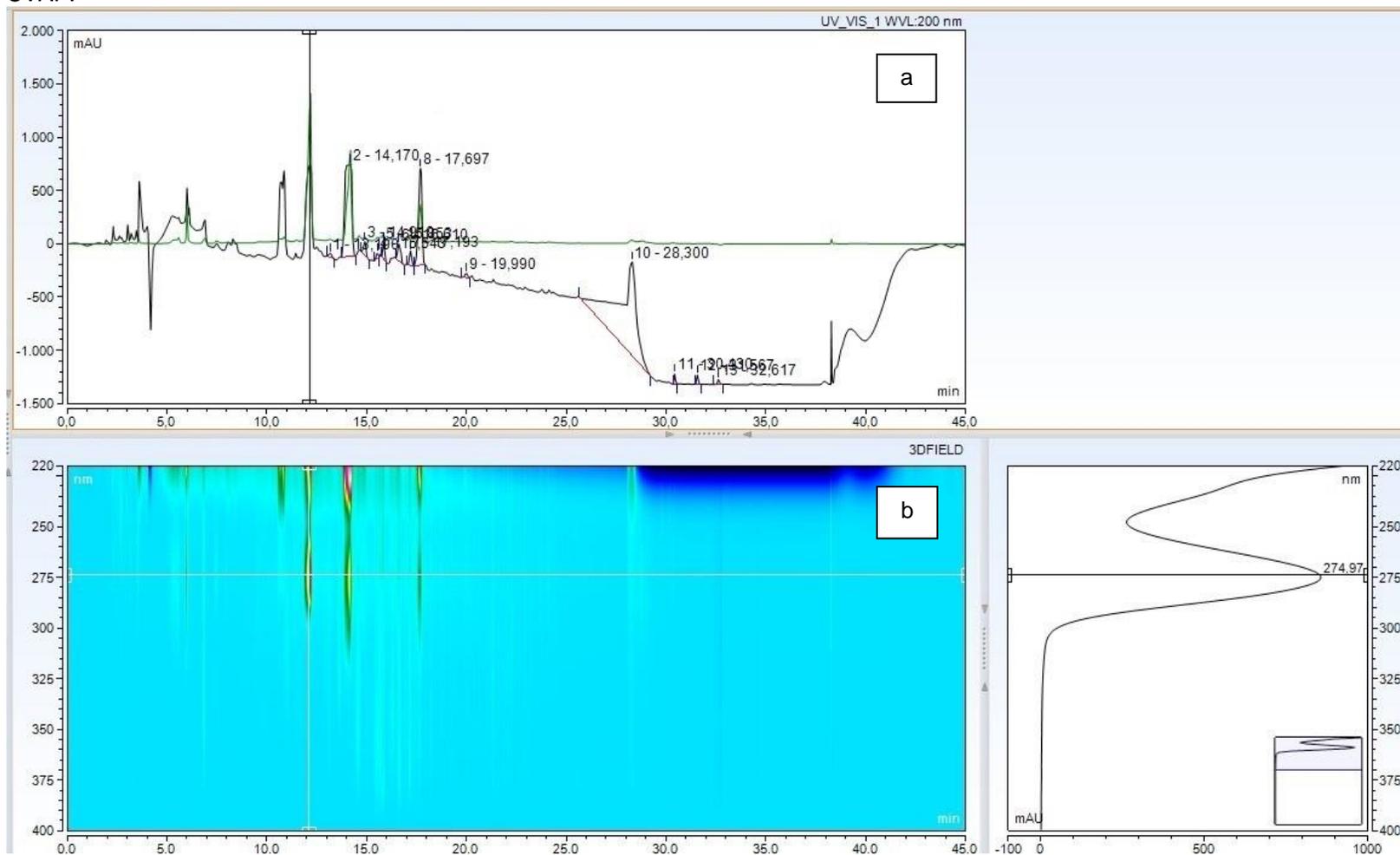


Condições experimentais: Cromatograma obtido através do HPLC –UV/Vis-DAD, λ : 200nm, utilizando-se a coluna **Phenomenex®**, diluente: composto por uma solução de água e isopropanol a 50% v/v, fase A: solução 0,1% de heptanosulfonato (p/v) com pH 3,55, fase C: acetonitrila, fluxo: 1mL/min .

Segundo a literatura na composição do chá verde consta, principalmente, catequinas, relacionadas aos taninos (ésteres do ácido gálico), como o epigalocatequina-3-galato (EGCG) e, contêm também derivados de xantinas, como a cafeína, teofilina e teobromina (FREITAS; NAVARRO, 2012; SEERAM et al, 2006).

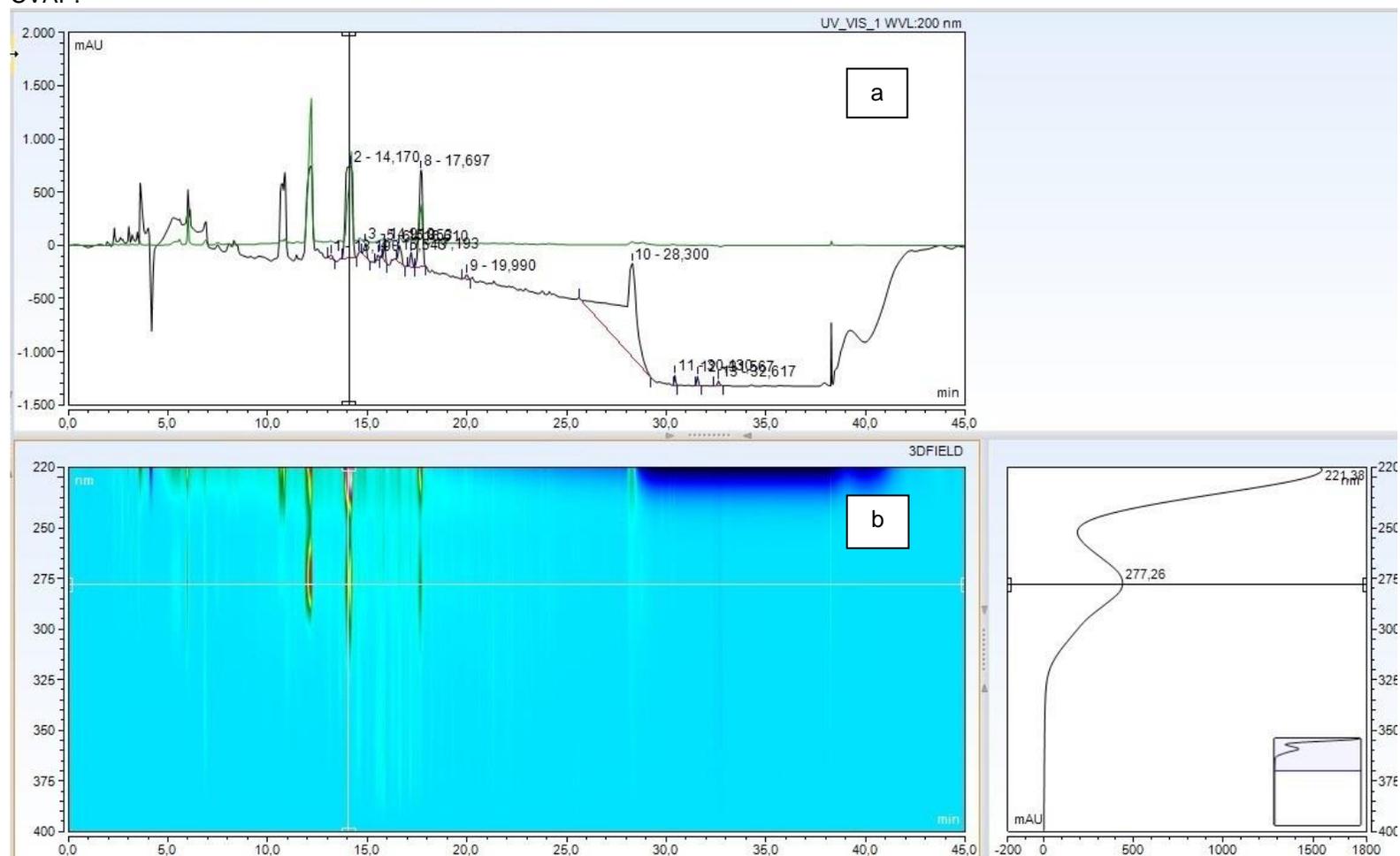
Nos cromatogramas referentes à amostra CVAP não foram observados nenhuma das substâncias estudadas. Contudo, a presença de dois sinais majoritários foi observado e, através da comparação com os espectros das matérias-primas do banco de dados, identificou-se sendo um sinal referente à cafeína (figura 28) e o outro ao EGCG (figura 29), marcadores comumente encontrados em amostra de chá verde. Na literatura consta que a cafeína apresenta um limite máximo de absorção no UV entre os comprimentos de onda de 271 e 275 nm, sendo o valor experimental da absorbância da cafeína (274,97nm) encontrado de acordo com o valor descrito na literatura e em banco de dados do Apêndice A (HOLIDAY, 1930).

Figura 28- (a) Cromatograma UV-Vis referente à amostra CVAP mostrando o pico em 274,97 nm da cafeína; (b) cromatograma por DAD referente à amostra CVAP.



Condições experimentais: Cromatograma obtido através do HPLC–UV/Vis-DAD, λ : 200nm, utilizando-se a coluna **Phenomenex®**, diluente: composto por uma solução de água e isopropanol a 50% v/v, fase A: solução 0,1% de heptanosulfonato (p/v) com pH 3,55, fase C: acetonitrila, fluxo: 1mL/min e concentração da amostra: 0,04 g/mL.

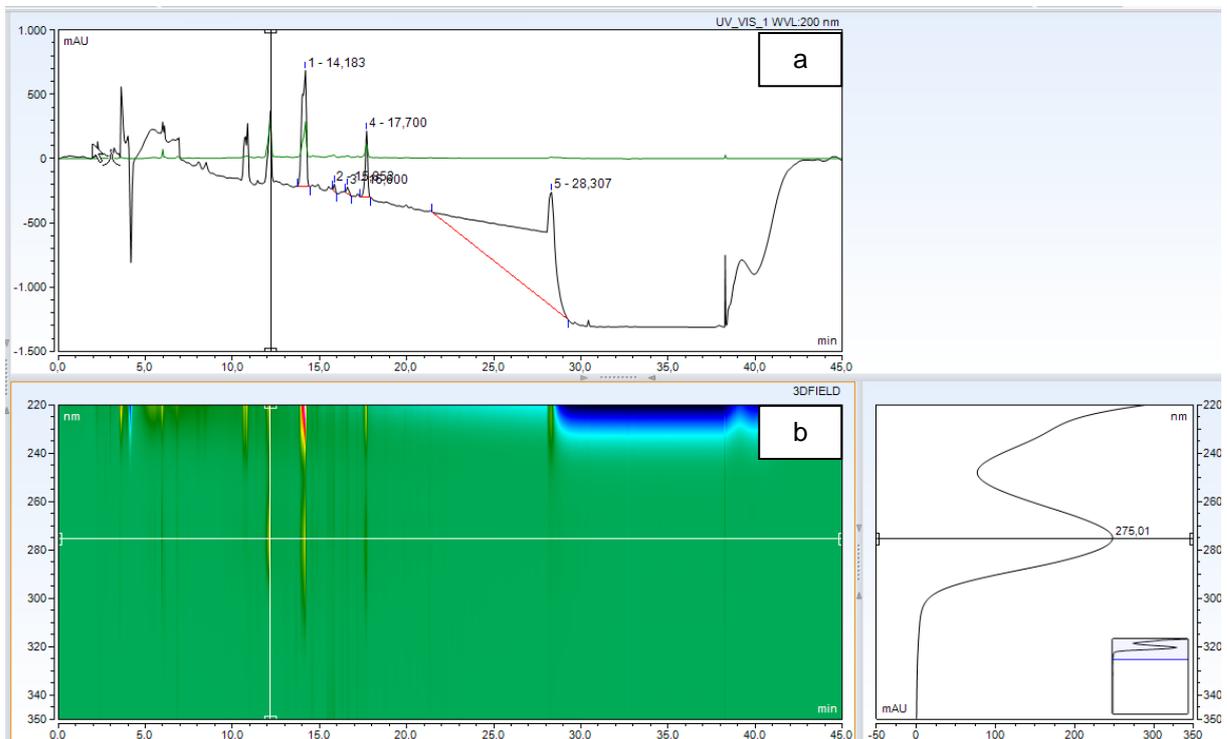
Figura 29- (a) Cromatograma UV/Vis referente à amostra CVAP mostrando o pico em 277,26 nm da EGCG; (b) cromatograma por DAD referente à amostra CVAP.



Condições experimentais: Cromatograma obtido através do HPLC–UV/Vis-DAD, λ : 200nm, utilizando-se a coluna **Phenomenex®**, diluente: composto por uma solução de água e isopropanol a 50% v/v, fase A: solução 0,1% de heptanosulfonato (p/v) com pH 3,55, fase C: acetonitrila, fluxo: 1mL/min .

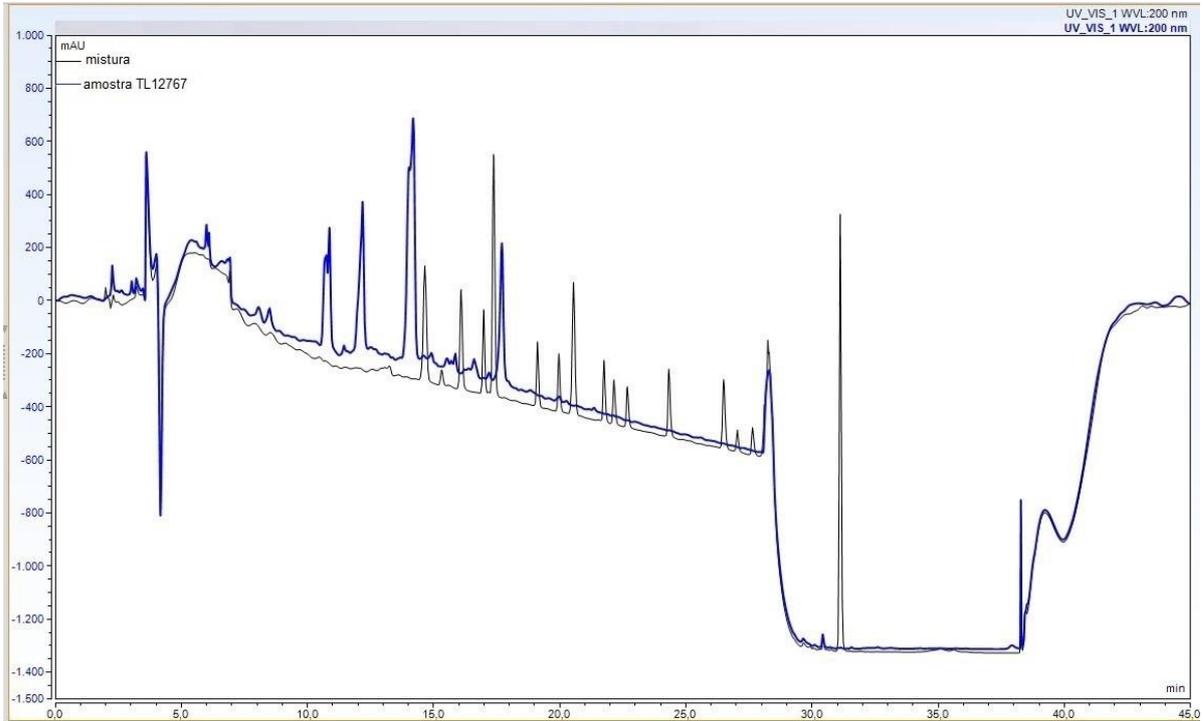
As amostras de chá verde: TL12767 (figuras 30 e 31), TL0040 (figuras 32 e 33), TL0017 (figuras 34 e 35) e TL0060 (figuras 36 e 37), apresentaram cromatogramas UV/Vis-DAD semelhantes ao da amostra de chá verde CVAP, ou seja, ausência de picos relacionados às substâncias estudadas e a presença dos marcadores que obrigatoriamente devem estar presentes em amostras de chá verde, os picos que eluem em cerca de 12,5 a 14 minutos referentes à cafeína e ao EGCG.

Figura 30 - (a) Cromatograma Uv/Vis (a); (b) cromatograma DAD referente à amostra TL12767.



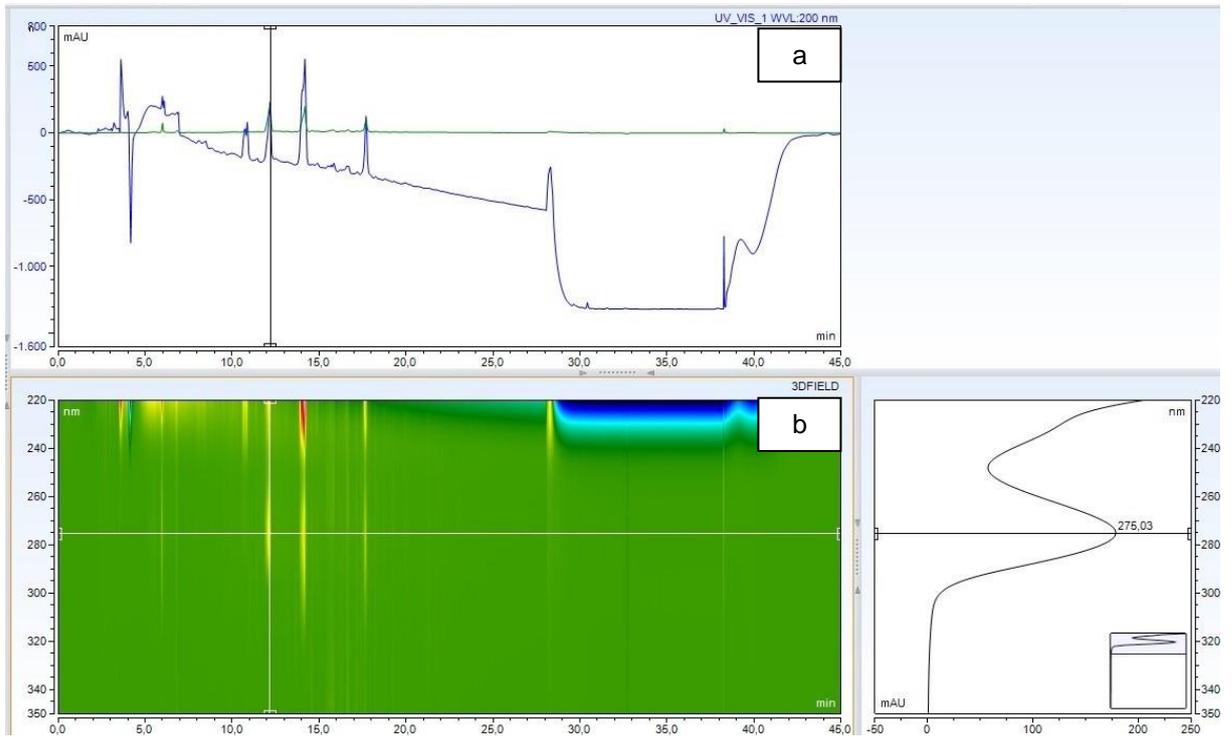
Condições experimentais: Cromatograma obtido através do HPLC–UV/Vis-DAD, λ : 200nm, utilizando-se a coluna **Phenomenex**®, diluente: composto por uma solução de água e isopropanol a 50% v/v, fase A: solução 0,1% de heptanosulfonato (p/v) com pH 3,55, fase C: acetonitrila, fluxo: 1mL/min .

Figura 31 - Cromatograma referente à sobreposição da mistura das substâncias (hidroclorotiazida, sinefrina, fenilpropanolamina, salbutamol, terbutalina, fenilefrina, efedrina, clortalidona, metanfetamina, anfepramona, femproporex, clenbuterol, mazindol, fenfluramina, furosemda, sibutramina, rimonabanto) e da amostra TL12767.



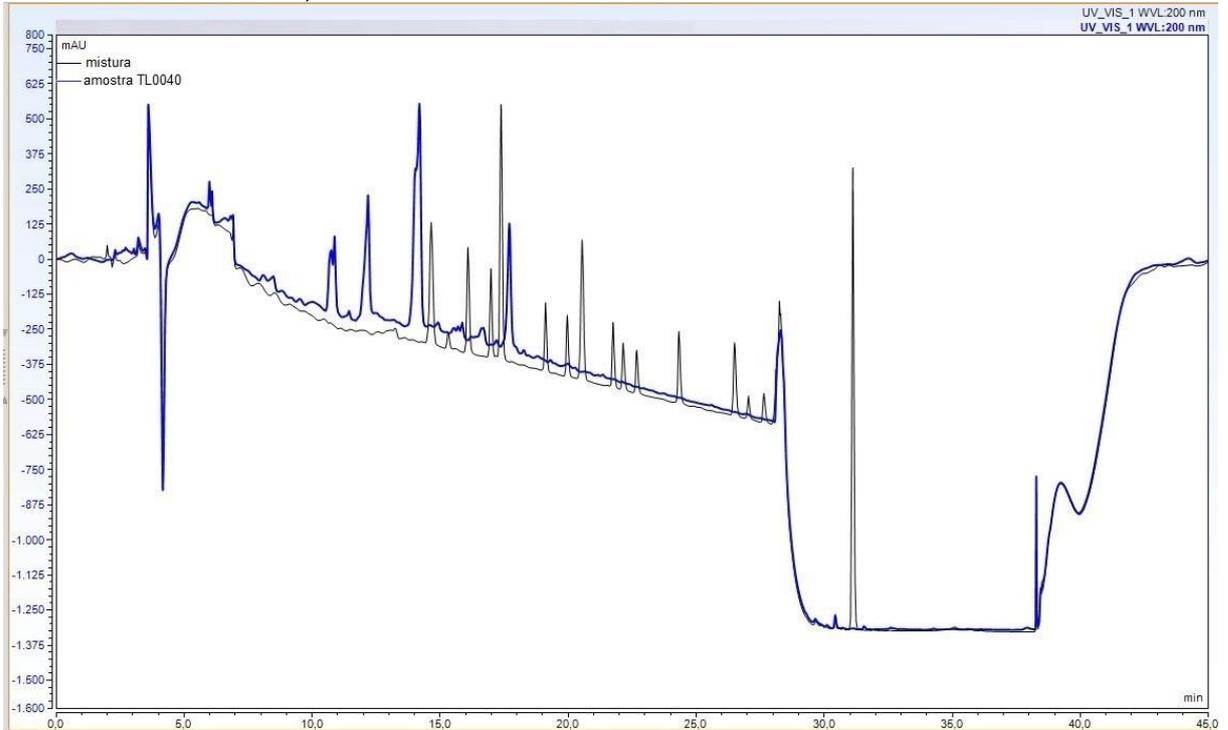
Condições experimentais: Cromatograma obtido através do HPLC–UV/Vis-DAD, λ : 200nm, utilizando-se a coluna **Phenomenex**®, diluente: composto por uma solução de água e isopropanol a 50% v/v, fase A: solução 0,1% de heptanosulfonato (p/v) com pH 3,55, fase C: acetonitrila, fluxo: 1mL/min .

Figura 32- (a) Cromatograma UV-Vis; (b) cromatograma DAD referente à amostra TL0040.



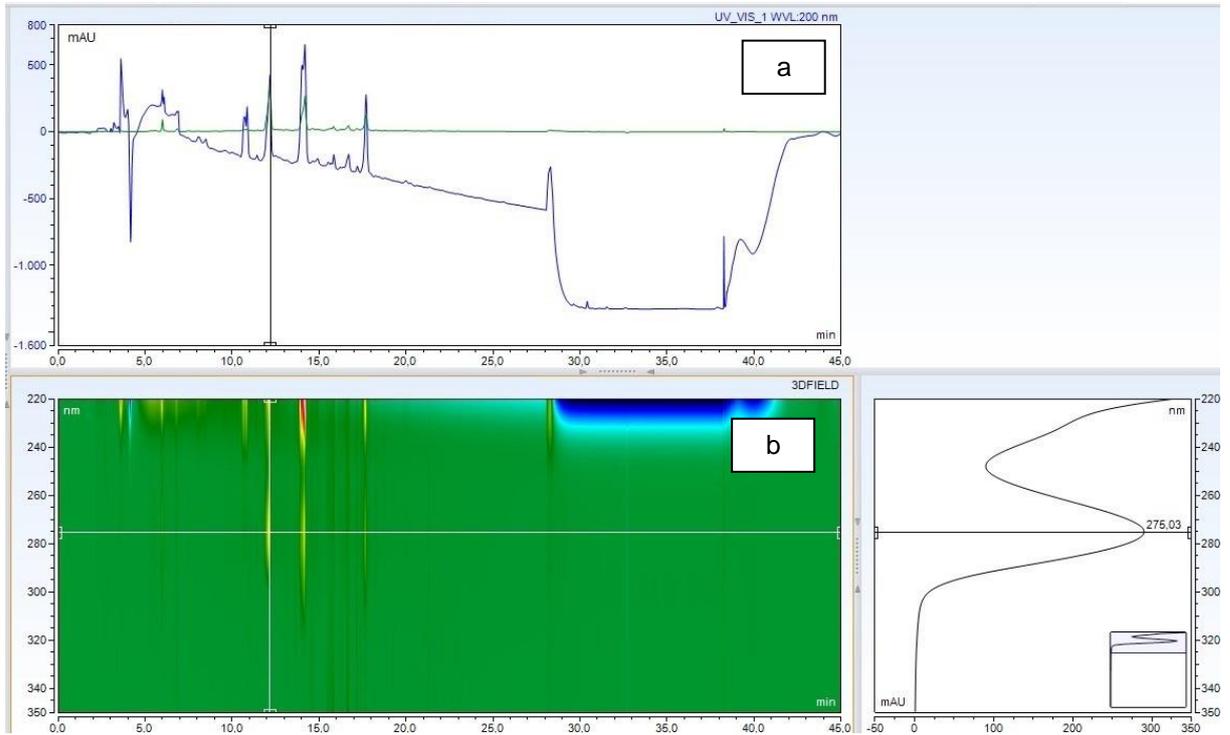
Condições experimentais: Cromatograma obtido através do HPLC–UV/Vis-DAD, λ : 200nm, utilizando-se a coluna **Phenomenex**®, diluente: composto por uma solução de água e isopropanol a 50% v/v, fase A: solução 0,1% de heptanosulfonato (p/v) com pH 3,55, fase C: acetonitrila, fluxo: 1mL/min .

Figura 33 - Cromatograma referente à sobreposição da mistura das substâncias (hidroclorotiazida, sinefrina, fenilpropanolamina, salbutamol, terbutalina, fenilefrina, efedrina, clortalidona, metanfetamina, anfepiramina, femproporex, clenbuterol, mazindol, fenfluramina, furosemida, sibutramina, rimonabanto) e da amostra TL0040.



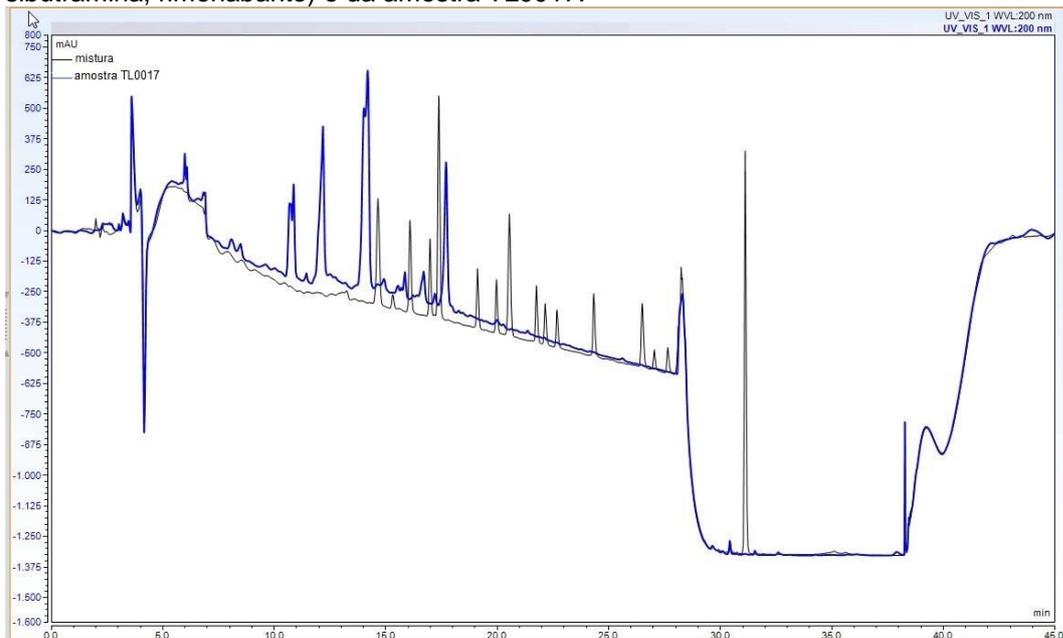
Condições experimentais: Cromatograma obtido através do HPLC–UV/Vis-DAD, λ : 200nm, utilizando-se a coluna **Phenomenex**®, diluente: composto por uma solução de água e isopropanol a 50% v/v, fase A: solução 0,1% de heptanosulfonato (p/v) com pH 3,55, fase C: acetonitrila, fluxo: 1mL/min.

Figura 34 - (a) Cromatograma Uv-Vis; (b) cromatograma DAD referente à amostra TL0017.



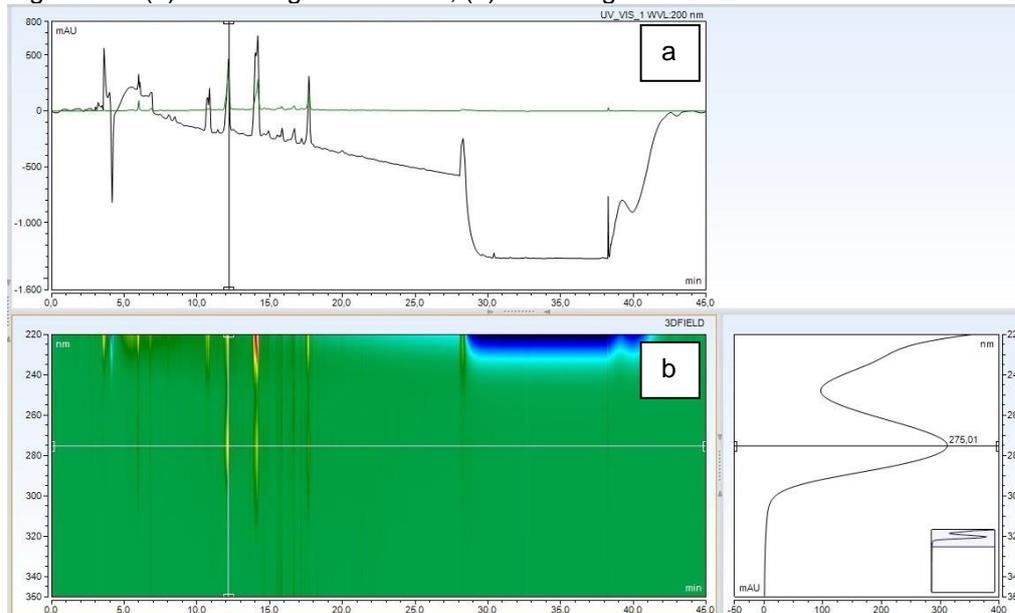
Condições experimentais: Cromatograma obtido através do HPLC–UV/Vis-DAD, λ : 200nm, utilizando-se a coluna **Phenomenex®**, diluente: composto por uma solução de água e isopropanol a 50% v/v, fase A: solução 0,1% de heptanosulfonato (p/v) com pH 3,55, fase C: acetonitrila e fluxo: 1mL/min .

Figura 35 - Cromatograma referente à sobreposição da mistura das substâncias (hidroclorotiazida, sinefrina, fenilpropranolamina, salbutamol, terbutalina, fenilefrina, efedrina, clortalidona, metanfetamina, anfepramona, femproporex, clenbuterol, mazindol, fenfluramina, furosemda, sibutramina, rimonabanto) e da amostra TL0017.



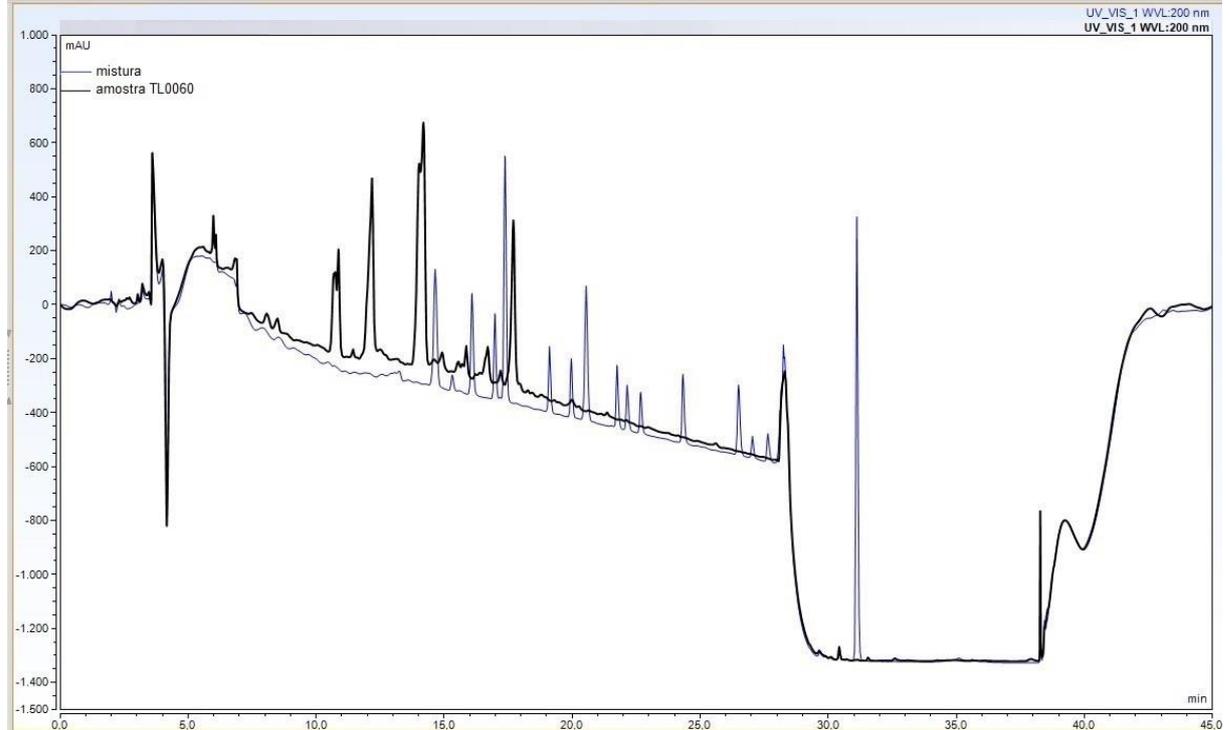
Condições experimentais: Cromatograma obtido através do HPLC–UV/Vis-DAD, λ : 200nm, utilizando-se a coluna **Phenomenex®**, diluente: composto por uma solução de água e isopropanol a 50% v/v, fase A: solução 0,1% de heptanosulfonato (p/v) com pH 3,55, fase C: acetonitrila, fluxo: 1mL/min .

Figura 36 - (a) Cromatograma Uv-Vis; (b) cromatograma DAD referente à amostra TL0060.



Condições experimentais: Cromatograma obtido através do HPLC–UV/Vis-DAD, λ : 200nm, utilizando-se a coluna **Phenomenex**®, diluente: composto por uma solução de água e isopropanol a 50% v/v, fase A: solução 0,1% de heptanosulfonato (p/v) com pH 3,55, fase C: acetonitrila, fluxo: 1mL/min .

Figura 37 - Cromatograma referente à sobreposição da mistura das substâncias (hidroclorotiazida, sinefrina, fenilpropranolamina, salbutamol, terbutalina, fenilefrina, efedrina, clortalidona, metanfetamina, anfepramona, femproporex, clenbuterol, mazindol, fenfluramina, furosemida, sibutramina, rimonabanto) e da amostra TL0060.



Condições experimentais: Cromatograma obtido através do HPLC–UV/Vis-DAD, λ : 200nm, utilizando-se a coluna **Phenomenex**®, diluente: composto por uma solução de água e isopropanol a 50% v/v, fase A: solução 0,1% de heptanosulfonato (p/v) com pH 3,55, fase C: acetonitrila, fluxo: 1mL/min .

5.4.1.2 Amostras OLB6307 e OLA6191

Através da comparação do perfil cromatográfico das amostras OLB6307 e OLA6191 com o perfil da mistura de matérias-primas foi observado que não houve indícios da presença das substâncias presentes na mistura (figura 38). Comparando-se o perfil dessa amostra com o perfil cromatográfico das amostras anteriores, praticamente não são observados os sinais marcadores principais que obrigatoriamente devem estar presentes em amostras de chá verde: a cafeína e os polifenóis, que eluem em torno de 12,5 e 14 minutos, conforme as figuras 39,40 e 41, indicando muito baixa concentração dessas substâncias.

Assim como foi observado no presente estudo, na dissertação de mestrado de Martini (2010), em que foram pesquisadas as substâncias sintéticas anfepramona, femproporex, sibutramina e fluoxetina não declaradas em amostras de chá verde por eletroforese capilar, também não foram encontradas nenhuma das substâncias pesquisadas.

Apesar das amostras de chá verde analisadas não apresentarem presença das substâncias analisadas, existem estudos que apontam a adulteração de suplementos alimentares à base de chá verde. Em um estudo realizado por Shi e colaboradores (2015), em que se desenvolveu um método por HPLC–MS/MS para a determinação simultânea de 8 adulterantes em 12 amostras de alimentos funcionais baseado em extratos de ervas, foi detectado sibutramina e/ ou fenfluramina na maioria das amostras analisadas.

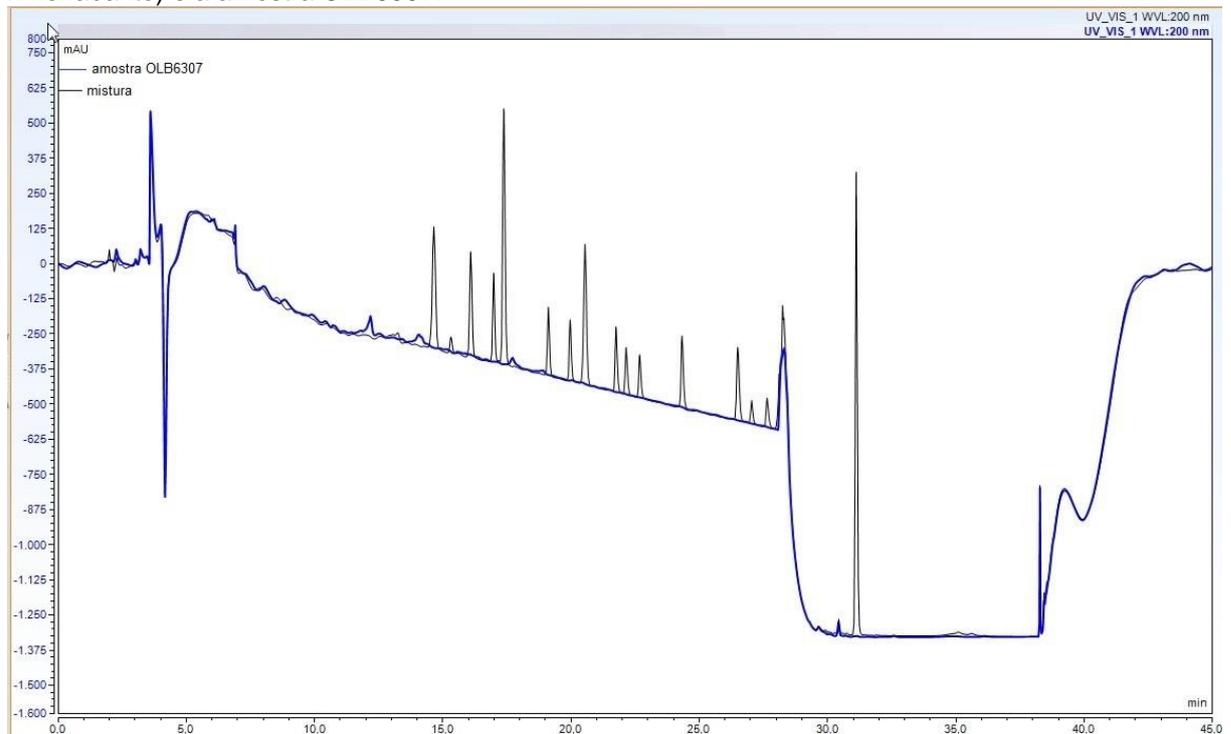
Russo e colaboradores (2016) proporem um método por LC/UV para a identificação e quantificação simultânea de fluoxetina (antidepressivo), tiratricol (análogo ao hormônio da tireóide), benfluorex (anoréxico) e pseudoefedrina (agente simpaticomimético com efeitos anoréxicos) em formulações emagrecedoras. Foram testadas dezesseis misturas de ervas diferentes, dentre elas o chá verde, para as quais as quatro substâncias pesquisadas foram confirmadas pela espectrometria de massas. Fluoxetina foi encontrada em 5 amostras (31%), tiratricol e pseudoefedrina em 11 amostras (69%), benfluorex em 7 amostras (44%).

Estudos que avaliaram a qualidade de suplementos alimentares à base de chá verde atentam para problemas relacionados aos teores de EGCG e cafeína declarada no rótulo. Seeram e colaboradores (2006) em um estudo que avaliou a qualidade dos suplementos alimentares de chá verde, verificaram que 6 das 11

amostras que informavam os níveis de catequina possuíam menos EGCG do que estava indicado no rótulo e em 3 amostras das 19 que informavam os níveis de cafeína foi constatado quantidades inferiores ao declarado no rótulo.

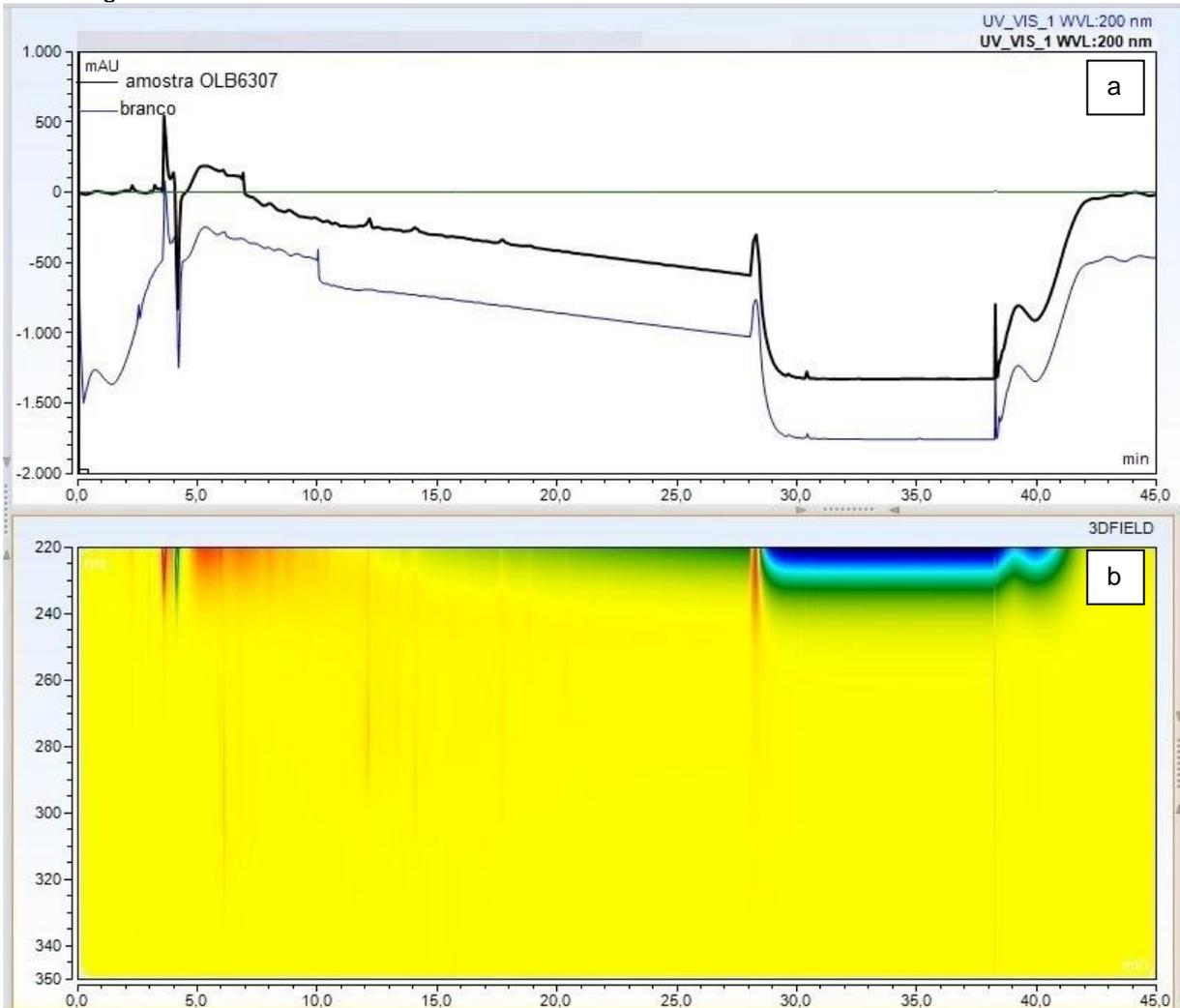
Manning e Roberts (2003) também demonstraram problema na qualidade de suplementos alimentares à base de chá verde, ao identificarem que o teor de catequina de sete produtos comerciais foi menor do que estava declarado no rótulo.

Figura 38 - Sobreposição entre a mistura das substâncias (hidroclorotiazida, sinefrina, fenilpropanolamina, salbutamol, terbutalina, fenilefrina, efedrina, clortalidona, metanfetamina, anfepramona, femproporex, clenbuterol, mazindol, fenfluramina, furosemida, sibutramina, rimonabanto) e a amostra OLB6307.



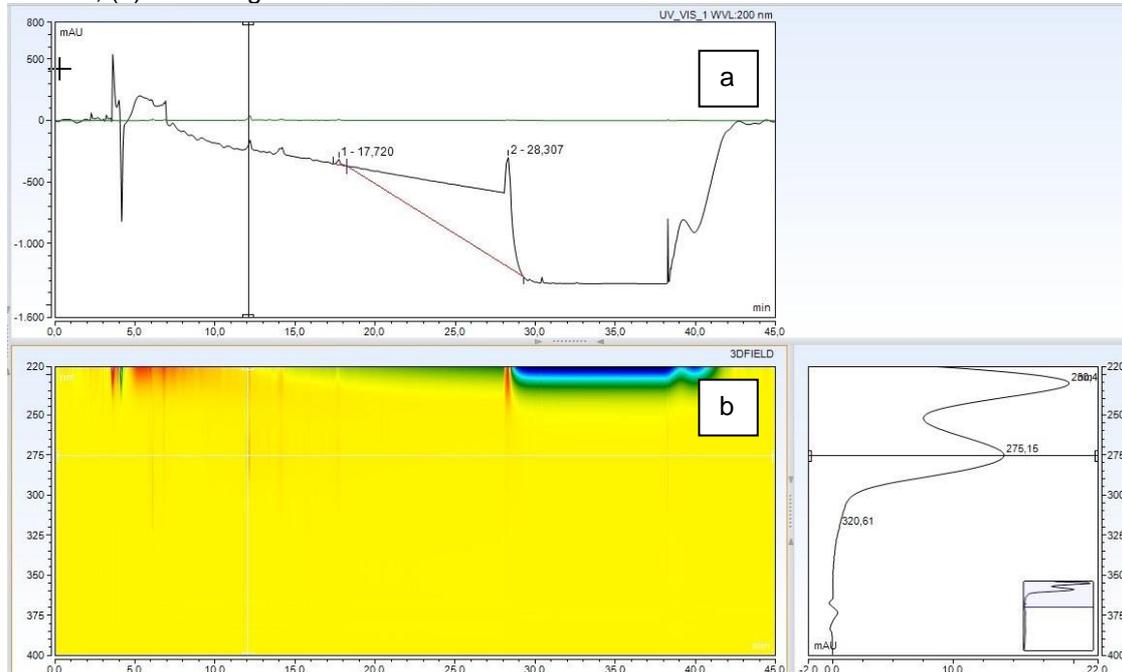
Condições experimentais: Cromatograma obtido através do HPLC–UV/Vis-DAD, λ : 200nm, utilizando-se a coluna **Phenomenex**®, diluente: composto por uma solução de água e isopropanol a 50% v/v, fase A: solução 0,1% de heptanosulfonato (p/v) com pH 3,55, fase C: acetonitrila e fluxo: 1mL/min .

Figura 39 - (a) Sobreposição dos cromatogramas UV/vis entre o branco e a amostra OLB6307; (b) Cromatograma DAD da amostra OLB6307.



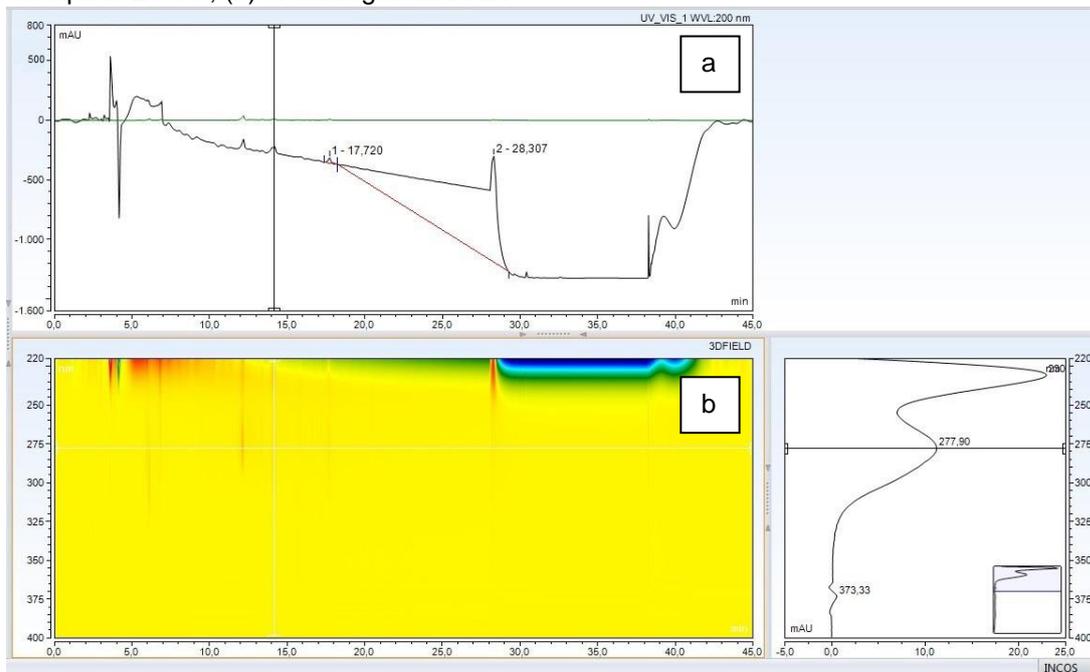
Condições experimentais: Cromatograma obtido através do HPLC–UV/vis-DAD, λ : 200nm, utilizando-se a coluna **Phenomenex**®, diluente: composto por uma solução de água e isopropanol a 50% v/v, fase A: solução 0,1% de heptanosulfonato (p/v) com pH 3,55, fase C: acetonitrila, fluxo: 1mL/min .

Figura 40 - (a) Cromatograma UV/Vis referente à amostra OLA6191 demonstrando a presença da cafeína; (b) cromatograma DAD.



Condições experimentais: Cromatograma obtido através do HPLC–UV/Vis-DAD, λ : 200nm, utilizando-se a coluna **Phenomenex®**, diluente: composto por uma solução de água e isopropanol a 50% v/v, fase A: solução 0,1% de heptanosulfonato (p/v) com pH 3,55, fase C: acetonitrila e fluxo: 1mL/min .

Figura 41 - (a) Cromatograma UV/Vis referente à amostra OLA6191 demonstrando a presença da catequina EGCG; (b) cromatograma DAD.



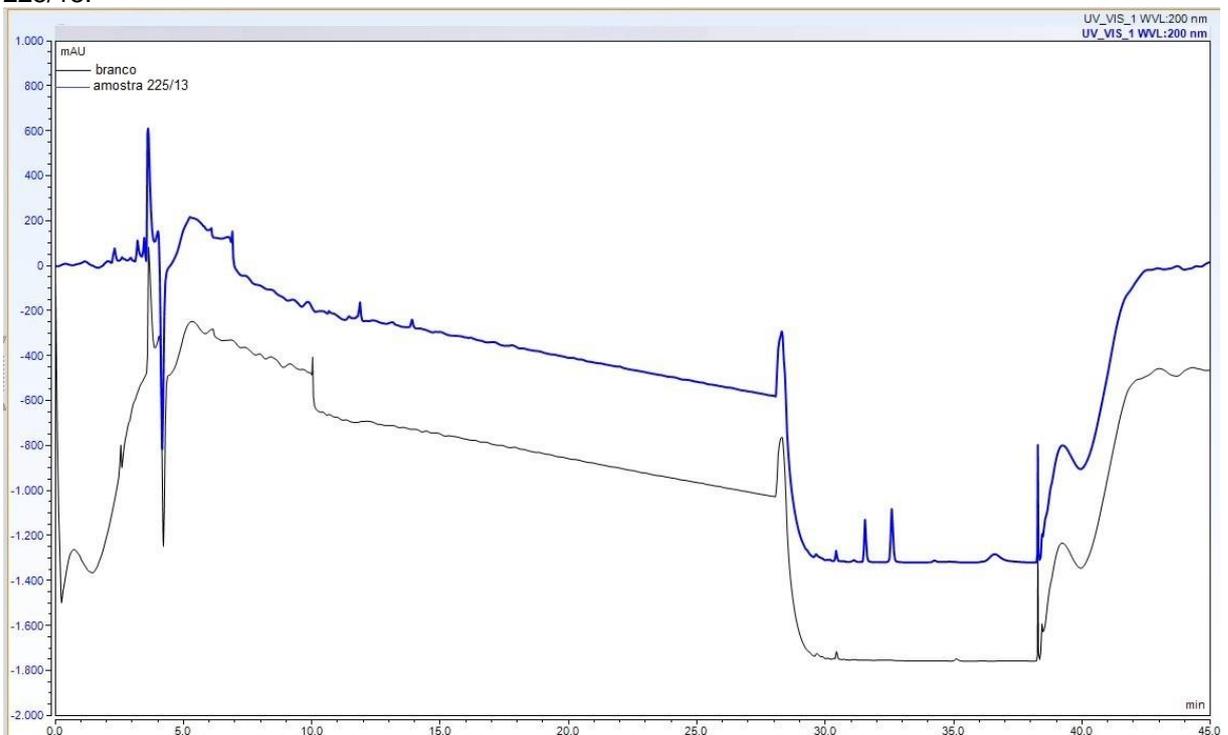
Condições experimentais: Cromatograma obtido através do HPLC–UV/Vis-DAD, λ : 200nm, utilizando-se a coluna Phenomenex®, diluente: composto por uma solução de água e isopropanol a 50% v/v, fase A: solução 0,1% de heptanosulfonato (p/v) com pH 3,55, fase C: acetonitrila e fluxo: 1mL/min .

5.5 RESULTADOS DAS AMOSTRAS DE QUITOSANA

Foram analisadas as amostras 225/13 e 224/13 que possuíam na sua formulação quitosana.

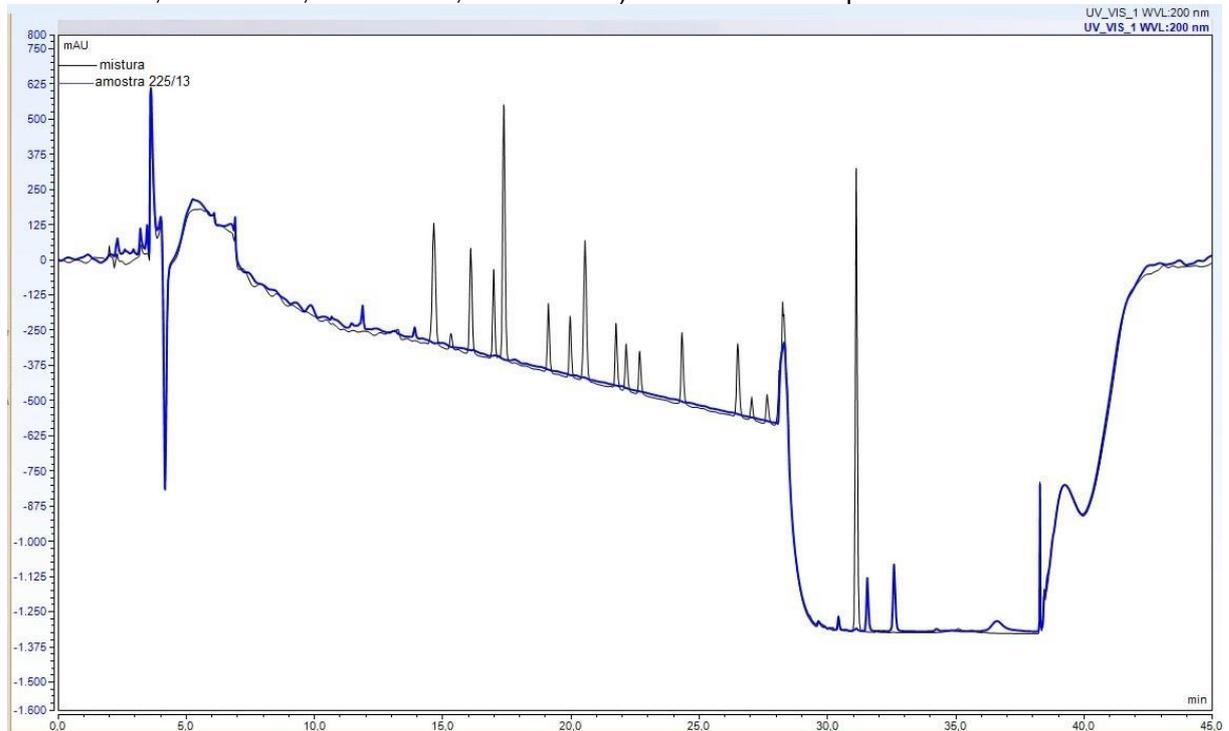
A quitosana é um derivado desacetilado de quitina, um polissacarídeo, promovido como um suplemento para auxiliar na redução da absorção de gordura, que a princípio, devido ao impedimento estérico, não penetra nos poros da coluna utilizada, com diâmetro de poro de 100 Å (PITTLER; ERNST, 2004). Por meio da comparação entre o perfil cromatográfico do diluente e da amostra 225/13 (figura 42), e do perfil cromatográfico da amostra 225/13 com a mistura das matérias-primas (figura 43) foi observado que os sinais que apareceram na amostra, foram provenientes muito provavelmente da clivagem do polímero ou de impurezas e que, não possuíam retenção coincidente com a retenção dos componentes da mistura das matérias-primas.

Figura 42 - Sobreposição entre os cromatogramas do branco (diluente) e da amostra de quitosana 225/13.



Condições experimentais: Cromatograma obtido através do HPLC–UV/Vis-DAD, λ : 200nm, utilizando-se a coluna **Phenomenex**®, diluente: composto por uma solução de água e isopropanol a 50% v/v , fase A: solução 0,1% de heptanosulfonato (p/v) com pH 3,55, fase C: acetonitrila e fluxo: 1mL/min .

Figura 43 - Cromatograma referente à sobreposição entre o cromatograma da mistura das substâncias (hidroclorotiazida, sinefrina, fenilpropanolamina, salbutamol, terbutalina, fenilefrina, efedrina, clortalidona, metanfetamina, anfepramona, femproporex, clenbuterol, mazindol, fenfluramina, furosemida, sibutramina, rimonabanto) e da amostra de quitosana 225/13.



Condições experimentais: Cromatograma obtido através do HPLC–UV/Vis-DAD, λ : 200nm, utilizando-se a coluna **Phenomenex**®, diluente: composto por uma solução de água e isopropanol a 50% v/v, fase A: solução 0,1% de heptanosulfonato (p/v) com pH 3,55, fase C: acetonitrila e fluxo: 1mL/min, .

Foi visualizado um sinal coincidente em termos de k' correspondente ao rimonabanto na amostra 224/13 através da comparação entre o cromatograma da amostra com o cromatograma da mistura (figura 44). O espectro UV (figura 45) e o espectro de massas de alta resolução (figura 46) são similares aos espectros do rimonabanto no banco de dados e na literatura, sugerindo adulteração da amostra com substância não declarada (VENHUIS et al, 2011).

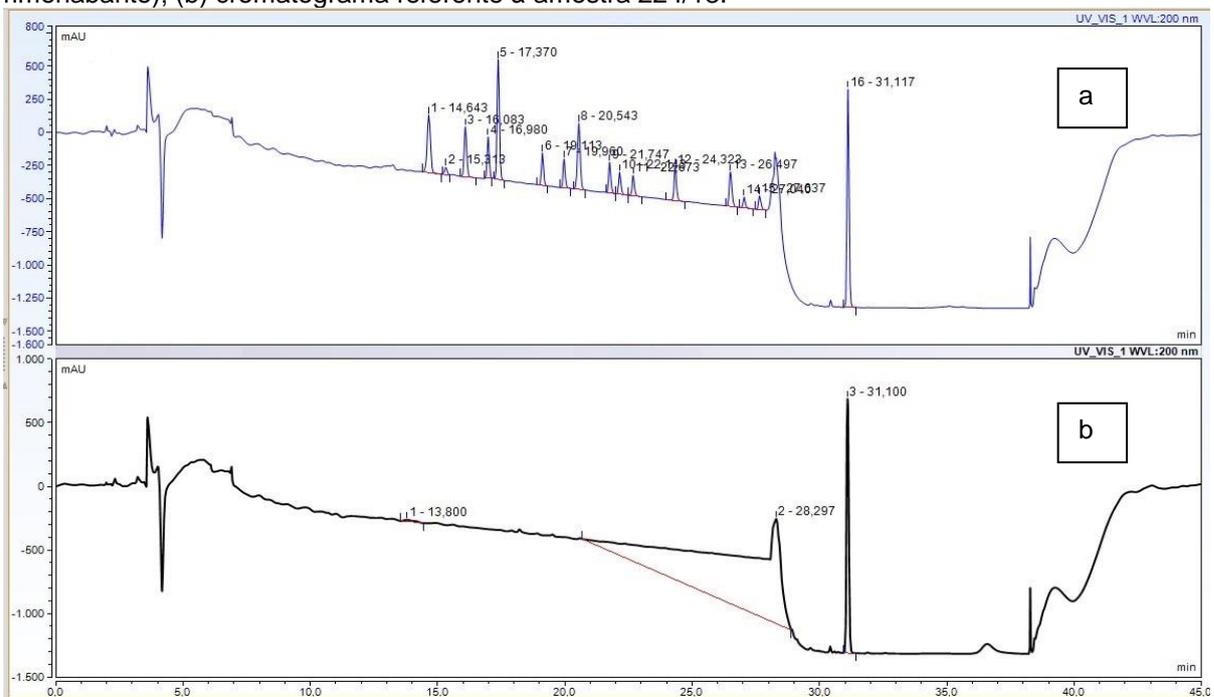
O medicamento Acomplia® cujo princípio ativo é o rimonabanto foi retirado do mercado europeu no final de 2008 devido a efeitos colaterais, como depressão e comportamento suicida, e falta de eficácia (VENHUIS et al., 2011).

Doménech-Carbó e colaboradores (2013) também encontraram substância não declarada em amostra de quitosana. O método proposto analisou 15 formulações fitoterápicas, baseado na voltametria de micropartículas, permitindo distinguir anorexígenos (anfepramona, femproporex e sibutramina), ansiolíticos-benzodiazepínicos (clonazepam, flurazepam, lorazepam, aloprazolam, midazolam, medazepam, clordiazepóxido e diazepam), antidepressivos (bupropiona, fluoxetina, sertralina e paroxetina), diuréticos (hidroclorotiazida, furosemida, clortalidona,

amilorida e espironolactona) e hipoglicemiantes (glimeperida, clorpropamida e glibenclamida) baseado em sinais voltamétricos característicos registados em micro ou nano amostras sólidas ligadas a eletrodos de grafite imersos em eletrólitos aquosos. Em duas amostras de quitosana foram encontradas lorazepam e em outra amostra de quitosana foi encontrada femproporex.

Reeuwijk e colaboradores (2014) determinaram um método por HPLC-DAD-MS/MS para avaliar 50 amostras de suplementos alimentares à base de plantas quanto à presença de substâncias farmacologicamente ativas, sendo o rimonabanto identificado em uma dessas amostras.

Figura 44 - (a) Cromatograma da mistura das matérias-primas (hidroclorotiazida, sinefrina, fenilpropranolamina, salbutamol, terbutalina, fenilefrina, efedrina, clortalidona, metanfetamina, anfepramona, femproporex, clenbuterol, mazindol, fenfluramina, furosemida, sibutramina, rimonabanto); (b) cromatograma referente à amostra 224/13.



Condições experimentais: Cromatograma obtido através do HPLC–UV/Vis-DAD, λ : 200nm, utilizando-se a coluna **Phenomenex®**, diluente: composto por uma solução de água e isopropanol a 50% v/v, fase A: solução 0,1% de heptanosulfonato (p/v) com pH 3,55, fase C: acetonitrila e fluxo: 1mL/min, .

Figura 45 - Espectro ultravioleta da matéria-prima rimonabanto.

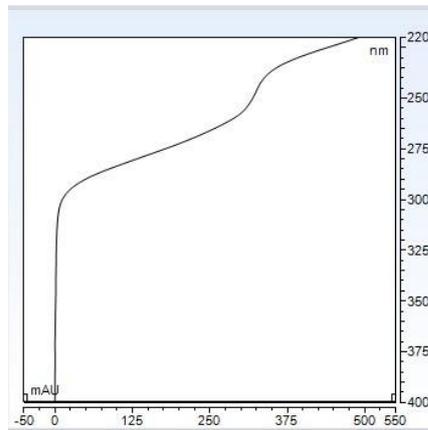
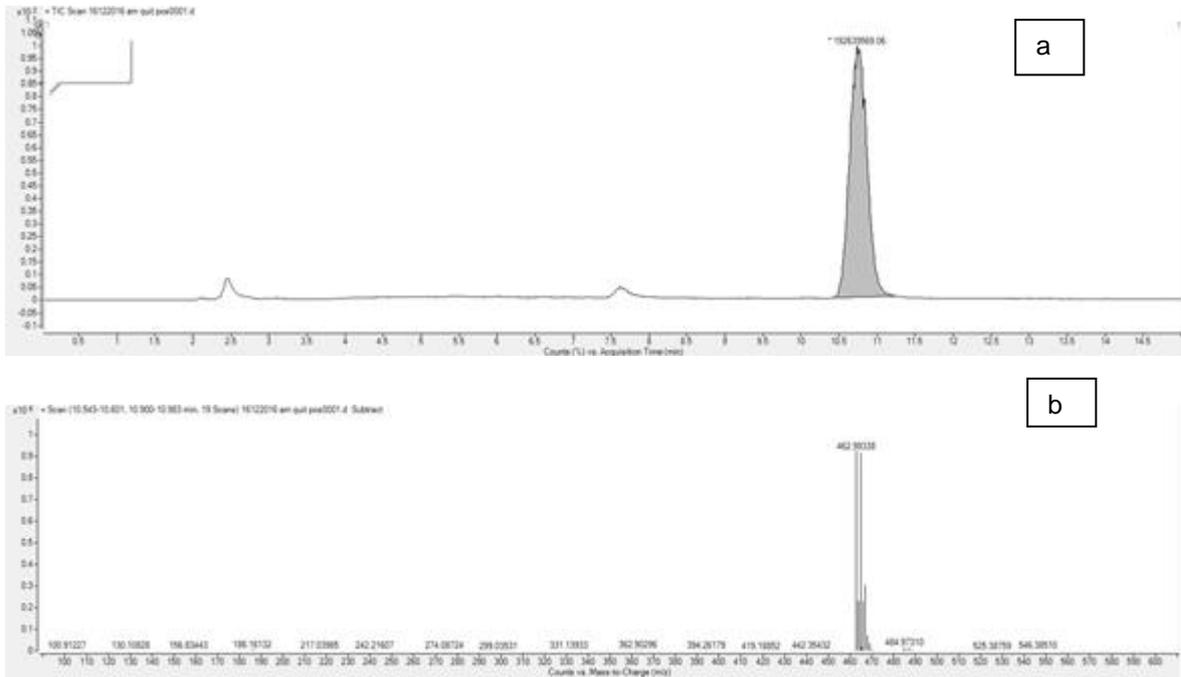


Figura 46 - (a) Cromatograma do rimonabanto; (b) Espectro de massas de alta resolução do rimonabanto.

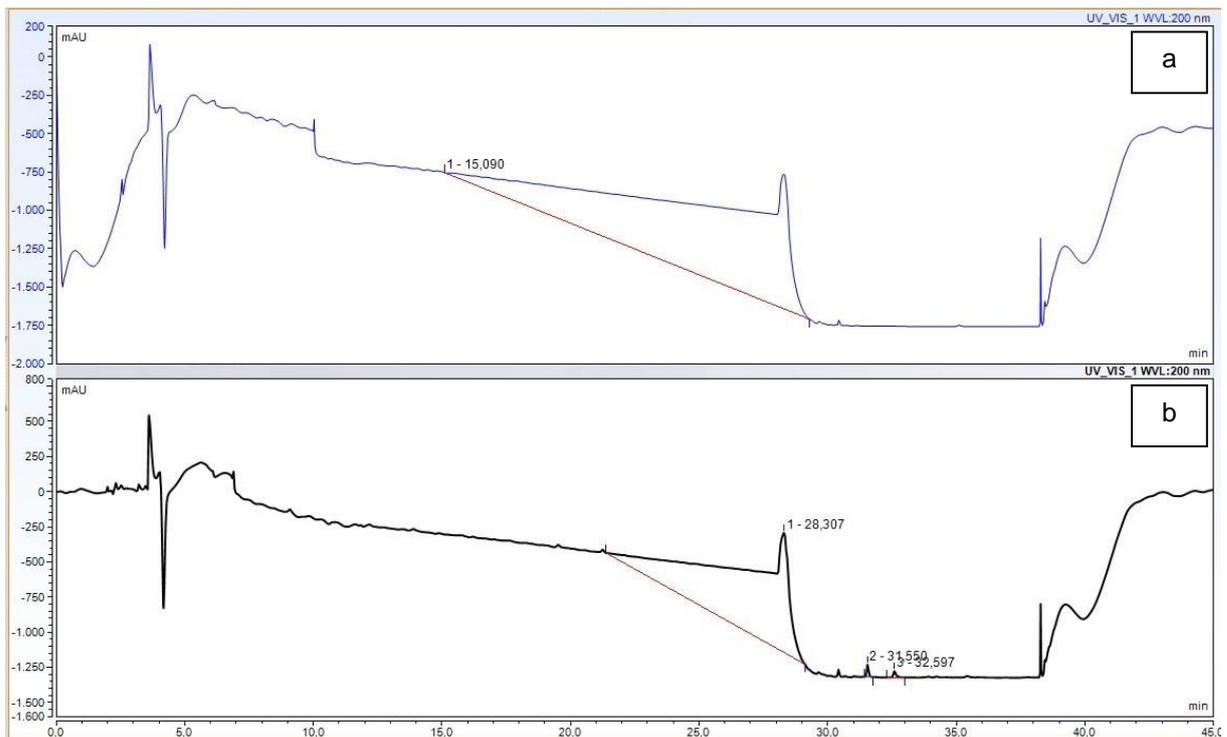


Condições experimentais: Equipamento Espectrômetro Q-TOF, interface do tipo ESI, modo isocrático com inserção direta, modo de varredura m/z 100-600, com taxa de varredura (espectros/segundos) de 2,00, VC:4000, VF: 175, volume de injeção: 1 μ L com fluxo 0,2 mL/min, a composição do solvente da fase móvel foi 50% de ácido fórmico e 50% de acetonitrila.

5.6 RESULTADO DA AMOSTRA SCBA

Os cromatogramas do branco e da amostra (figura 47) só se diferenciam pelo aparecimento de dois sinais na amostra com tempos de retenção acima de 31 minutos, que não tem relação com nenhuma das substâncias pesquisadas, nem com os marcadores, EGCG e cafeína, que deveriam estar presente nessa amostra, já que no rótulo encontra-se em destaque o chá verde. Como esse cromatograma foi gerado a partir de uma amostra preparada utilizando-se uma quantidade referente à dose diária recomendada, isso sugere que muito provavelmente, trata-se de um caso de adulteração, mesmo constando no rótulo o número de registro no Ministério da Saúde (MS).

Figura 47 - Comparação entre o cromatograma do branco (a) e da amostra SCBA (b).



Condições experimentais: Cromatograma obtido através do HPLC–UV/Vis-DAD, λ : 200nm, utilizando-se a coluna **Phenomenex®**, diluente: composto por uma solução de água e isopropanol a 50% v/v, fase A: solução 0,1% de heptanosulfonato (p/v) com pH 3,55, fase C: acetonitrila e fluxo: 1mL/min .

5.7 RESULTADO DA AMOSTRA HBCO

No rótulo deste suplemento recomenda-se uma porção diária de 2,5g ou 5 comprimidos e apresenta uma indicação quantitativa por porção do picolinato de cromo (III), um complexo de coordenação de cromo III e ácido picolínico, na dosagem de 18 µg/porção. Suplementos contendo picolinato de cromo estão sendo utilizados para tratamento dos sintomas de diabetes tipo II e hipoglicemia (BROADHURST, 1997; PITTLER; ERNST, 2004). Levando-se em consideração que o cromatograma (figura 48) foi obtido a partir de uma extração da amostra na quantidade aproximadamente igual à sugerida pela recomendação de ingestão diária pelo fabricante, isso indica uma concentração baixa dos insumos declarados.

Com o objetivo de eliminar dúvidas se o produto, o qual possui registro no MS, trata-se ou não de adulteração, foi feita uma pesquisa qualitativa de picolinato de cromo (III) no produto utilizando a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas por tempo de voo em modo de varredura positivo e utilizando baixo potencial de fragmentação. Foi obtido o espectro de massas de alta resolução do padrão de picolinato de cromo (III) (figura 49). No espectro de varredura podem ser observados o íon protonado m/z 418, 887 e o aduto com sódio m/z 440,888, esse padrão de fragmentação do picolinato de cromo (III) foi semelhante ao reportado por Kim e colaboradores (2003). Nesse estudo, foi determinado um método de identificação do picolinato de cromo (III) por HPLC-ESI-MS, a molécula protonada $[Cr-(pic)_3 + H]^+$ para o composto (m/z 419) foi observado como o pico base. O padrão isotópico característico de Cr para a molécula protonada, assim como a massa molecular (418 u), mostra que o pico se refere ao picolinato de cromo (III).

Após a análise da amostra, a partir do cromatograma de íons totais, foi obtido o cromatograma de íons extraídos, tomando-se como base os íons obtidos na figura 49 (figura 50).

Depois de obtidos os espectros de massas dos sinais, observou-se que os espectros do padrão e da amostra não foram similares e os íons relativos ao aduto e a molécula protonada não condizem com as mesmas abundâncias relativas do espectro do padrão.

Figura 48- (a) Cromatograma do diluente (branco); (b) Cromatograma da amostra HBCO.

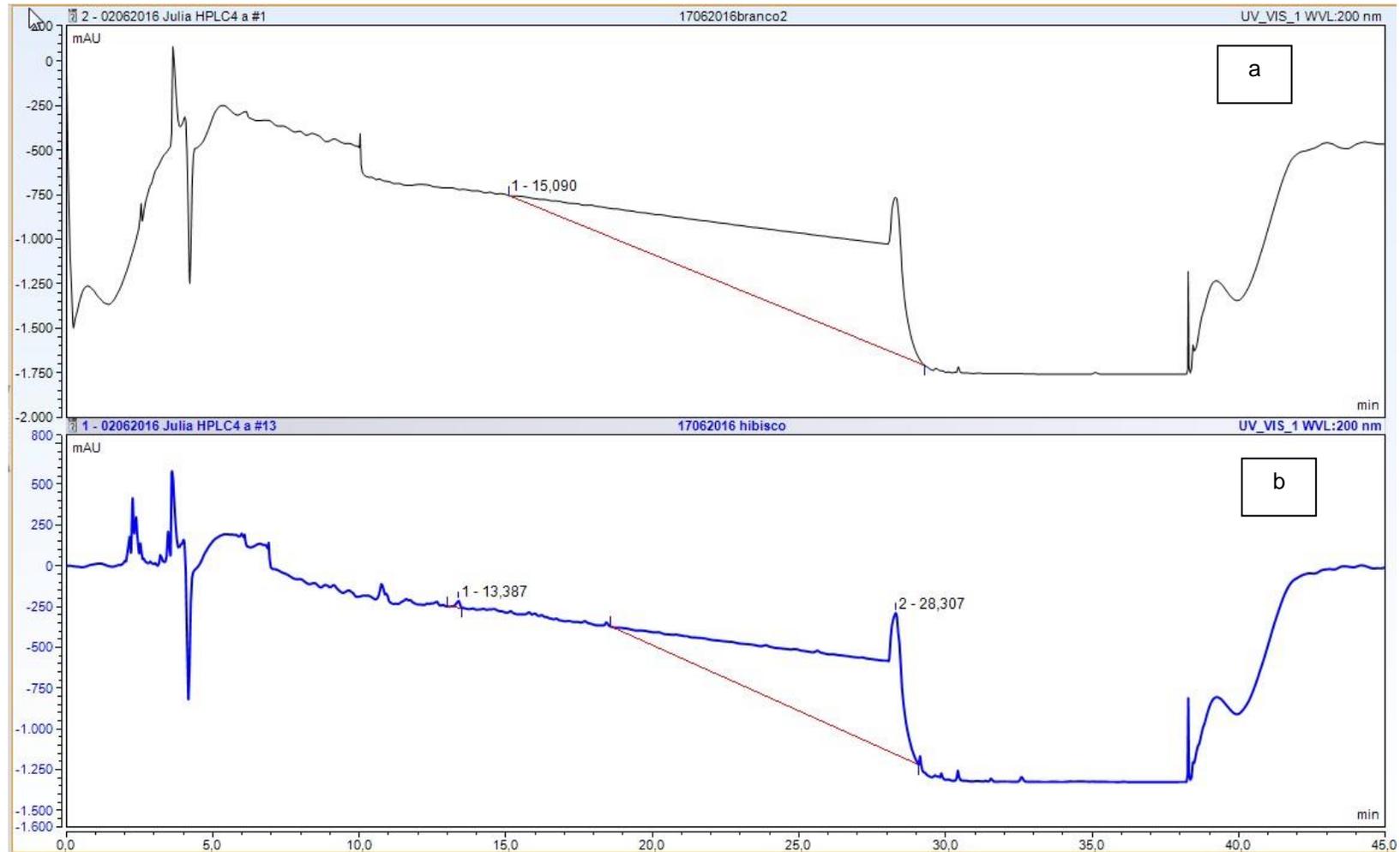
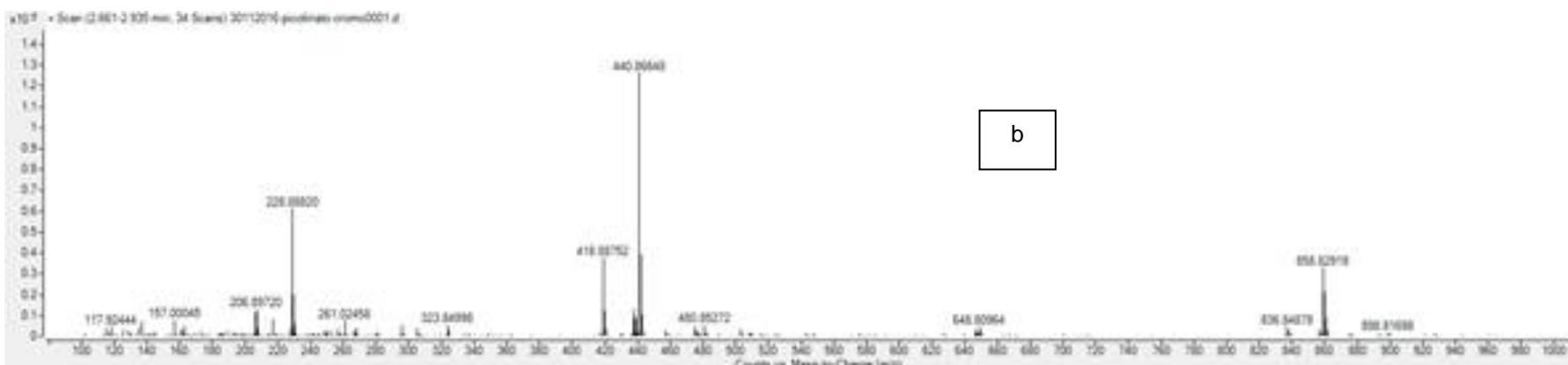
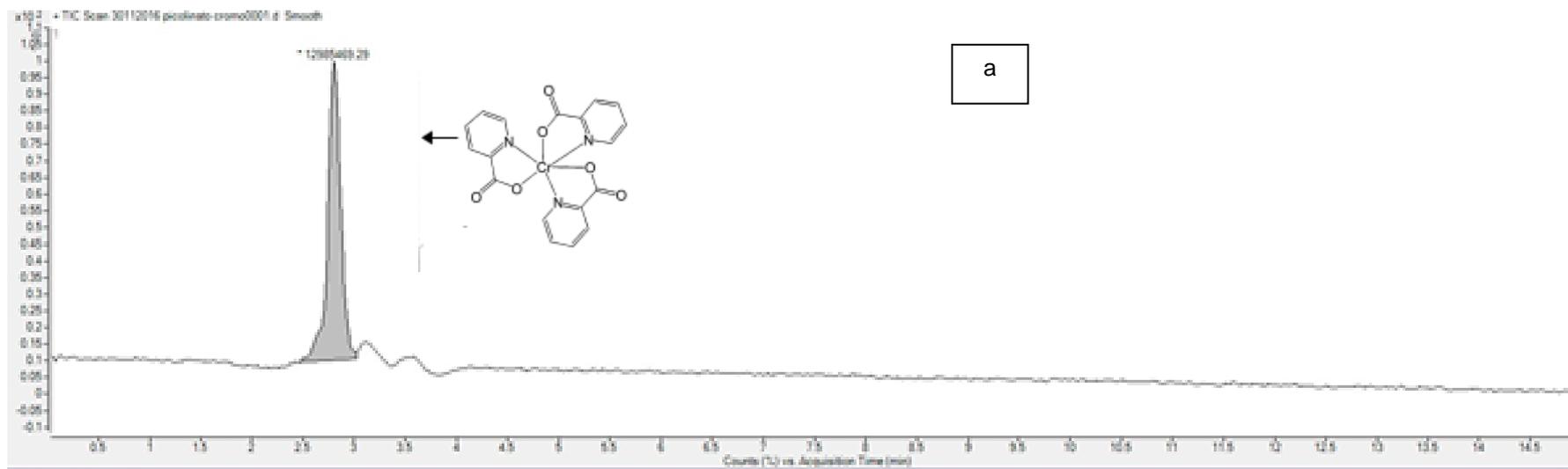
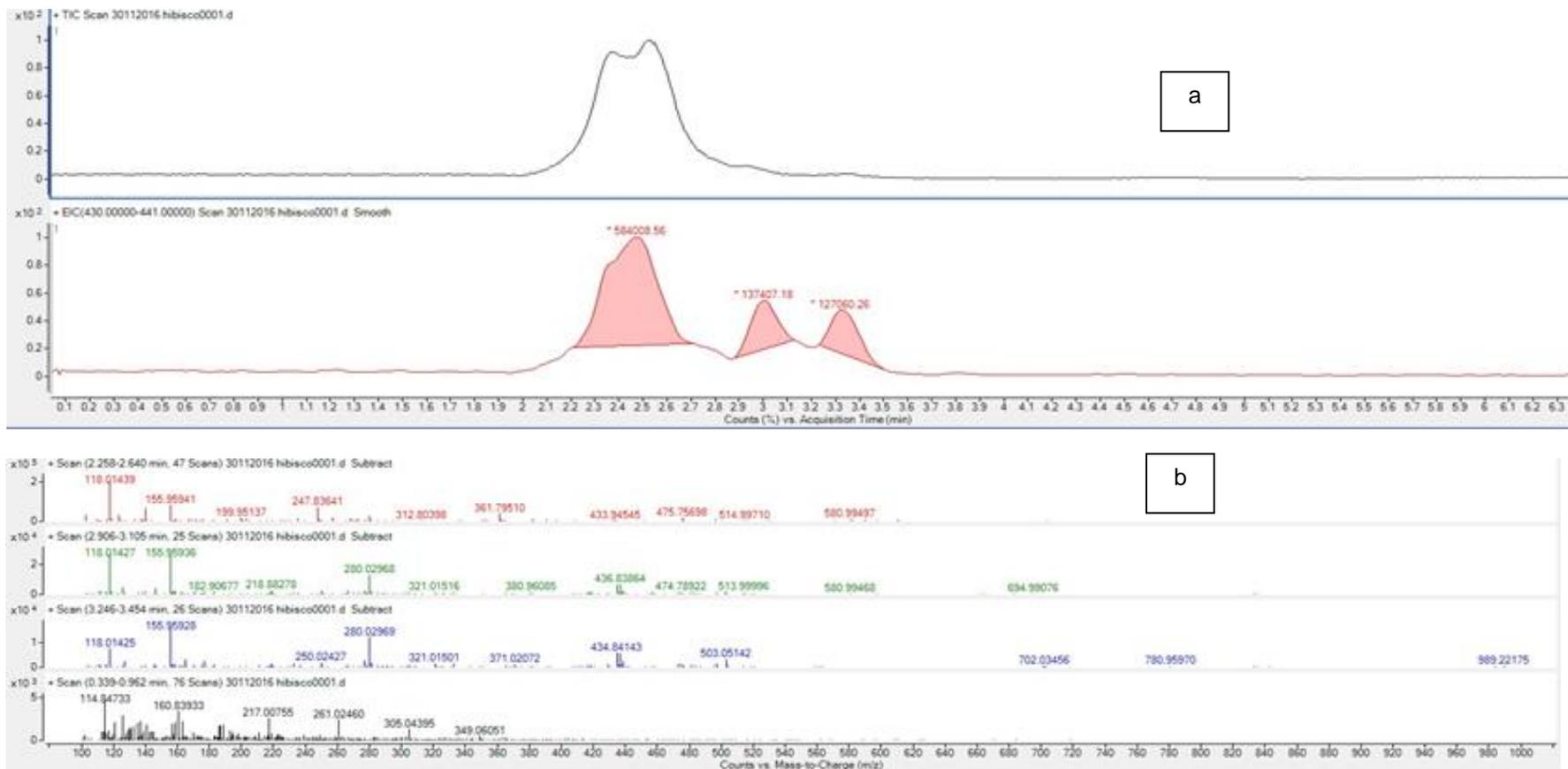


Figura 49 - (a) Cromatograma do picolinato de cromo (III); (b) Espectro de massas do picolinato de cromo (III).



Condições cromatográficas: (a) Espectro obtido por HPLC- UV/Vis; (b) Equipamento: Espectrômetro Q-TOF, interface do tipo ESI, modo isocrático com inserção direta, modo de varredura completa de m/z 100-1000, com taxa de varredura (espectros/segundos) de 2,00, VC:4000, VF: 175, volume de injeção: 1 μ L com fluxo 0,2 mL/min, fase móvel foi 50% de ácido fórmico e 50% de acetonitrila.

Figura 50 - Cromatograma de íons extraídos na amostra HBCO e espectro de massas dos íons extraídos na amostra.



Condições cromatográficas: (a) Espectro obtido por HPLC- UV/Vis; (b) Equipamento: Espectrômetro Q-TOF, interface do tipo ESI, modo isocrático com inserção direta, modo de varredura m/z 100-1000, com taxa de varredura (espectros/segundos) de 2,00, VC:4000, VF: 175, volume de injeção: 1 μ L com fluxo 0,2 mL/min, fase móvel foi 50% de ácido fórmico e 50% de acetonitrila.

O gengibre também consta como um dos ingredientes do produto HBCO. Os hidrocarbonetos de sesquiterpeno, diaril-heptanoides e compostos relacionados ao gingerol são constituintes principais do gengibre e nesse contexto foi obtido um espectro de massas (figura 51) através do cromatograma de íons extraídos, buscando o íon relativo ao gingerol (294,4 *u*), a partir do cromatograma de íons totais da amostra, cujo sinal cromatográfico deveria aparecer também no cromatograma (UV) da figura 48, adquirido em 200 nm, já que se trata de um metoxifenil, com cromóforo aromático. Jiang e colaboradores (2005) identificaram [4]-, [6]-, [8]-, [10]-, E [12]- gingerol, por LC/ESI-MS/MS (tabela 5) acoplado ao DAD, esses compostos foram identificados por HPLC-DAD a 280 e 230 nm, absorção característica para os gingeróis.

Após análise do espectro de massas, não foi observada a presença dos íons protonados e nem de possíveis adutos identificados por Jiang e colaboradores (2005) descritos na tabela 5. Levando-se em conta que a quantidade de amostra extraída é aproximadamente igual à quantidade indicada na recomendação diária do produto, os resultados acima permitem concluir que nessa amostra não há princípio ativo suficiente em dose terapêutica.

Tabela 5 - Características cromatográficas e espectrais de massa de compostos relacionados com gingerol detectados por LC-ESI-MS em extratos de gengibre.

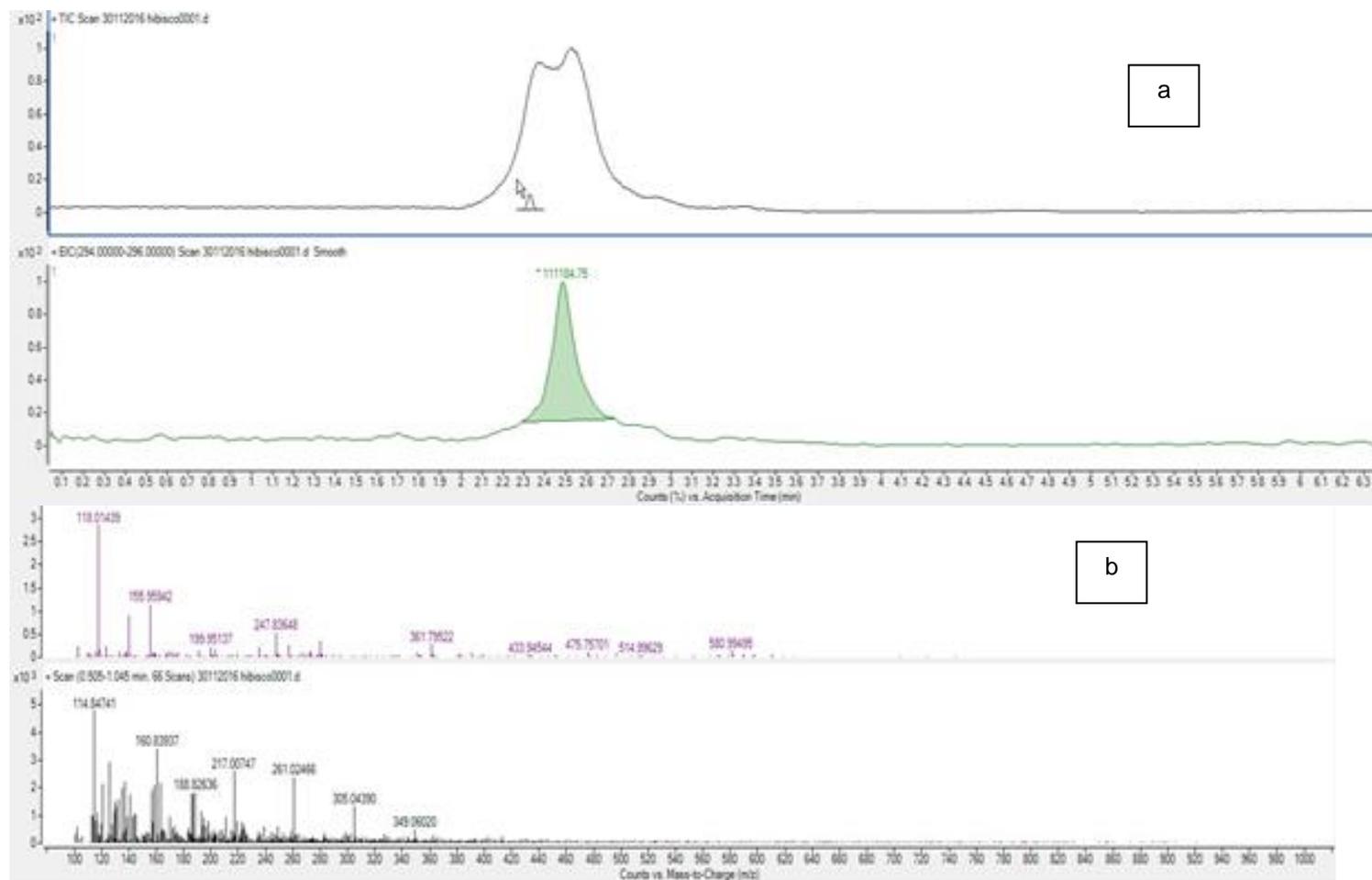
t_R (min)	(+) ESI-MS (<i>m/z</i>)	(+) ESI-MS/MS (<i>m/z</i>) ^a	Composto
25,6	249 [M + H - H ₂ O] ⁺	177	[4]-Gingerol
	284 [M + NH ₄] ⁺	249, 267	
	289 [M + Na] ⁺	N/ D	
32,5	277 [M + H - H ₂ O] ⁺	177	[6]-Gingerol
	312 [M + Na] ⁺	217	
	611 [2M + Na] ⁺	317	
38,7	305 [M + H - H ₂ O] ⁺	177	[8]-Gingerol
	340 [M + NH ₄] ⁺	305, 323	
	345 [M + Na] ⁺	217	
44,6	333 [M + H - H ₂ O] ⁺	177	[10]-Gingerol
	368 [M + NH ₄] ⁺	333, 351	
	373 [M + Na] ⁺	217	
50,2	361 [M + H - H ₂ O] ⁺	177	[12]-Gingerol
	401 [M + Na] ⁺	217	

Fonte: JIANG et al, 2005.

^a Os íons de produto mostrados em cada linha são dados na ordem de sua abundância relativa: o primeiro íon, em cada caso, é o mais abundante.

N/D indica que o íon precursor em ESI-MS e/ou íons produto em ESI-MS/MS não foi detectável.

Figura 51 - Espectro de massas da amostra HBCO.



Condições cromatográficas: (a) Espectro obtido por HPLC- UV/Vis; (b) Equipamento: ESI-Q-TOF-MS, modo isocrático com inserção direta, modo de varredura completa de m/z 100-620, com taxa de varredura (espectros/segundos) de 2,00, VC:4000, VF: 175, volume de injeção: 1 μ L com fluxo 0,2 mL/min, fase móvel foi 50% de ácido fórmico 0,1M e 50% de acetonitrila.

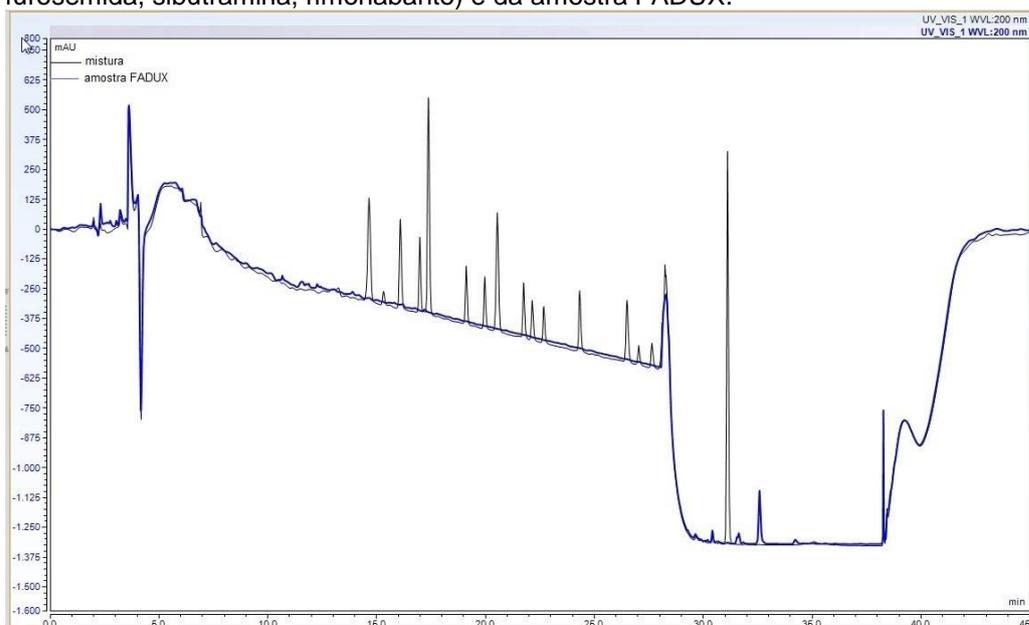
5.8 RESULTADO DA AMOSTRA FADUX

Na comparação do cromatograma da amostra com o cromatograma da mistura das matérias-primas das substâncias alvo (figura 52), pode ser observada a ausência de sobreposição de sinais.

Através da comparação do cromatograma do branco (diluyente) com o cromatograma da amostra (figura 53), só foi observada a presença de dois pequenos sinais entre 31 e 33 minutos, que não tem relação com nenhuma das substâncias pesquisadas. A ausência de sinais e a baixa absorvância dos existentes foram confirmadas pela observação do espectro UV tridimensional da amostra (figura 54), com auxílio do detector com arranjo de diodos.

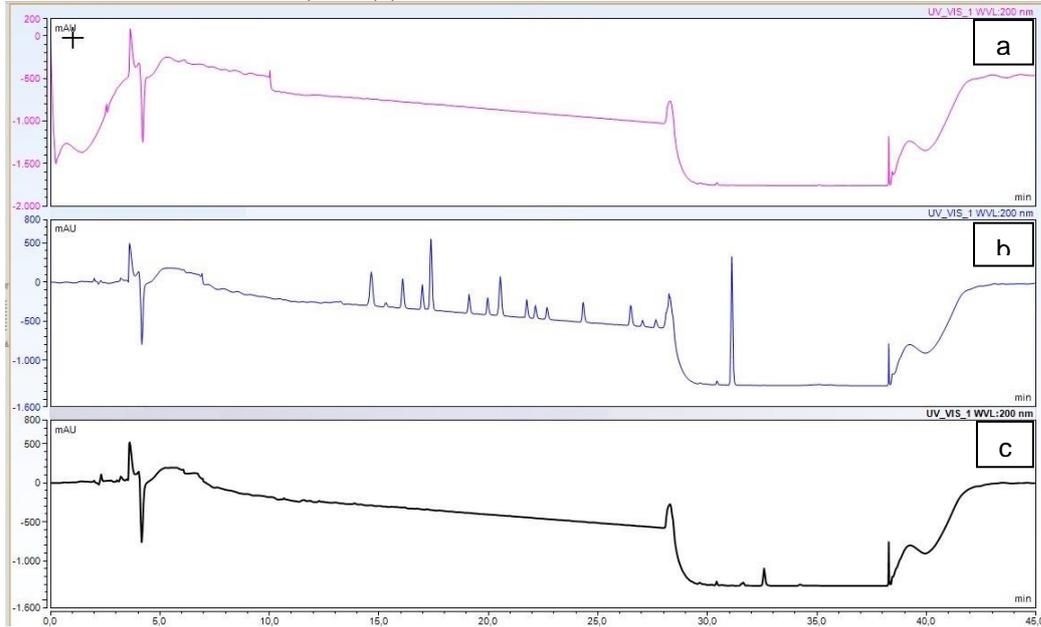
Como os cromatogramas da amostra FADUX foram gerados a partir de uma amostra preparada utilizando-se uma quantidade aproximada à dose diária recomendada, assim como foi preparada a amostra HBCO, isso sugere que muito provavelmente, trata-se de um caso de adulteração, mesmo constando no rótulo o número de registro no MS.

Figura 52 - Cromatograma referente à sobreposição da mistura das matérias-primas (hidroclorotiazida, sinefrina, fenilpropranolamina, salbutamol, terbutalina, fenilefrina, efedrina, clortalidona, metanfetamina, anfepramona, femproporex, clenbuterol, mazindol, fenfluramina, furosemida, sibutramina, rimonabanto) e da amostra FADUX.



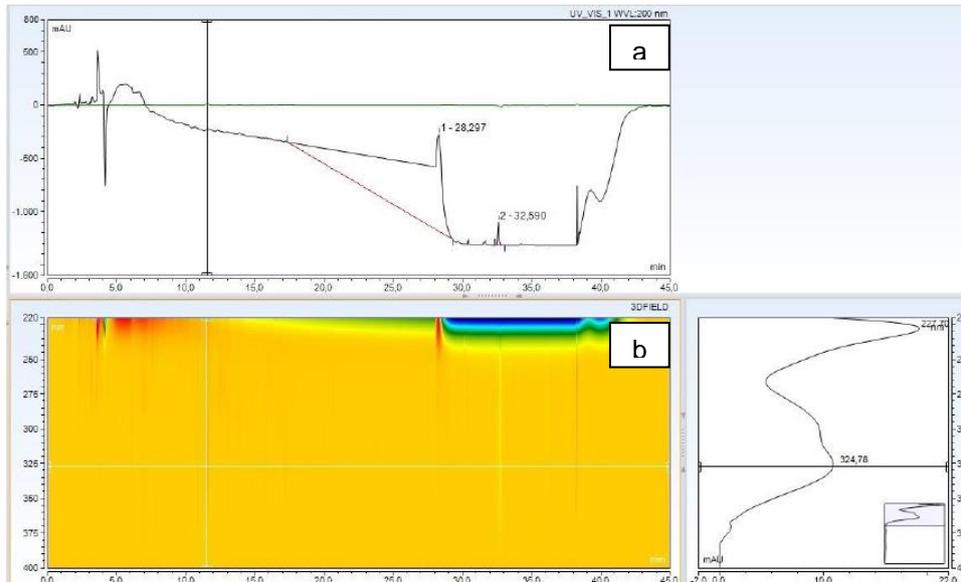
Condições experimentais: Cromatograma obtido através do HPLC–UV/Vis-DAD, λ : 200nm, utilizando-se a coluna **Phenomenex®**, diluente: composto por uma solução de água e isopropanol a 50% v/v, fase A: solução 0,1% de heptanosulfonato (p/v) com pH 3,55, fase C: acetonitrila e fluxo: 1mL/min, .

Figura 53 - Cromatogramas referentes: (a) branco; (b) mistura das matérias-primas (hidroclorotiazida, sinefrina, fenilpropranolamina, salbutamol, terbutalina, fenilefrina, efedrina, clortalidona, metanfetamina, anfepramona, femproporex, clenbuterol, mazindol, fenfluramina, furosemida, sibutramina, rimonabanto) e a (c) amostra FADUX.



Condições experimentais: Cromatograma obtido através do HPLC–UV/Vis-DAD, λ : 200nm, utilizando-se a coluna Phenomenex®, diluente: composto por uma solução de água e isopropanol a 50% v/v, fase A: solução 0,1% de heptanosulfonato (p/v) com pH 3,55, fase C: acetonitrila e fluxo: 1mL/min .

Figura 54 – (a) Cromatograma UV/Vis referente à amostra FADUX; (b) cromatograma DAD da amostra FADUX.



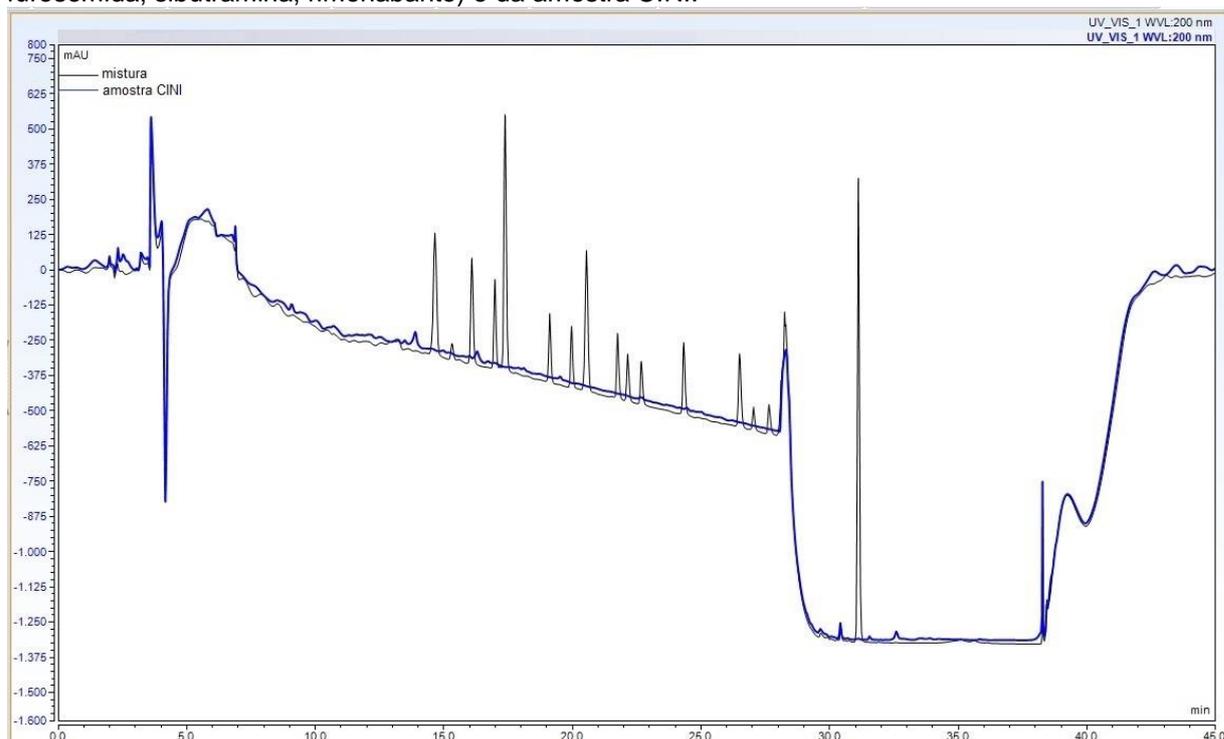
Condições experimentais: Cromatograma obtido através do HPLC–UV/Vis-DAD, λ : 200nm, utilizando-se a coluna **Phenomenex®**, diluente: composto por uma solução de água e isopropanol a 50% v/v, fase A: solução 0,1% de heptanosulfonato (p/v) com pH 3,55, fase C: acetonitrila e fluxo: 1mL/min, .

5.9 RESULTADO DA AMOSTRA CINI

Na composição declarada pelo fabricante consta noz da índia, insumo recentemente proibido de ser comercializado pela Anvisa, devido a sua toxicidade, estando associado a casos de mortes (ANVISA, 2017).

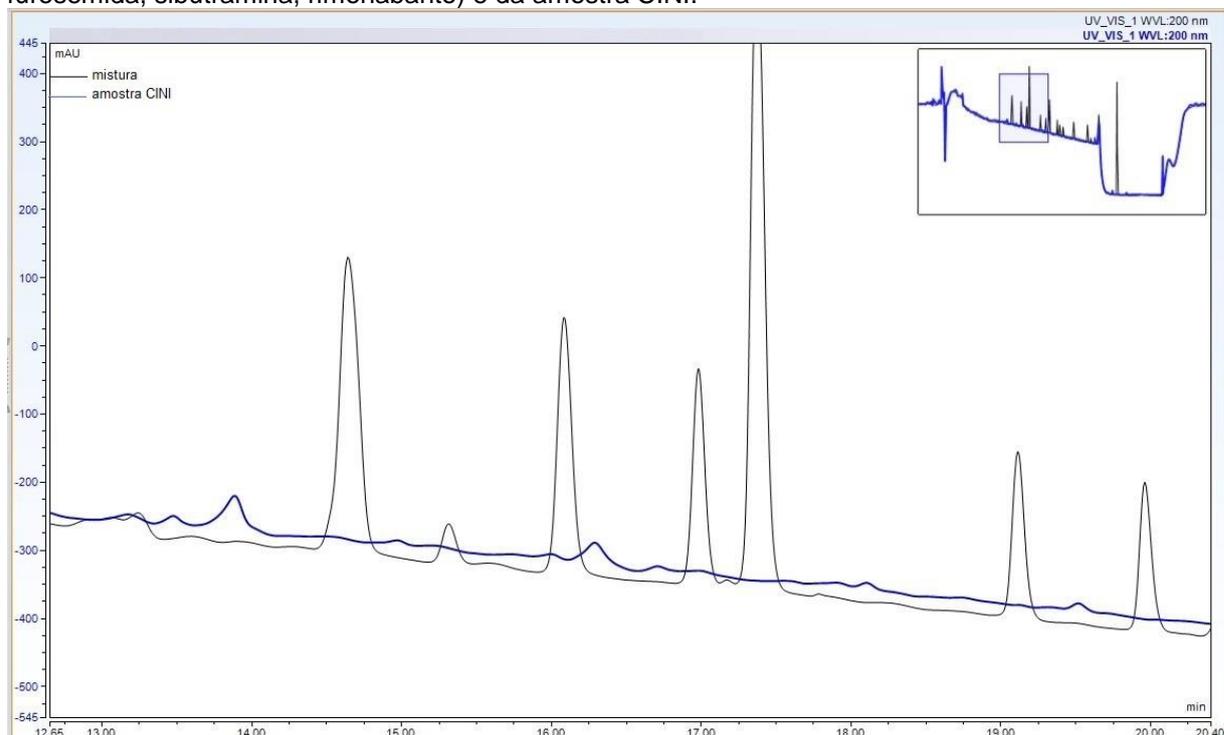
Comparando-se os cromatogramas referentes à sobreposição da mistura das matérias-primas e da amostra CINI (figura 55-vista normal e figura 56-vista expandida), pôde-se observar que não houve coeluição, exceto na região em torno de 16 a 16,5 minutos, onde apareceu um pico que apresentou uma pequena coincidência em termos de k' .

Figura 55 - Cromatograma (vista normal) referentes à sobreposição da mistura das matérias-primas (hidroclorotiazida, sinefrina, fenilpropranolamina, salbutamol, terbutalina, fenilefrina, efedrina, clortalidona, metanfetamina, anfepramona, femproporex, clenbuterol, mazindol, fenfluramina, furosemida, sibutramina, rimonabanto) e da amostra CINI.



Condições experimentais: Cromatograma obtido através do HPLC–UV/Vis-DAD, λ : 200nm, utilizando-se a coluna **Phenomenex®**, diluente: composto por uma solução de água e isopropanol a 50% v/v, fase A: solução 0,1% de heptanosulfonato (p/v) com pH 3,55, fase C: acetonitrila e fluxo: 1mL/min, .

Figura 56- Cromatograma (vista expandida) referente à sobreposição da mistura das matérias-primas (hidroclorotiazida, sinefrina, fenilpropanolamina, salbutamol, terbutalina, fenilefrina, efedrina, clortalidona, metanfetamina, anfepramona, femproporex, clenbuterol, mazindol, fenfluramina, furosemida, sibutramina, rimonabanto) e da amostra CINI.



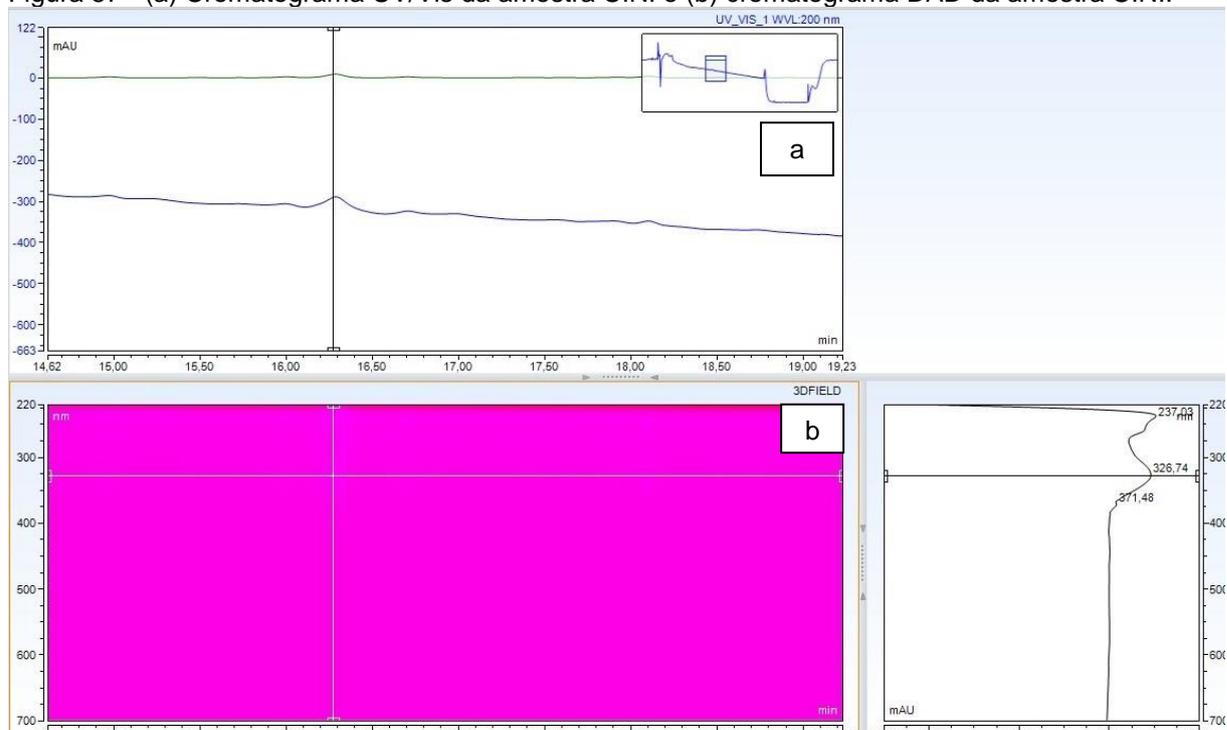
Condições experimentais: Cromatograma obtido através do HPLC–UV/Vis-DAD, λ : 200nm, utilizando-se a coluna **Phenomenex**®, diluente: composto por uma solução de água e isopropanol a 50% v/v, fase A: solução 0,1% de heptanosulfonato (p/v) com pH 3,55, fase C: acetonitrila e fluxo: 1mL/min, .

A fim de analisar se o espectro do sinal detectado tem alguma similaridade espectral com a sinefrina, foi realizada uma varredura espectral com o detector DAD, o qual mostrou que o espectro do sinal detectado não tem similaridade alguma com o espectro da sinefrina do banco de dados (figura 57). Por este motivo e também pela absorvância reduzida do sinal em 200 nm, não foi considerado necessário o uso de técnicas auxiliares para descartar a presença de sinefrina na amostra em quantidade terapêutica.

Resultados similares aos obtidos para essa amostra foram observados por Paiga e colaboradores (2017), os quais desenvolveram um método por UHPLC-MS/MS para a análise de 26 substâncias farmacêuticas pertencentes a diferentes classes terapêuticas (anoréxicos, estimulantes, ansiolíticos, antidepressivos e laxantes), em suplementos alimentares a base de plantas destinadas a perda de peso, não encontrando nenhuma adulteração pela adição ilegal de substâncias proibidas. Sinefrina foi o único composto detectado e quantificado em uma amostra, mas com uma concentração muito baixa (768 $\mu\text{g/L}$) e a sua presença pode ser

devida aos extratos de plantas utilizados na formulação, uma vez que a sinefrina é conhecida por ser um constituinte natural da planta *Citrus aurantium amara*, corroborando com os resultados obtidos para essa amostra.

Figura 57 - (a) Cromatograma UV/Vis da amostra CINI e (b) cromatograma DAD da amostra CINI.



Condições experimentais: Cromatograma obtido através do HPLC–UV/Vis-DAD, λ : 200nm, utilizando-se a coluna **Phenomenex**®, diluente: composto por uma solução de água e isopropanol a 50% v/v, fase A: solução 0,1% de heptanosulfonato (p/v) com pH 3,55, fase C: acetonitrila e fluxo: 1mL/min, .

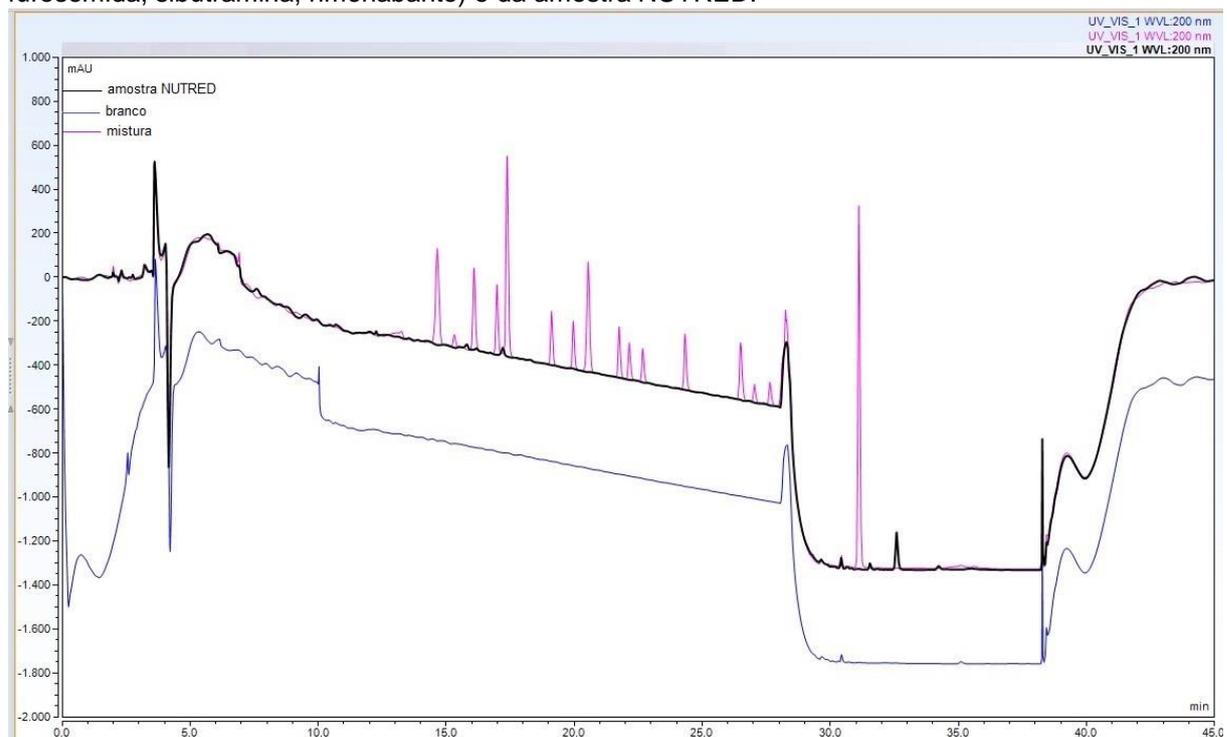
5.10 RESULTADO DA AMOSTRA NUTRED

Segundo a literatura, o bagaço da maçã apresenta composição química dependente do processo de obtenção (tipo de moagem e processo de extração dos sólidos solúveis) e de beneficiamento (tempo e temperatura de desidratação) (COELHO; WOSIACKI, 2010). O aparecimento de poucos sinais com baixa absorvância no cromatograma da figura 58 foi considerado compatível com a formulação.

Em relação ao cromatograma da mistura de matérias-primas, não há indícios de sobreposição de sinais, exceto em cerca de 16,2 minutos, onde foi observada coeluição com a sinefrina, mas não houve similaridade espectral, conforme pode ser observado na figura 59 (vista expandida), e com o auxílio do detector DAD (figura 60).

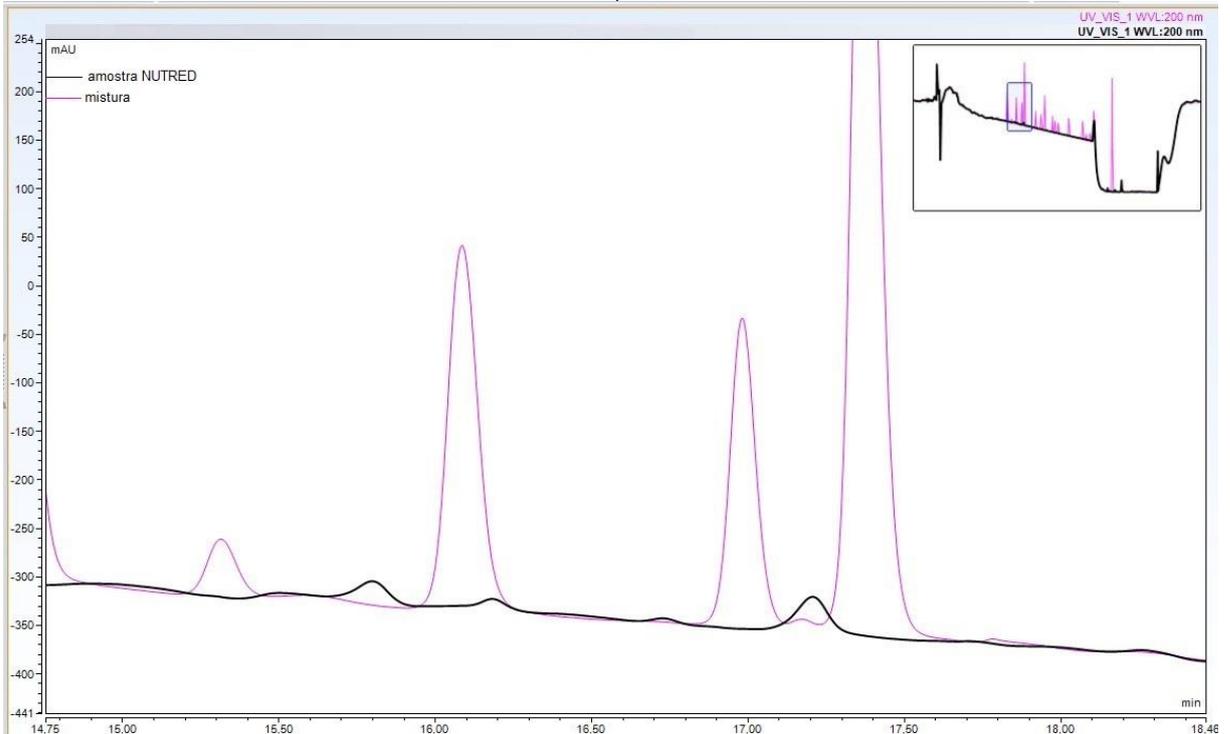
Assim não foi observada a presença das substâncias estudadas na amostra NUTRED.

Figura 58 - Cromatograma referente à sobreposição do branco (diluyente), da mistura das matérias-primas (hidroclorotiazida, sinefrina, fenilpropanolamina, salbutamol, terbutalina, fenilefrina, efedrina, clortalidona, metanfetamina, anfepramona, femproporex, clenbuterol, mazindol, fenfluramina, furosemida, sibutramina, rimonabanto) e da amostra NUTRED.



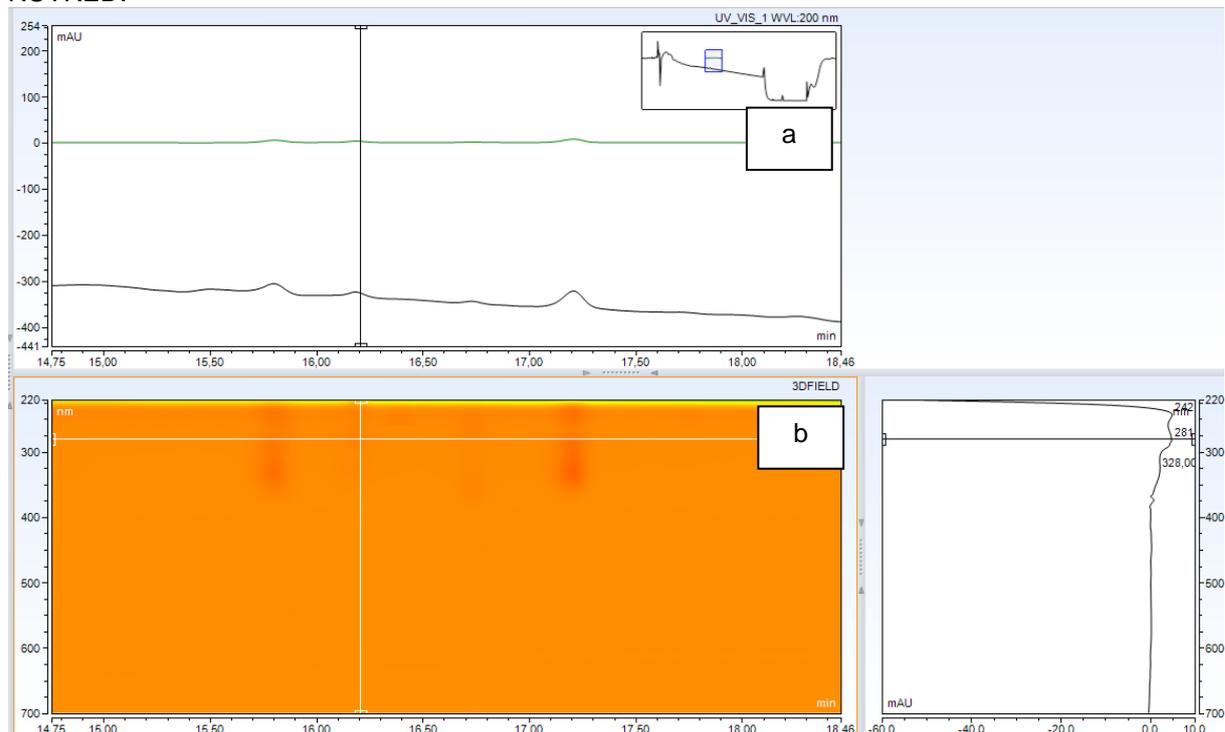
Condições experimentais: Cromatograma obtido através do HPLC–UV/Vis-DAD, λ : 200nm, utilizando-se a coluna **Phenomenex®**, diluyente: composto por uma solução de água e isopropanol a 50% v/v, fase A: solução 0,1% de heptanosulfonato (p/v) com pH 3,55, fase C: acetonitrila e fluxo: 1mL/min, .

Figura 59 - Cromatograma vista expandida referente à sobreposição do cromatograma da mistura das matérias-primas (hidroclorotiazida, sinefrina, fenilpropanolamina, salbutamol, terbutalina, fenilefrina, efedrina, clortalidona, metanfetamina, anfepramona, femproporex, clenbuterol, mazindol, fenfluramina, furosemida, sibutramina, rimonabanto) com a amostra NUTRED.



Condições experimentais: Cromatograma obtido através do HPLC–UV/Vis-DAD, λ : 200nm, utilizando-se a coluna **Phenomenex**®, diluente: composto por uma solução de água e isopropanol a 50% v/v, fase A: solução 0,1% de heptanosulfonato (p/v) com pH 3,55, fase C: acetonitrila e fluxo: 1mL/min, .

Figura 60– (a) Cromatograma UV/Vis da amostra NUTRED; (b) cromatograma DAD da amostra NUTRED.



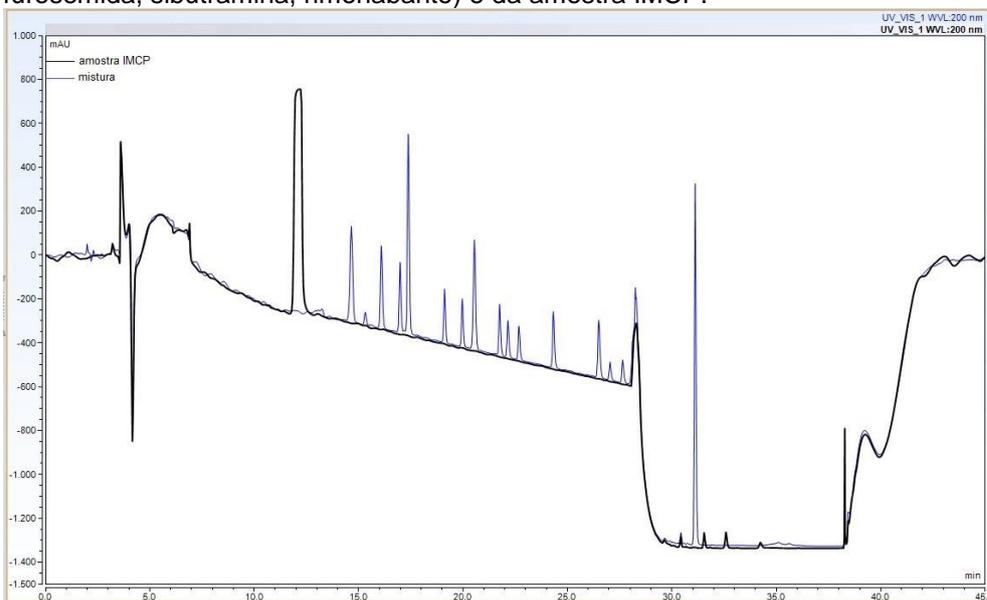
Condições experimentais: Cromatograma obtido através do HPLC–UV/Vis-DAD, λ : 200nm, utilizando-se a coluna **Phenomenex®**, diluente: composto por uma solução de água e isopropanol a 50% v/v, fase A: solução 0,1% de heptanosulfonato (p/v) com pH 3,55, fase C: acetonitrila e fluxo: 1mL/min, .

5.11 RESULTADO DA AMOSTRA IMCP

Segundo o fabricante é um nutracêutico indicado para redução de medidas e possui em sua composição: cafeína, óleo de cártamo, óleo de uva, óleo de gergelim, lecitina de soja e cera de abelha.

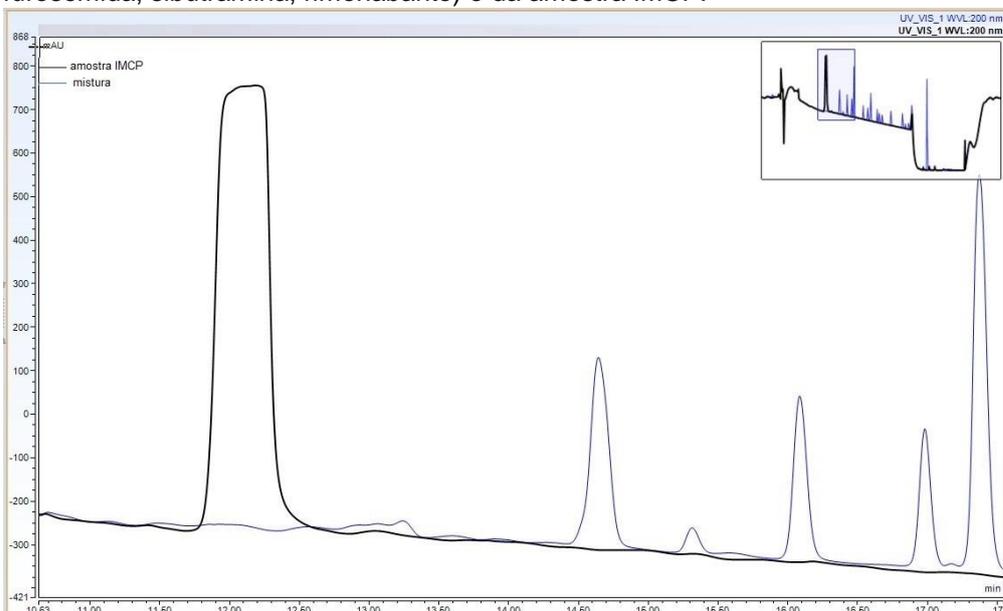
Não foram observadas sobreposições entre os cromatogramas da mistura de matérias-primas e a amostra IMCP (figura 61). O pico pronunciado do insumo presente na amostra IMCP, o qual pode ser observado nas figuras 61 (vista real) e 62 (vista expandida), se encontram provavelmente em alta concentração devido ao seu formato largo e supersaturando a zona de concentração da coluna cromatográfica.

Figura 61 - Cromatograma vista real referente à sobreposição da mistura das matérias-primas (hidroclorotiazida, sinefrina, fenilpropranolamina, salbutamol, terbutalina, fenilefrina, efedrina, clortalidona, metanfetamina, anfepramona, femproporex, clenbuterol, mazindol, fenfluramina, furosemida, sibutramina, rimonabanto) e da amostra IMCP.



Condições experimentais: Cromatograma obtido através do HPLC–UV/Vis-DAD, λ : 200nm, utilizando-se a coluna **Phenomenex**®, diluente: composto por uma solução de água e isopropanol a 50% v/v, fase A: solução 0,1% de heptanosulfonato (p/v) com pH 3,55, fase C: acetonitrila e fluxo: 1mL/min, .

Figura 62 - Cromatograma vista expandida referente à sobreposição da mistura das matérias-primas (hidroclorotiazida, sinefrina, fenilpropranolamina, salbutamol, terbutalina, fenilefrina, efedrina, clortalidona, metanfetamina, anfepramona, femproporex, clenbuterol, mazindol, fenfluramina, furosemida, sibutramina, rimonabanto) e da amostra IMCP.

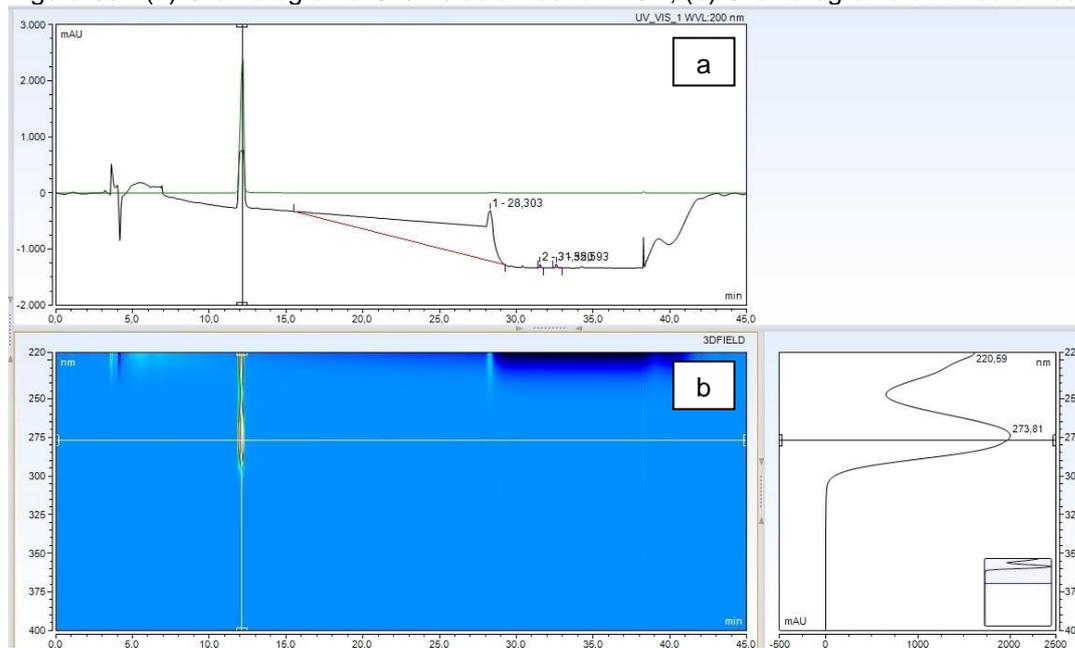


Condições experimentais: Cromatograma obtido através do HPLC–UV/Vis-DAD, λ : 200nm, utilizando-se a coluna **Phenomenex**®, diluente: composto por uma solução de água e isopropanol a 50% v/v, fase A: solução 0,1% de heptanosulfonato (p/v) com pH 3,55, fase C: acetonitrila e fluxo: 1mL/min, .

Foi confirmado através da espectroscopia UV e pela espectrometria de massas de alta resolução em modo positivo como sendo cafeína (figuras 63 e 64). O

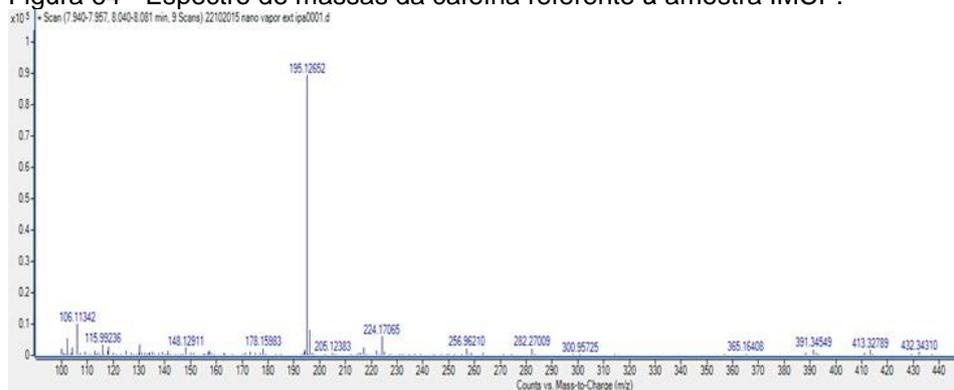
espectro de massas estabelecido para a cafeína foi comparado com dados de referência da biblioteca NIST (National Institute of Standards and Technology), permitindo comprovar sua autenticidade. O sinal em 195 m/z refere-se ao íon da cafeína e os demais picos referem-se aos íons gerados pela fragmentação do mesmo (NIST, 2017).

Figura 63 - (a) Cromatograma UV/Vis da amostra IMCP; (b) Cromatograma DAD da amostra IMCP.



Condições experimentais: Cromatograma obtido através do HPLC–UV/Vis-DAD, λ : 200nm, utilizando-se a coluna **Phenomenex**®, diluente: composto por uma solução de água e isopropanol a 50% v/v, fase A: solução 0,1% de heptanosulfonato (p/v) com pH 3,55, fase C: acetonitrila e fluxo: 1mL/min, .

Figura 64 - Espectro de massas da cafeína referente à amostra IMCP.



Condições experimentais: Equipamento: Espectrômetro Q-TOF, interface do tipo ESI, modo isocrático com inserção direta, modo de varredura de m/z 100-500, com taxa de varredura (espectros/segundos) de 2,00, VC:4000, VF: 175, volume de injeção: 1 μ L com fluxo 0,2 mL/min, fase móvel foi 50% de ácido fórmico e 50% de acetonitrila.

6 CONCLUSÃO

Neste trabalho desenvolveu-se um método analítico utilizando a cromatografia líquida com detector UV/Vis-DAD para detecção das substâncias hidroclorotiazida, sinefrina, fenilpropanolamina, salbutamol, terbutalina, fenilefrina, efedrina, clortalidona, metanfetamina, anfepramona, femproporex, clenbuterol, mazindol, fenfluramina, furosemida, sibutramina e rimonabanto em formulações emagrecedoras. Esse método mostrou-se adequado para as substâncias estudadas, apresentando uma eficiência de extração entre 72 e 97%.

O detector UV/Vis com arranjo de diodos, a espectrometria de massas e o banco de dados espectrais, permitiram a comparação entre o espectro da substância encontrada na amostra e a matéria-prima correspondente, levando a confirmação ou não do composto detectado.

A aplicação do método alcançou o objetivo proposto que foi a análise qualitativa para 17 compostos com atividades farmacológicas em amostras de suplementos nacionais destinados à perda de peso, adquiridas pelo laboratório de alimentos do INCQS e legalmente classificadas pela Anvisa em Suplemento de cafeína para atletas, Novos Alimentos ou Ingredientes e chá.

Por meio do método de triagem desenvolvido não foram encontradas as substâncias estudadas nas amostras analisadas, exceto para uma amostra, em que foi encontrada a substância rimonabanto. Em três amostras não foram detectados os sinais marcadores, cafeína e EGCG, referentes ao chá verde declarado no rótulo. Já na amostra HBCO não foram detectados os sinais marcadores do picolinato de cromo (III) e o gengibre, ambos declarados no rótulo como ingredientes.

Os dados encontrados no presente estudo, assim como análises realizadas por outros autores atentam para a necessidade de análises da qualidade dos suplementos alimentares, bem como a correlação dos rótulos com os conteúdos fitoquímicos.

Oficialmente não existem normas estabelecidas pela Anvisa para o controle de formulações emagrecedoras, a adulteração dessas formulações é uma prática recorrente em todo o mundo, sendo os fármacos sintéticos estudados os mais citados internacionalmente.

As análises realizadas confirmaram a deficiência existente no controle de qualidade de suplementos nacionais destinados ao emagrecimento atentando para a necessidade de um monitoramento mais rigoroso e eficaz.

REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Alerta sobre presença de substâncias proibidas no suplemento Mayhem. **ANVISA**, 18 nov. 2014. Notícias. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/noticias/-/asset_publisher/FXrpx9qY7FbU/content/alerta-sobre-presenca-de-substancias-proibidas-no-suplemento-mayhem/219201/pop_up?inheritRedirect=false>. Acesso em: 07 nov. 2015.

_____. **Anvisa alerta para presença de lorcaserina no suplemento termogênico B-Lipo e sibutramina e fenolftaleína no Slim-K.** Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/Anvisa+Portal/Anvisa/Inicio/Alimentos/Publicacao+Alimentos/Alerta+sobre+presenca+de+substancias+proibidas+nos+suplementos+B-Lipo+Capsules+e+Slim-K+Capsules>>. Acesso em: 07 nov./2015.

_____. **Anvisa alerta para risco de consumo de suplemento alimentar.**

Disponível em:

<http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/anvisa+portal/anvisa/sala+de+imprensa/assunto+de+interesse/noticias/anvisa+alerta+para+risco+de+consumo+de+suplemento+alimentar>. Acesso em: 07/11/2015.

_____. **Informe técnico**, n. 44. Disponível em:

<<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/35605800474574fb8333d73fbc4c6735/Informe+T%C3%A9cnico+Divine+Shen+e+Caralluma+fimbriata.pdf?MOD=AJPERE>>. Acesso em: 08 nov. 2015, 2010c.

_____. Lei nº 9.782, de 26 de janeiro de 1999. Define o Sistema Nacional de Vigilância Sanitária, cria a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, e dá outras providências. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. Brasília, 27.1.1999. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/decreto-lei/Del0986.htm>. Acesso em: 9 out. 2015, 1999a.

_____. Noz da Índia está proibida no Brasil. 07 fev. 2017. **Notícias ANVISA**.

Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/noticias/-/asset_publisher/FXrpx9qY7FbU/content/noz-da-india-esta-proibida-no-brasil/219201?p_p_auth=bgXO9GCD&inheritRedirect=false&redirect=http%3A%2F%2Fportal.anvisa.gov.br%2Fnoticias%3Fp_p_auth%3DbgXO9GCD%26p_p_id%3D101_INSTANCE_FXrpx9qY7FbU%26p_p_lifecycle%3D0%26p_p_state%3Dnormal%26p_p_mode%3Dview%26p_p_col_id%3Dcolumn-4%26p_p_col_count%3D2

<http://portal.anvisa.gov.br/noticias/-/asset_publisher/FXrpx9qY7FbU/content/noz-da-india-esta-proibida-no-brasil/219201?p_p_auth=bgXO9GCD&inheritRedirect=false&redirect=http%3A%2F%2Fportal.anvisa.gov.br%2Fnoticias%3Fp_p_auth%3DbgXO9GCD%26p_p_id%3D101_INSTANCE_FXrpx9qY7FbU%26p_p_lifecycle%3D0%26p_p_state%3Dnormal%26p_p_mode%3Dview%26p_p_col_id%3Dcolumn-4%26p_p_col_count%3D2>. Acesso em: 01/02/2017.

_____. Portaria nº 15, de 30 de abril de 1999. Institui junto à Câmara Técnica de Alimentos a Comissão de Assessoramento Tecnocientífico em Alimentos Funcionais e Novos Alimentos, com a incumbência de prestar consultoria e assessoramento em matéria relacionada a alimentos funcionais e novos alimentos, segurança de consumo e alegação de função em rótulos, submetidos por lei ao regime de vigilância sanitária. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília; 1999.

_____. Portaria nº 30, de 13 de janeiro de 1998. Aprova o Regulamento Técnico referente a Alimentos para Controle de Peso. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, 16 jan. 1998a.

_____. Portaria SVS/MS nº 32, de 13 de janeiro de 1998. Regulamento Técnico para Suplementos Vitamínicos e ou de Minerais. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, 15 jan. 1998b.

_____. Portaria nº 398, de 30 de abril de 1999. Regulamento Técnico que Estabelece as Diretrizes Básicas para Análise e Comprovação de Propriedades Funcionais e ou de Saúde Alegadas em Rotulagem de Alimentos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. Brasília, 03 maio. 1999. Disponível em: <http://e-legis.bvs.br/leisref/public/showAct.php?id=11297&mode=PRINT_VERSION>. Acesso em: 19 out.2015. 1999b.

_____. Resolução n. 16, de 30 de abril de 1999. Aprova o Regulamento Técnico de Procedimentos para Registro de Alimentos e ou Novos Ingredientes. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, seção 1-E, p. 11, 1999c.

_____. Resolução n. 17, de 30 de abril de 1999. Aprova o Regulamento Técnico que Estabelece as Diretrizes Básicas para Avaliação de Risco e Segurança dos Alimentos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, seção 1-E, p. 11, 1999d.

_____. Resolução n. 18, de 30 de abril de 1999. Aprova o Regulamento Técnico que Estabelece as Diretrizes Básicas para Análise e Comprovação de Propriedades Funcionais e ou de Saúde Alegadas em Rotulagem de Alimentos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, seção 1-E, p. 11, 1999e.

_____. Resolução nº 19, de 30 de abril de 1999. Aprova o Regulamento Técnico de Procedimentos para Registro de Alimento com Alegação de Propriedades Funcionais e ou de Saúde em sua Rotulagem. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, de 03 de maio de 1999. Seção 1-E, p. 12, 1999f.

_____. Resolução RDC nº 2, de 07 de janeiro de 2002. Aprova o Regulamento Técnico de Substâncias Bioativas e Probióticos Isolados com Alegação de Propriedades Funcional e ou de Saúde. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, 09 de janeiro de 2002.

_____. Resolução RDC nº 18, de 27 de abril de 2010. Dispõe sobre alimentos para atletas. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, de 28 de abril de 2010. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/65f5b80047457f258ad7de3fbc4c6735/RDC+dos+Atletas+-+Dicol.pdf?MOD=AJPERES>. Acesso em: 15/10/2015, 2010a.

_____. 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. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, Disponível em:

<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/91607e0048998db4b02ffafd7a12d53b/RDC+n27_2010.pdf?MOD=AJPERES>. Acesso em: 15 out. 2015, 2010b.

ANDRIOLO, D. S. M. et al. Investigação da presença de anorexígenos, benzodiazepínicos e antidepressivos em formulações fitoterápicas emagrecedoras. **Rev. do Instituto Adolfo Lutz**, v. 71, n. 1, p. 148-152, 2012.

ANJO, D. F. C. Alimentos funcionais em angiologia e cirurgia vascular. **Jornal vascular brasileiro**, v 3, n. 2, p. 145-54, 2004.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DE ALIMENTAÇÃO. **Página institucional**. São Paulo: ABIA, 2014. Disponível em: <<http://www.abia.org.br/vs/setoremnumeros.aspx>>. Acesso em: 15 out. 2015.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DO COMÉRCIO FARMACÊUTICO. **Afinal porque tanta discussão sobre suplementos alimentares?** São Paulo: ABCFARMA, 2014. Disponível em: <<http://abcfarma.org.br/noticias/alimentos-funcionais.html>>. Acesso em: 10 out. 2015.

AUTORIDADE BRASILEIRA CONTROLE DE DOPAGEM. **A Lista proibida de 2016 código mundial antidopagem**. Brasília: ABCD, 2016. Disponível em: <<http://www.abcd.gov.br/arquivos/lista2016.pdf>>. Acesso em: 05 fev. 2017.

BAUME, Norbert et al. Research of stimulants and anabolic steroids in dietary supplements. **Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports**, v. 16, n. 1, p. 41-48, 2006.

BOGUSZ, M. J. et al. Application of LC–ESI–MS–MS for detection of synthetic adulterants in herbal remedies. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 41, n. 2, p. 554-564, 2006.

BRASIL. Decreto-Lei n.º 986, de 12 de outubro de 1969. Institui normas básicas sobre alimentos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 21 de outubro de 1969.

_____. Lei nº 8.080, de 19 de setembro de 1990. Dispõe sobre as condições para a promoção, proteção e recuperação da saúde, a organização e o funcionamento dos serviços correspondentes e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 20 set. 1990. Seção 1, p. 18055.

_____. Ministério da saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC 2, de 07 de janeiro de 2002. Aprova o Regulamento Técnico de Substâncias Bioativas e Probióticos Isolados com Alegação de Propriedade Funcional e ou de Saúde. Diário Oficial **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 2002.

BRASIL. Ministério do Esporte. Comissão Nacional de Combate ao Doping. **Relatório de Controle Antidoping no Brasil de 2004**. Disponível em: <<http://www.cob.org.br/pt/cob/movimento-olimpico/combate-ao-doping>>. Acesso em: 25 jul. 2016.

_____. **Controle Antidoping no Brasil Ano de 2004**. Brasília: Comissão Nacional de Combate ao Doping. 2005. Disponível em: <<https://www.cob.org.br/Handlers/RecuperaDocumento.ashx?codigo=1155>>. Acesso em 9 mar. 2015.

BROADHURST, C. L. et al. Characterization and structure by NMR and FTIR spectroscopy, and molecular modeling of chromium (III) picolinate and nicotinate complexes utilized for nutritional supplementation. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 66, n. 2, p. 119-130, 1997.

BRUNTON, L. L. et al. **As Bases farmacológicas da terapêutica de Goodman & Gilman**. 10 ed. Guanabara Koogan, 2005.

CADWALLADER, A. B. et al. The abuse of diuretics as performance-enhancing drugs and masking agents in sport doping: pharmacology, toxicology and analysis. **British Journal of Pharmacology**, v.161, n .1, p.1–16, 2010.

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

_____. Presence of synthetic pharmaceuticals as adulterants in slimming phytotherapeutic formulations and their analytical determination. **Forensic science international**, v. 204, n. 1, p. 6-12, 2011.

CATLIN, D. H. et al. Trace contamination of over-the-counter androstenedione and positive urine test results for a nandrolone metabolite. **The Journal of the American Medical Association**, v. 284, n. 20, p. 2618-2621, nov. 2000.

CHAMPAGNE, A. B.; EMMEL, K. V. Rapid screening test for adulteration in raw materials of dietary supplements. **Vibrational Spectroscopy**, v. 55, n. 2, p. 216-223, 2011.

CHUST, R. B. Introdução Cromatografia de Líquidos (HPLC). **Boletim SPQ**, 39, 1990. Disponível em: <<http://www.spq.pt/magazines/BSPQ/563/article/3000458/pdf>>. Acesso em: 17 ago. 2016.

COELHO, L. M.; WOSIACKI, G. Avaliação sensorial de produtos panificados com adição de farinha de bagaço de maçã. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v. 30, n. 3, p. 582-588, Sept. 2010

CROWE, K. M.; FRANCIS, C. Position of the academy of nutrition and dietetics: functional foods. **J Acad Nutr Diet.** v.113, n. 8, p. 1096-103, 2013. Disponível em:<<http://dx.doi.org/10.1016/j.jand.2013.06.002>>. Acesso em: 16 out. 2015.

CSUPOR, D. et al. Rapid identification of sibutramine in dietary supplements using a stepwise approach. **Die Pharmazie-an International Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 68, n. 1, p. 15-18, 2013.

DE COCK, K. J. S. et al. Detection and determination of anabolic steroids in nutritional supplements. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 25, n. 5, p. 843-852, 2001.

DECONINCK, E. et al. A validated Ultra High Pressure Liquid Chromatographic method for the characterisation of confiscated illegal slimming products containing anorexics. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 59, p. 38-43, 2012.

DEGANI, A. L. G. et al. Cromatografia, um Breve Ensaio. **Química Nova na Escola**, n. 7, 1998.

DEFELICE, S. L. The nutraceutical revolution, its impact on food industry research and development. **Trends Food Sci. Technol.** vl. 6, p. 59–61, 1995.

DEVENTER, Koen et al. Detection of selected stimulants as contaminants in solid nutritional supplements by liquid chromatography–mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 103, n. 4, p. 1508-1513, 2008.

DOCHERTY, J. R. Pharmacology of stimulants prohibited by the World Anti-Doping Agency (WADA). **British Journal of Pharmacology**, v.154, n.3, p.606–622, 2008.

DOMÉNECH-CARBÓ, A. et al. Screening of pharmacologic adulterant classes in herbal formulations using voltammetry of microparticles. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 74, p. 194-204, 2013.

DUNN, J. D. et al. Qualitative screening for adulterants in weight-loss supplements by ion mobility spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 71, p. 18-26, 2012.

FONTENELE, M. L. S.; LUNA, G. I. Regulamentação da Suplementação Nutricional no Brasil. **Acta de Ciências e Saúde**, v. 1, n. 2, p. 82-94, 2013.

FRANCO, R. C. **Análise comparativa de legislações internacionais referentes aos alimentos funcionais**. 2006. Dissertação (Mestrado em Nutrição Humana

Aplicada) - Nutrição Humana Aplicada, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006. doi:10.11606/D.89.2006.tde-30032007-140759. Acesso em: 2017-02-05.

FREITAS, H. C. P.; NAVARRO, F. O chá verde induz o emagrecimento e auxilia no tratamento da obesidade e suas comorbidades. **RBONE - Revista Brasileira De Obesidade, Nutrição e Emagrecimento**, v. 1, n. 2, 2012.

GEYER, H. et al. Nutritional supplements cross-contaminated and faked with doping substances. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 43, n. 7, p. 892-902, 2008.

GULATI, O. M. P.; OTTAWAY, P. B. Legislation relating to nutraceuticals in the European Union with a particular focus on botanical-sourced products. **Toxicology**, v. 221, n. 1, p. 75-87, 2006.

HACHEM, R. et al. First identification and quantification of lorcaserin in an herbal slimming dietary supplement. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 98, p. 94-99, 2014.

HO, C. S. et al. Electrospray Ionisation Mass Spectrometry: principles and clinical applications. **The Clinical Biochemist Reviews**, v. 24, n. 1, p. 03-12, 2003.

HOLIDAY E. R. The characteristic absorption of ultra-violet radiation by certain purines. **Biochem J.**, v.24, n.3, p.619–625, 1930.

IKEDA, A. A. et al. Considerações sobre tendências e oportunidades dos alimentos funcionais. **Rev. P & D em Engenharia de Produção**, v. 8, p. 40-56, 2010.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA. **DOQ-CGCRE-008**: Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos. Rio de Janeiro: INMETRO, 2010, 20p.

JIANG, H. et al. Characterization of gingerol-related compounds in ginger rhizome (*Zingiber officinale* Rosc.) by high-performance liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 19, n. 20, p. 2957-2964, 2005.

JUNG, J. et al. Anorectic sibutramine detected in a Chinese herbal drug for weight loss. **Forensic Science International**, v. 161, n. 2, p. 221-222, 2006.

KAMBER, M. et al. Nutritional supplements as a source for positive doping cases?. **Rev. International Journal of Sport Nutrition and Exercise Metabolism**, v.11, n. 2, p. 258-263, jun. 2001.

KIM, E. H. et al. Reliable screening and confirmation of 156 multi-class illegal adulterants in dietary supplements based on extracted common ion chromatograms by ultra-high-performance liquid chromatography-quadrupole/time of flight-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, 2017.

KU, Y. et al. Analysis and confirmation of synthetic anorexics in adulterated traditional Chinese medicines by high-performance capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v. 848, n. 1, p. 537-543, 1999.

LANÇAS, F. M. A Cromatografia Líquida Moderna e a Espectrometria de Massas: finalmente “compatíveis”? **Scientia Chromatographia**. v. 1, nº. 2, 2009. Disponível em: <<http://scientiachromatographica.com/files/v1n2/v1n2a4.pdf>>. Acesso em: 15 ago 2016.

LIANG, Q. et al. Rapid and reliable determination of illegal adulterant in herbal medicines and dietary supplements by LC/MS/MS. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 40, n. 2, p. 305-311, 2006.

LIRA, C. R. G. et al. Nutracêuticos: aspectos sobre segurança, controle de qualidade e legislação. **Rev. Bras. Farm.**, v. 90, n.1, p. 45-49, 2009.

LIU, S. et al. HPLC and GC–MS screening of Chinese proprietary medicine for undeclared therapeutic substances. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 24, n. 5, p. 983-992, 2001.

LUIZETTO, E. M. et al. Alimentos funcionais em alimentação coletiva: reflexões acerca da promoção da saúde fora do domicílio. **Nutrire**, v. 40, n. 2, p. 188-199, 2015.

MALDANER, L.; JARDIM, I. C. S. F. The state of art of ultra performance liquid chromatography. **Química Nova**, v. 32, n. 1, p. 214-222, 2009.

MANNING, J.; ROBERTS, J. C. Analysis of catechin content of commercial green tea products. **Journal of Herbal Pharmacotherapy**, v. 3, n. 3, p. 19-32, 2003.

MARTINI, M. **Desenvolvimento de metodologia para a determinação de fármacos sintéticos em formulações de fármacos sintéticos em formulações fitoterápica emagredoras empregando eletroforese capilar**. 2010. Dissertação (Mestrado em Química) – Programa de Pós-graduação em Química Área de Concentração em Química Analítica. Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2010.

MATHON, C. et al. Screening and determination of sibutramine in adulterated herbal slimming supplements by HPTLC-UV densitometry. **Food Additives & Contaminants: Part A**, v. 31, n. 1, p. 15-20, 2014.

_____. Multi-targeted screening of botanicals in food supplements by liquid chromatography with tandem mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 138, n. 1, p. 709-717, 2013.

MERCADO COMUM DO SUL. **Resolução GMC (Grupo Mercado Comum), n.54**, de 29 setembro de 2000 nº 54/2000. Regulamento técnico mercosul metodologias analíticas, ingestão diária admissível e limites máximos de resíduos para medicamentos veterinários em alimentos de origem animal. MERCOSUL. Disponível em: <<http://www.mercosul.gov.br/normativa/resolucao/2000/mercosul-gmc-res-no-54-00>>. Acesso em: 12 ago. 2016.

MONTEIRO, E. D. O.; MARIN, C. T. Alimentos funcionais. **Rev. Bras. Med**, v. 67, p. 10-19. 2015.

MORAES F. P.; COLLA L. M. Alimentos funcionais e nutracêuticos: definições, legislação e benefícios à saúde. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v.3, n.2, 109-122, 2006.

NATIONAL INSTITUTE OF STANDARDS AND TECHNOLOGY. United States: NIST **Caffeine**. Disponível em: <<http://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=C58082&Mask=200>>. Acesso em: 05 jan. 2017.

NETO, A. J. S. Problemas com o Formato dos Picos em Cromatografia Líquida – Parte 4. **Scientia Chromatographica**, v.2, n.3, p. 61-67, 2010.

NEVES, D. B. J.; CALDAS, E. D. Dietary supplements: International legal framework and adulteration profiles, and characteristics of products on the Brazilian clandestine market. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 73, n. 1, p. 93-104, 2015.

PAÍGA, P. et al. Analysis of pharmaceutical adulterants in plant food supplements by UHPLC-MS/MS. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 99, n.2017, p. 219–227, 2016.

PARK, S. et al. Determination of PDE-5 inhibitors and appetite suppressants in adulterated dietary supplements using LC/PDA and LC/MS. **Food Additives and Contaminants: part B**, v. 5, n. 1, p. 29-32, 2012.

PARRA, R. M. T. et al. Contamination of dietary supplements used for sport practice: A review of literature. **Revista Brasileira de Ciências do Esporte**, v. 33, n. 4, p. 1071-1084, 2011.

PITTLER, M. H.; ERNST, E. Dietary supplements for body-weight reduction: a systematic review. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 79, n. 4, p. 529-536, 2004.

POSITION of the American Dietetic Association: functional foods. **J Am Diet Assoc.**, v.109, n.4, p.735-46, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jada.2009.02.023>>. Acesso em: 16 out. 2015.

REBIERE, H. et al. Detection of hazardous weight-loss substances in adulterated slimming formulations using ultra-high-pressure liquid chromatography with diode-

array detection. **Food Additives & Contaminants: Part A**, v. 29, n. 2, p. 161-171, 2012.

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

ROCHA, T. et al. Adulteration of dietary supplements by the illegal addition of synthetic drugs: a review. **Comprehensive Reviews In Food Science and Food Safety**, v. 15, n. 1, p. 43-62, 2016.

ROSENFELD, S. **Fundamentos da vigilância sanitária**. 6. ed. Rio de Janeiro: Ed. Fiocruz, 2009.

RUSSO, G. et al. A validated LC/UV method for the determination of four adulterating drugs in herbal slimming capsules. **Journal of Pharmaceutical And Biomedical Analysis**, v. 117, p. 436-445, 2016.

SCHMITT, G. C. **Análise química e toxicológica de suplementos alimentares e compostos emagrecedores contendo p-sinefrina associada a efedrina, salicina e cafeína**. 2012. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul, 2012.

SEERAM, N. P. et al. Catechin and caffeine content of green tea dietary supplements and correlation with antioxidant capacity. **Journal of Agricultural And Food Chemistry**, v. 54, n. 5, p. 1599-1603, 2006.

SHI, Y. et al. Development of a liquid chromatography tandem mass spectrometry method for simultaneous determination of eight adulterants in slimming functional foods. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, n. 42, p. 7655-7662, 2011.

SILVA, L. F. M.; FERREIRA, K. S. Segurança alimentar de suplementos comercializados no Brasil. **Rev Bras Med Esporte**, v. 20, n. 5, set/out, p.374-78, 2014. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rbme/v20n5/1517-8692-rbme-20-05-00374.pdf>>. Acesso em: 05 fev. 2017.

SILVA, J. M.; PAULA, N. M. Alterações no padrão de consumo de alimentos no Brasil após o Plano Real. In.: Evento de Iniciação Científica da UFPR, 12, 2003, Paraná. **Anais...** Paraná, 2003.

SKOOG, D. A. et al. **Princípios de análise instrumental**. 6. ed. Porto Alegre: Editora Bookman, 2009.

SNYDER, L. R. et al. **Introduction to modern liquid chromatography**. 3rd. Canada: John Wiley & Sons, 1979, p.453-482.

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

SOUSA, A. A. et al. Perfil do consumidor de alimentos orientado para a saúde no Brasil. In.: Encontro de ANPAD, 31, 2007, Rio de Janeiro. **EnANPAD**. Rio de Janeiro: ANPAD, 2007. Disponível em: <<http://www.anpad.org.br/admin/pdf/MKT-B1027.pdf>>. Acesso em: 19 out. 2015.

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

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

VAN DER MERWE, P. J.; GROBBELAAR, E. Unintentional doping through the use of contaminated nutritional supplements. **South African Medical Journal**, v. 95, n. 7, p. 510-511, 2005.

VARVARA, A. et al. Ion-pair reversed-phase high performance liquid chromatography of ondasetron hydrochloride using sodium heptanesulphonate as a counterion. **Rev. Farmacia**, v. 57, n.4, p.442-51, 2009.

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

VENHUIS, B. J. et al. The identification of rimonabant polymorphs, sibutramine and analogues of both in counterfeit Acomplia bought on the internet. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 54, n. 1, p. 21-26, 2011.

YANO, H. M. et al. Pesquisa de anorexígenos e benzodiazepínicos em formulações emagrecedoras e avaliação de rotulagem, em análises da Seção de Farmacognosia do Instituto Adolfo Lutz no período de junho de 2004 a março de 2007. **Rev. do Instituto Adolfo Lutz**, v. 67, n. 1, p. 78-82, 2008.

WANG, J. et al. Analysis of six synthetic adulterants in herbal weight-reducing dietary supplements by LC electrospray ionization-MS. **Food Additives and Contaminants**, v. 25, n. 7, p. 822-830, 2008.

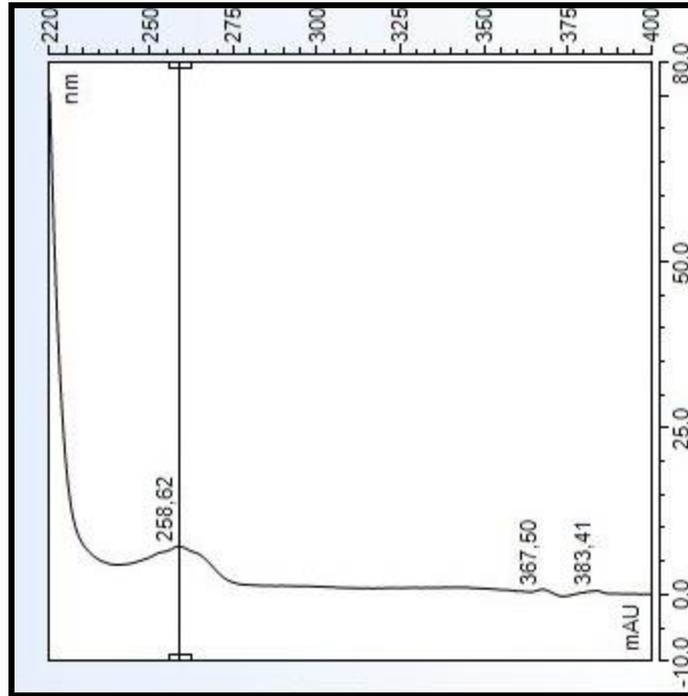
WORLD ANTI-DOPING CODE INTERNATIONAL STANDARD. **Prohibited list
january 2016**. WADA. Disponível em: <<http://www.bestsportswimming.com.br/wp-content/uploads/2015/10/ListaWada2016.pdf>>. Acesso em: 11 jan. 2017.

APÊNDICE A - CARACTERIZAÇÃO DAS MATÉRIAS-PRIMAS

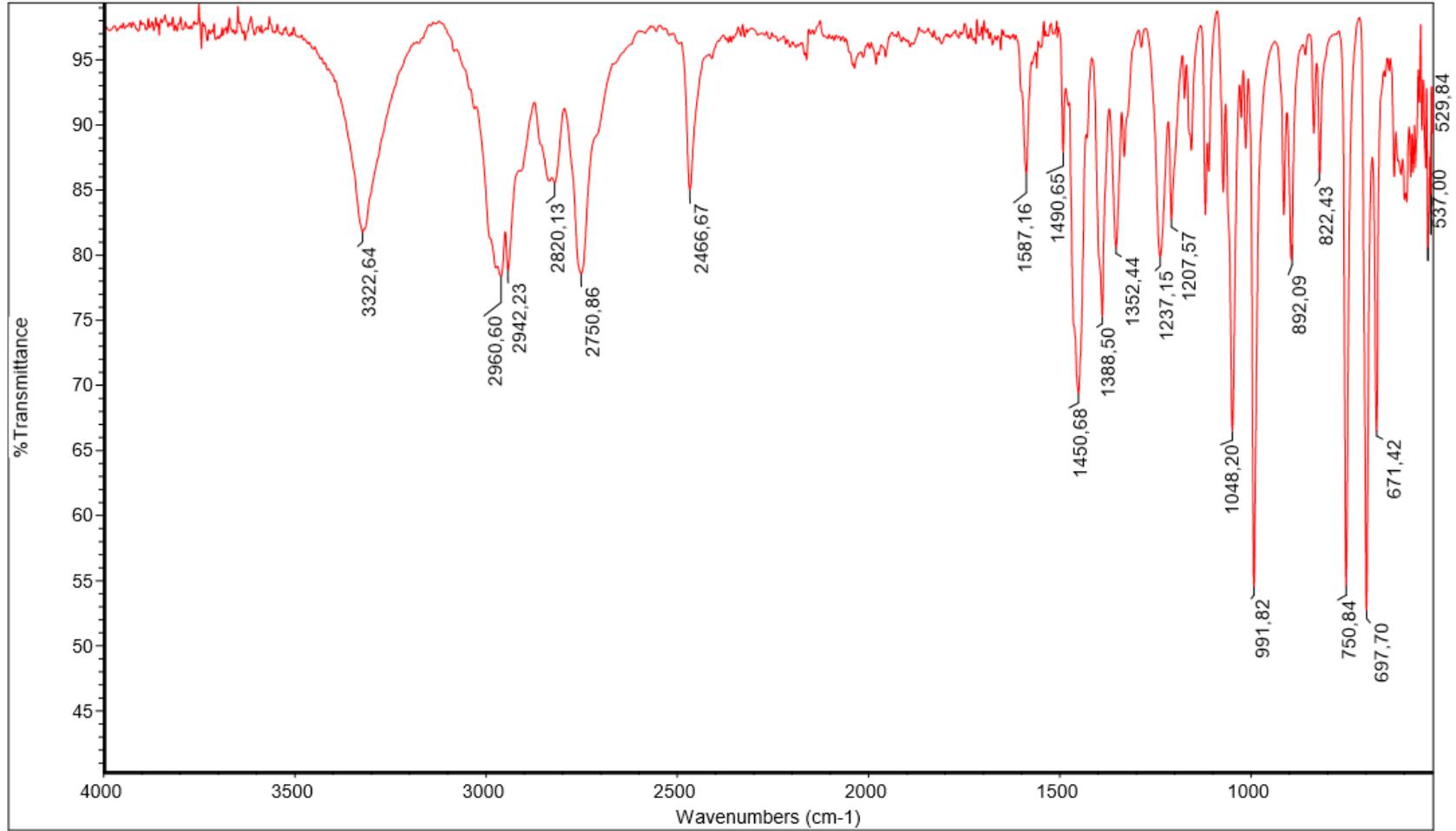
Banco de dados com espectros de absorção molecular na região do ultravioleta, espectros de massas de alta resolução em modo de varredura, espectros na região do infravermelho por transformada de Fourier e espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio e carbono 13.

Quadro 6 - Técnicas realizadas em cada matéria-prima.

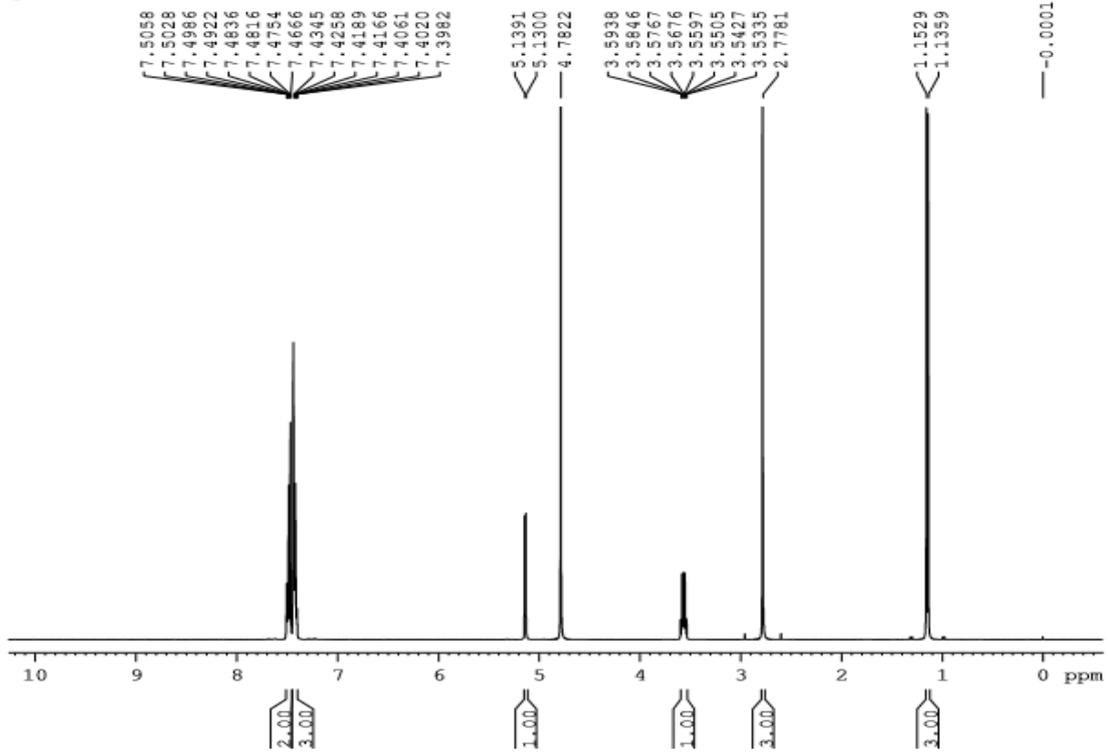
	Ultravioleta	Infravermelho	RMN	Massas
Efedrina	X	X	X	X
Sibutramina	X	X	X	X
Fenilefrina	X	X	X	X
Anfepramona	X	X	X	X
Fenfluramina	X		X	X
Femproporex	X	X	X	X
Terbutalina	X	X	X	X
Clembuterol	X	X	X	X
Sinefrina		X	X	X
Mazindol	X	X	X	X
Salbutamol	X	X	X	X
Fenilpropanolamina	X	X	X	X
Metanfetamina	X	X	X	X
Epigalocatequina-3- <i>galato</i>		X	X	
Rimonabanto	X		X	X
Clortalidona	X	X		X
Hidroclorotiazida	X	X	X	X
Furosemida	X	X		X
Cafeína	X	X		X

ESTIMULANTES-Ultravioleta - UV da Efedrina

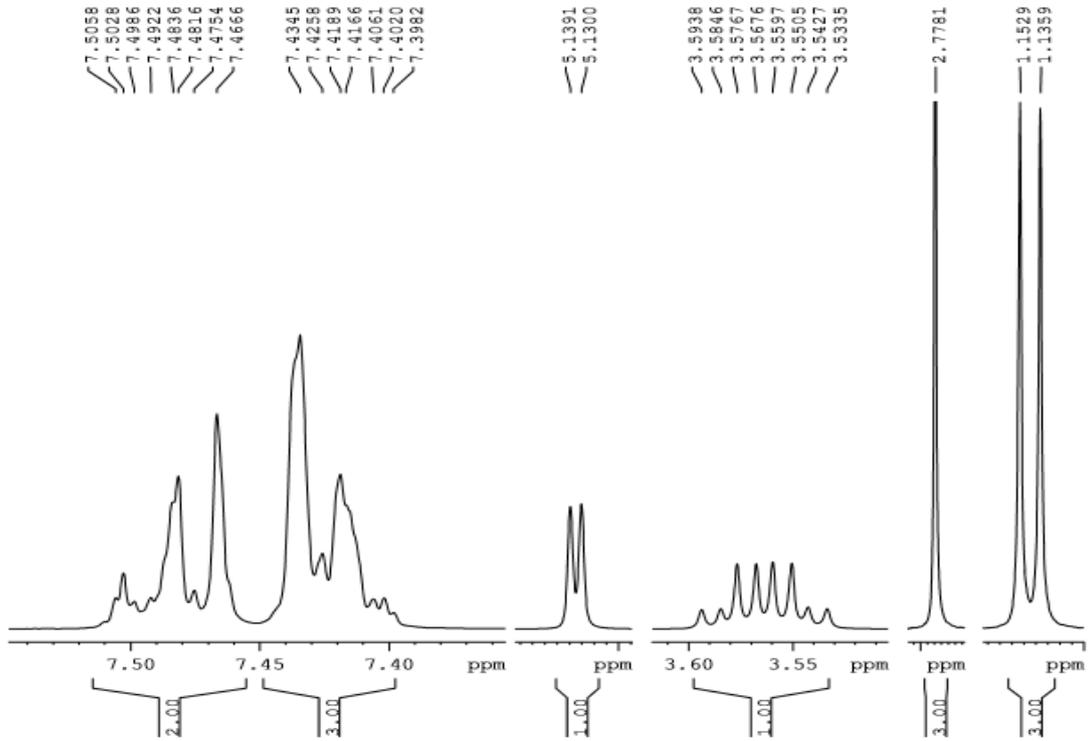
ESTIMULANTES - Espectro de Infravermelho da Efedrina



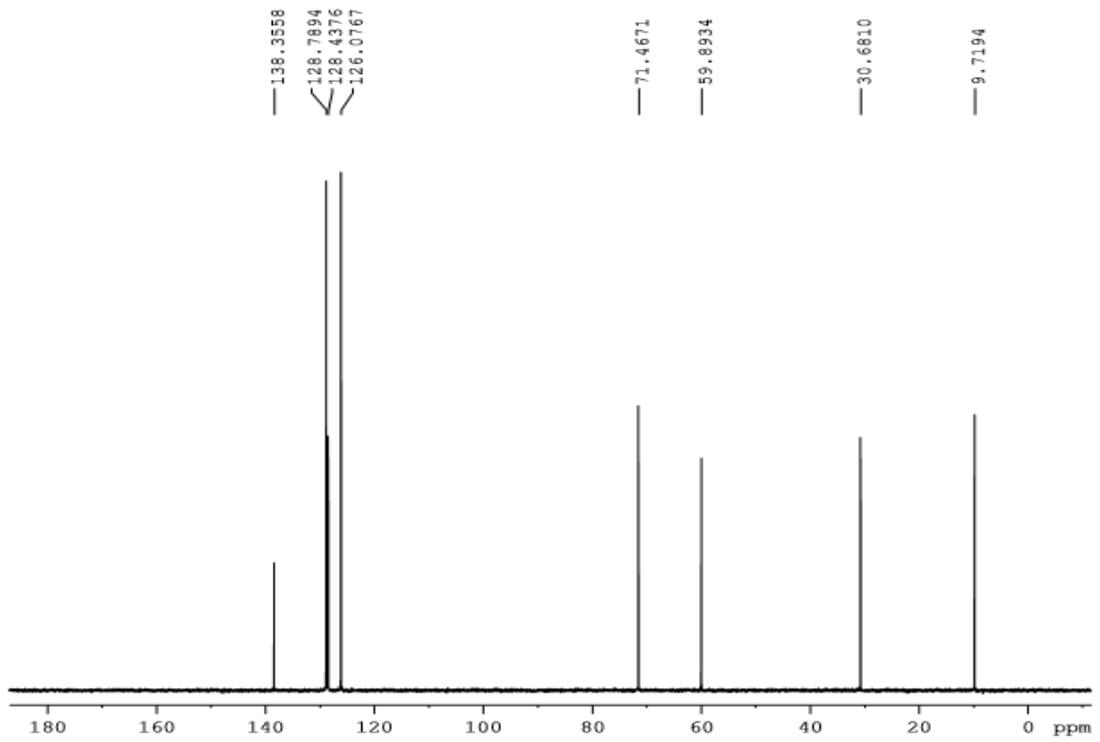
ESTIMULANTES - Espectro de RMN ¹H da Efedrina



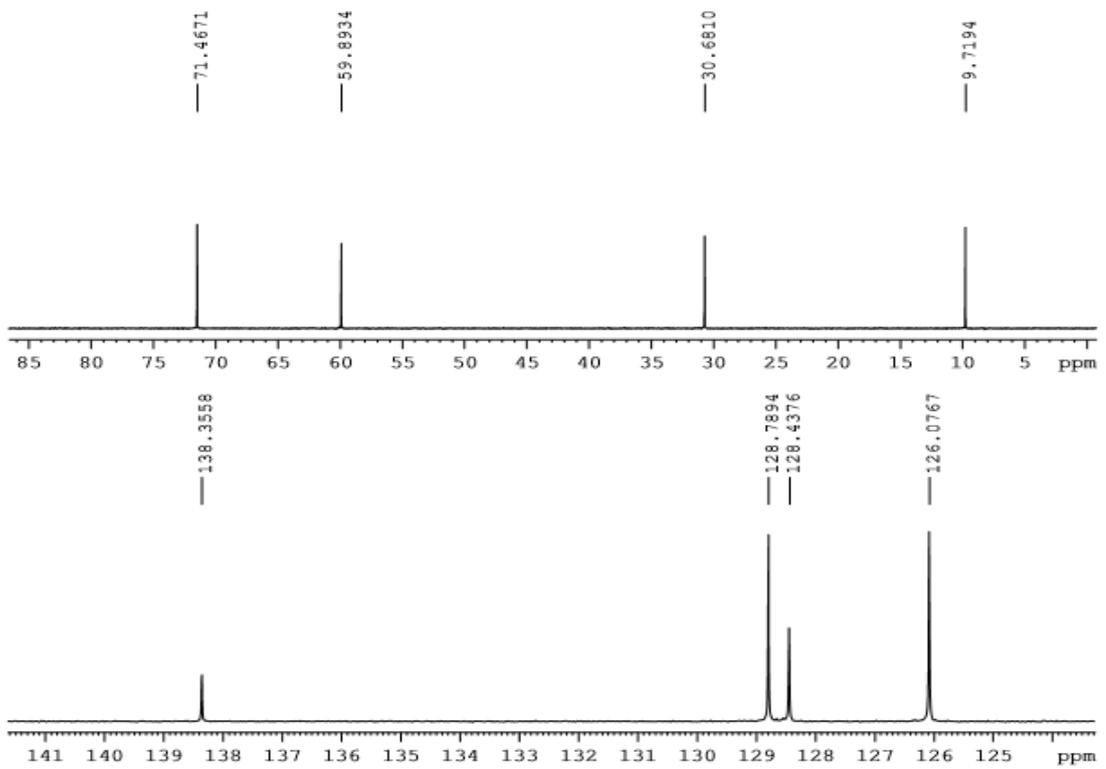
ESTIMULANTES - Espectro de RMN ¹H da Efedrina



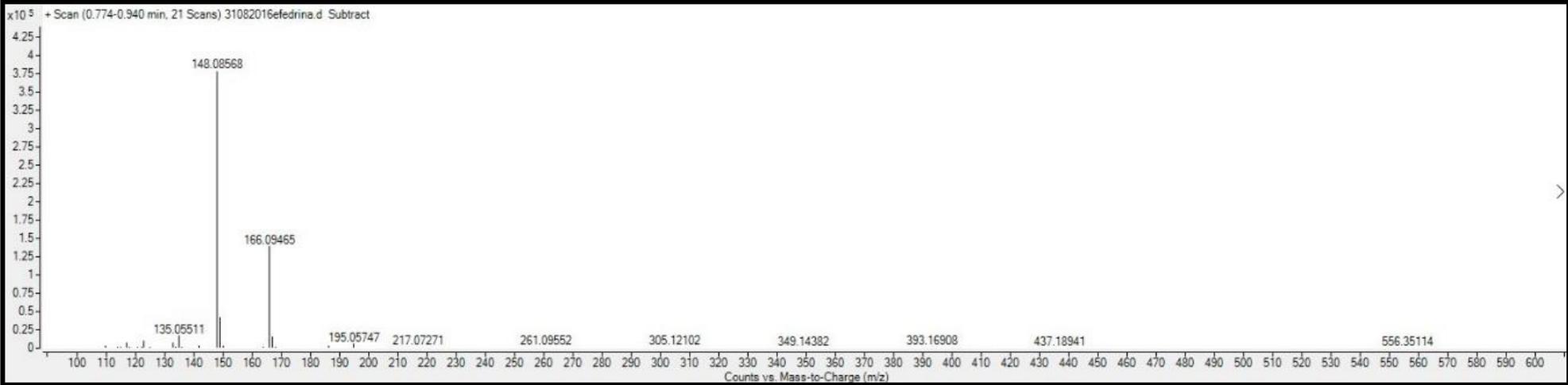
ESTIMULANTES - Espectro de RMN ^{13}C da Efedrina



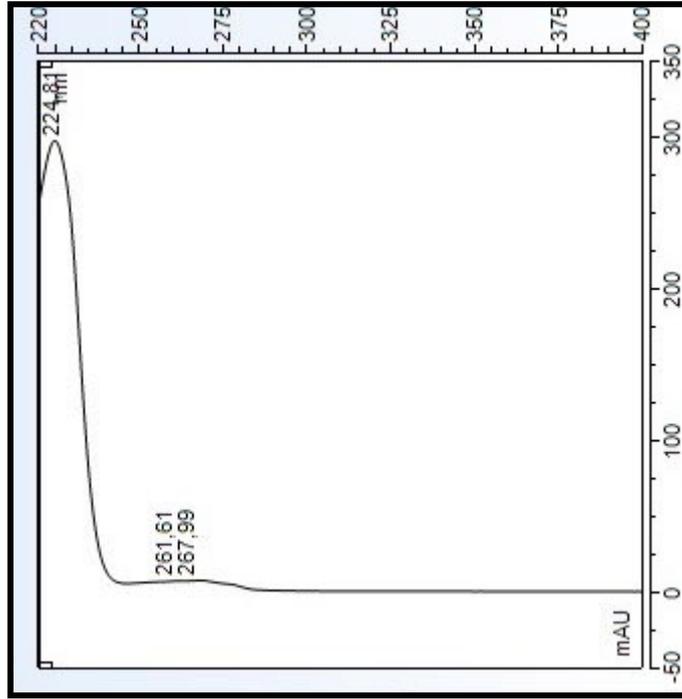
ESTIMULANTES - Espectro de RMN ^{13}Ca da Efedrina



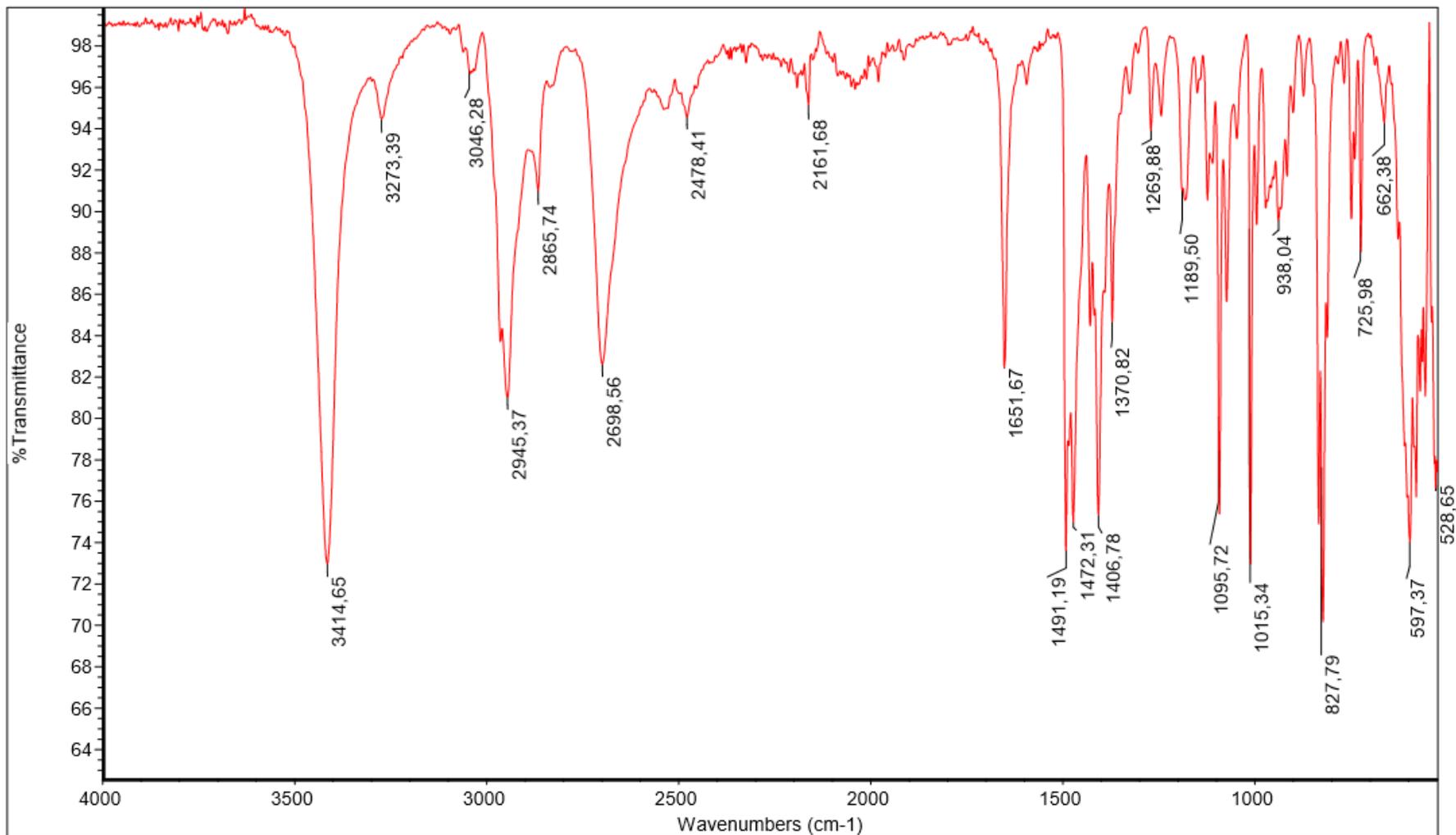
ESTIMULANTES - Espectro de massas da Efedrina



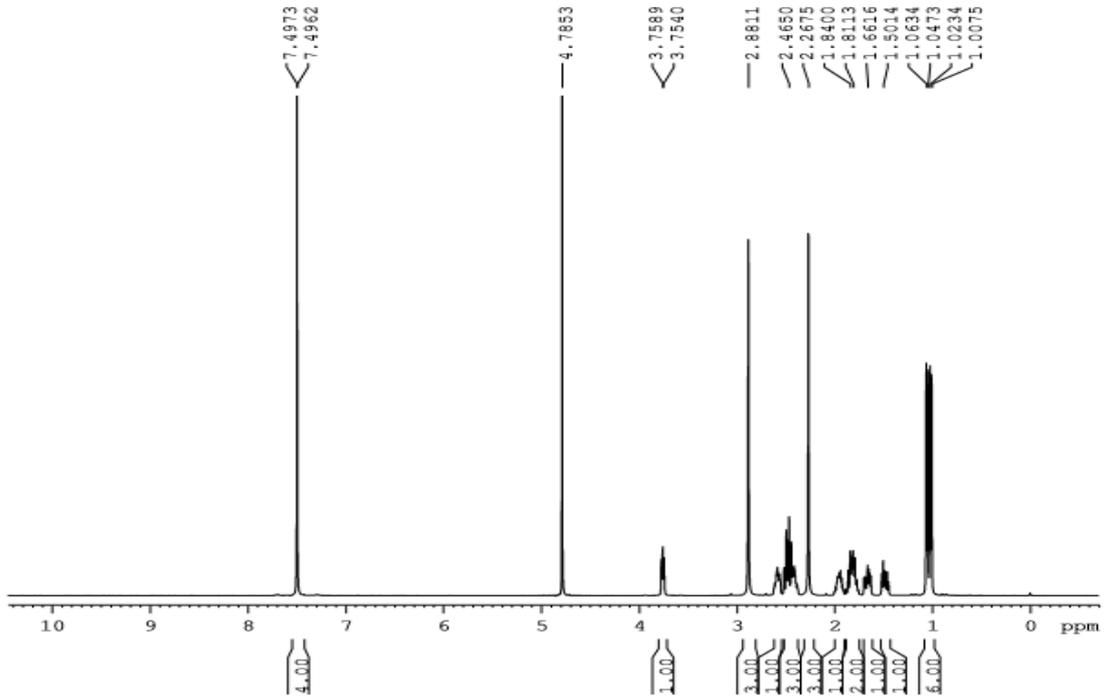
ANOREXÍGENOS - UV da Sibutramina



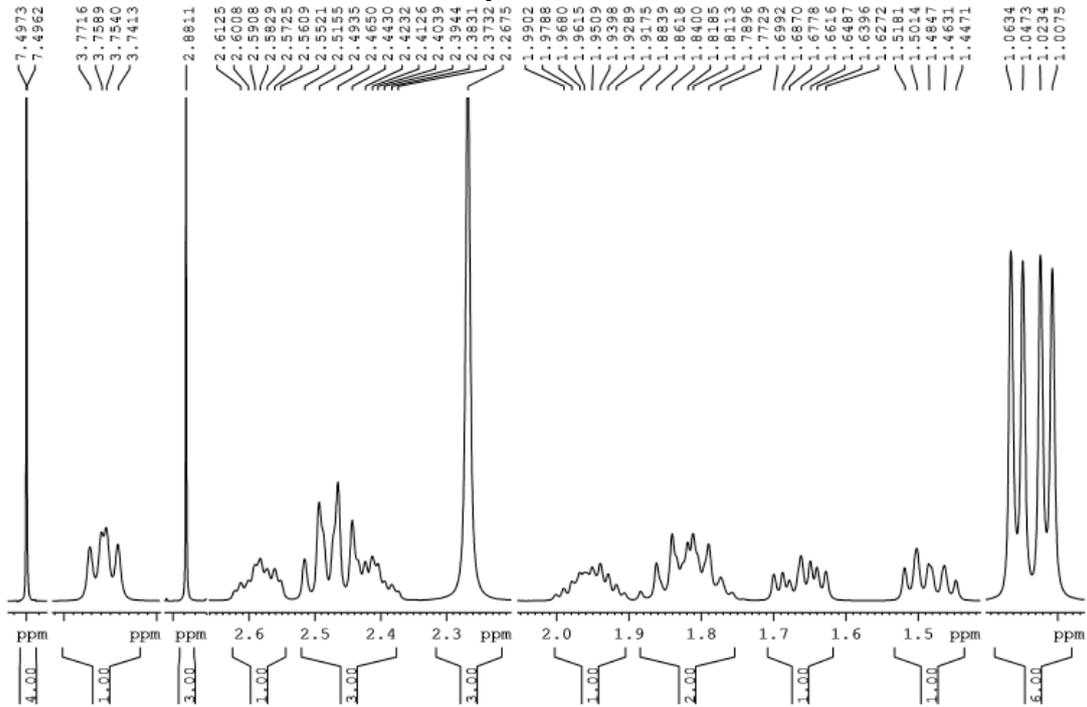
ANOREXÍGENOS - Espectro de Infravermelho da sibutramina



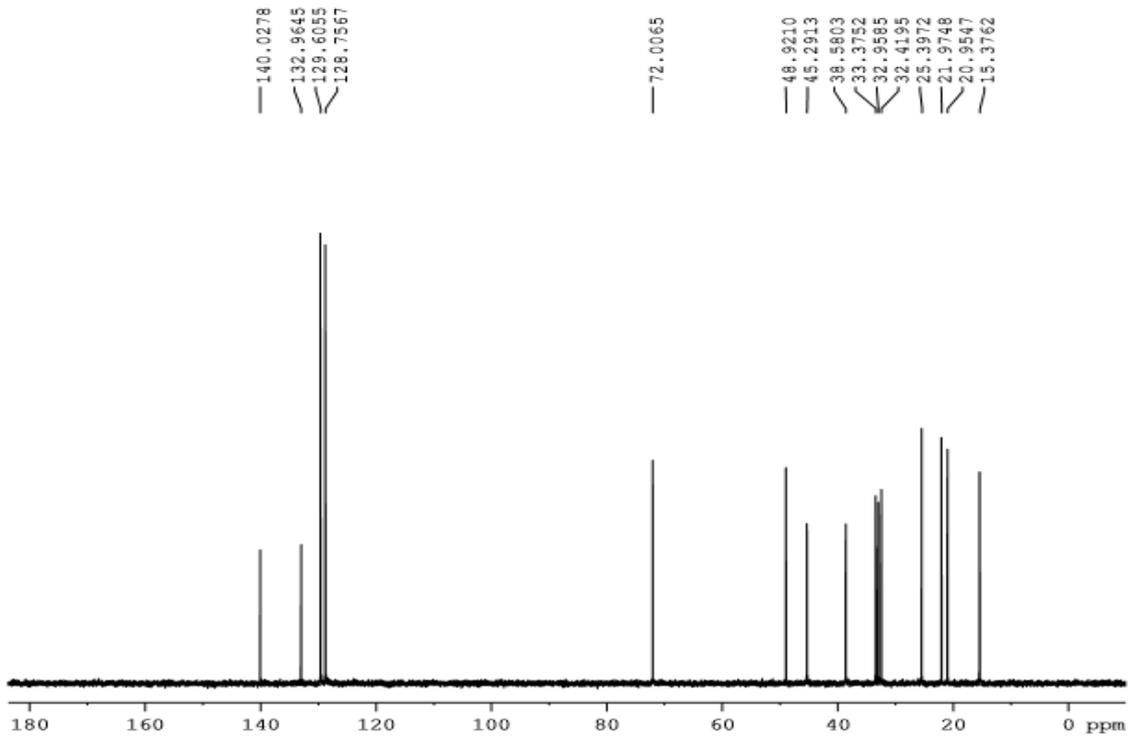
ANOREXÍGENOS - Espectro de RMN ¹H da Sibutramina



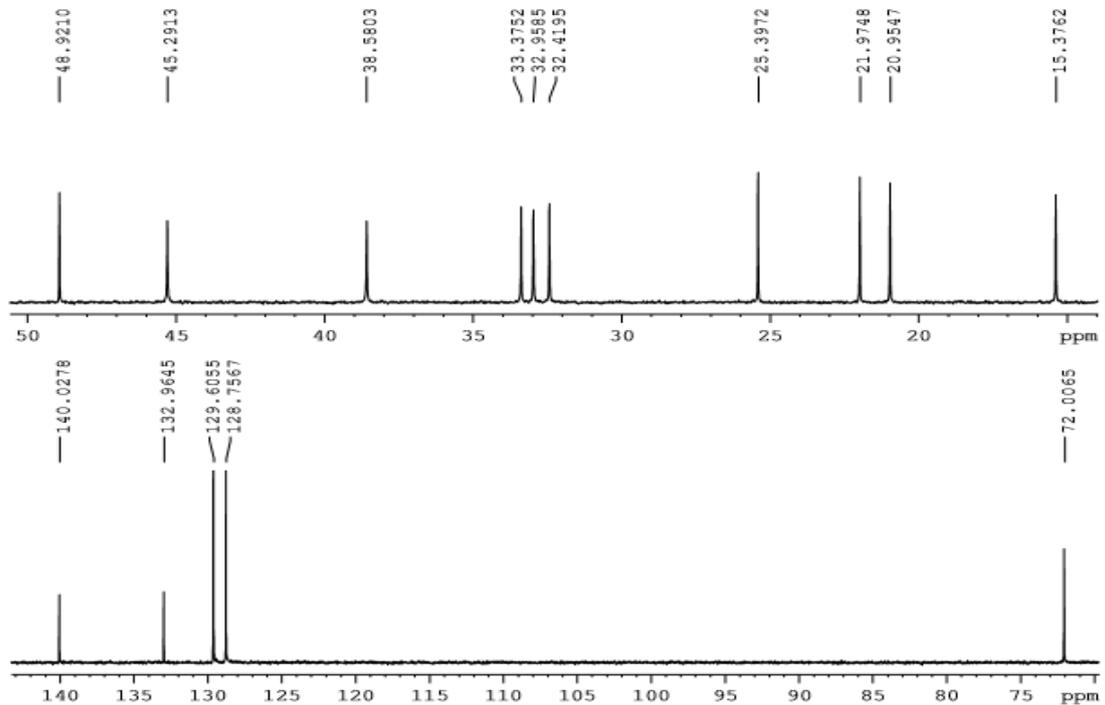
ANOREXÍGENOS - Espectro de RMN ¹H da Sibutramina



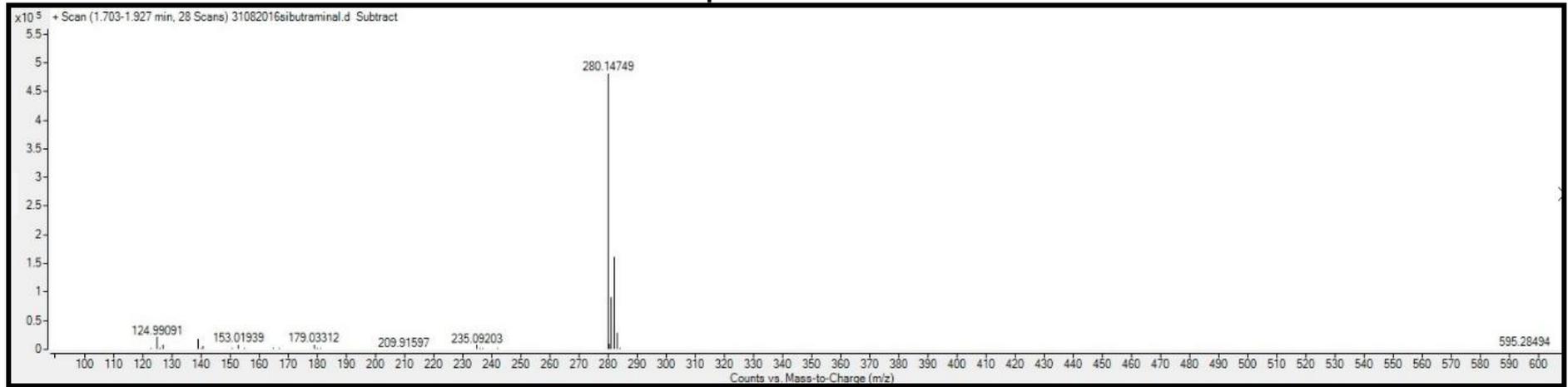
ANOREXÍGENOS - Espectro de RMN ^{13}C da Sibutramina

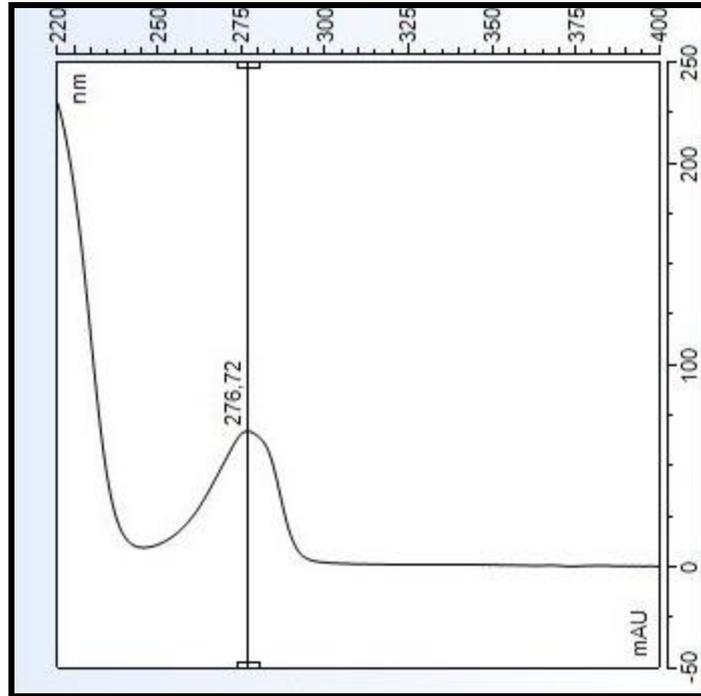


ANOREXÍGENOS - Espectro de RMN ^{13}Ca da Sibutramina

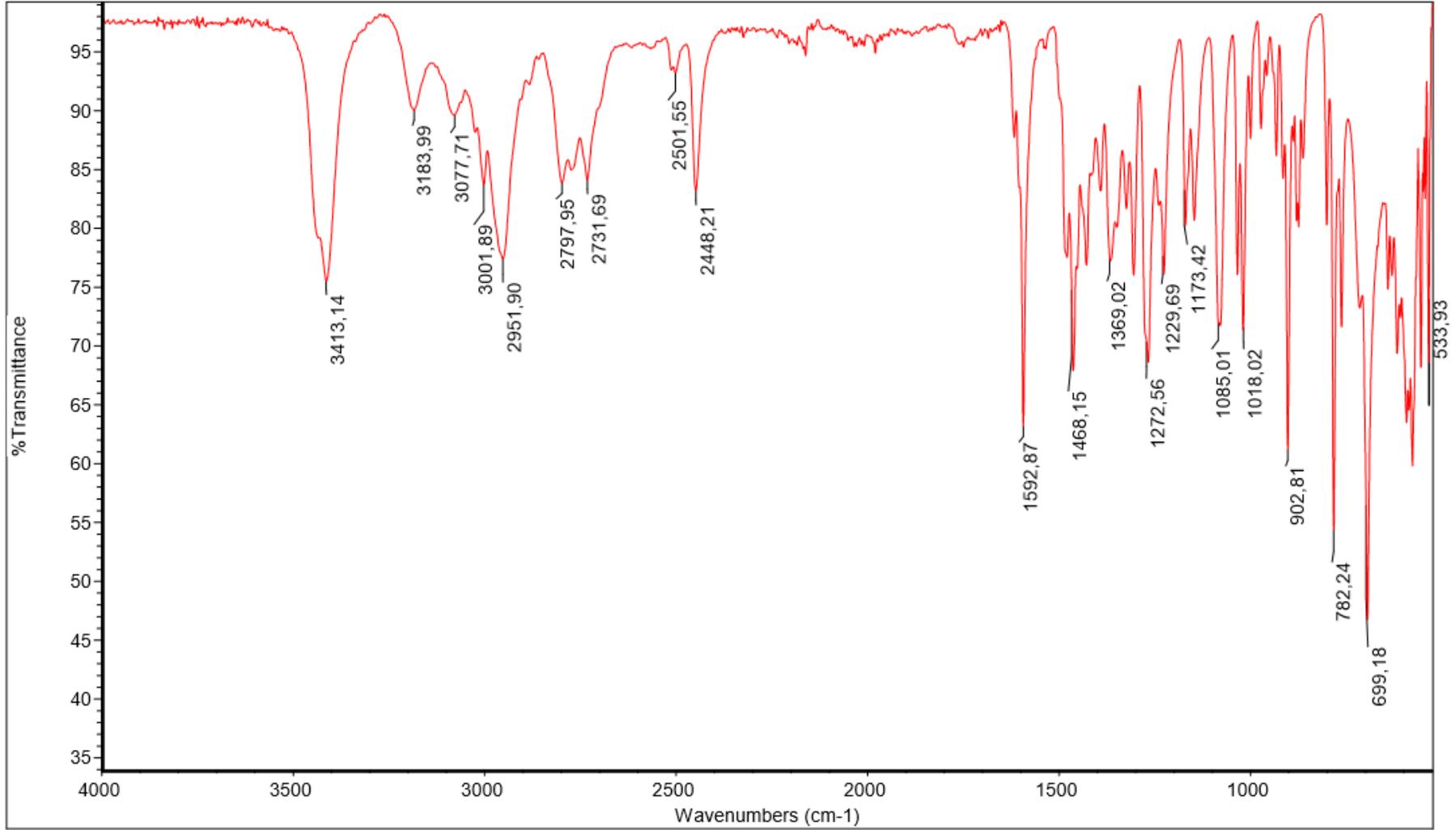


ANOREXÍGENOS - Espectro de massas da Sibutramina

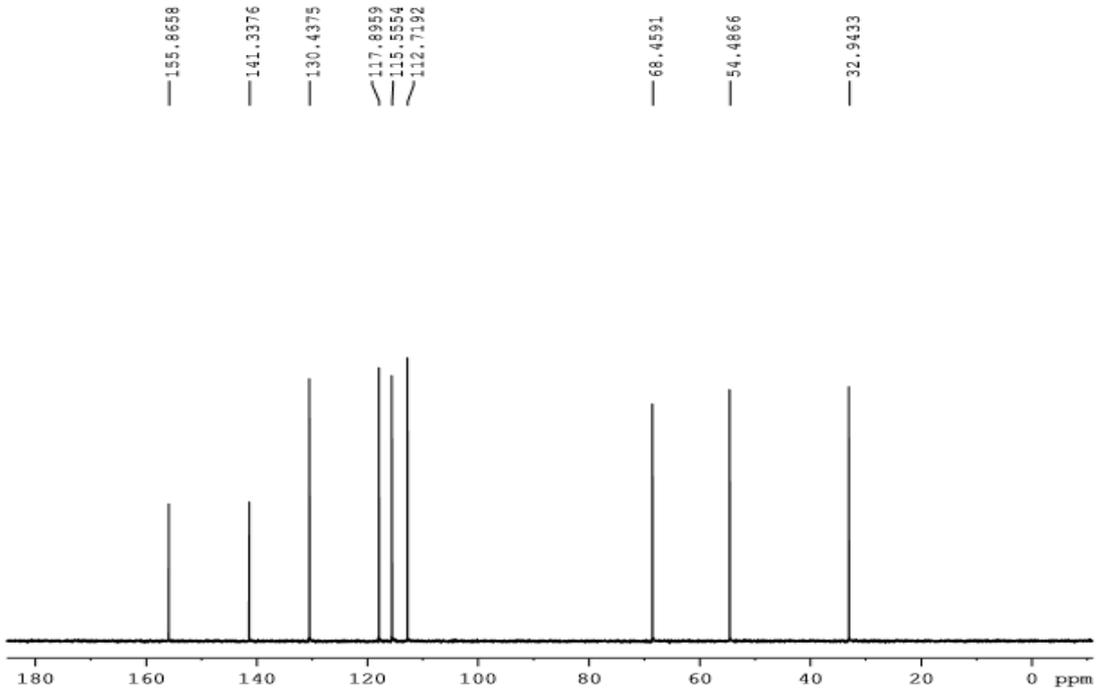


ESTIMULANTES - UV da Fenilefrina

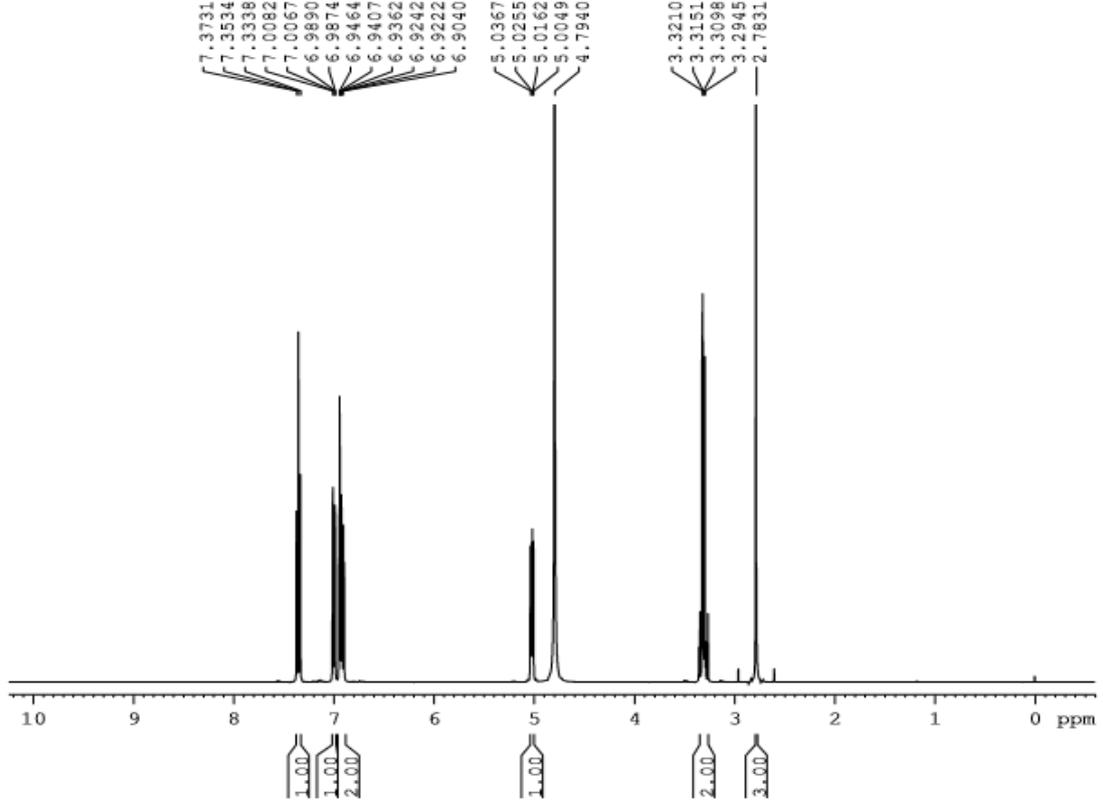
ESTIMULANTES - Espectro de Infravermelho da fenilefrina

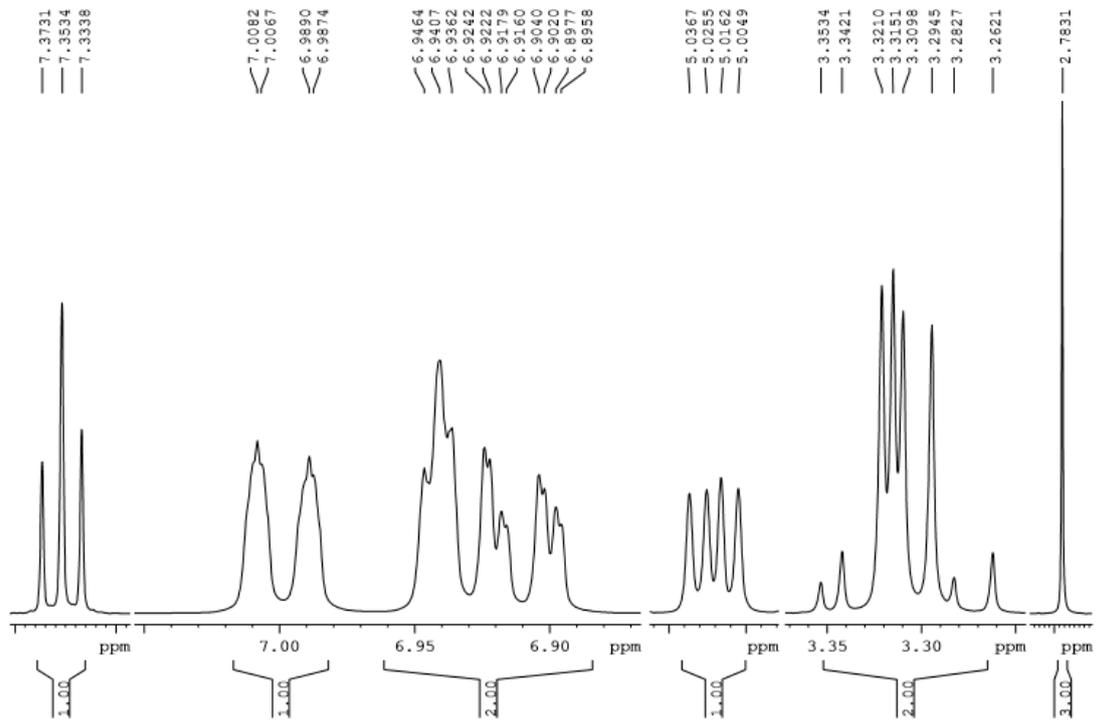


ESTIMULANTES - Espectro de RMN ¹³C da Fenilefrina

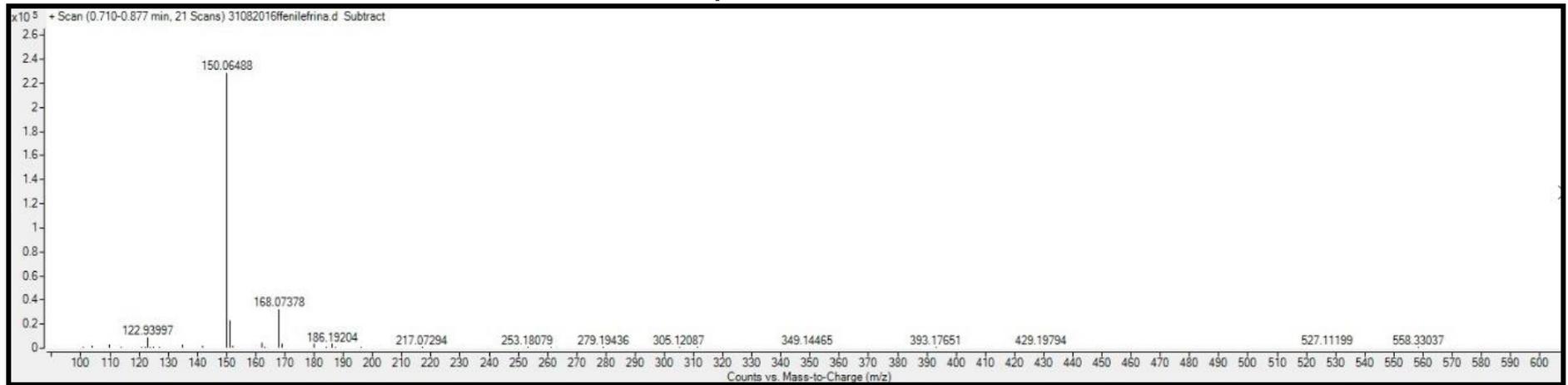


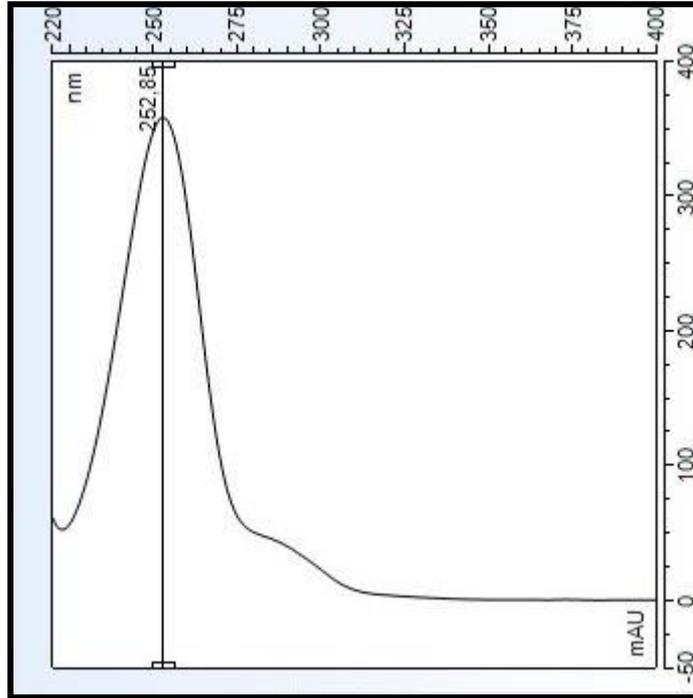
ESTIMULANTES - Espectro de RMN ¹H da Fenilefrina



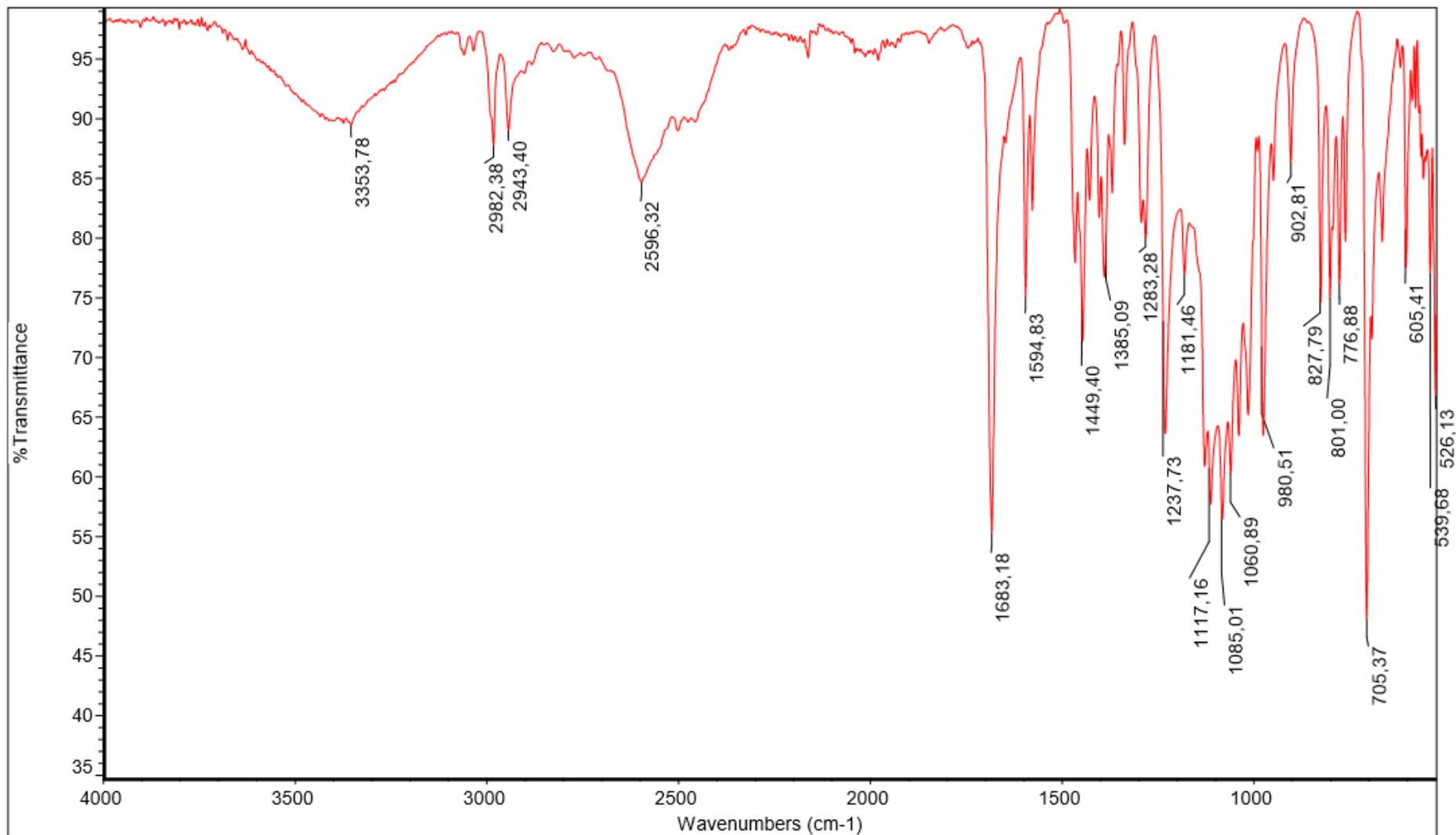
ESTIMULANTES - Espectro de RMN ^1H da Fenilefrina

ESTIMULANTES - Espectro de massas da fenilefrina

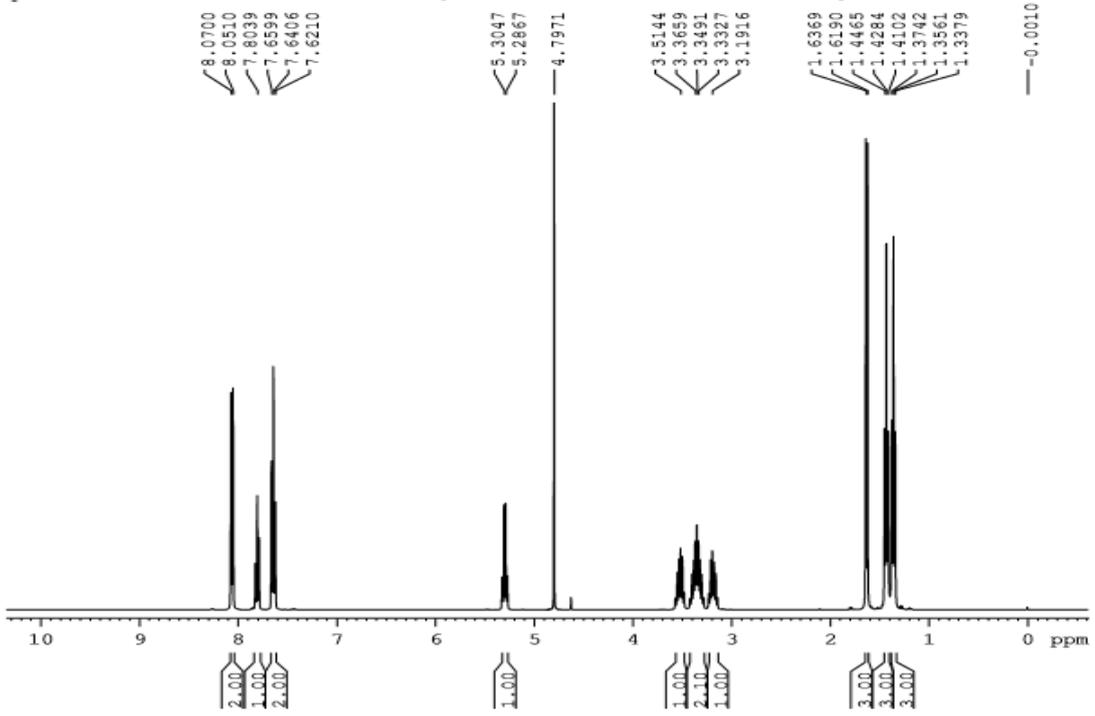


ANOREXÍGENOS - Ultravioleta - UV da Anfepromona

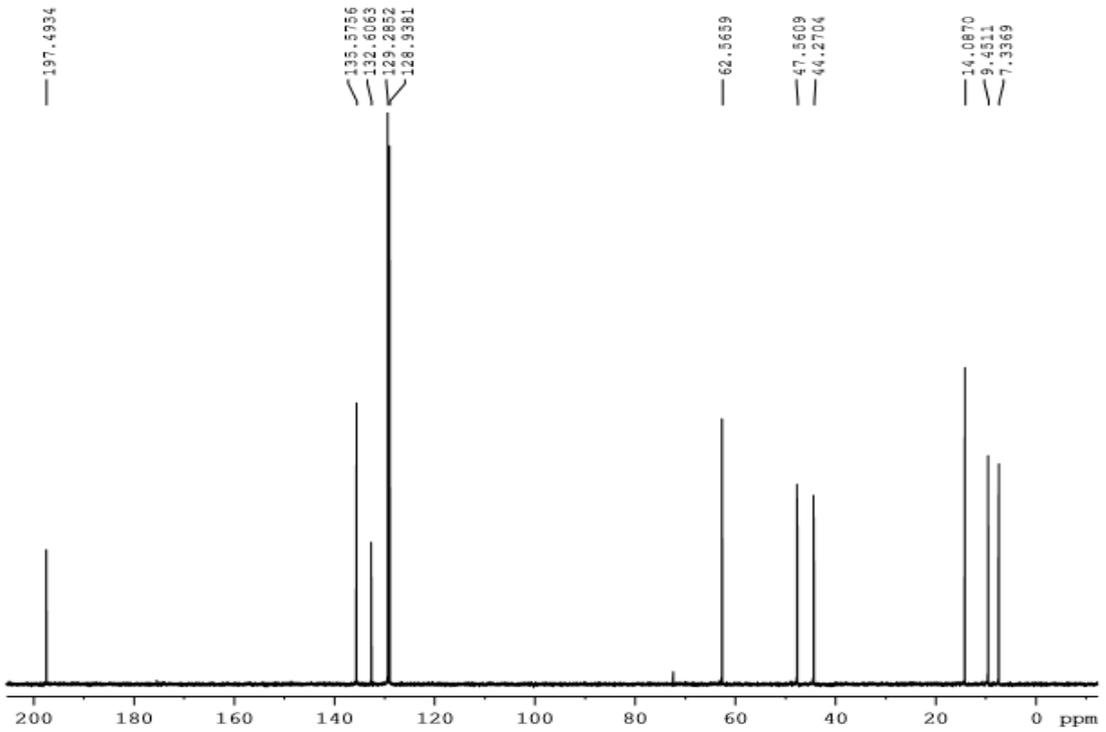
ANOREXÍGENOS - Espectro de Infravermelho da Anfepramona

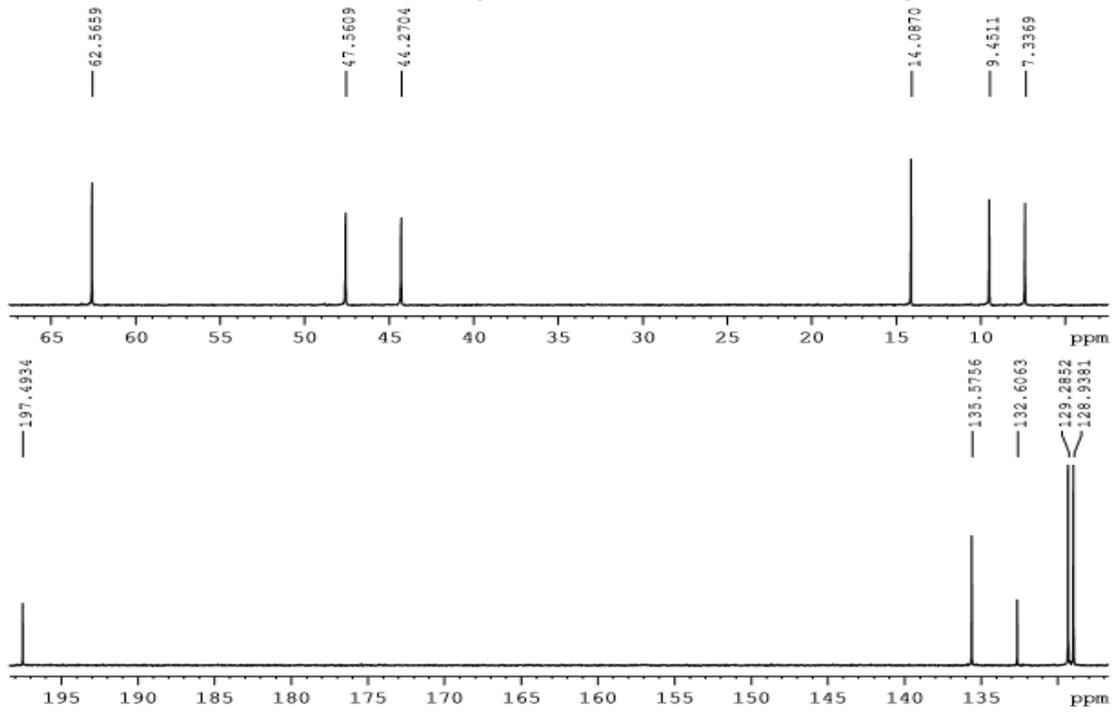


ANOREXÍGENOS - Espectro de RMN ¹H da Anfepramona

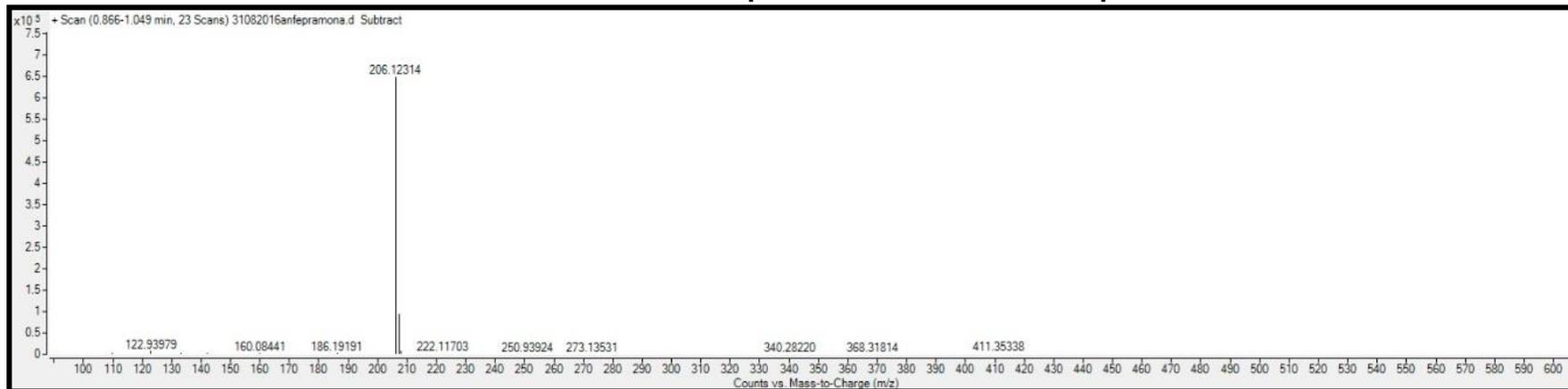


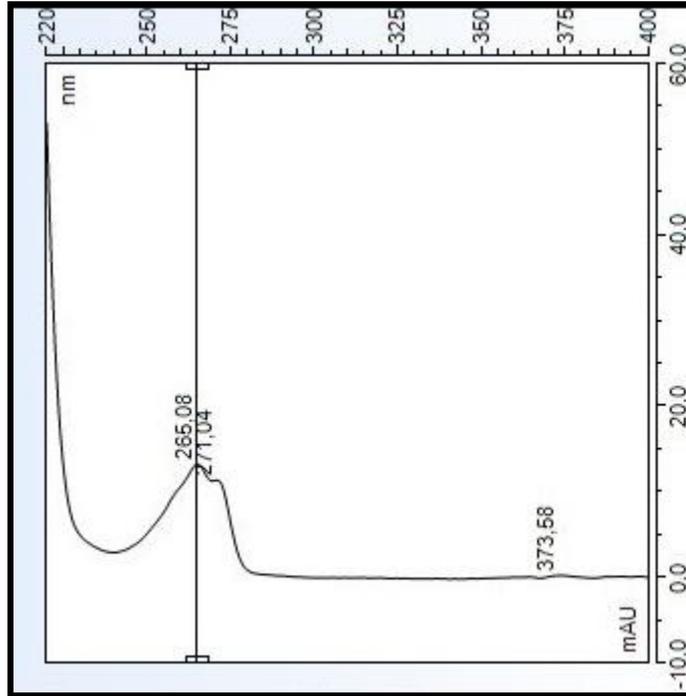
ANOREXÍGENOS - Espectro de RMN ¹³C da Anfepramona.



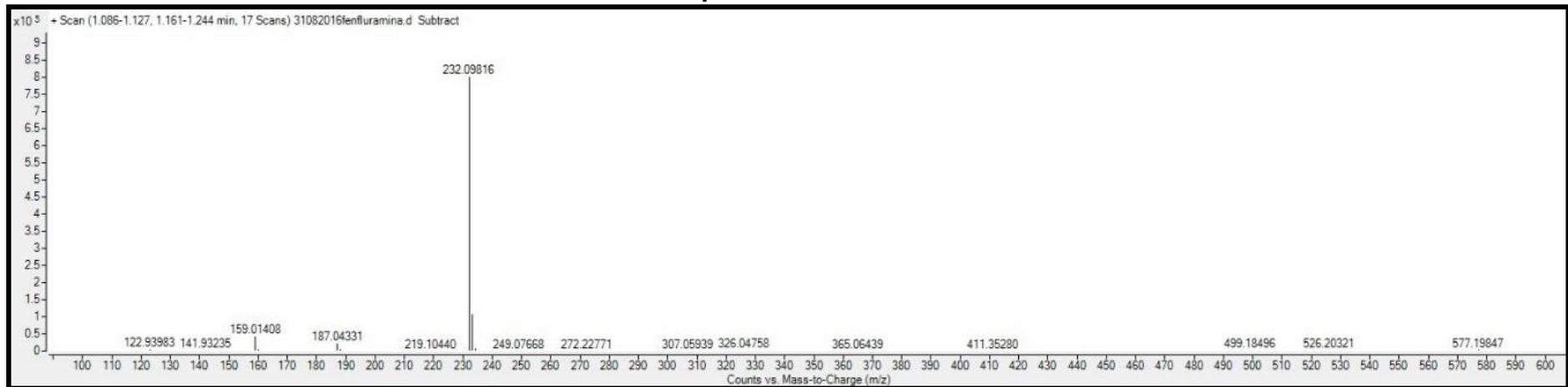
ANOREXÍGENOS - Espectro de RMN ^{13}C da Anfepramona

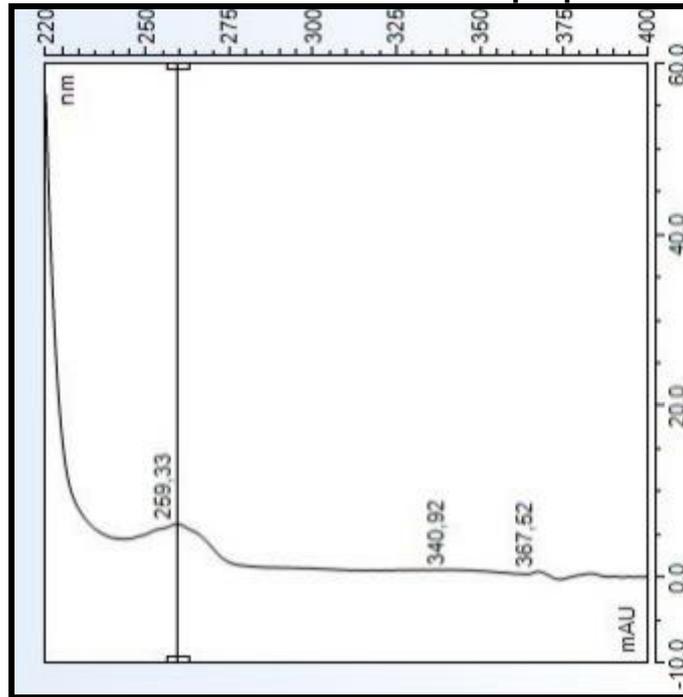
ANOREXÍGENOS - Espectro de massas da Anfepramona



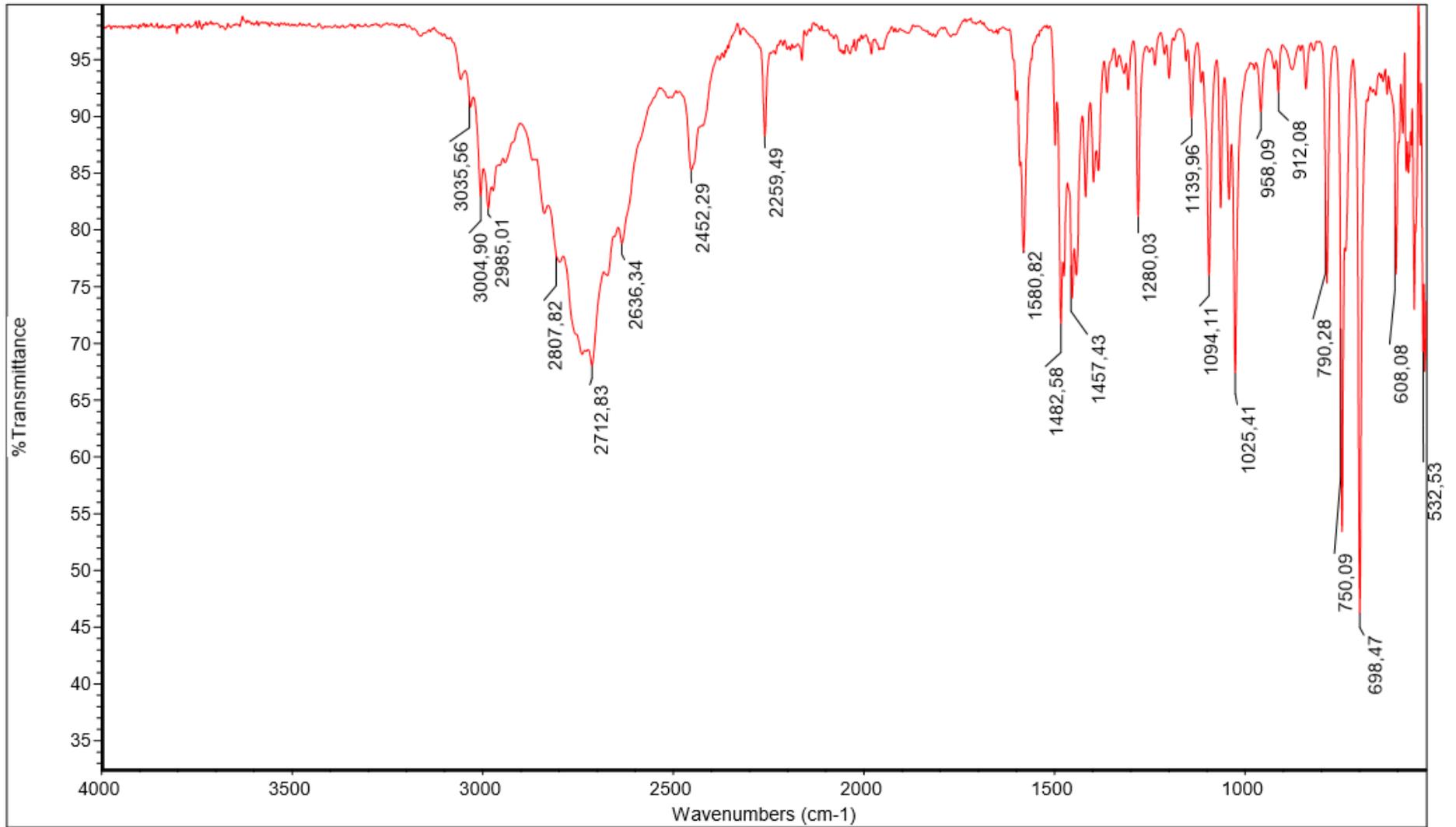
ANOREXÍGENOS - Ultravioleta - UV da Fenfluramina

ANOREXÍGENOS - Espectro de massas da Fenfluramina

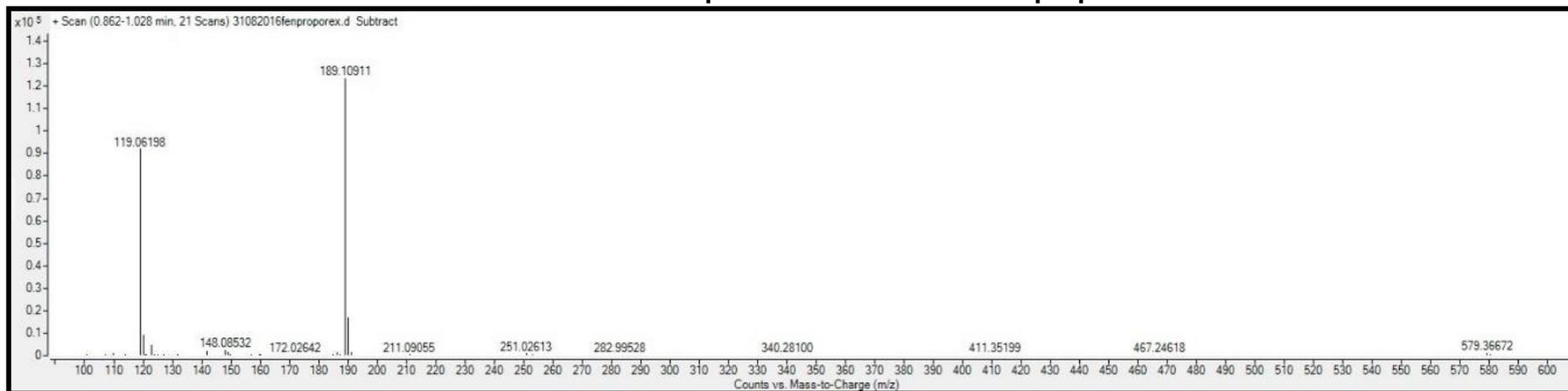


ANOREXÍGENOS - UV do Femproporex

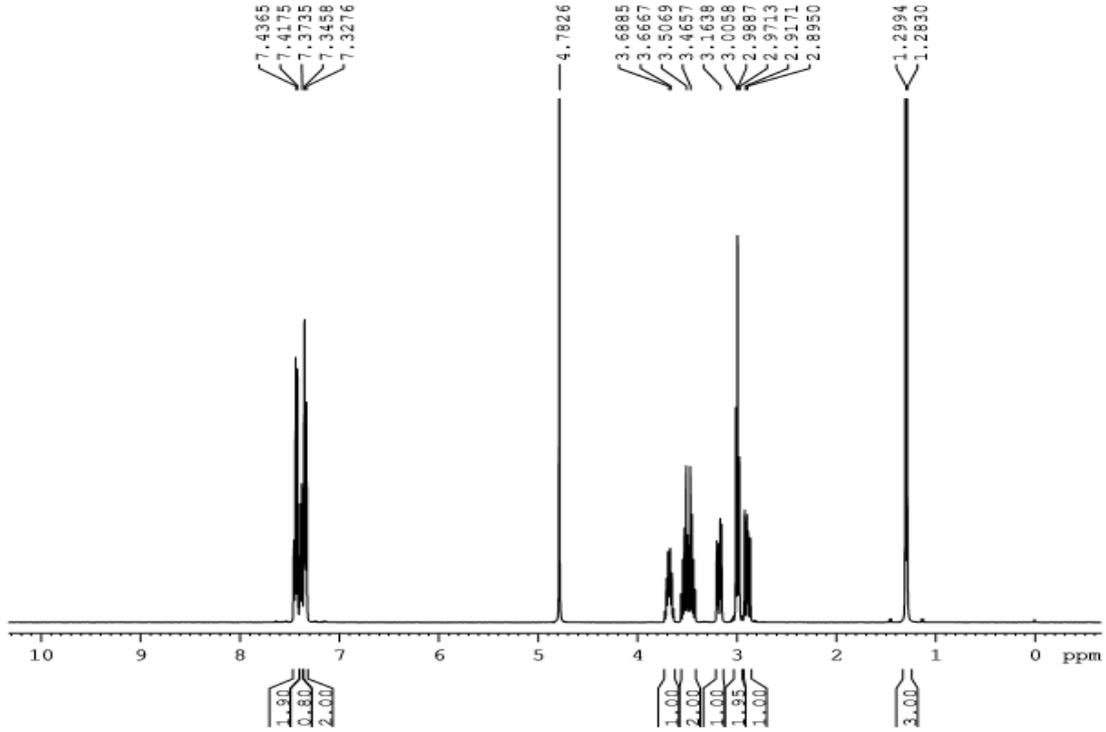
ANOREXÍGENOS - Espectro de Infravermelho do Femproporex



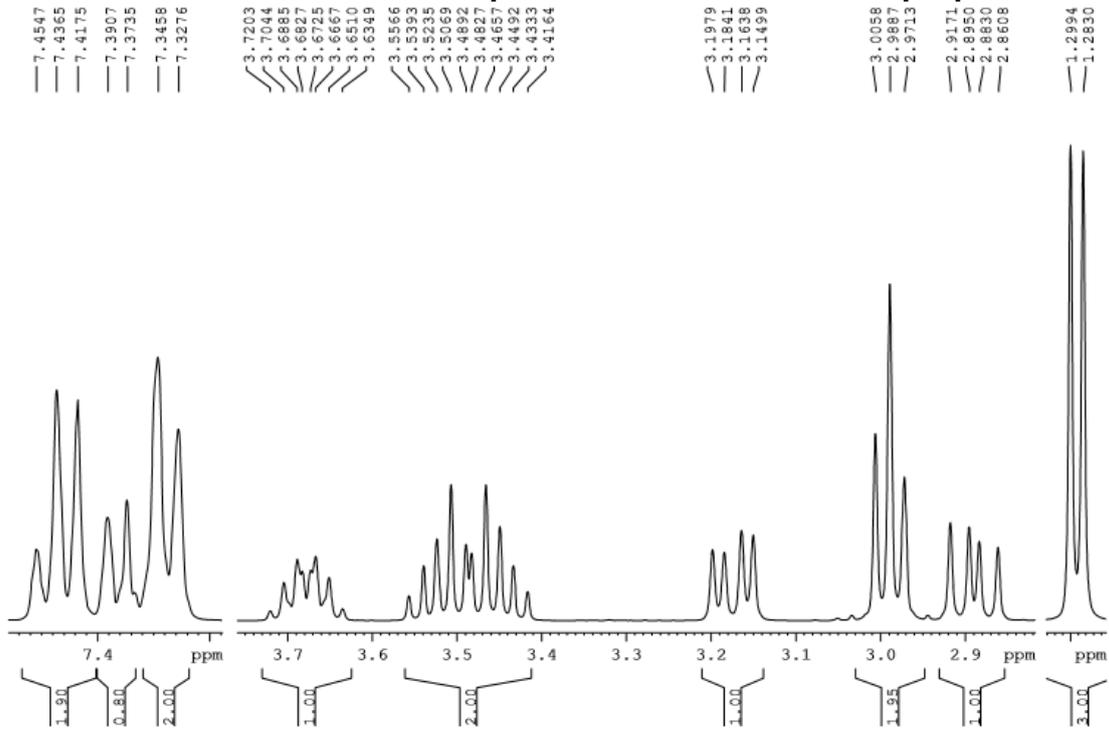
ANOREXÍGENOS - Espectro de massas do Femproporex



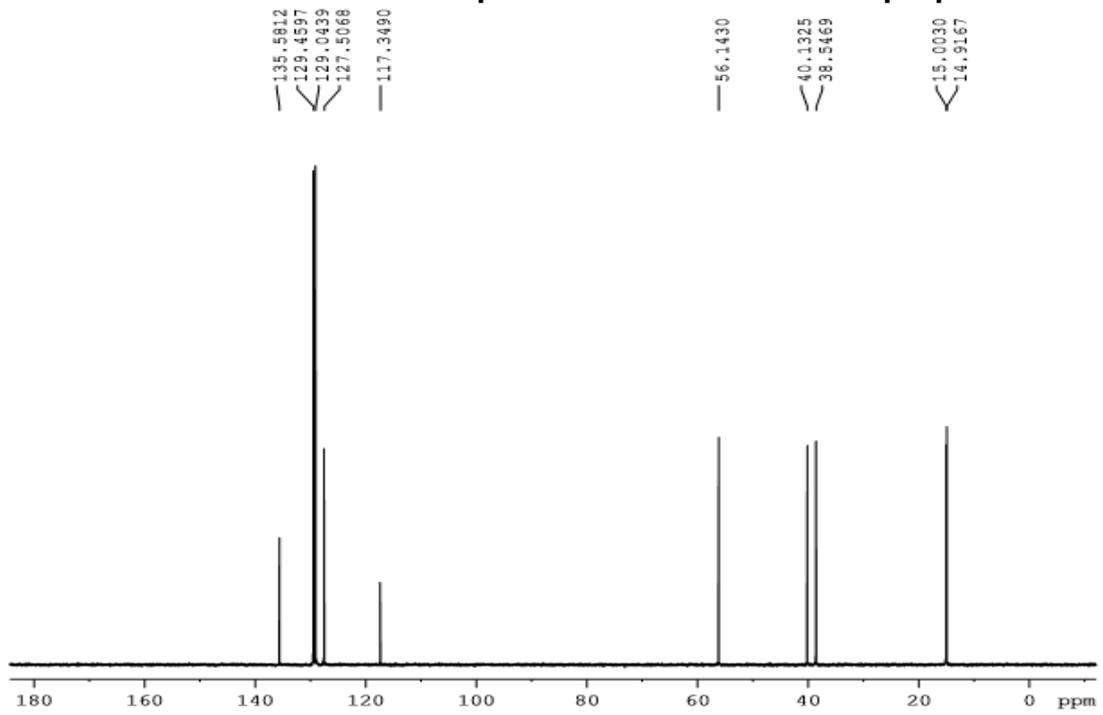
ANOREXÍGENOS - Espectro de RMN ¹H do Femproporex



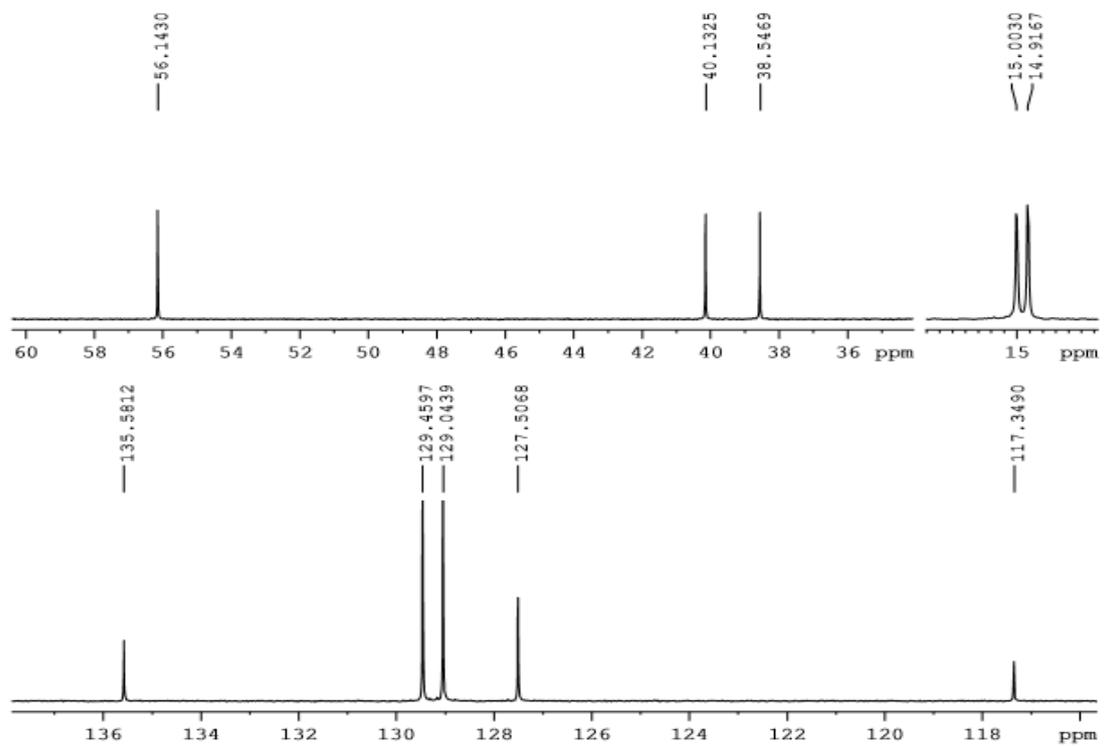
ANOREXÍGENOS - Espectro de RMN ¹Ha do Femproporex

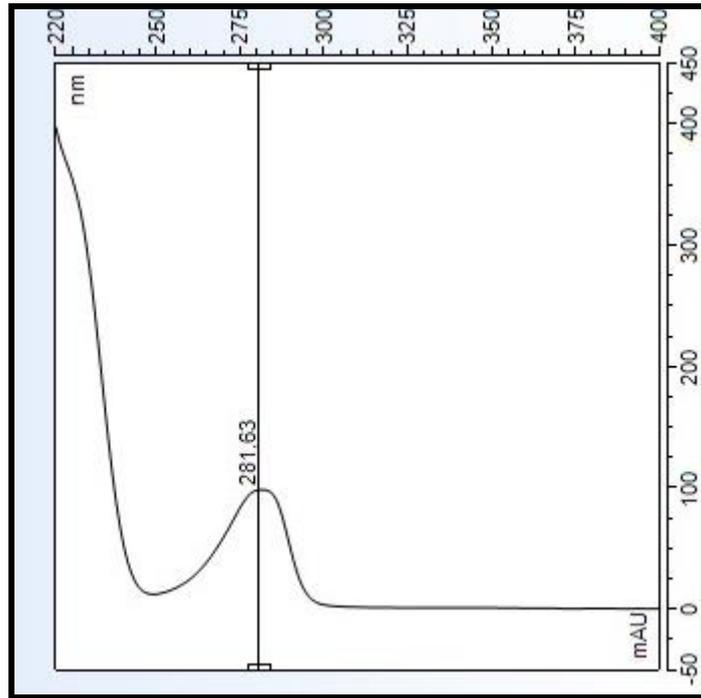


ANOREXÍGENOS - Espectro de RMN ^{13}C do Femproporex

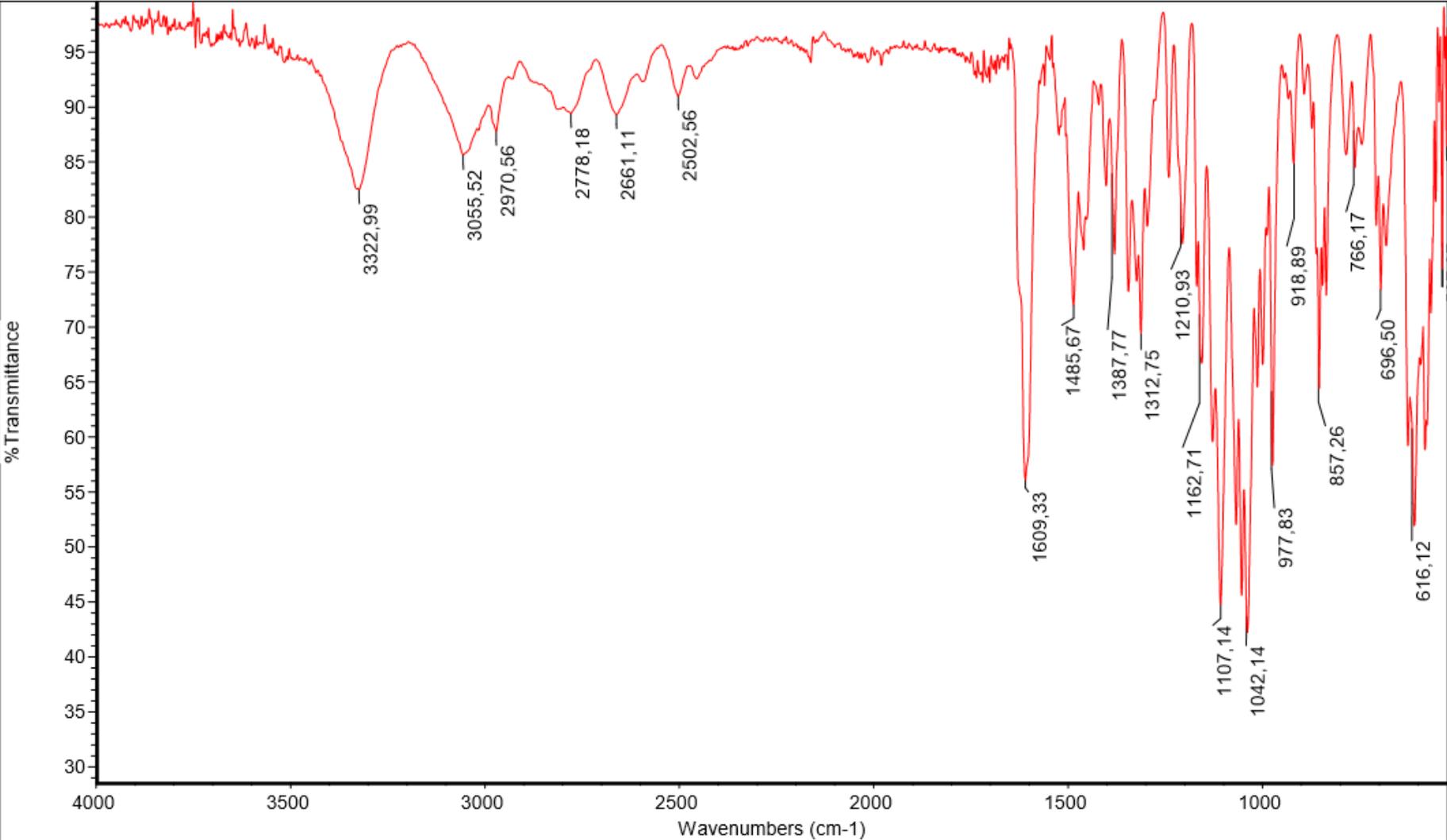


ANOREXÍGENOS - Espectro de RMN ^{13}Ca do Femproporex

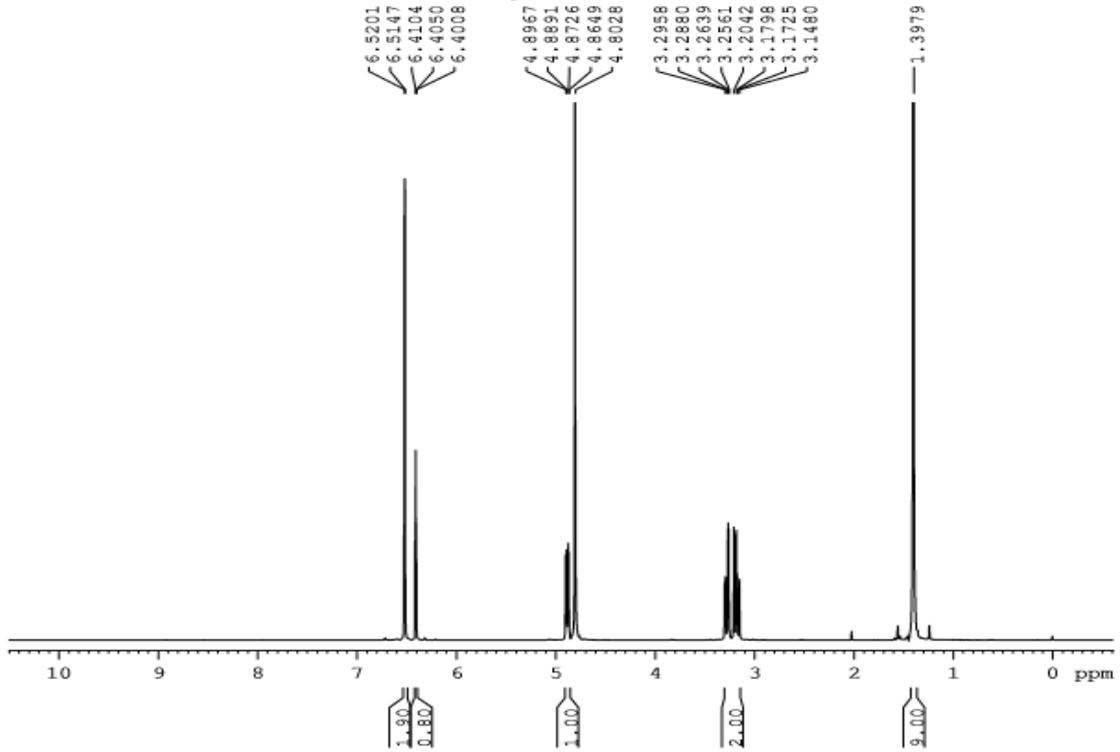


ESTIMULANTES - UV da Terbutalina

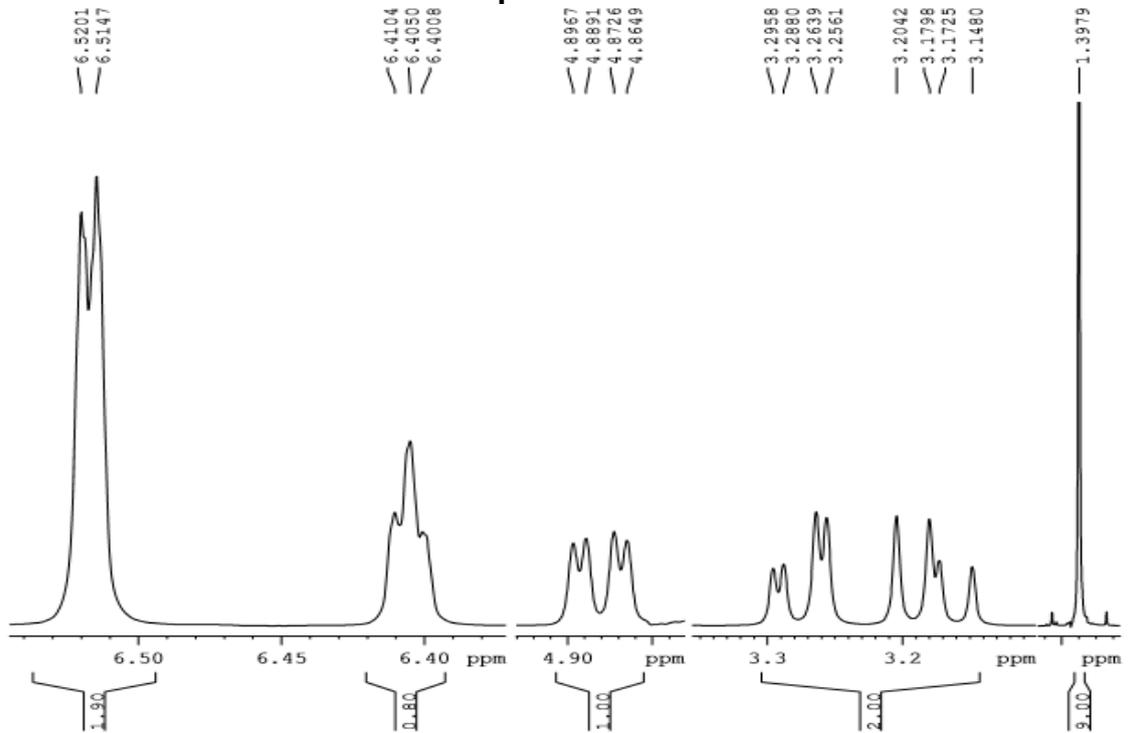
ESTIMULANTES - Espectro de Infravermelho da Terbutalina

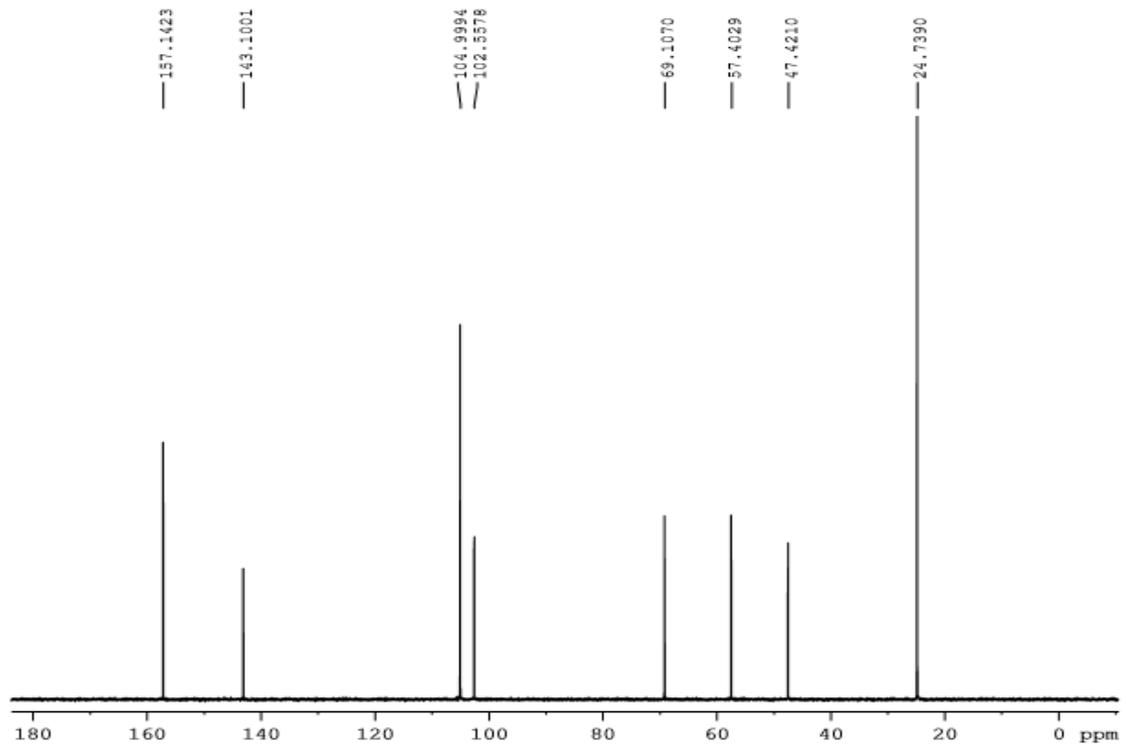


ESTIMULANTES - Espectro de RMN ¹H da Terbutalina

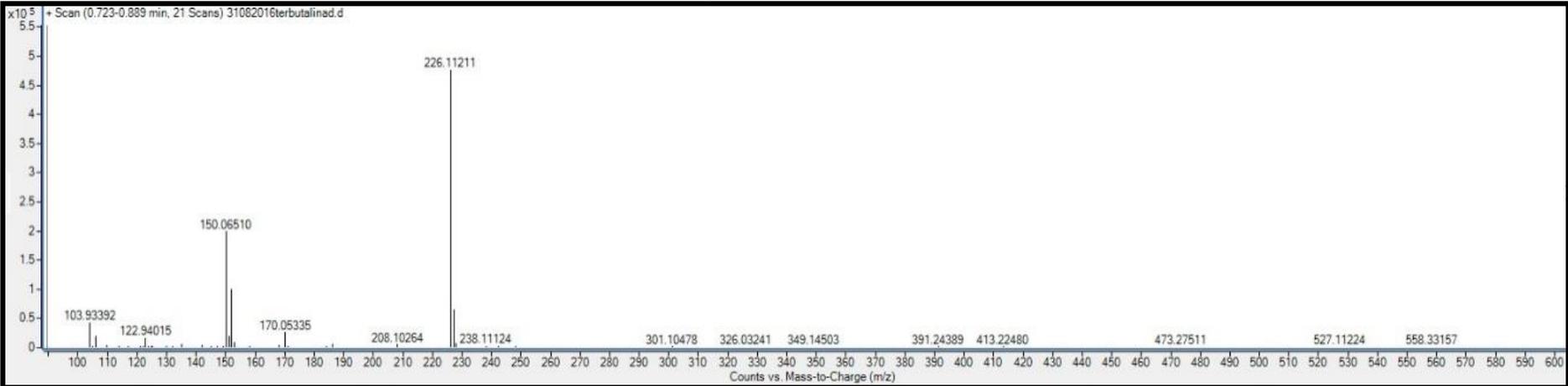


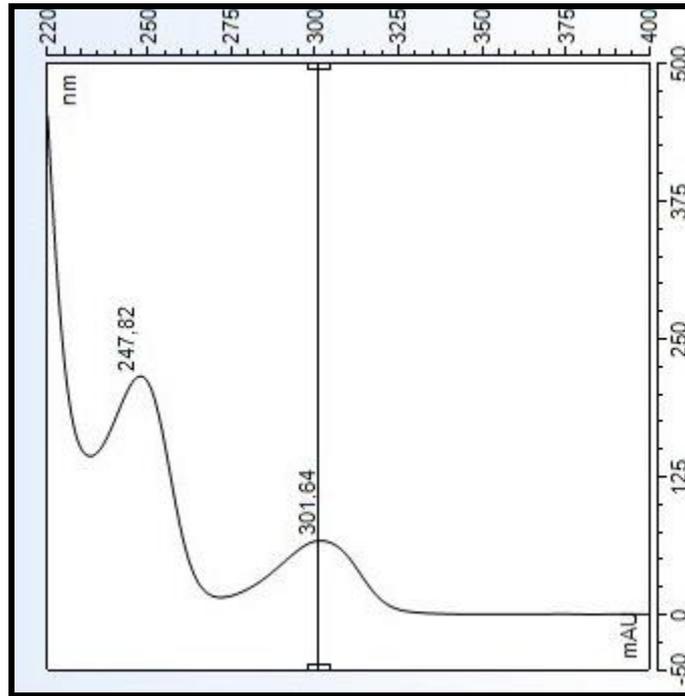
ESTIMULANTES - Espectro de RMN ¹H da Terbutalina



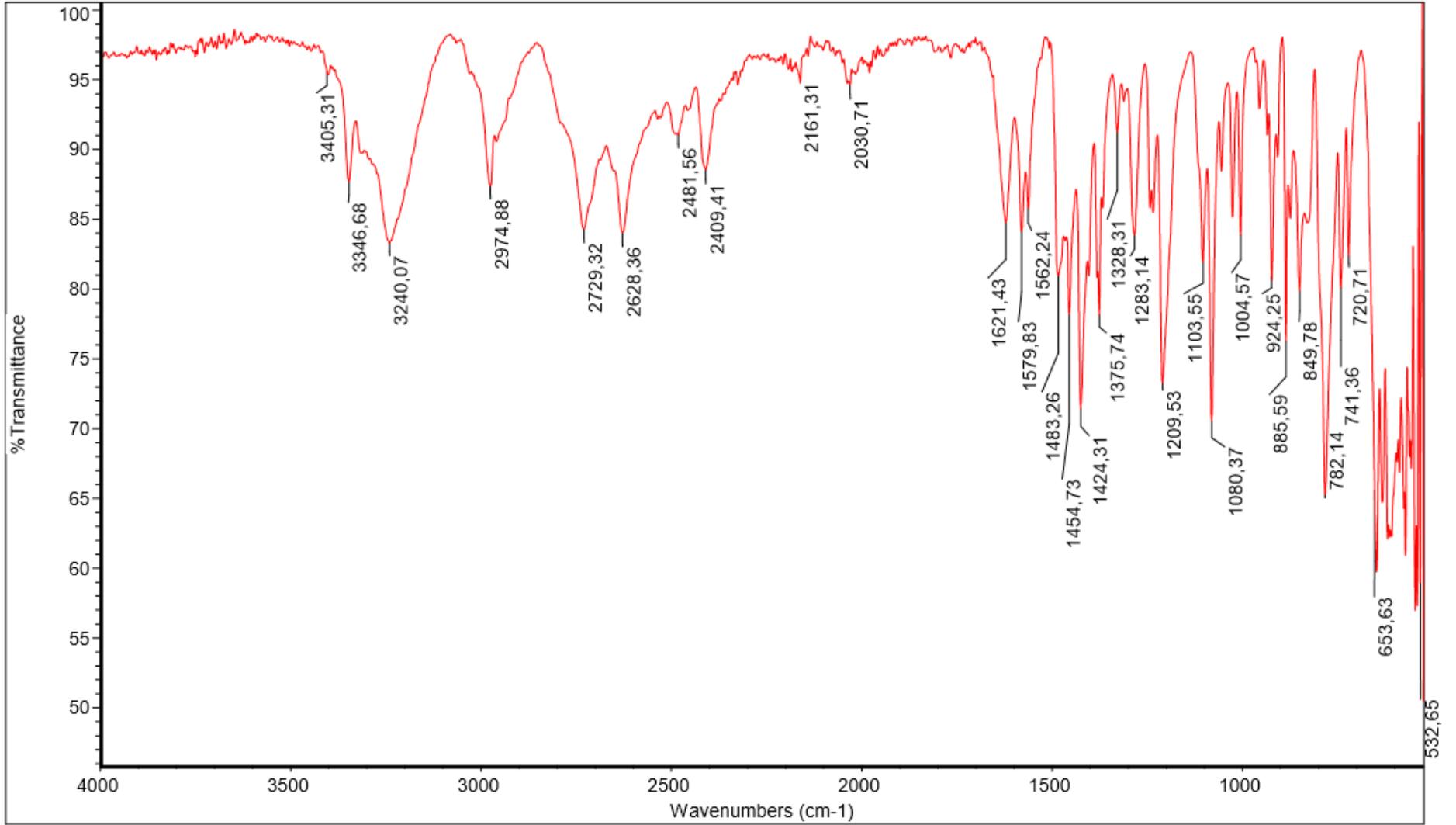
ESTIMULANTES - Espectro de RMN ^{13}C da Terbutalina

ESTIMULANTES - Espectro de massas da Terbutalina

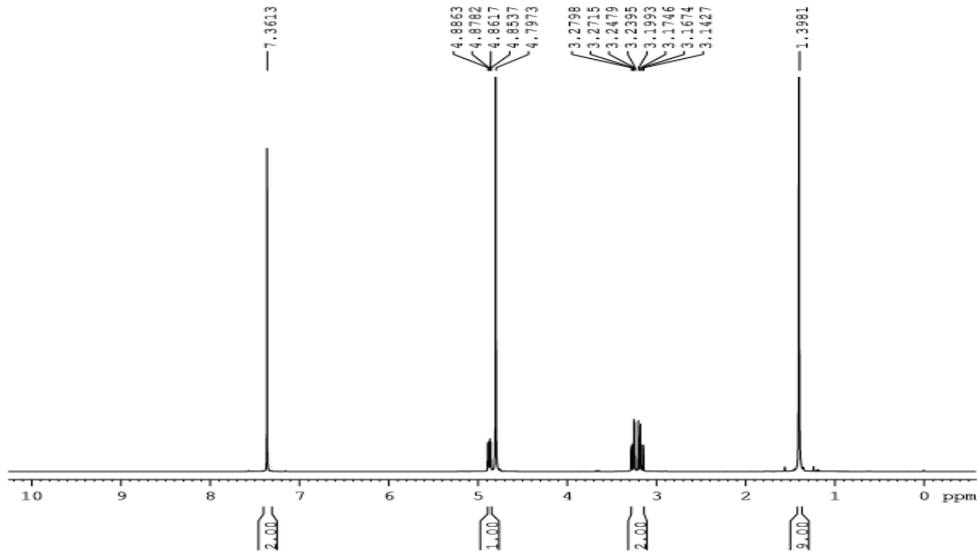


ESTIMULANTES - Ultravioleta - UV do Clembuterol

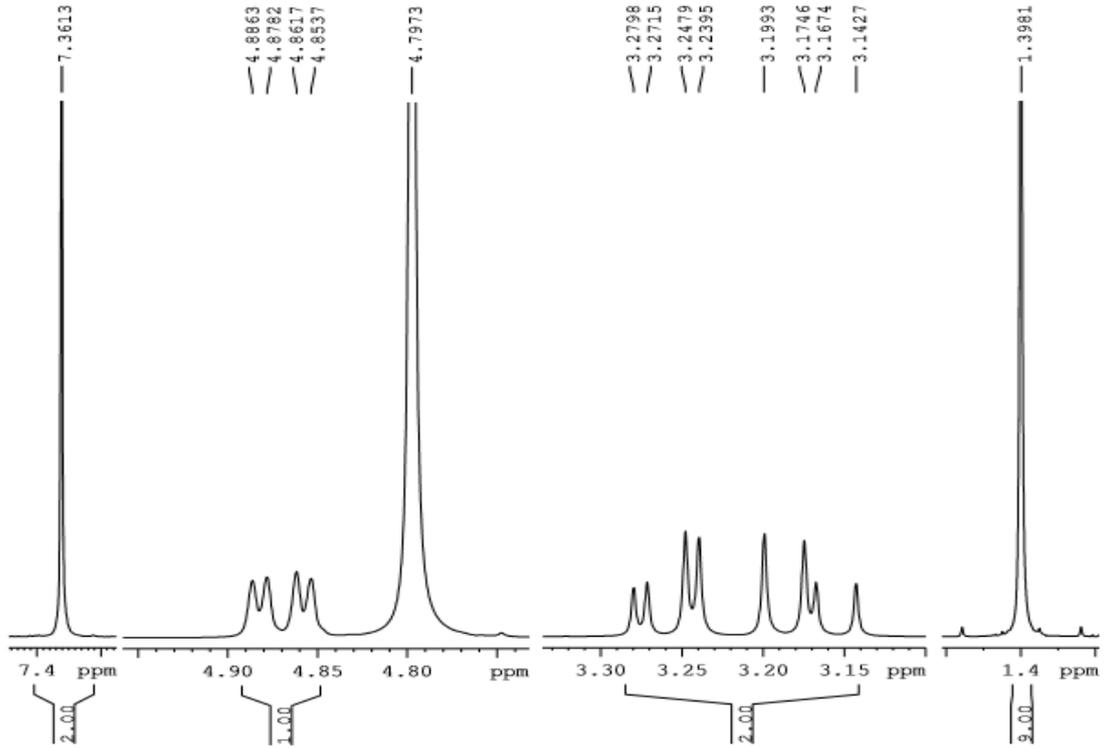
ESTIMULANTES - Espectro de Infravermelho do Clembuterol

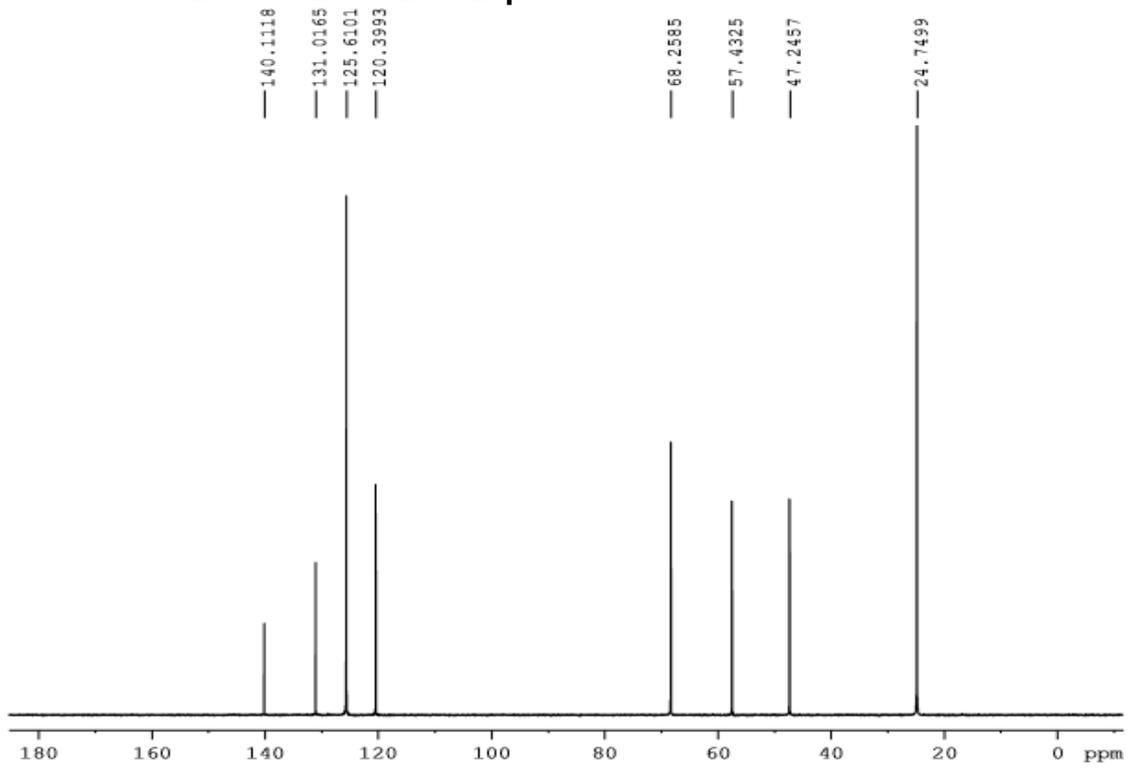


ESTIMULANTES - Espectro de RMN ¹H do Clembuterol

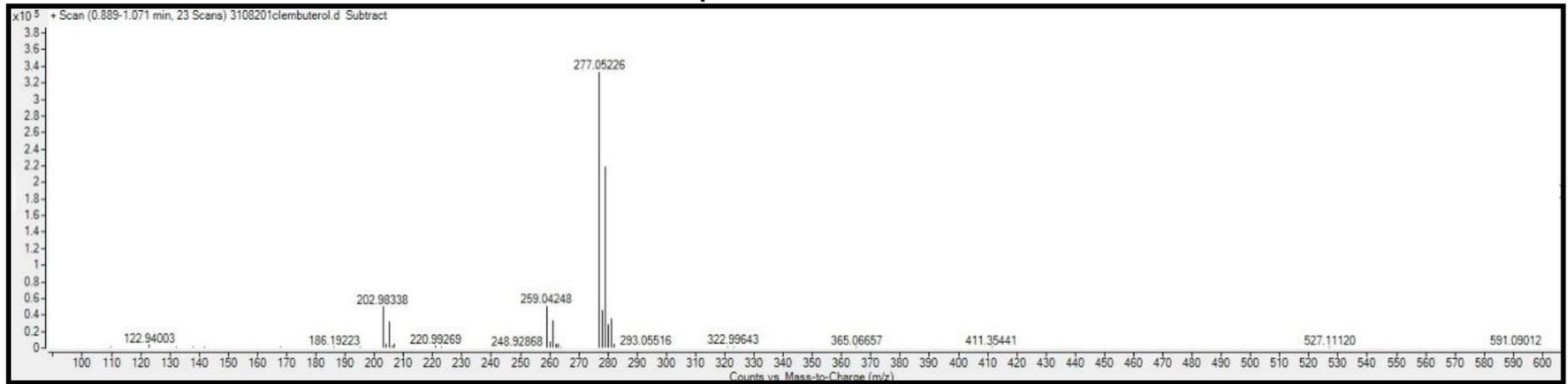


ESTIMULANTES - Espectro de RMN ¹H do Clembuterol

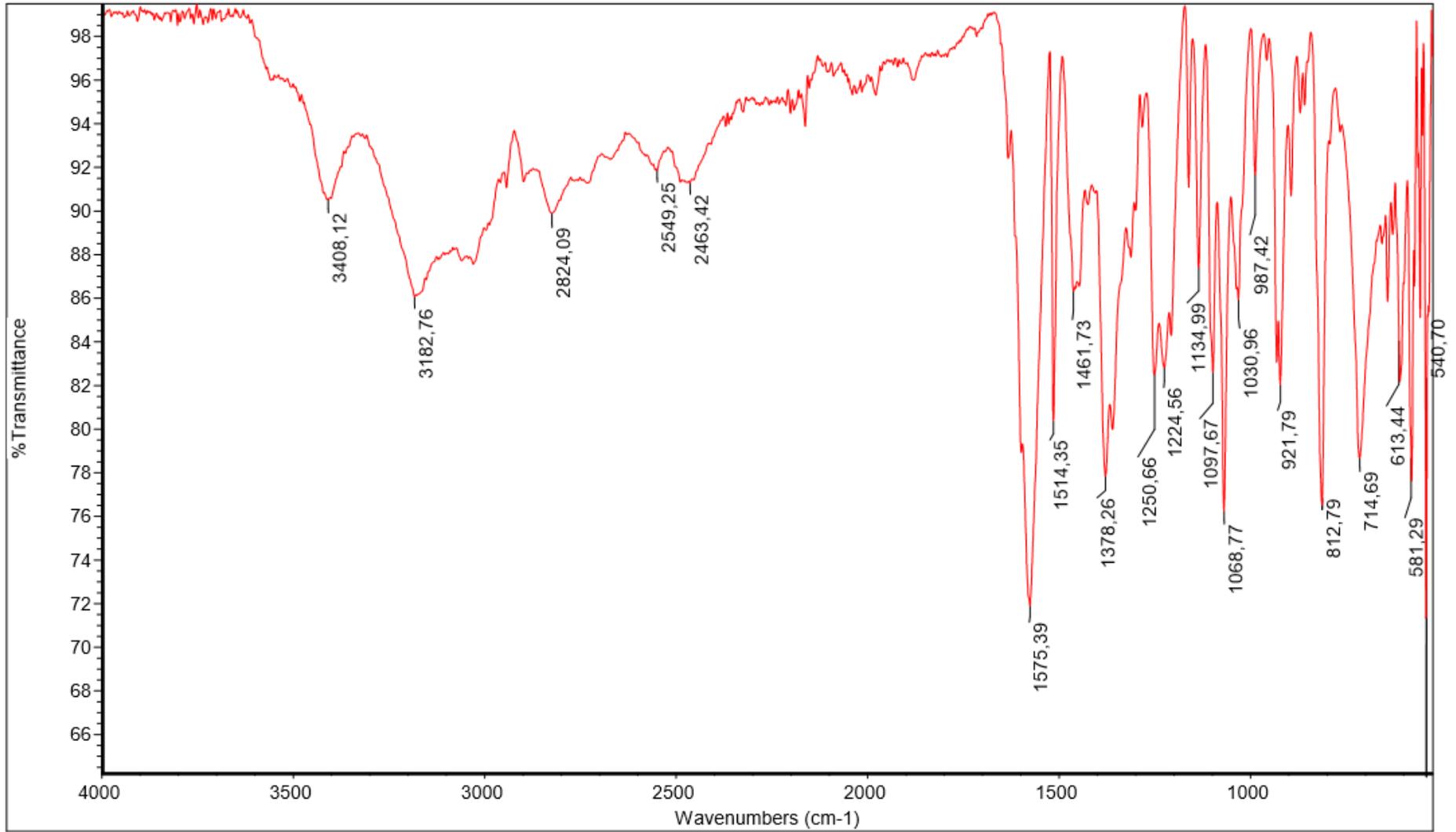


ESTIMULANTES - Espectro de RMN ^{13}C do Clenbuterol

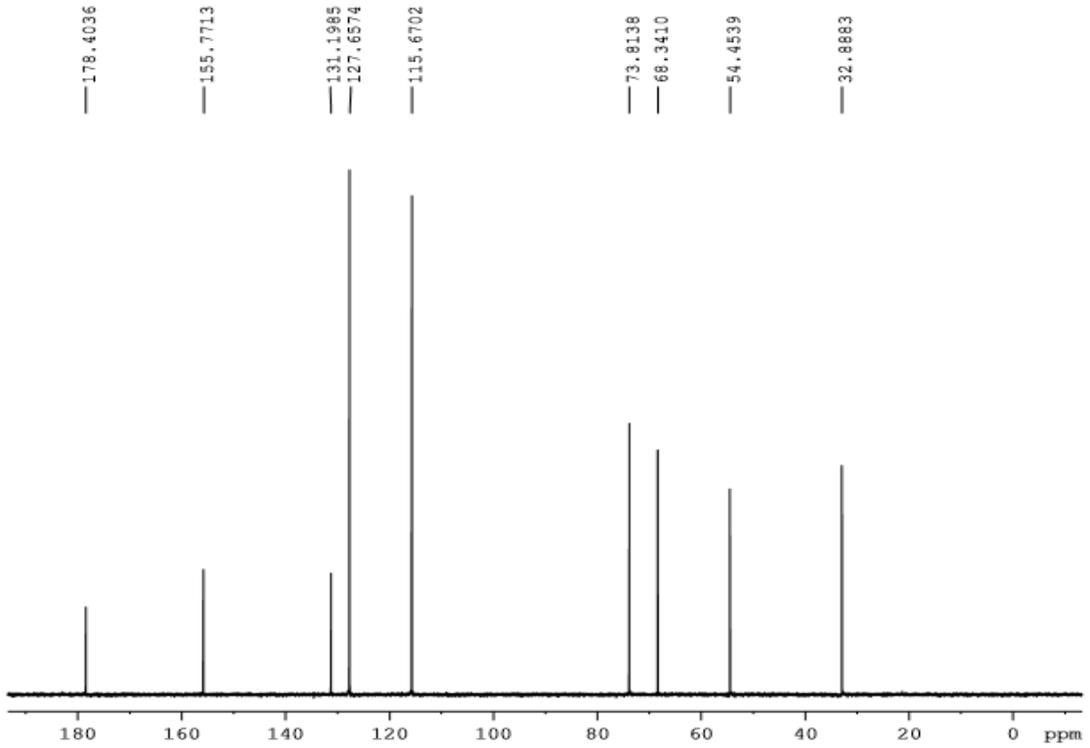
ESTIMULANTES - Espectro de massas do Clenbuterol



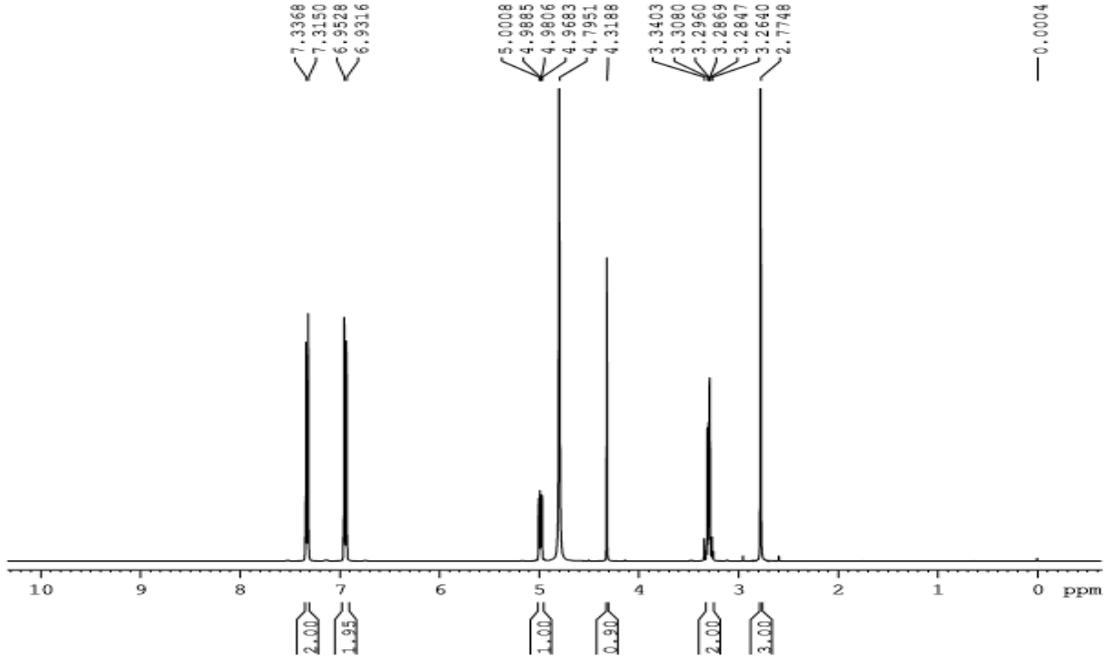
ESTIMULANTES - Espectro de Infravermelho da Sinefrina.



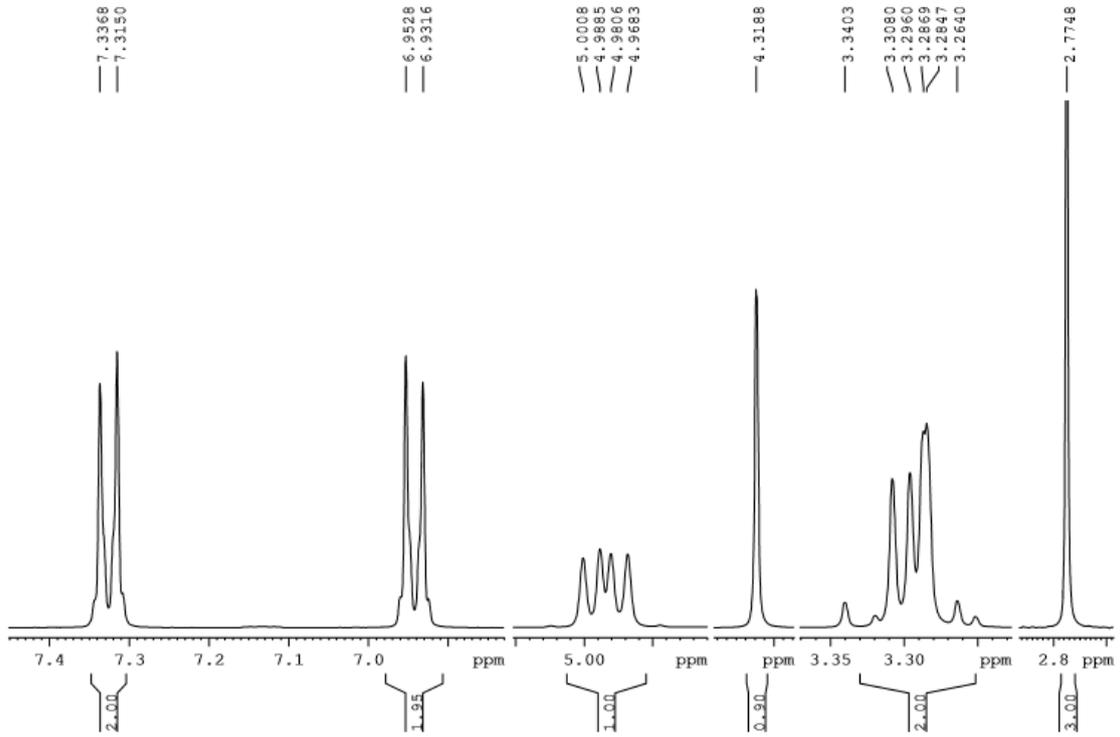
ESTIMULANTES - Espectro de RMN ¹³C da Sinefrina



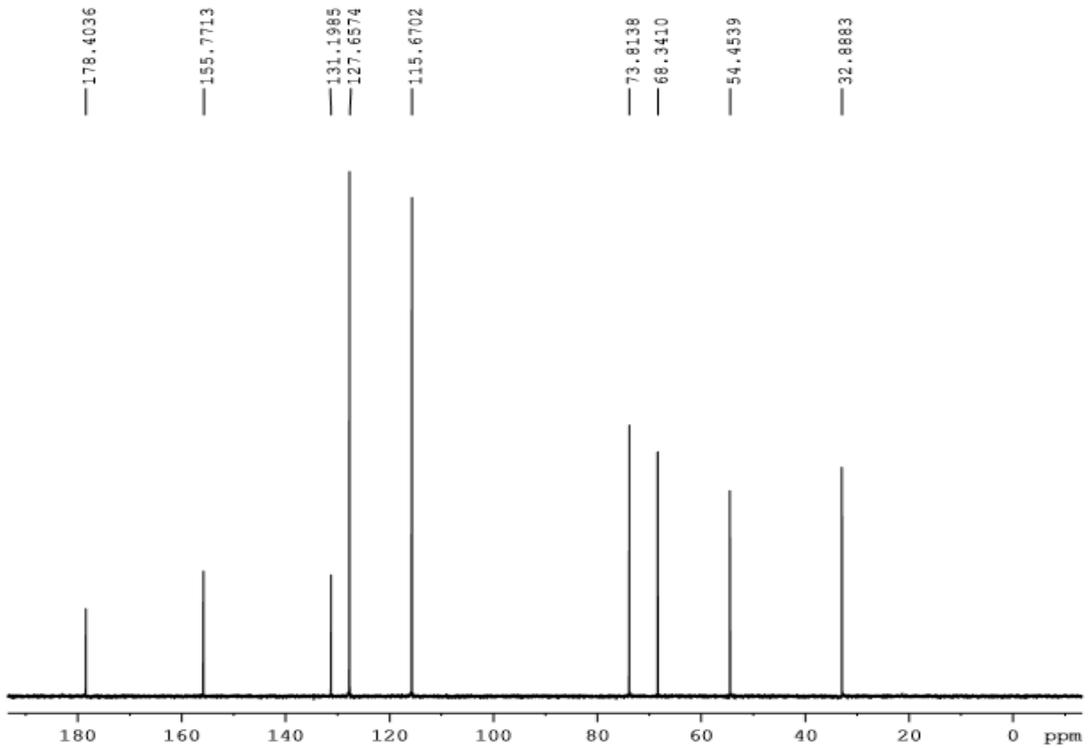
ESTIMULANTES - Espectro de RMN ¹H da Sinefrina



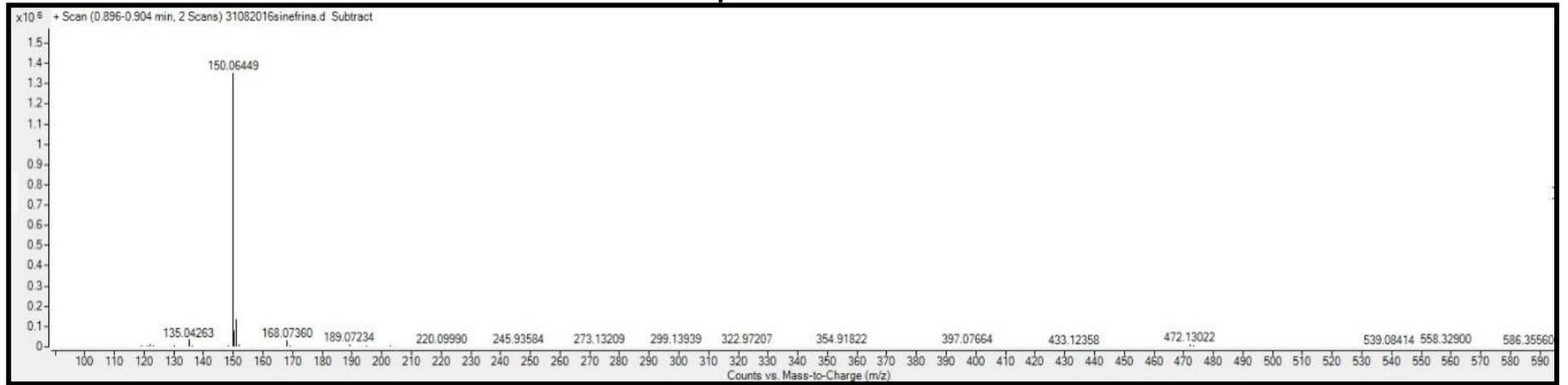
ESTIMULANTES - Espectro de RMN ¹Hα da Sinefrina

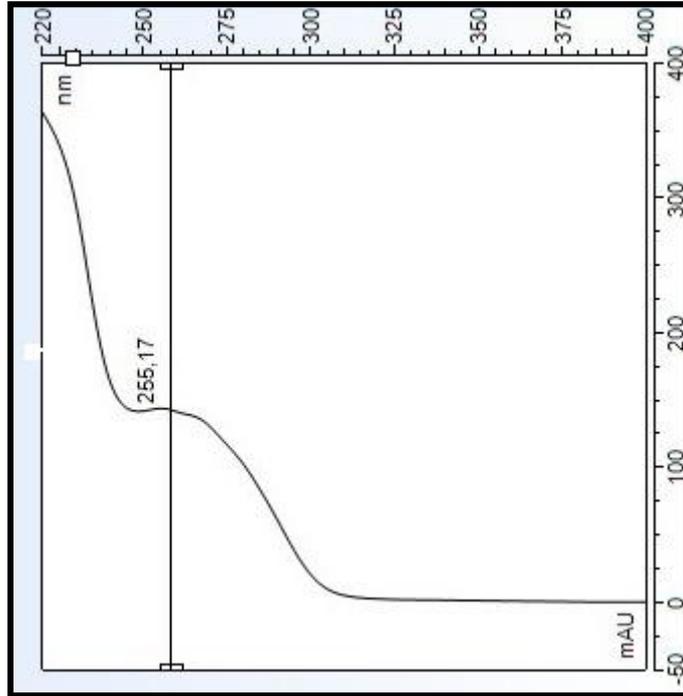


ESTIMULANTES - Espectro de RMN ¹³C da Sinefrina

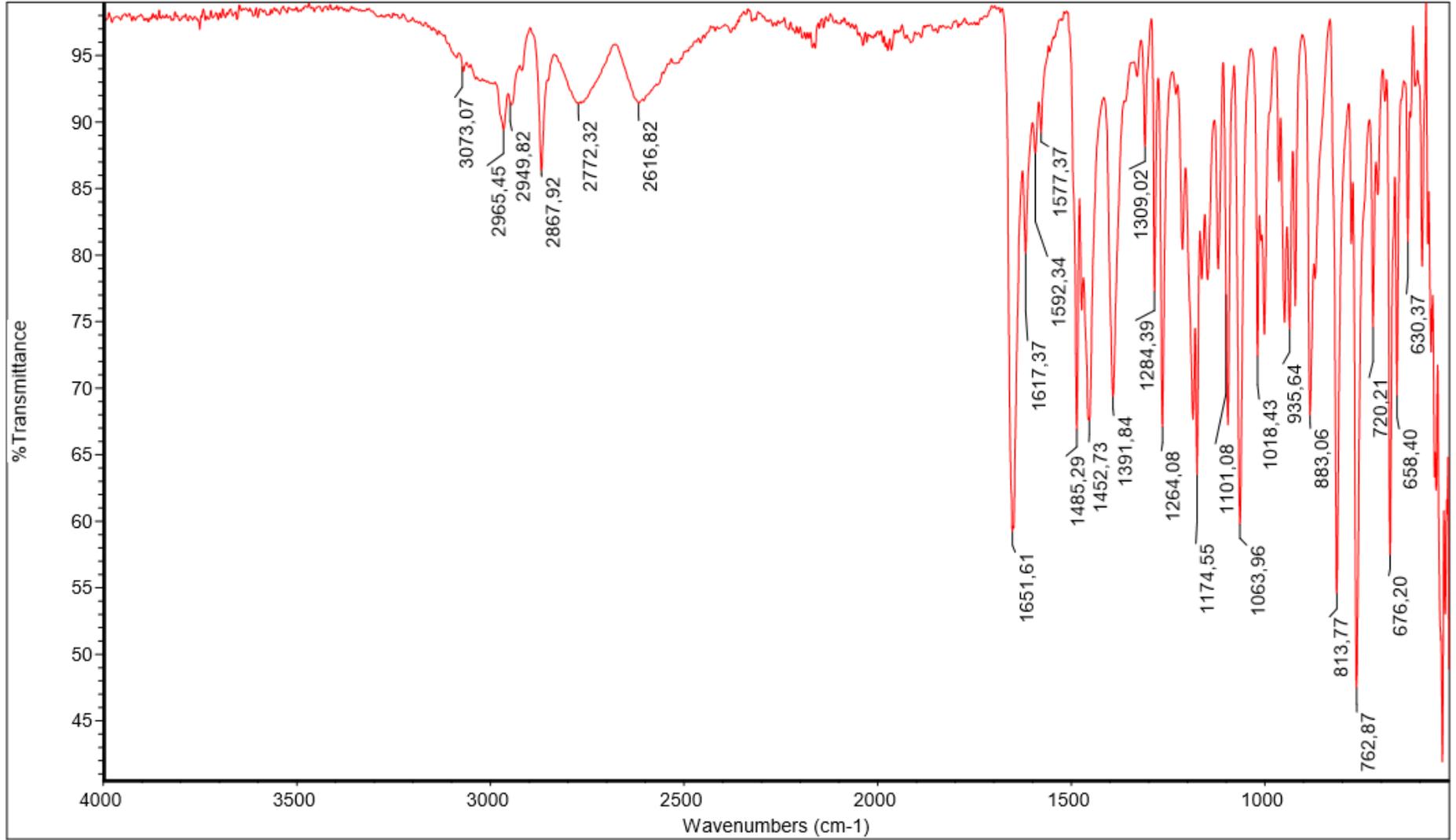


ESTIMULANTES - Espectro de massas da Sinefrina

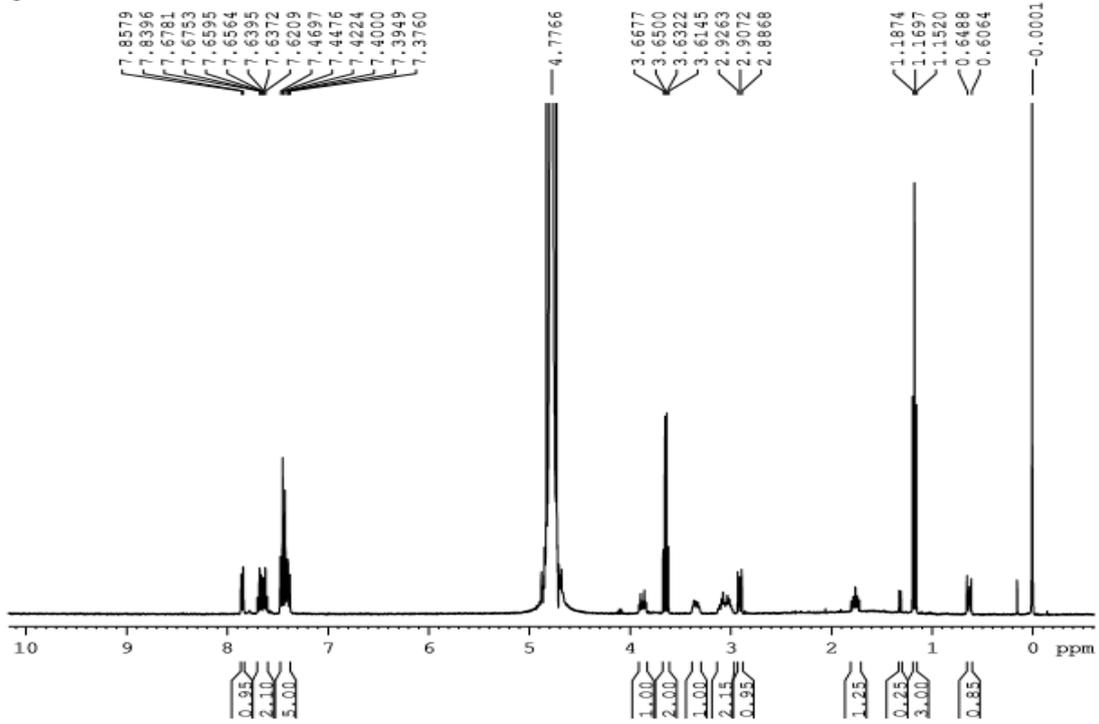


ANOREXÍGENOS - UV do Mazindol

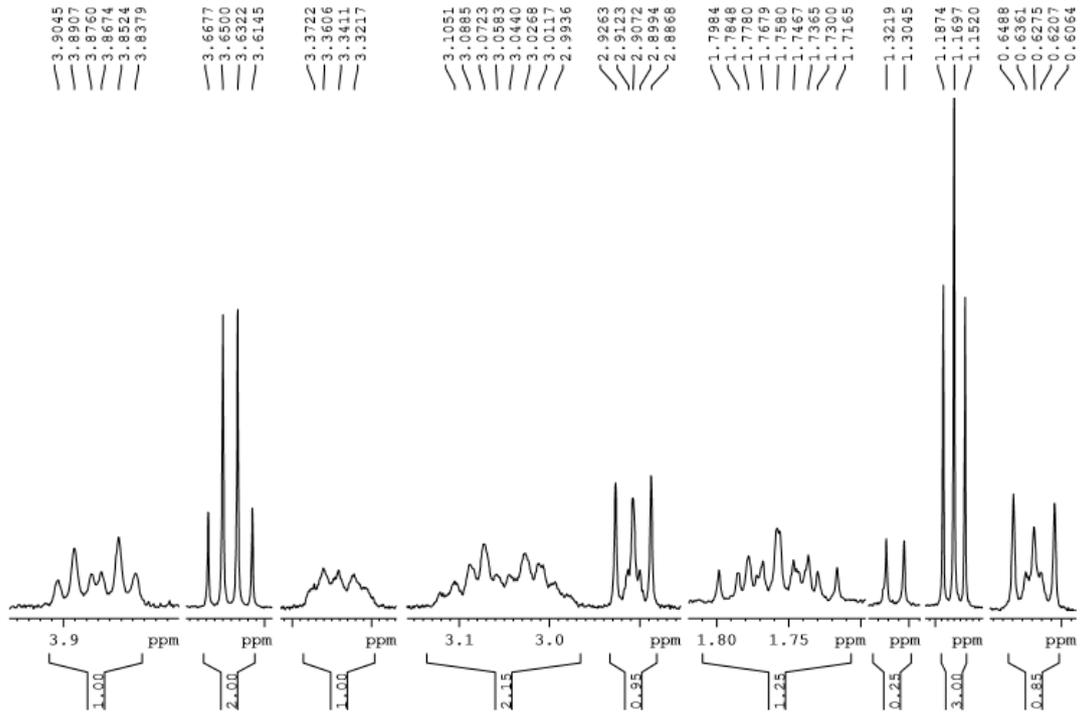
ANOREXÍGENOS - Espectro de Infravermelho do Mazindol

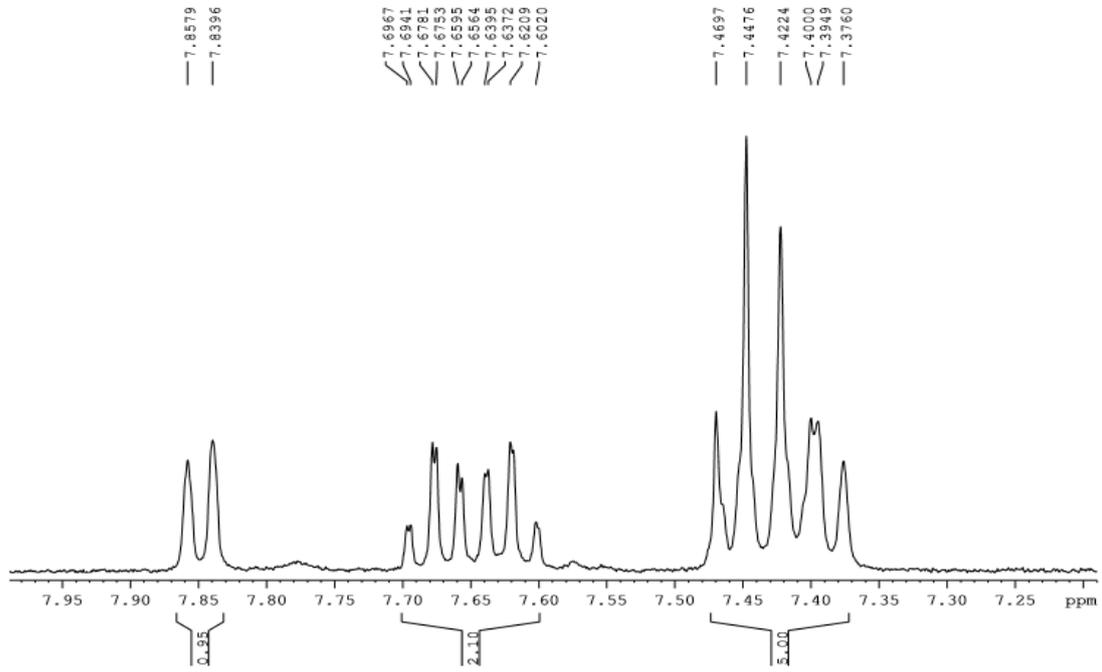


ANOREXÍGENOS - Espectro de RMN ¹H do Mazindol

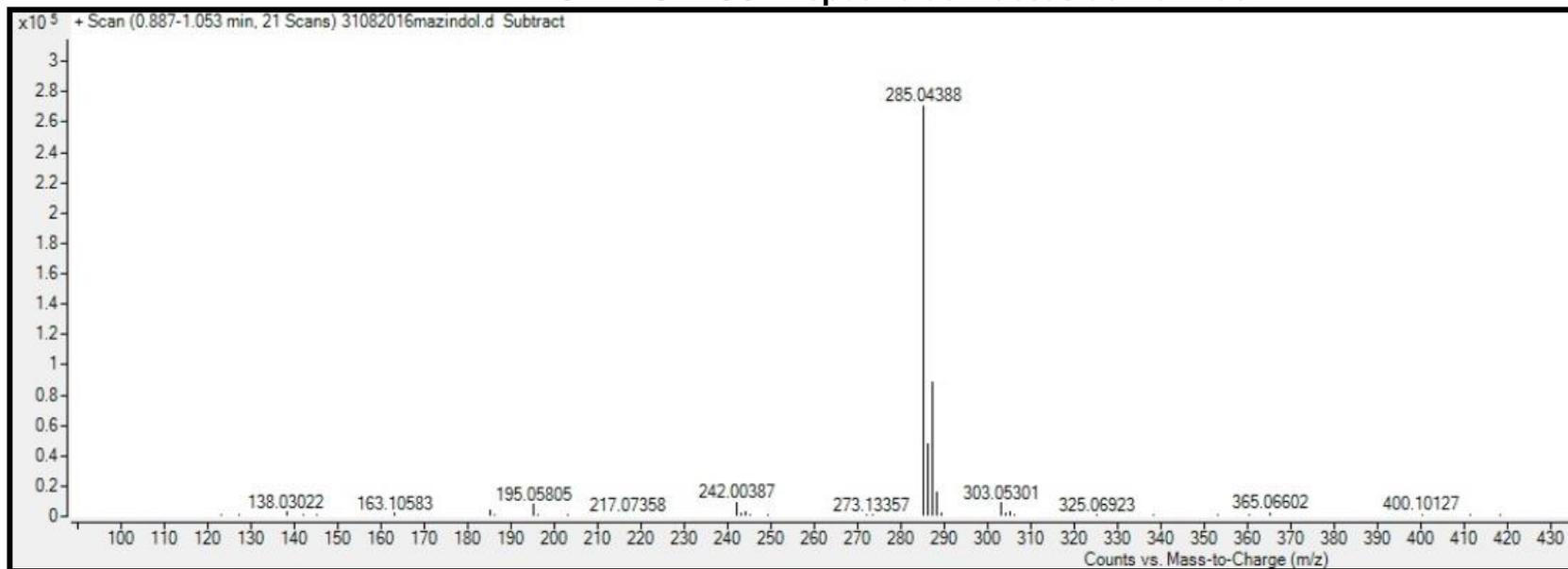


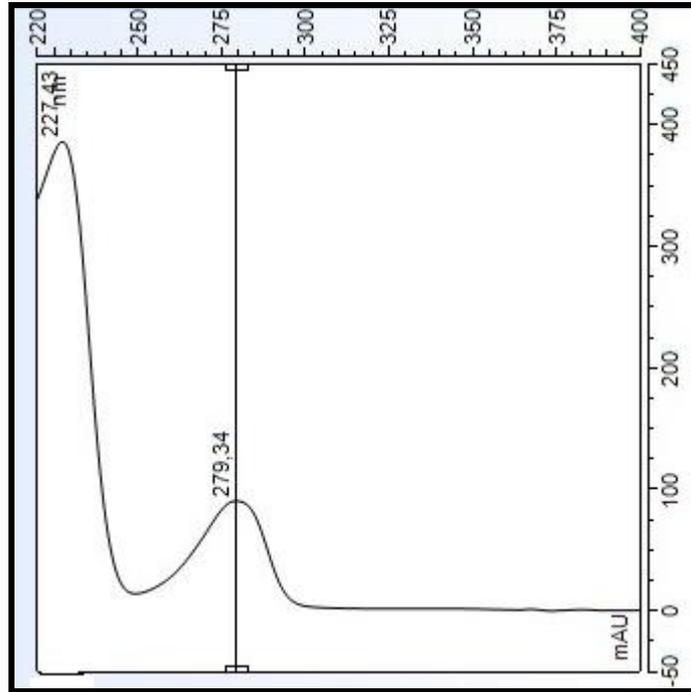
ANOREXÍGENOS - Espectro de RMN ¹H do Mazindol



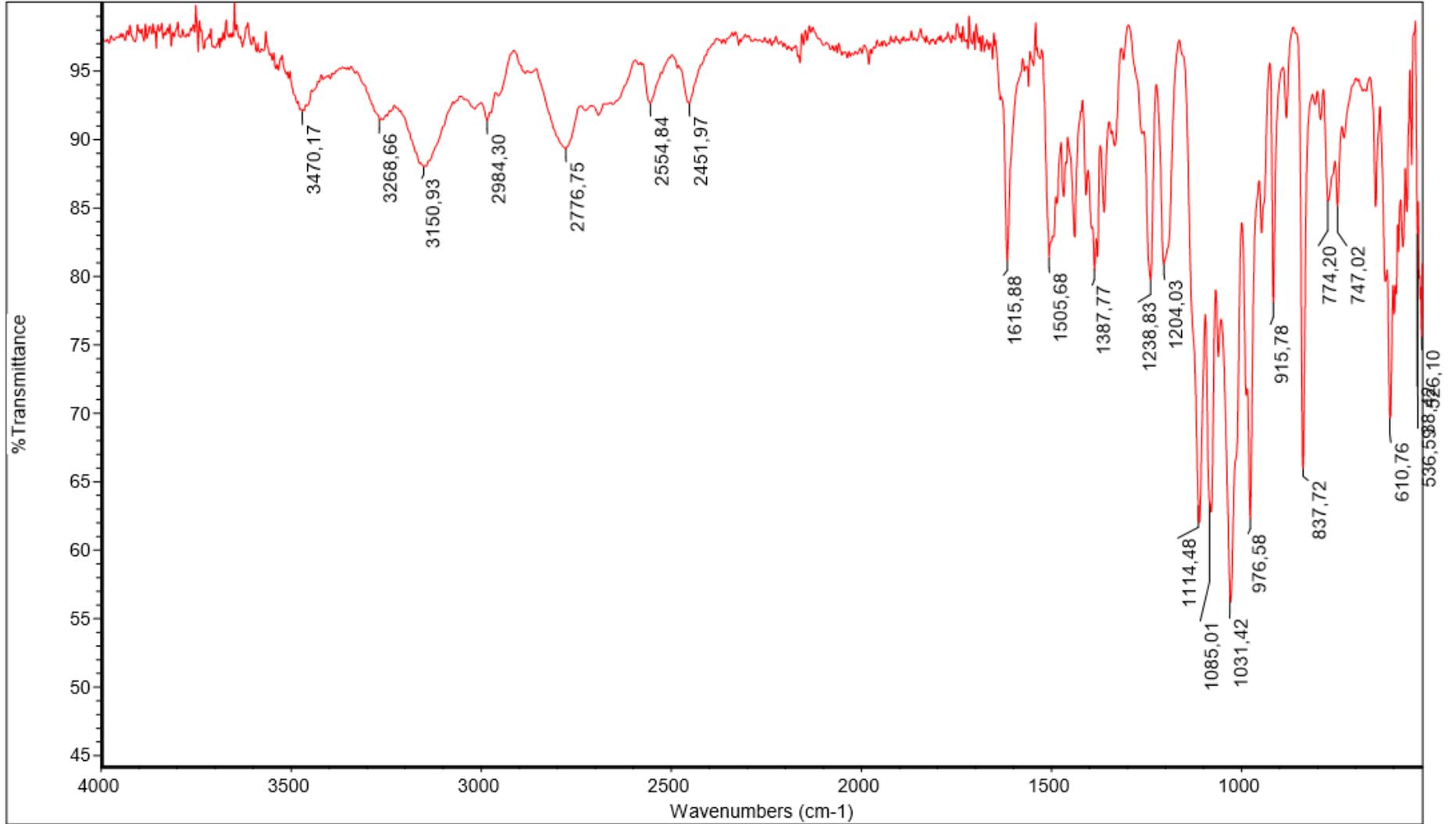
ANOREXÍGENOS - Espectro de RMN ^1H do Mazindol

ANOREXÍGENOS - Espectro de massas do Mazindol

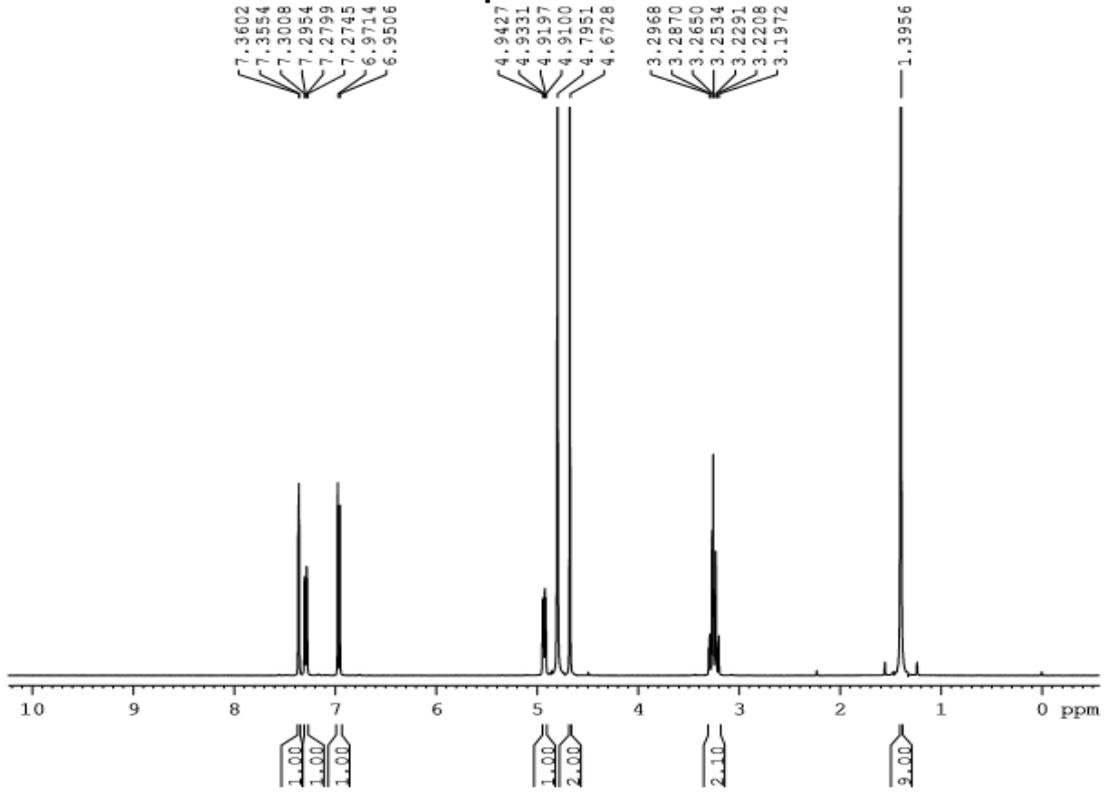


ESTIMULANTES - UV do Salbutamol

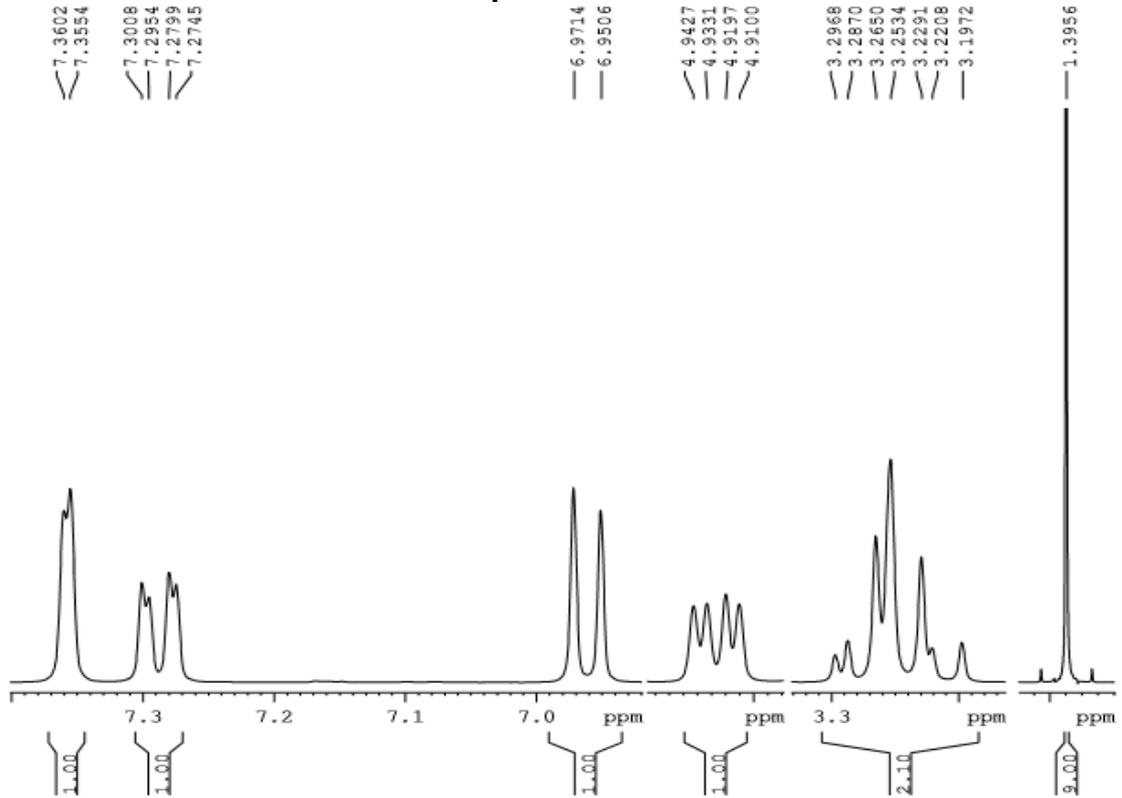
ESTIMULANTES - Espectro de Infravermelho do Salbutamol.



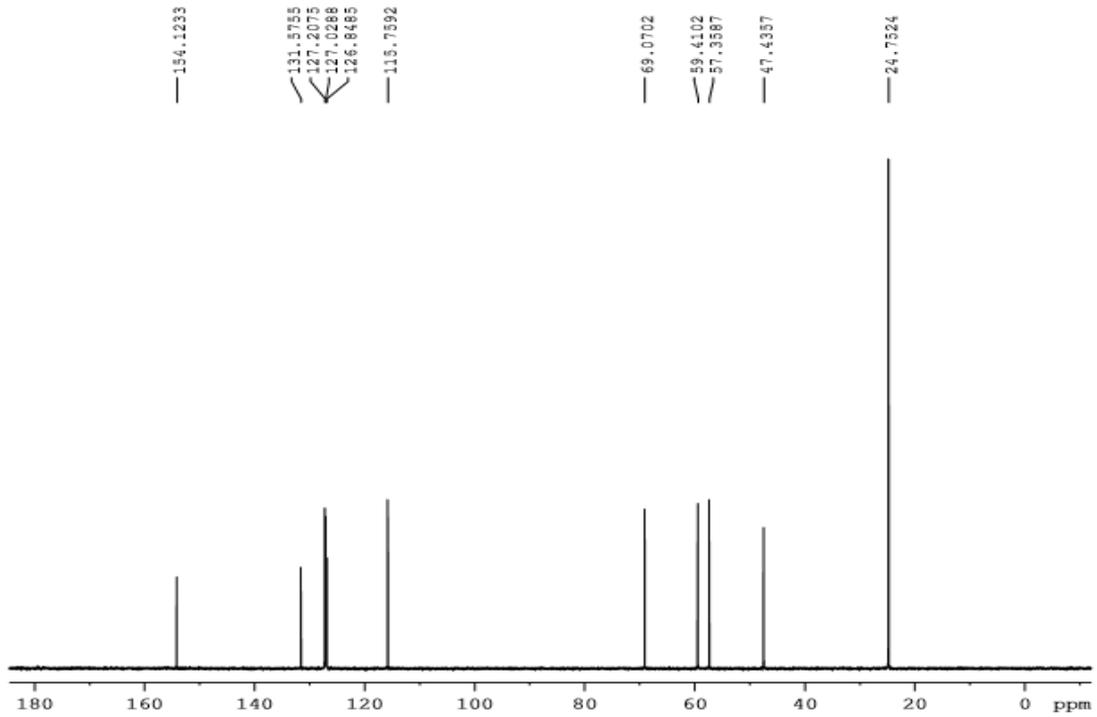
ESTIMULANTES - Espectro de RMN ¹H do Salbutamol.



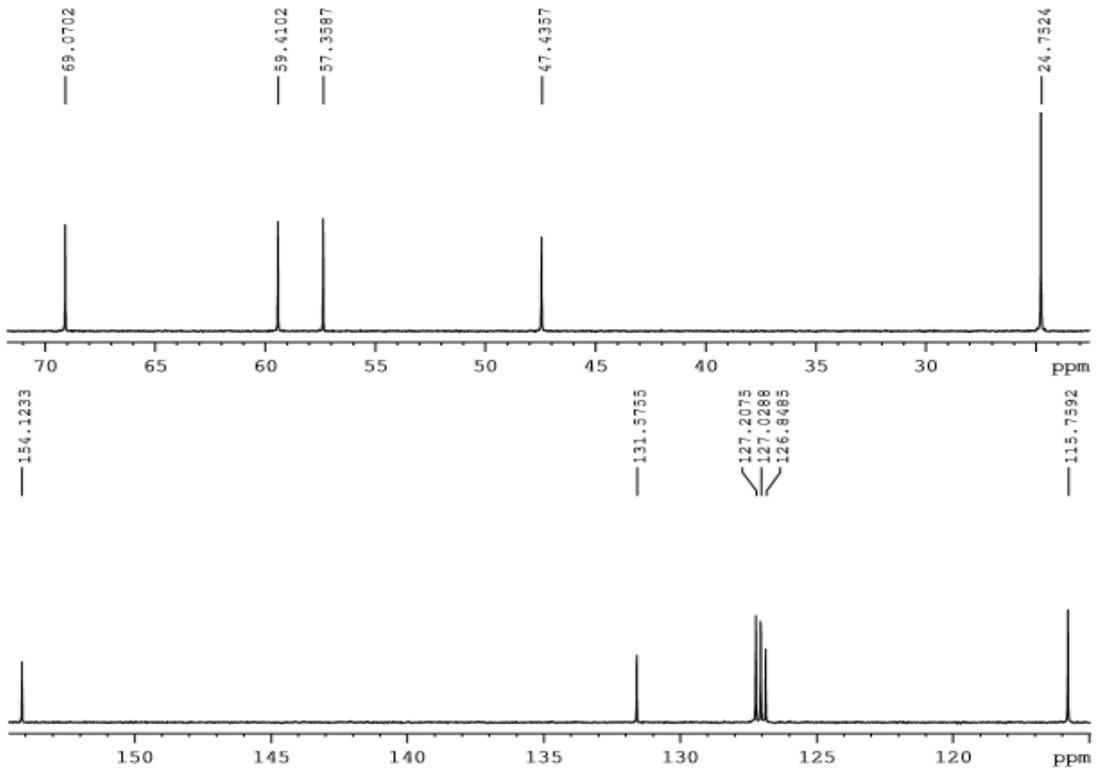
ESTIMULANTES - Espectro de RMN ¹Ha do Salbutamol.



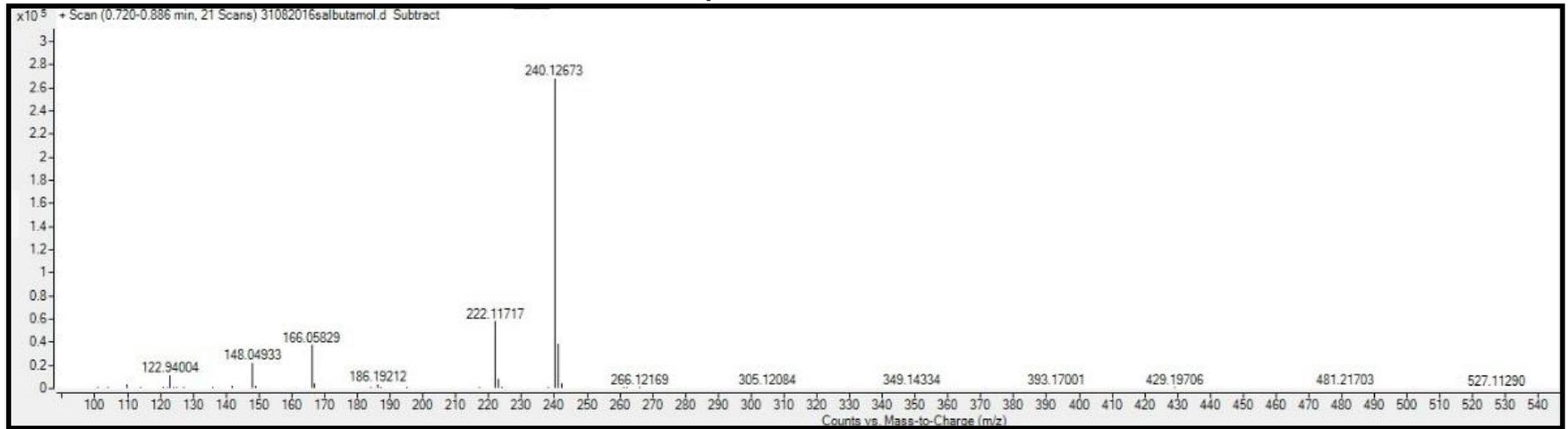
ESTIMULANTES - Espectro de RMN ^{13}C do Salbutamol.

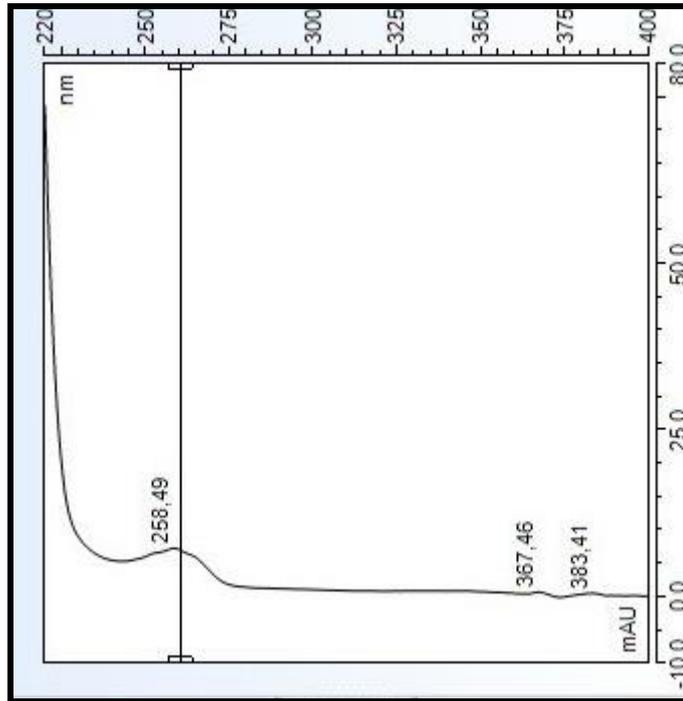


ESTIMULANTES - Espectro de RMN ^{13}Ca do Salbutamol.

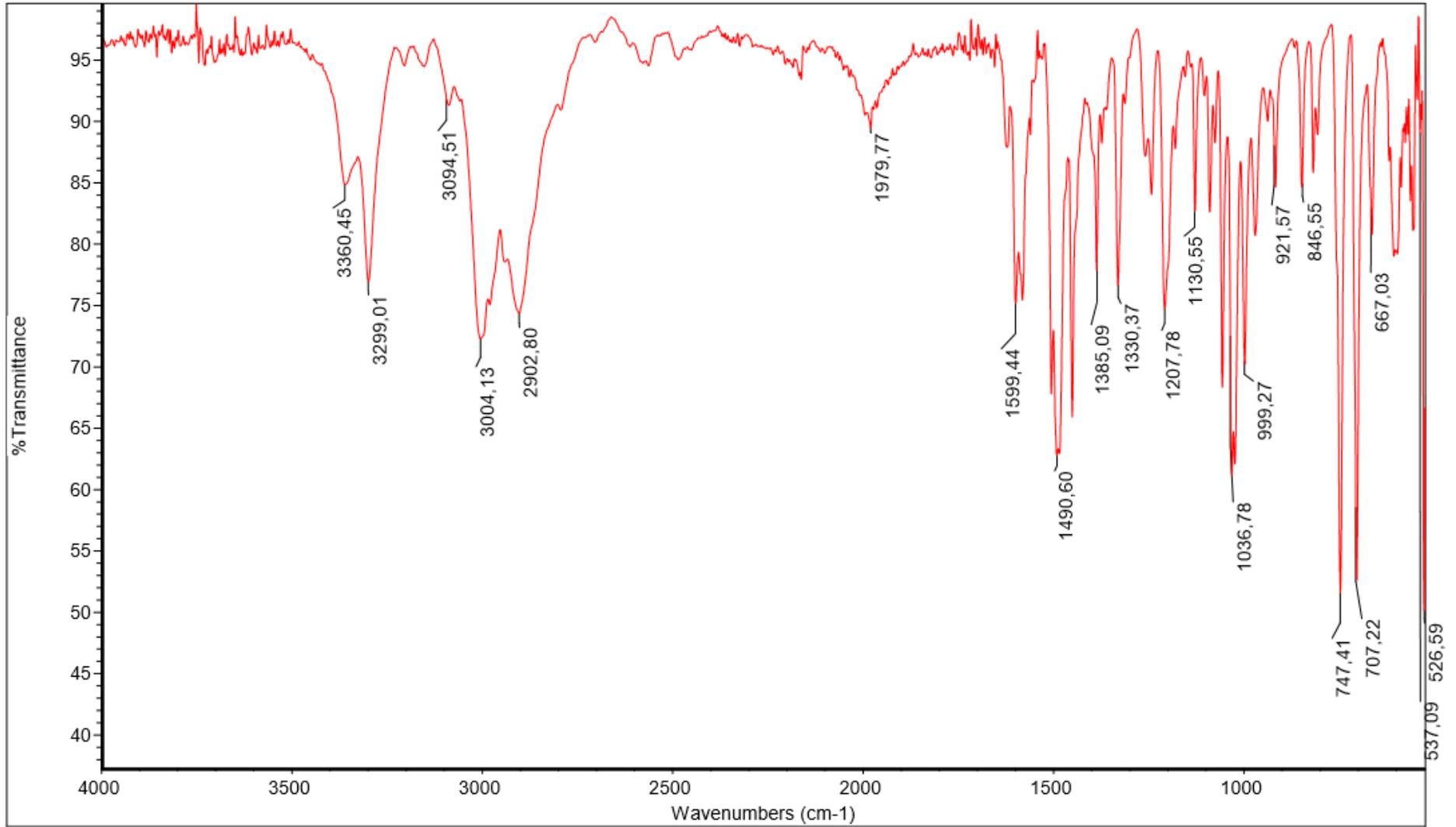


ESTIMULANTES - Espectro de massas do Salbutamol

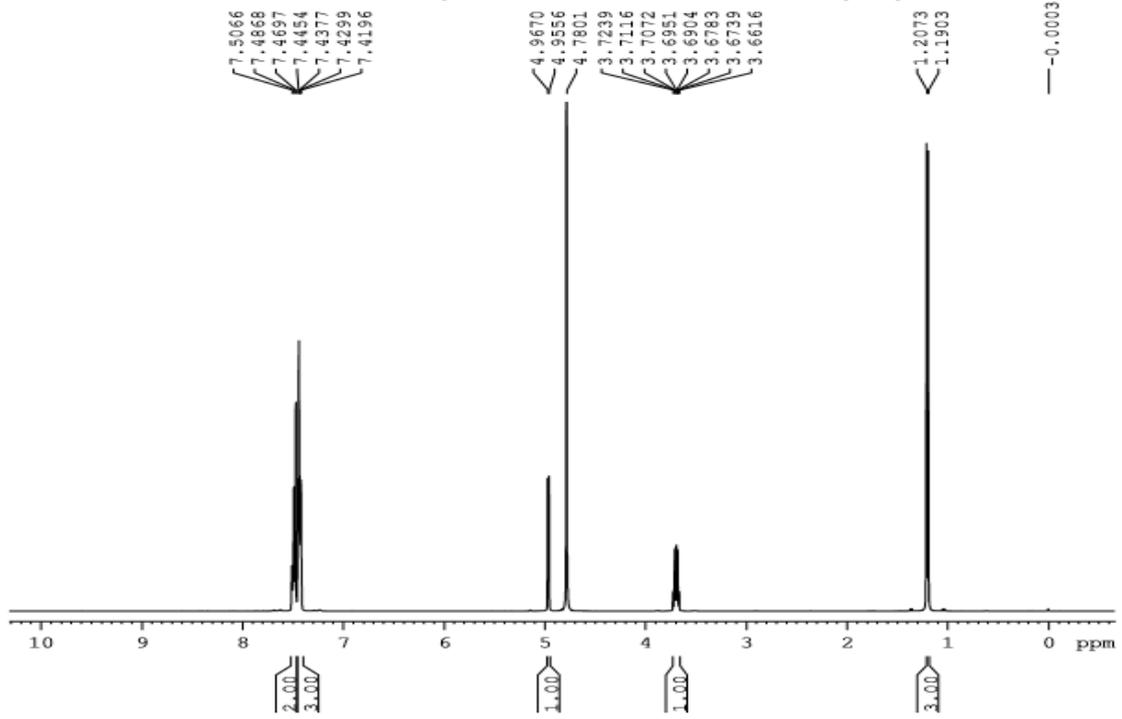


ESTIMULANTES - UV da Fenilpropanolamina

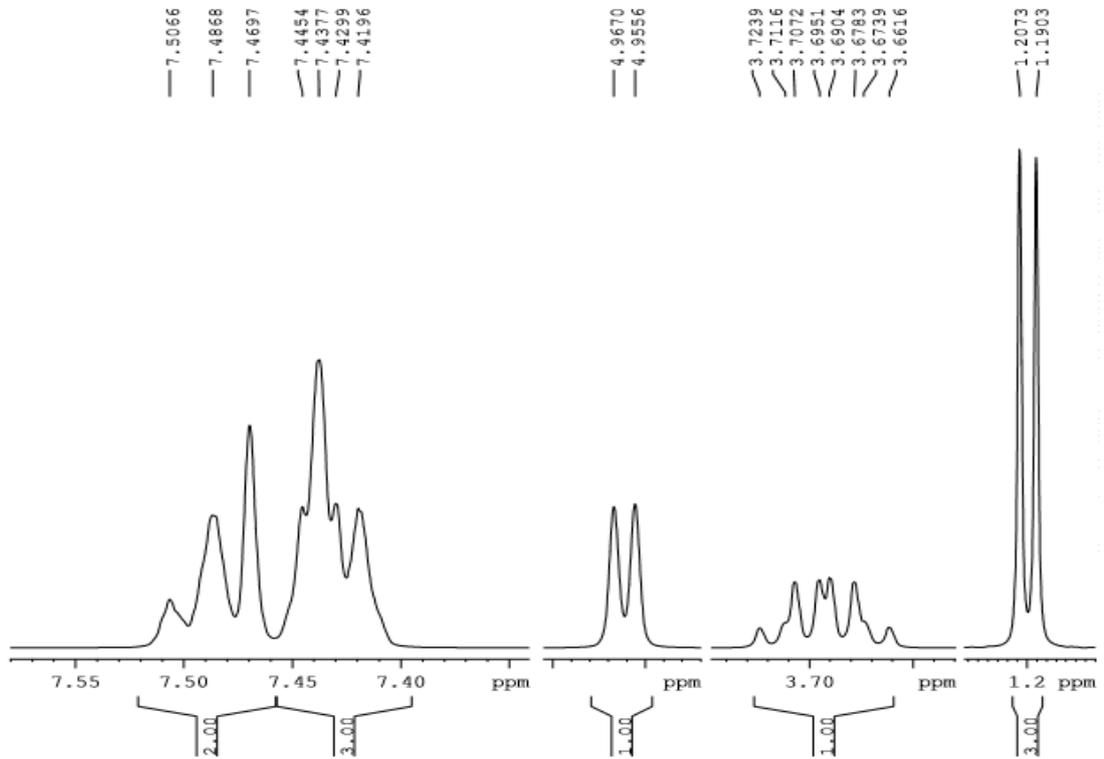
ESTIMULANTES - Espectro de Infravermelho da Fenilpropanolamina



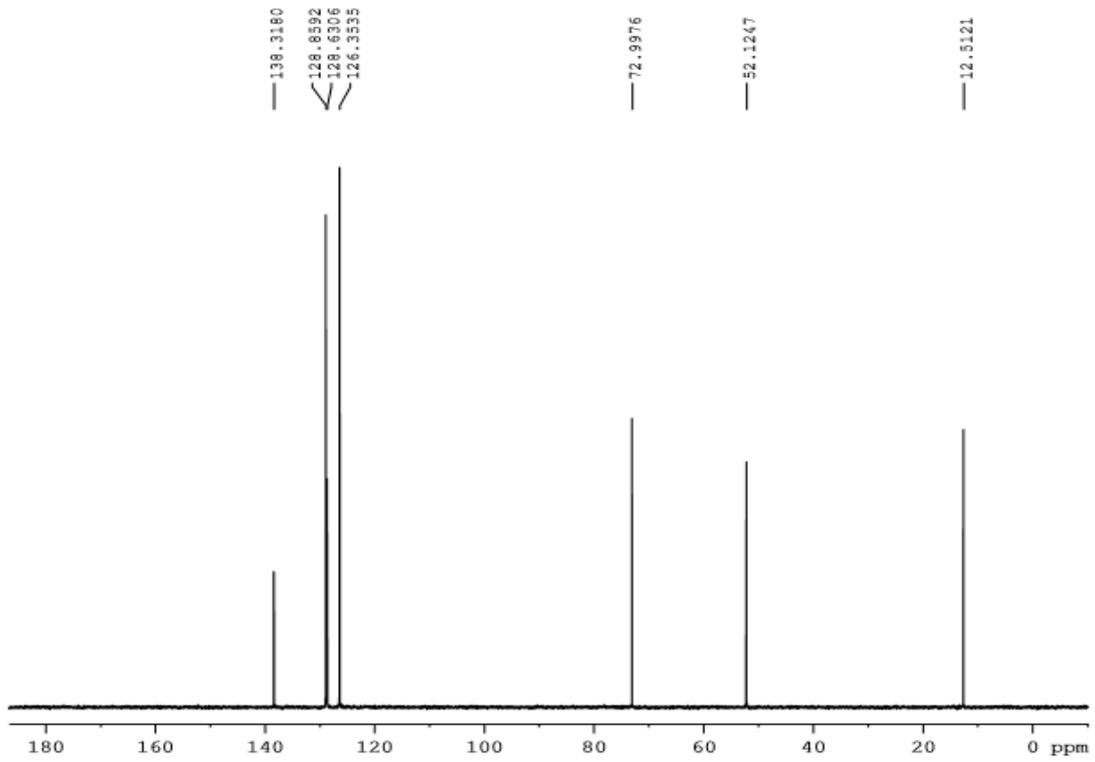
ESTIMULANTES - Espectro de RMN ¹H da Fenilpropanolamina



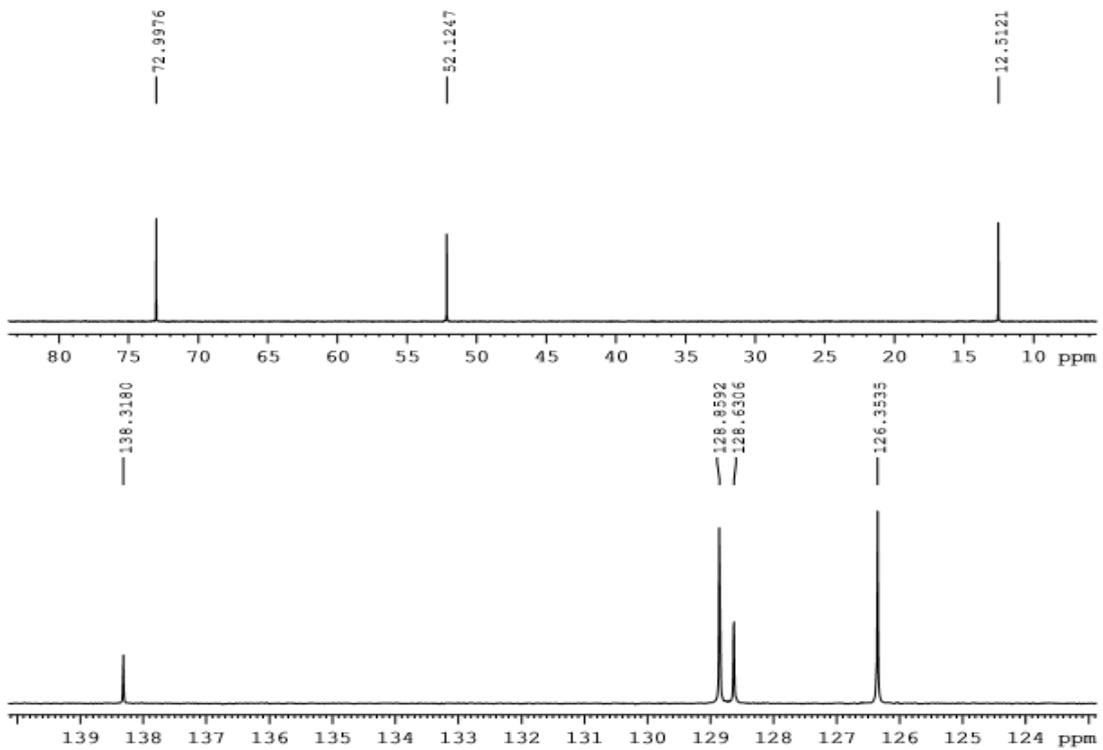
ESTIMULANTES - Espectro de RMN ¹H da Fenilpropanolamina



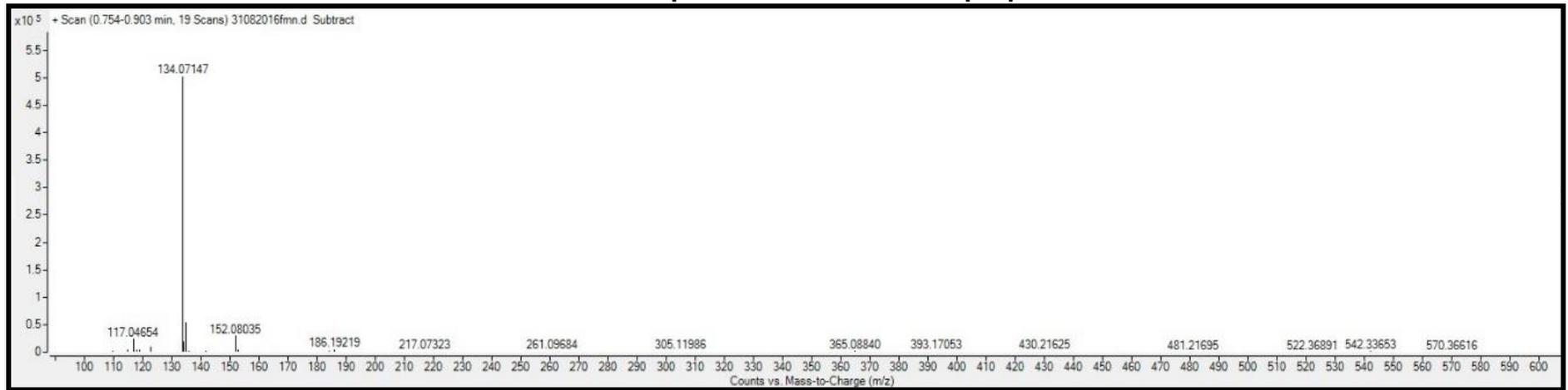
ESTIMULANTES - Espectro de RMN ^{13}C da Fenilpropanolamina

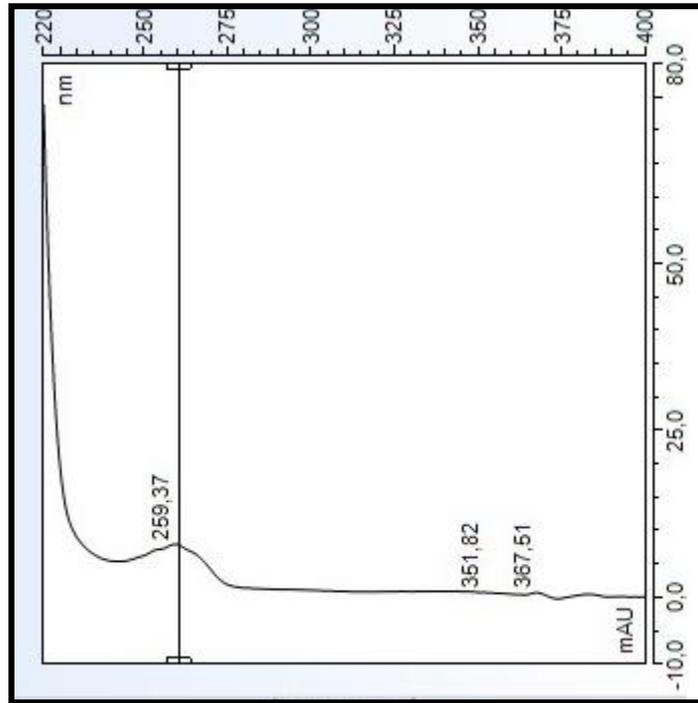


ESTIMULANTES - Espectro de RMN ^{13}Ca da Fenilpropanolamina

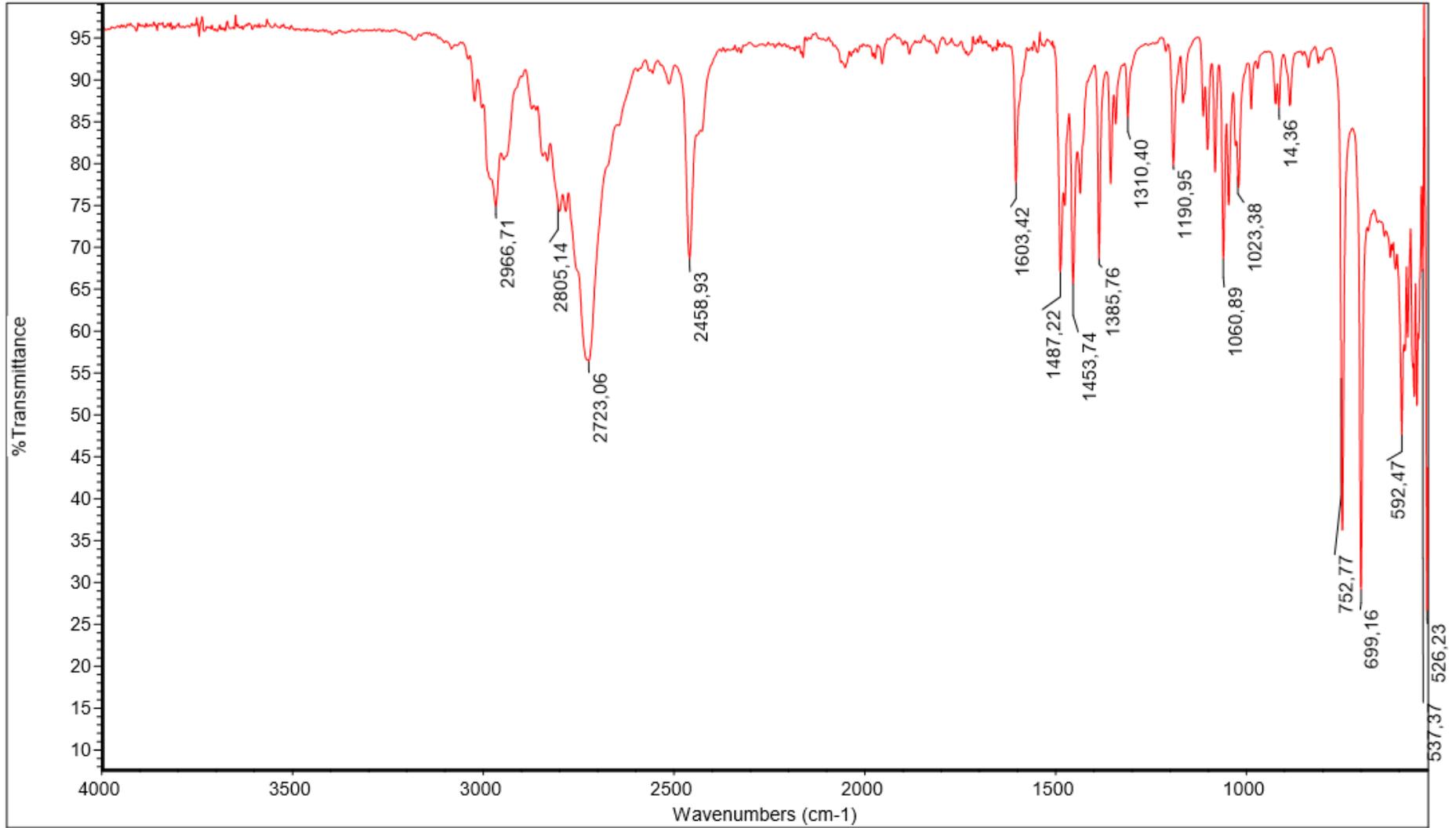


ESTIMULANTES - Espectro de massas Fenilpropanolamina

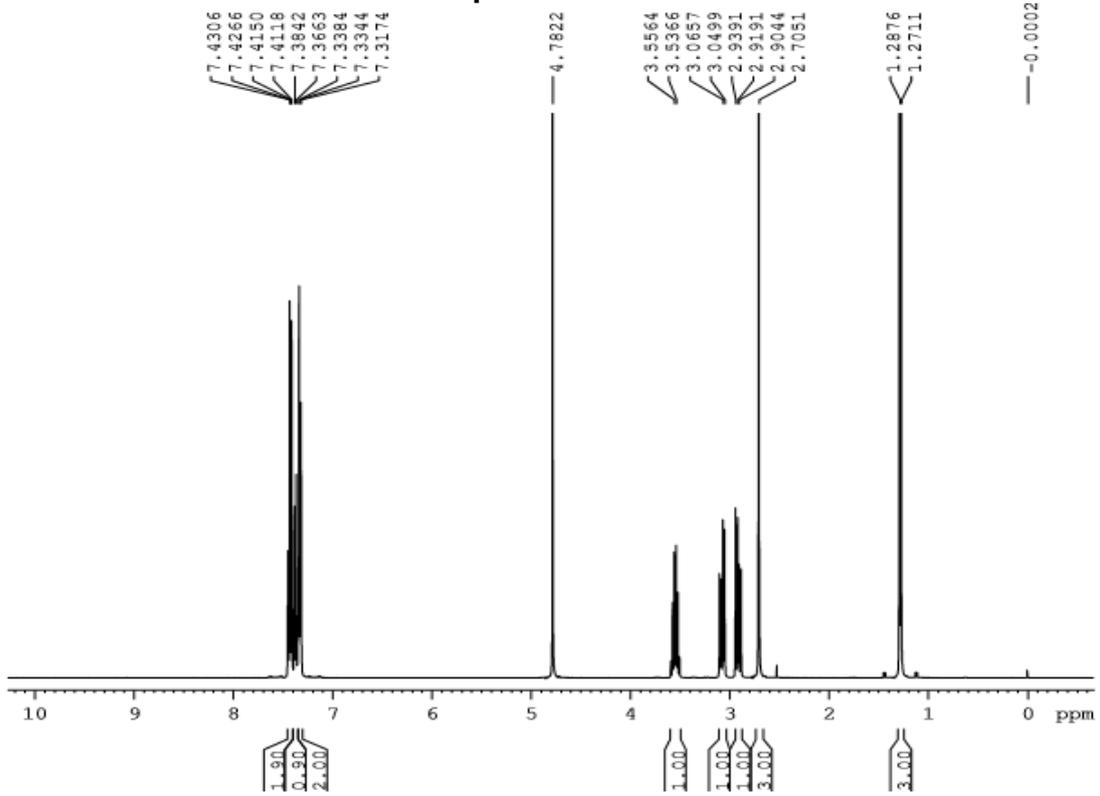


ANOREXÍGENOS - UV da Metanfetamina

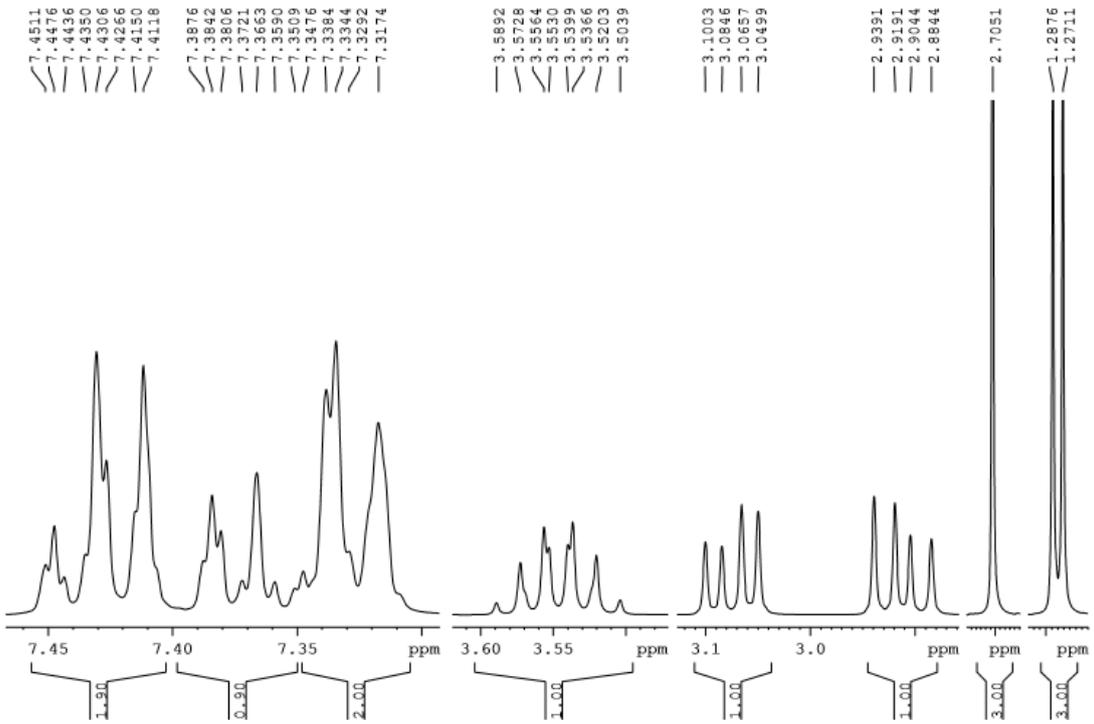
ANOREXÍGENOS - Espectro de Infravermelho da Metanfetamina



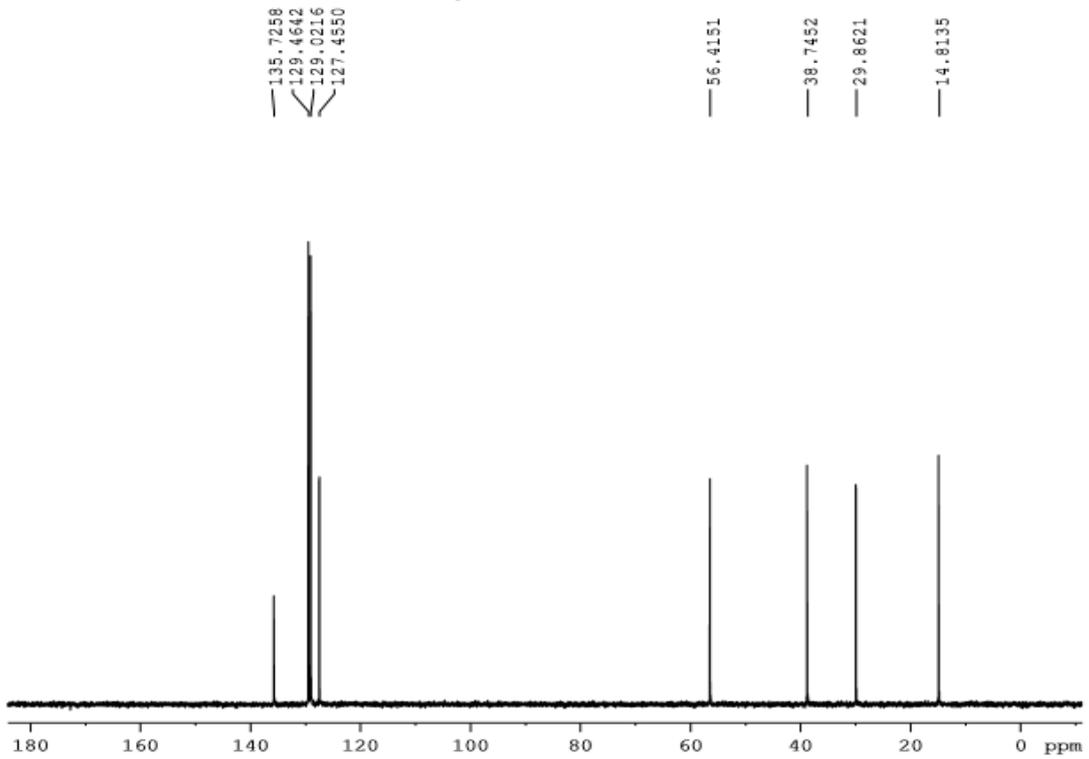
ANOREXÍGENOS - Espectro de RMN ¹H da Metanfetamina



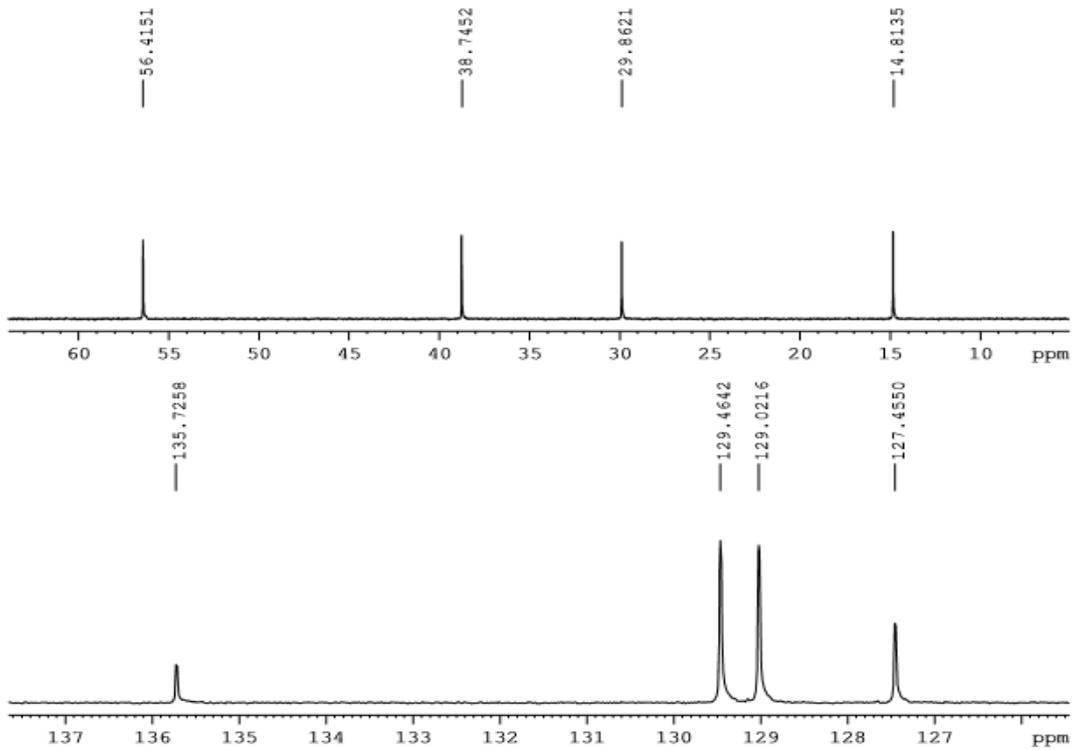
ANOREXÍGENOS - Espectro de RMN ¹Ha da Metanfetamina



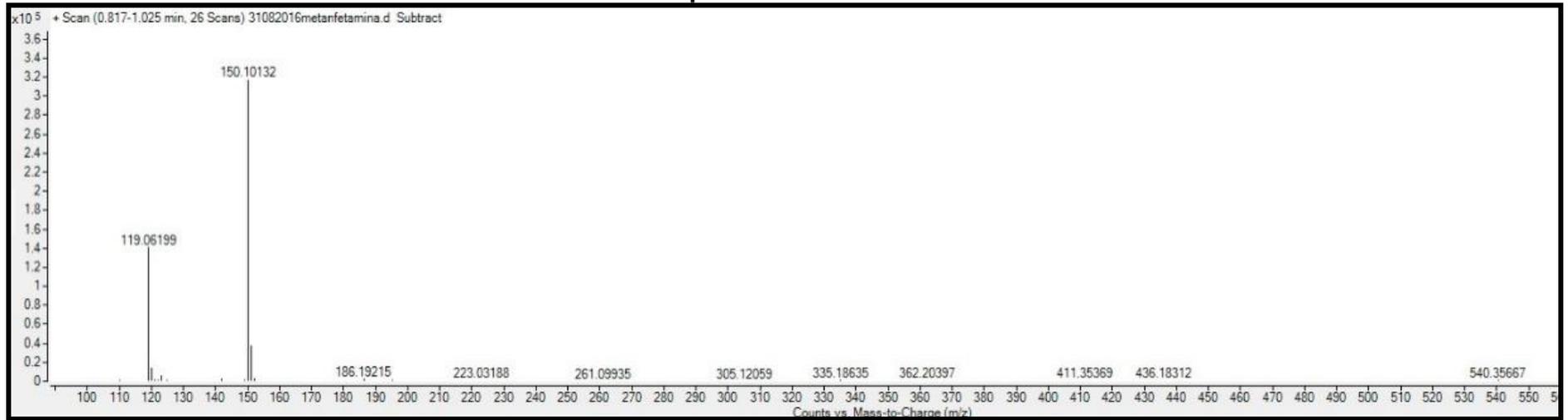
ANOREXÍGENOS - Espectro de RMN ^{13}C da Metanfetamina



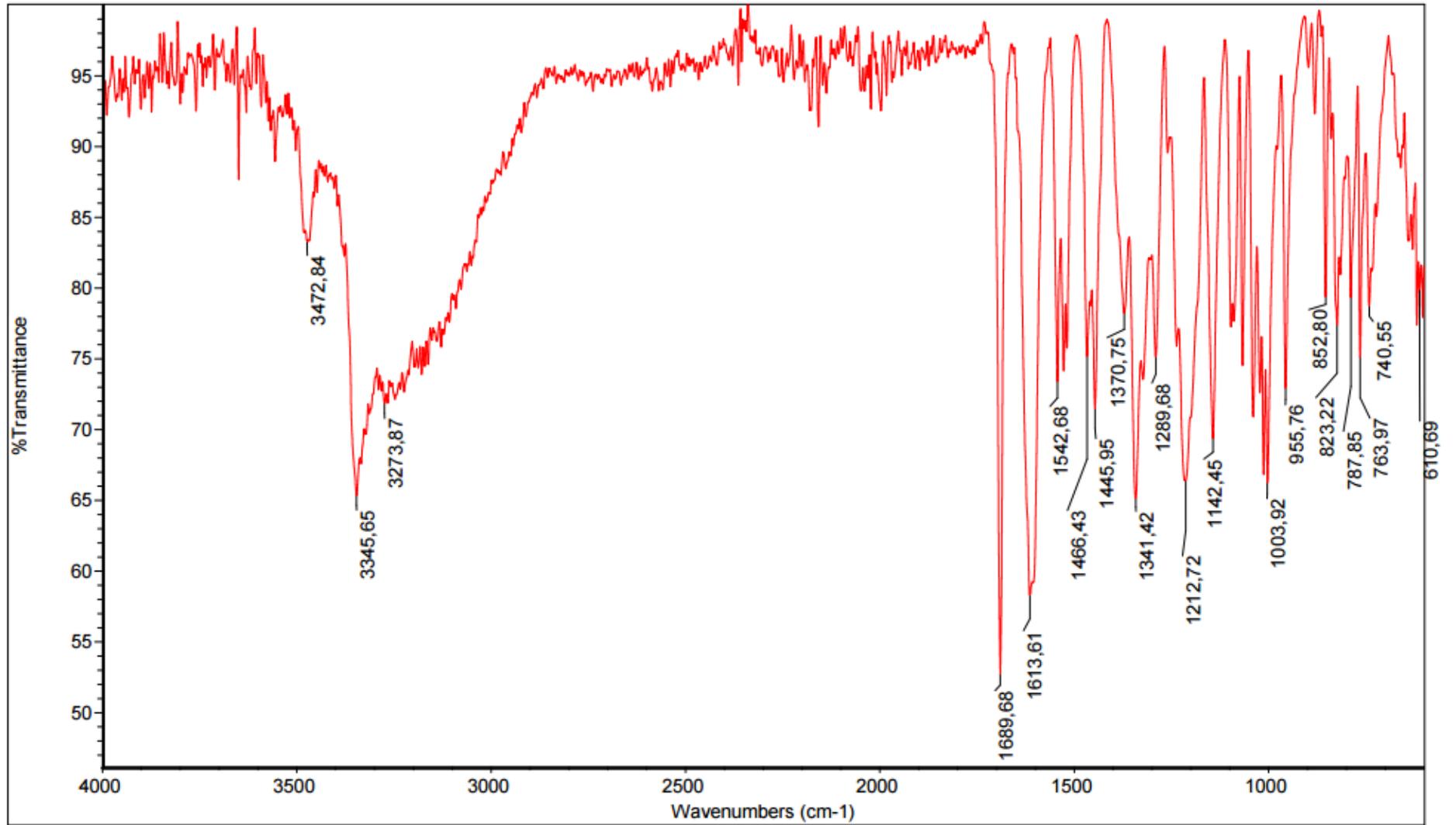
ANOREXÍGENOS - Espectro de RMN ^{13}Ca da Metanfetamina



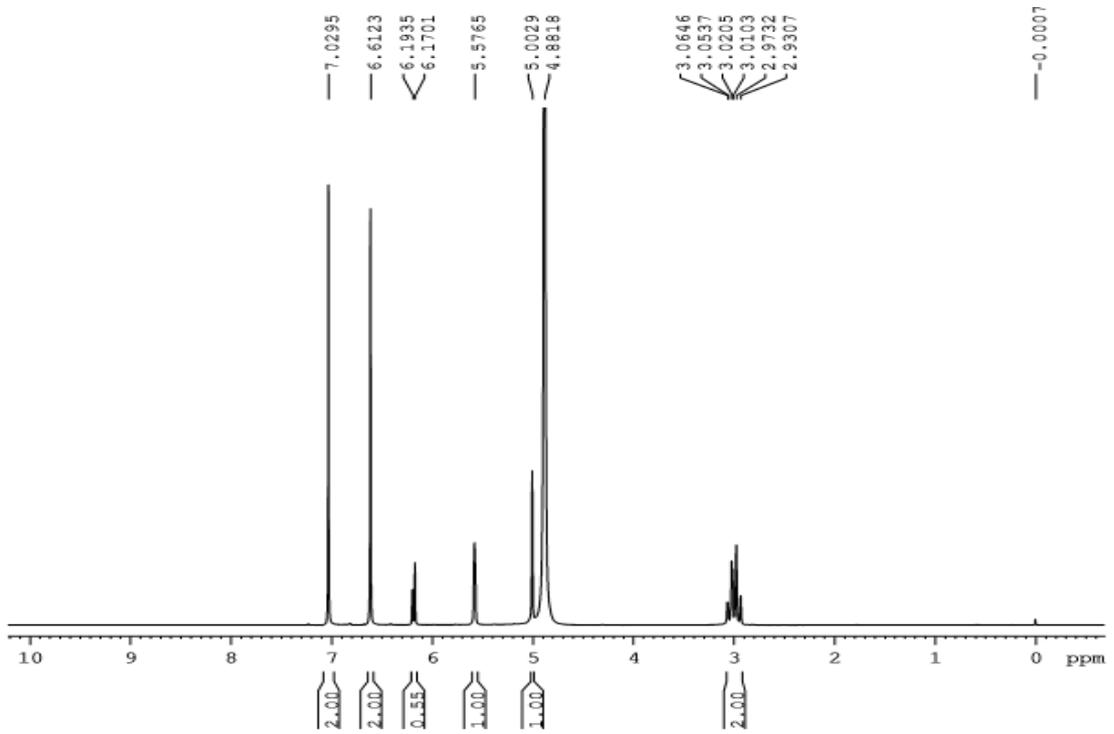
ANOREXÍGENOS - Espectro de massas da Metanfetamina



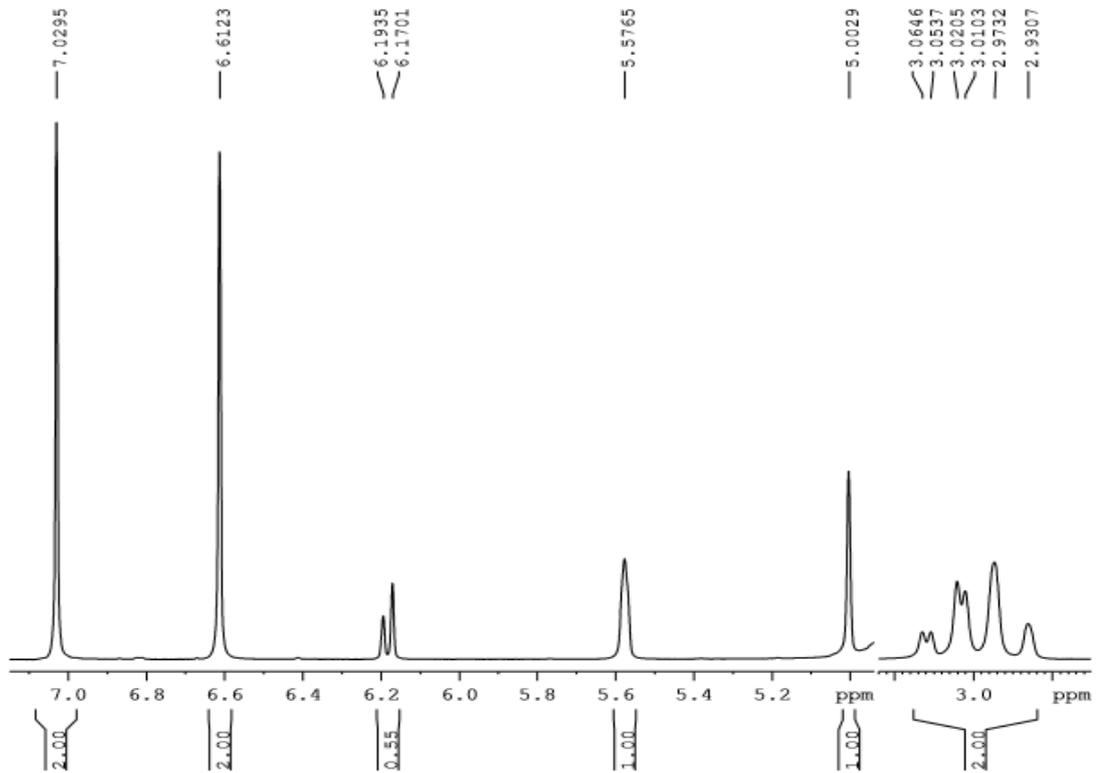
ANTIOXIDANTE - Espectro de infravermelho da Epigalocatequina- 3-galato



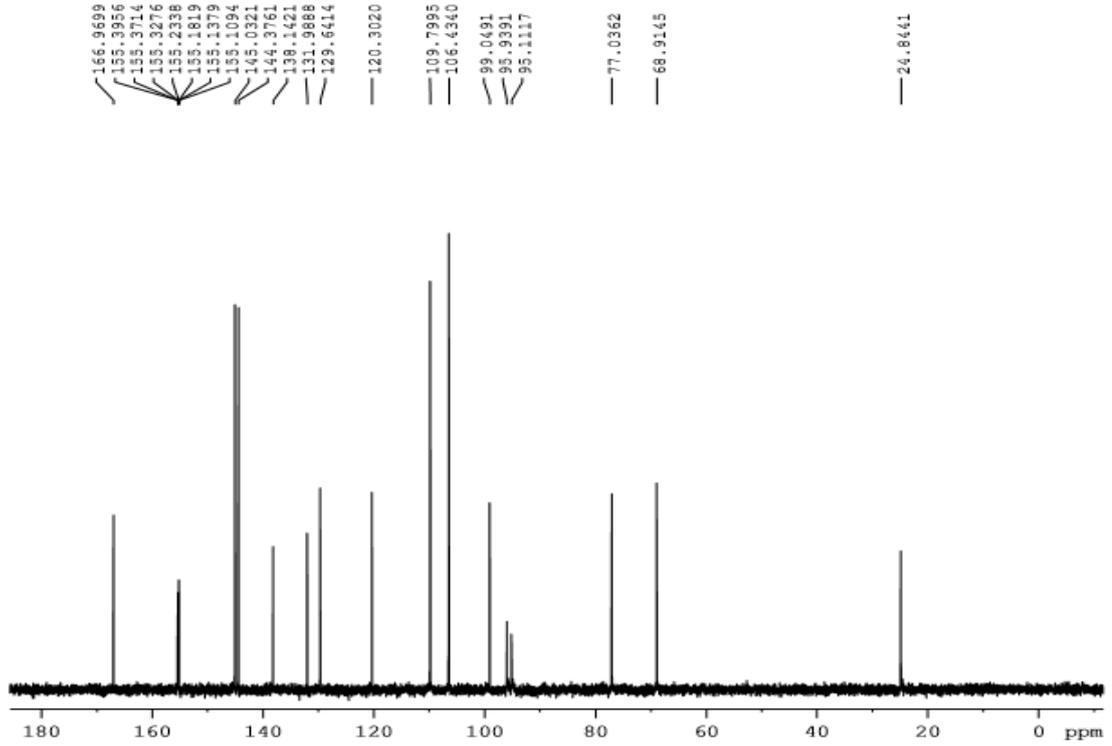
ANTIOXIDANTE - Espectro de RMN ¹H da Epigallocatequina-galato



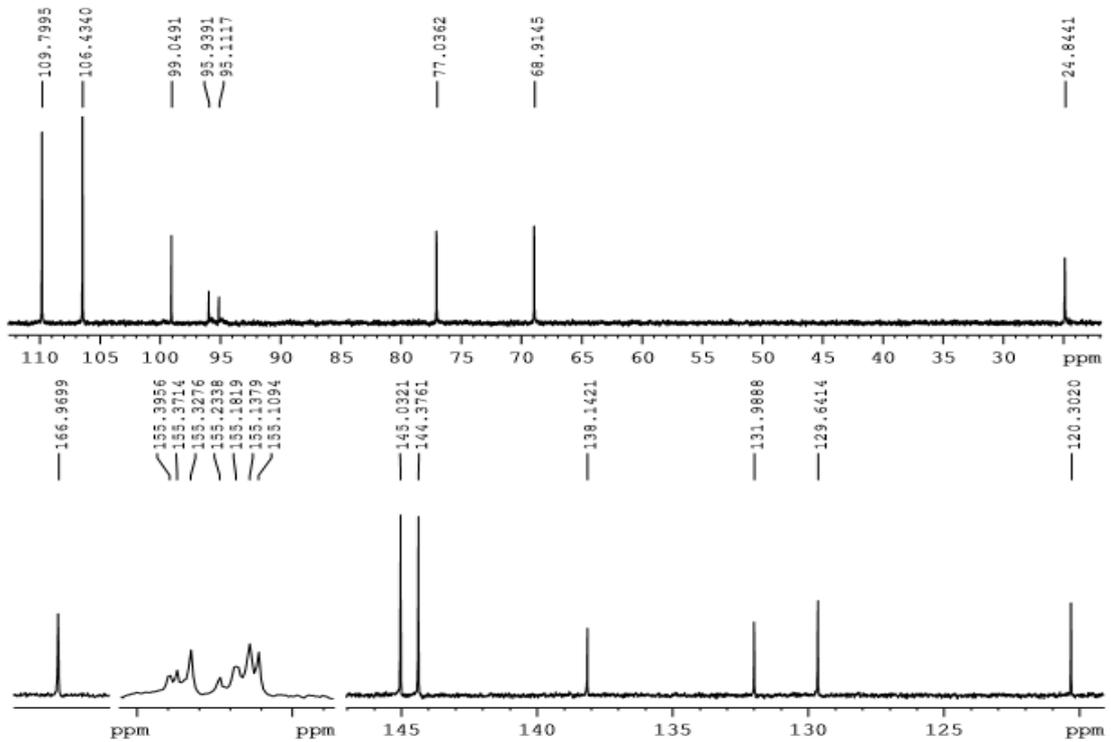
ANTIOXIDANTE - Espectro de RMN ¹H da Epigallocatequina-galato



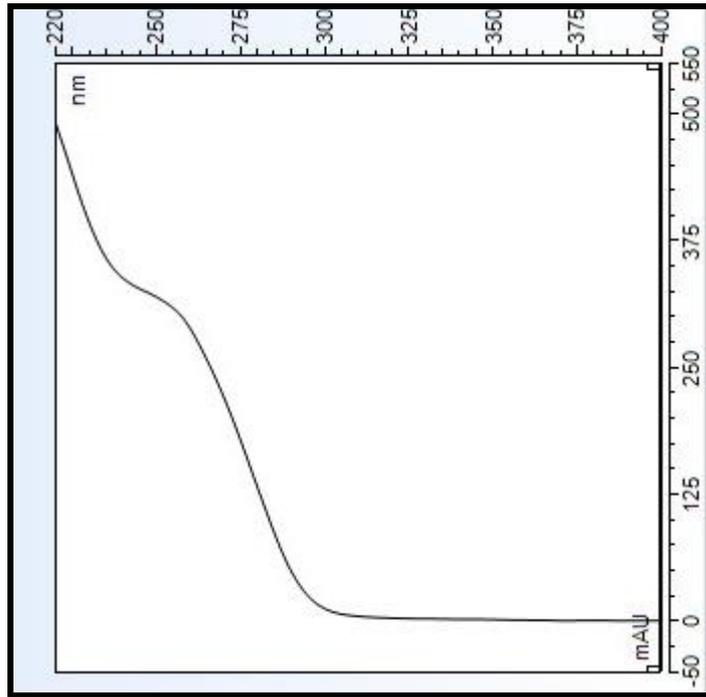
ANTIOXIDANTE - Espectro de RMN ¹³C da Epigallocatequina-galato



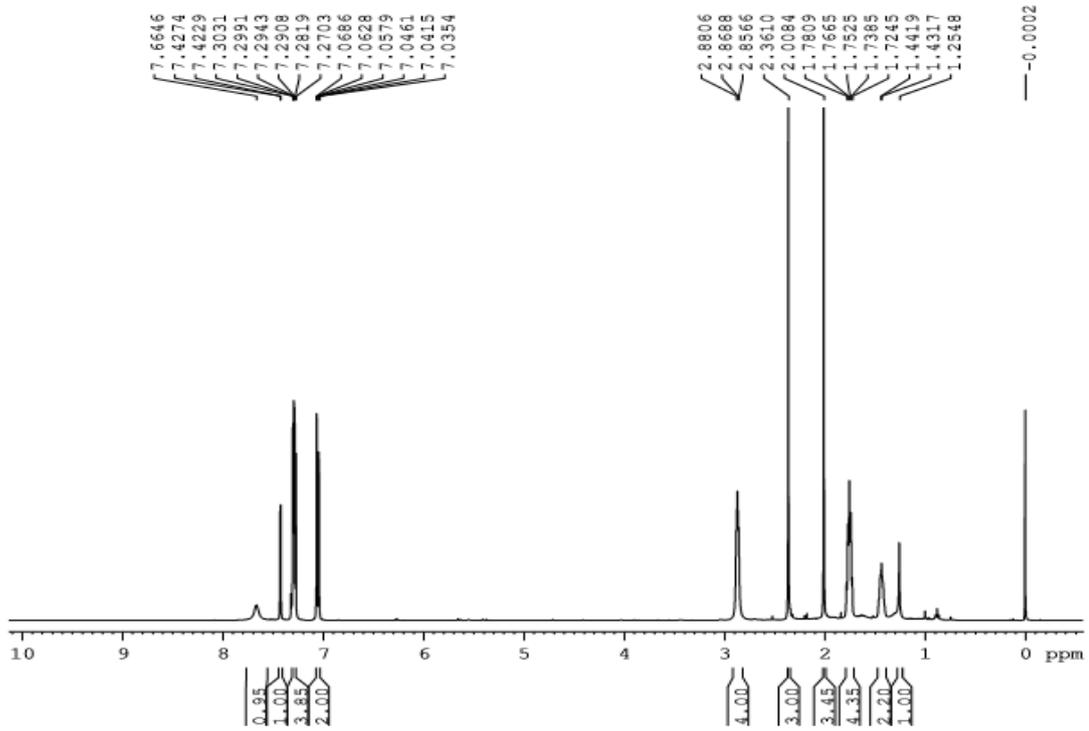
ANTIOXIDANTE - Espectro de RMN ¹³Ca da Epigallocatequina-galato



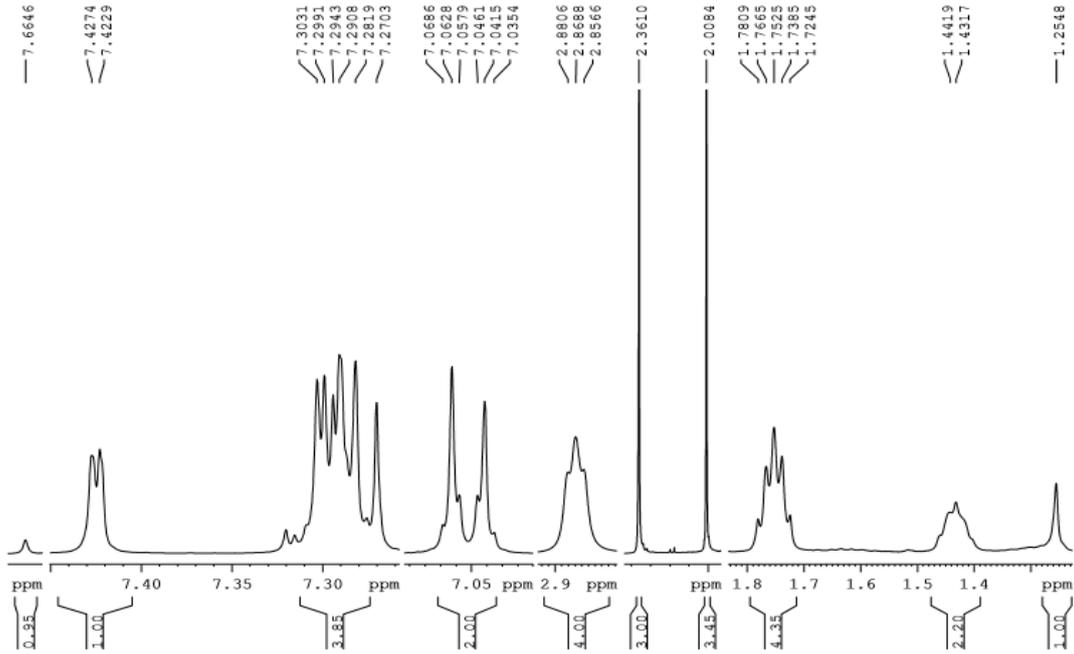
ANOREXÍGENOS - UV do Rimonabanto



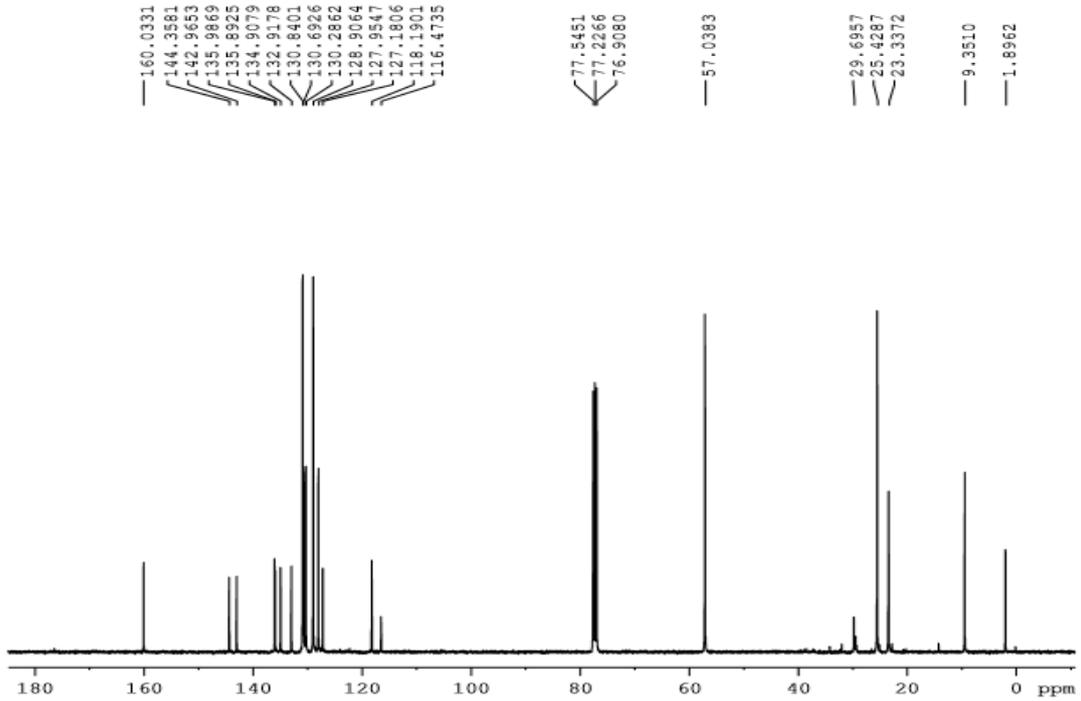
ANOREXÍGENOS - Espectro de RMN ¹H do Rimonabanto



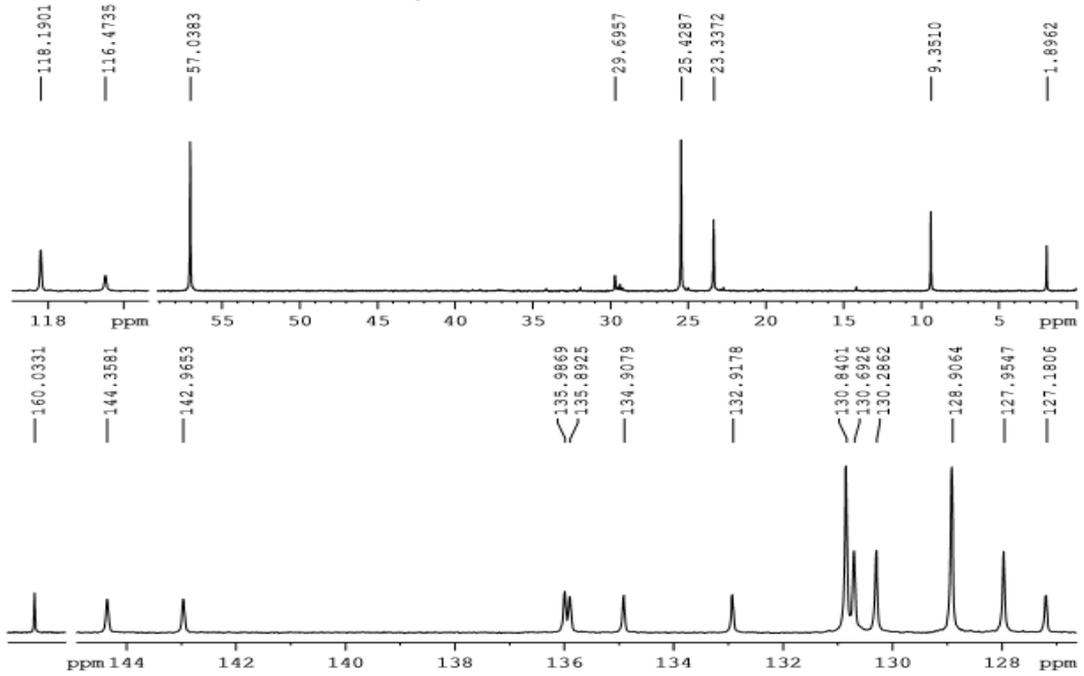
ANOREXÍGENOS - Espectro de RMN ¹Ha do Rimonabanto



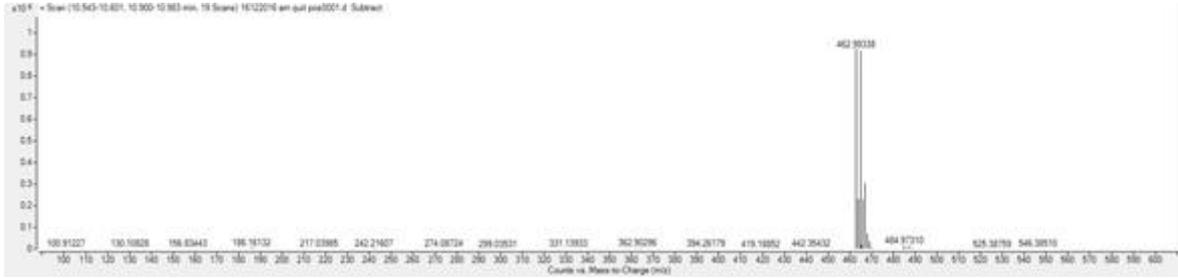
ANOREXÍGENOS - Espectro de RMN ¹³C do Rimonabanto

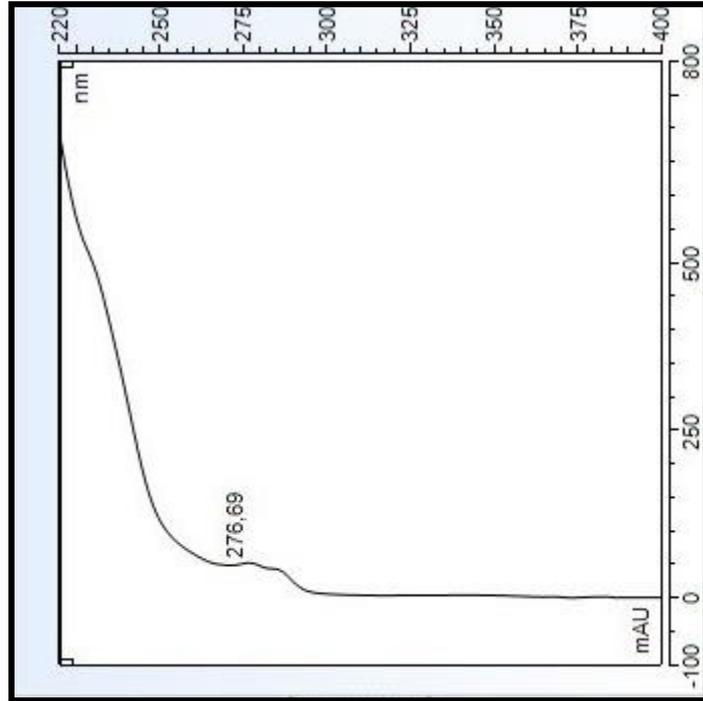


ANOREXÍGENOS - Espectro de RMN ¹³Ca do Rimonabanto

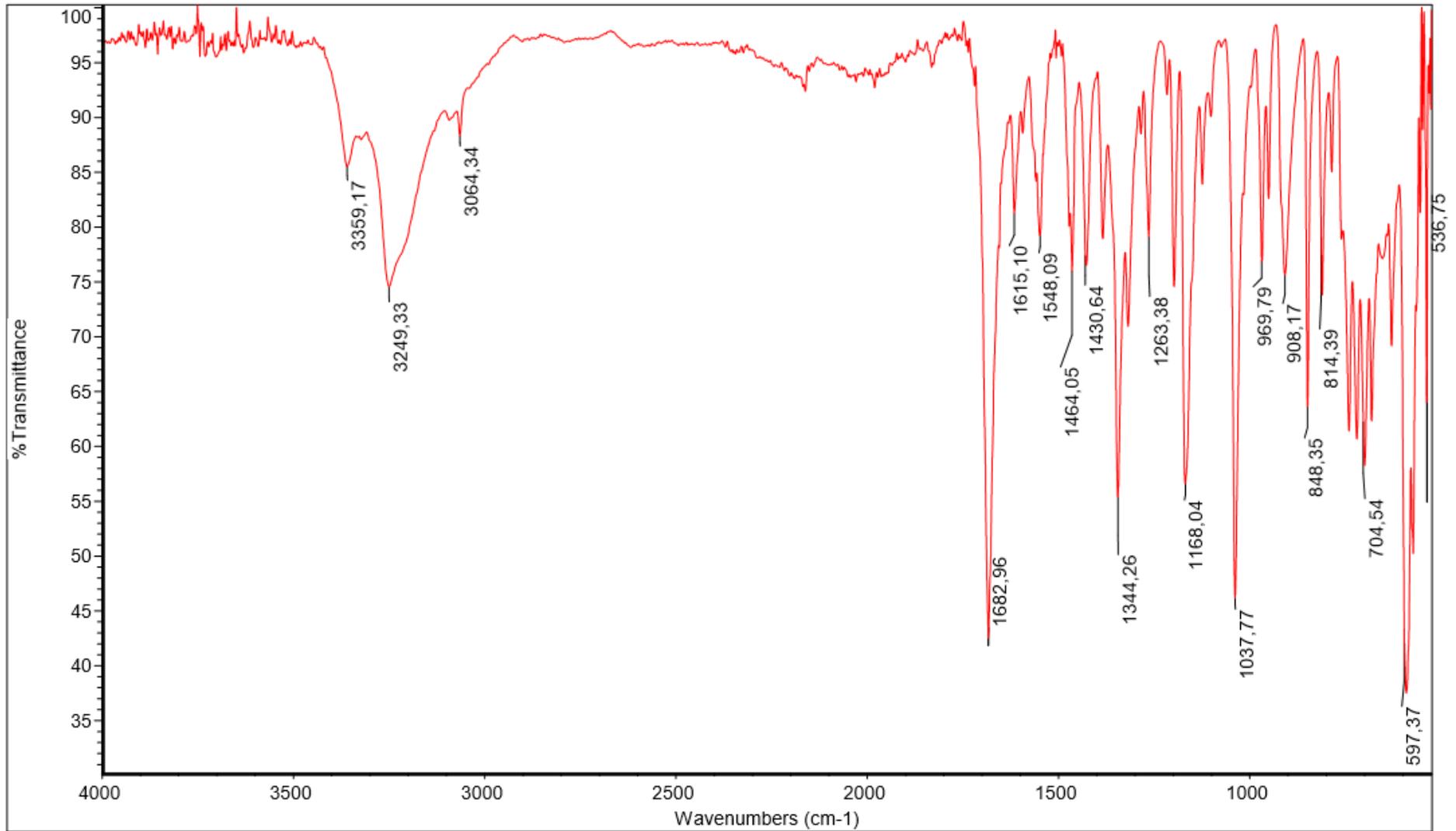


ANOREXÍGENOS - Espectro de massas do Rimonabanto

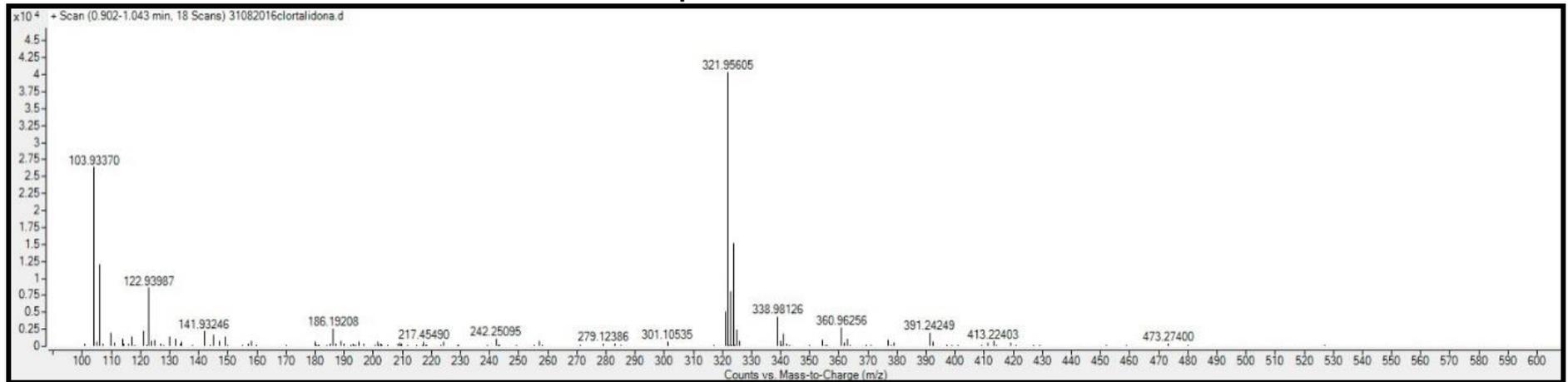


DIURÉTICOS - Ultravioleta - UV da Clortalidona

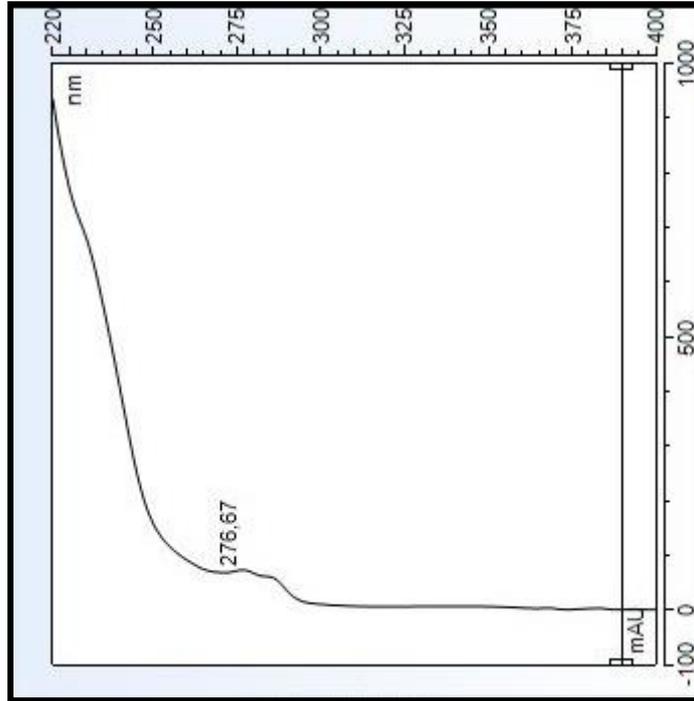
DIURÉTICOS - Espectro de Infravermelho da Clortalidona



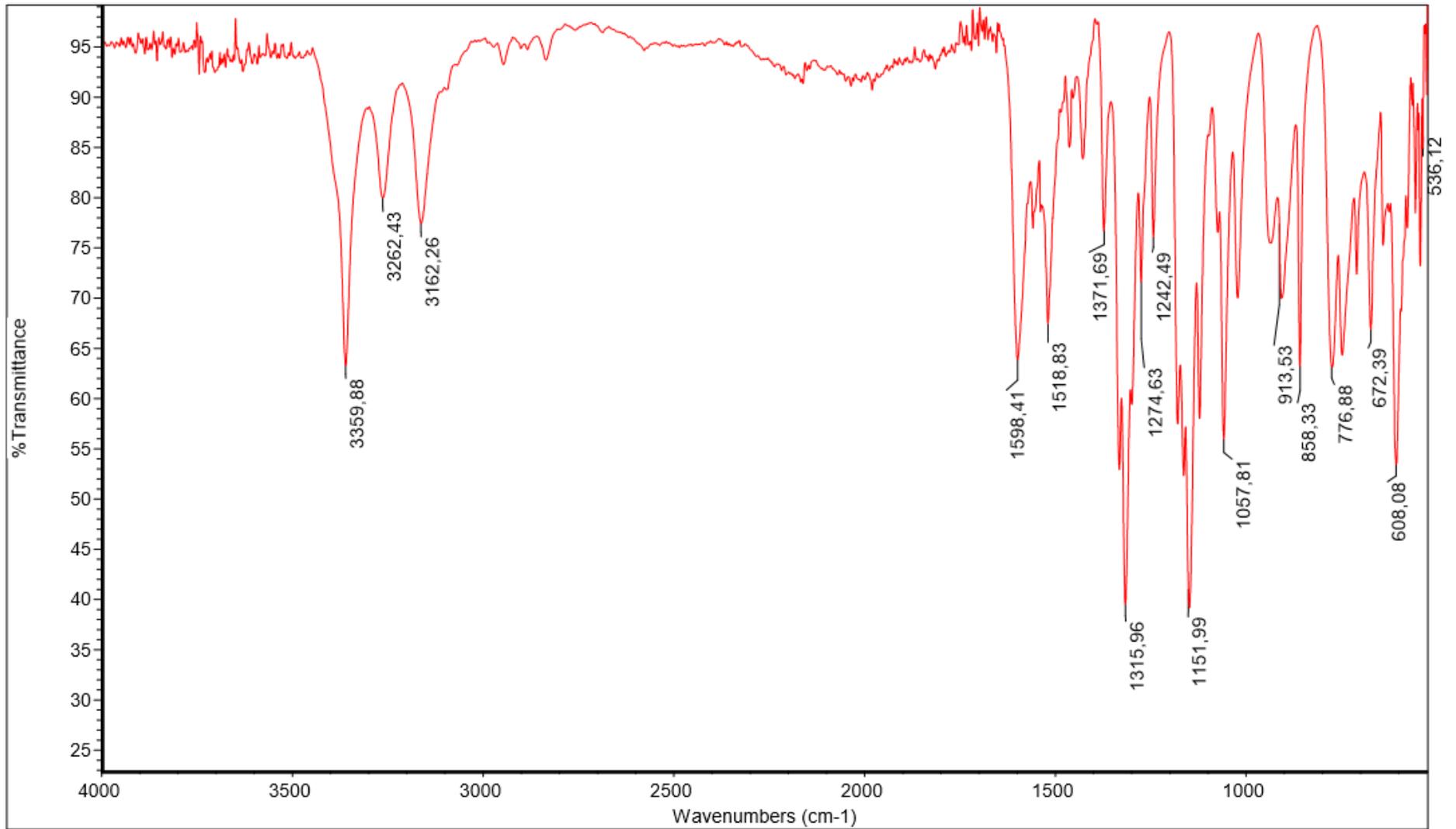
DIURÉTICOS - Espectro de massas da Clortalidona



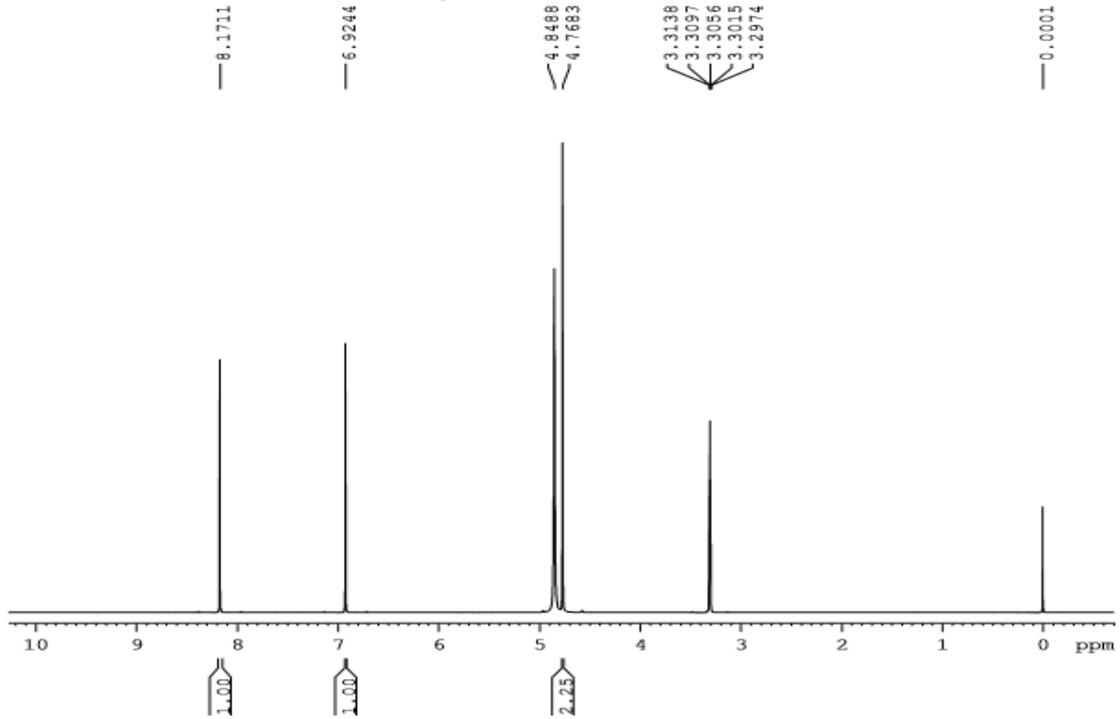
DIURÉTICOS - UV da Hidroclorotiazida



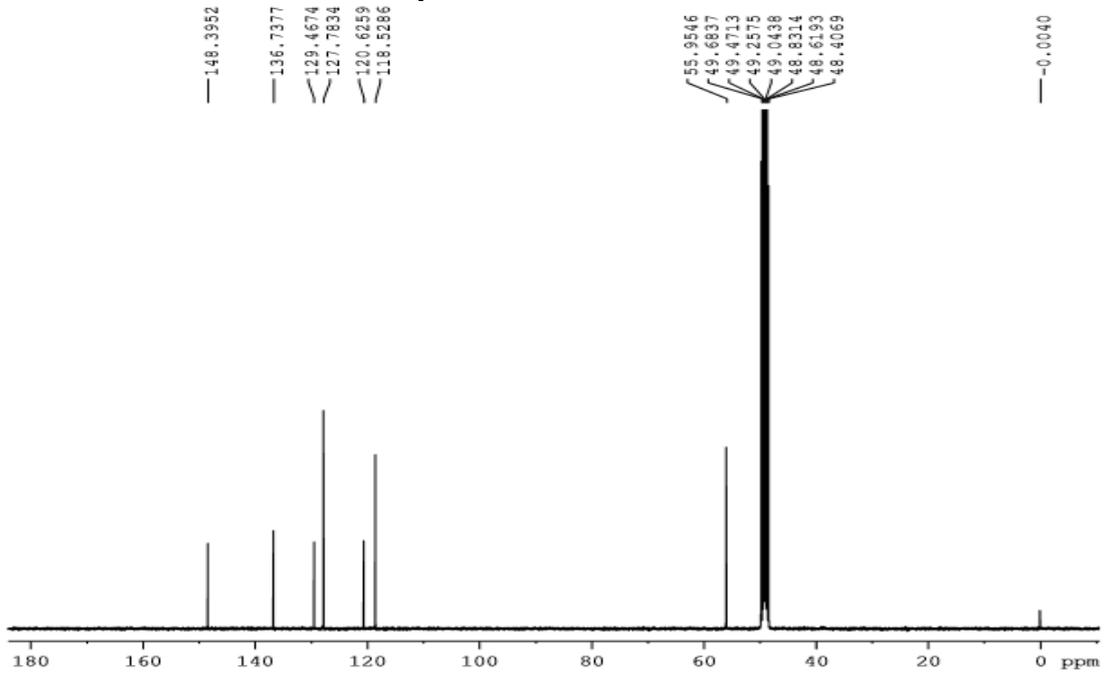
DIURÉTICOS - Espectro de Infravermelho da Hidroclorotiazida



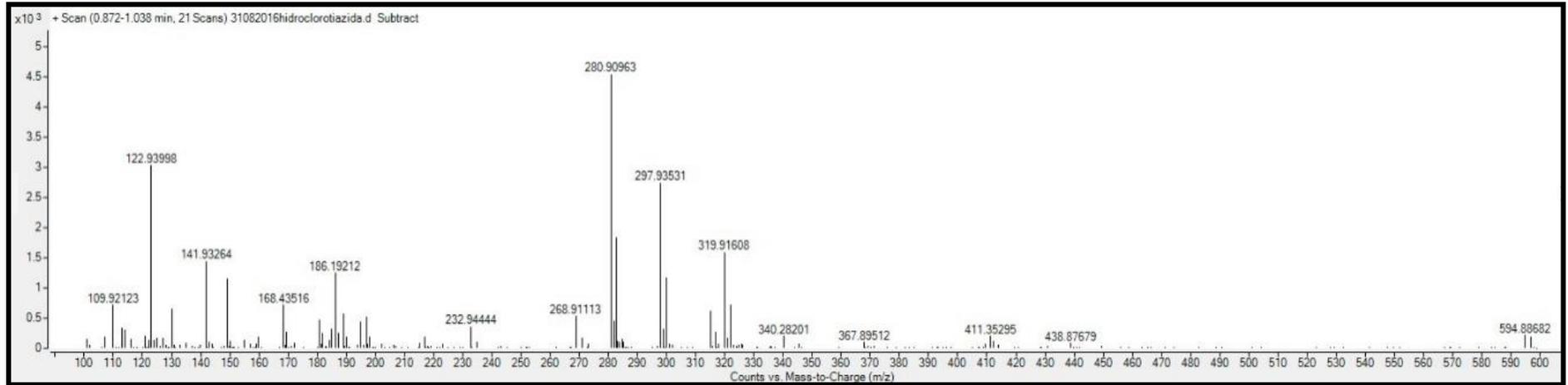
DIURÉTICOS - Espectro de RMN ^1H da Hidroclorotiazida

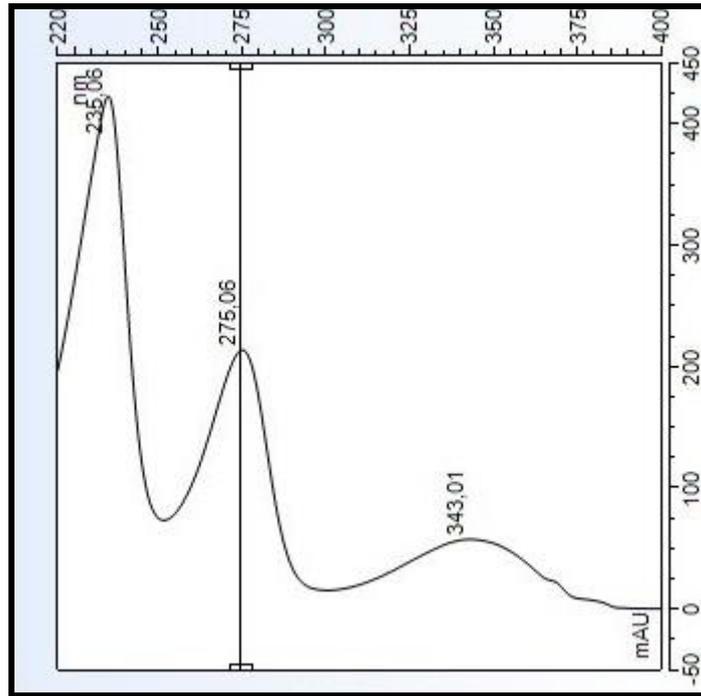


DIURÉTICOS - Espectro de RMN ^{13}C da Hidroclorotiazida

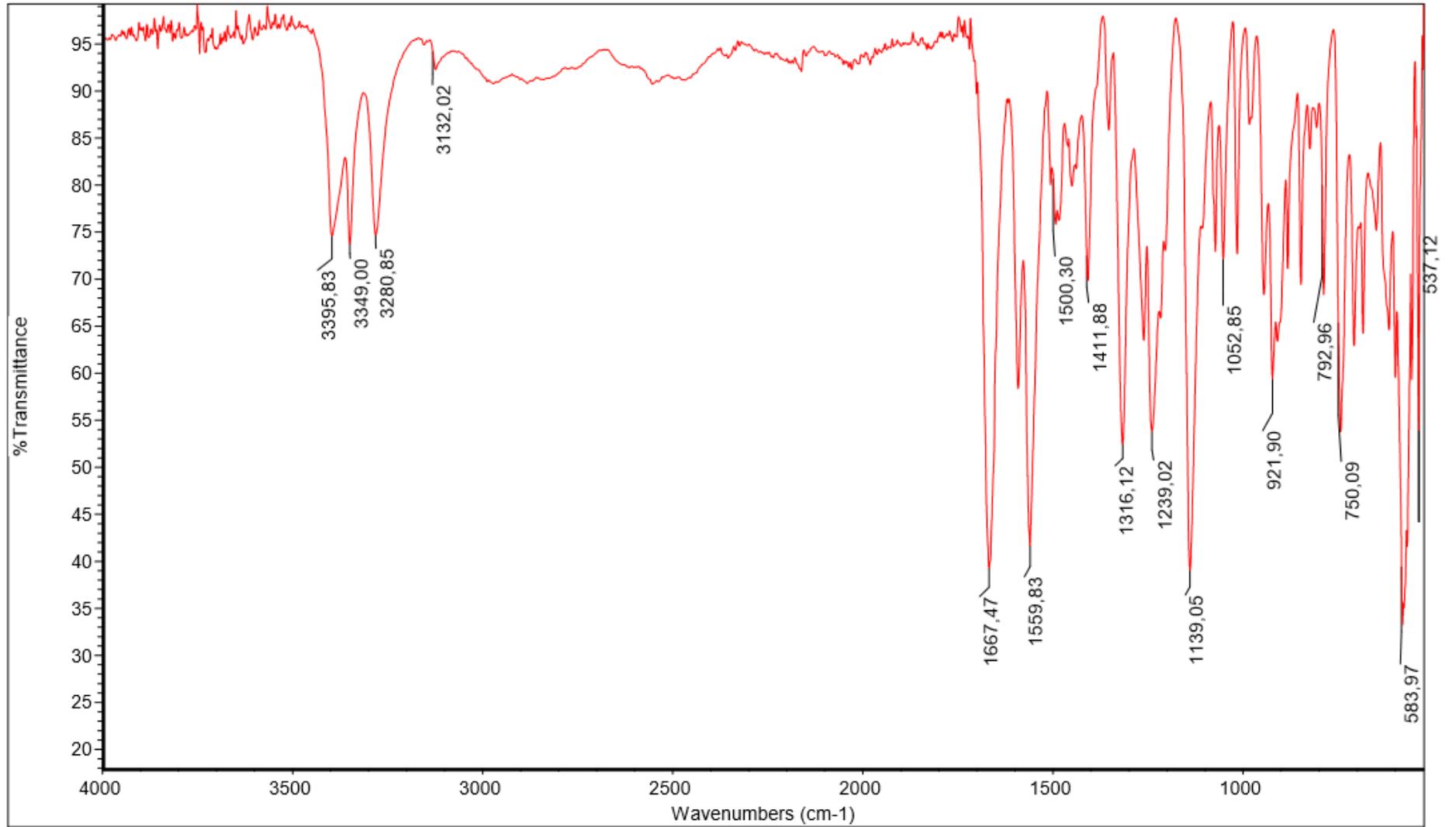


DIURÉTICOS - Espectro de massas da Hidroclorotiazida

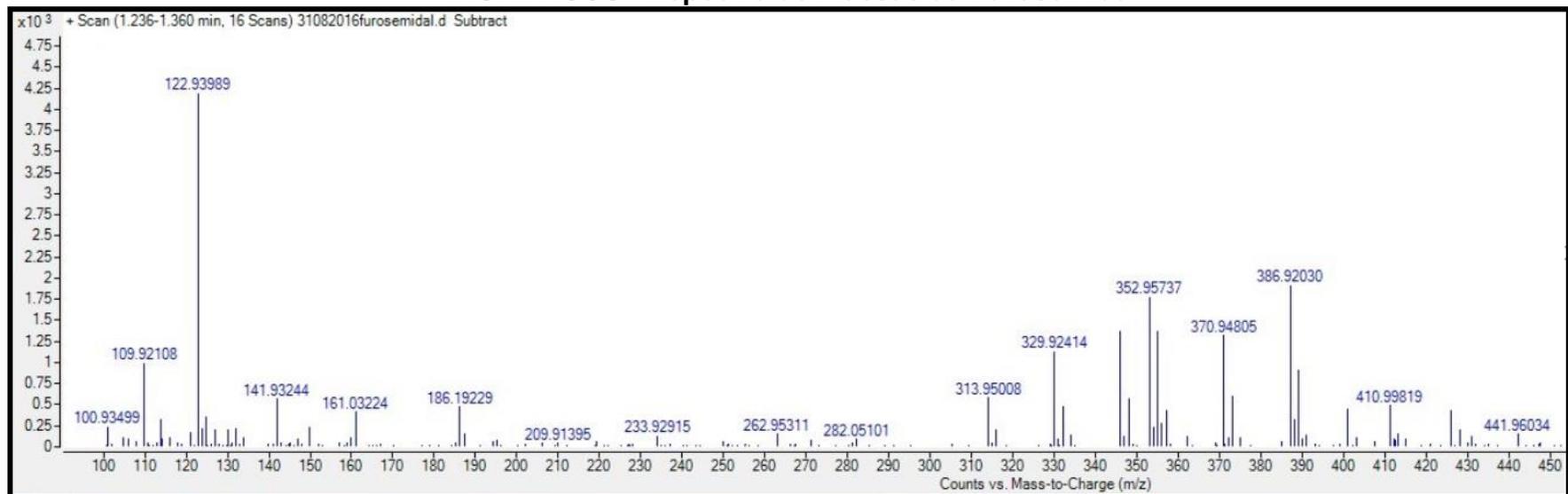


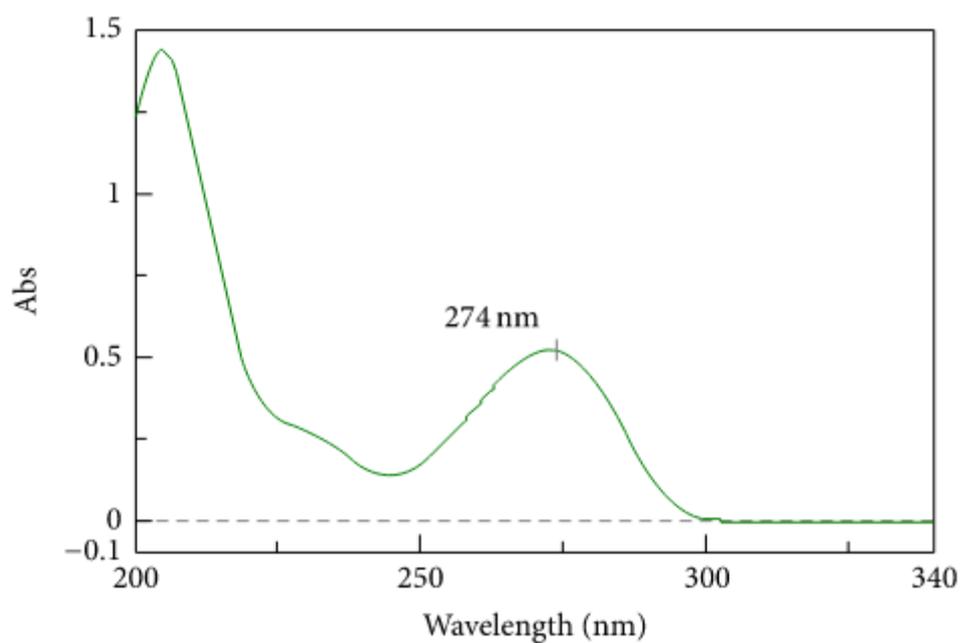
DIURÉTICOS - UV da Furosemida

DIURÉTICOS - Espectro de Infravermelho da Furosemida



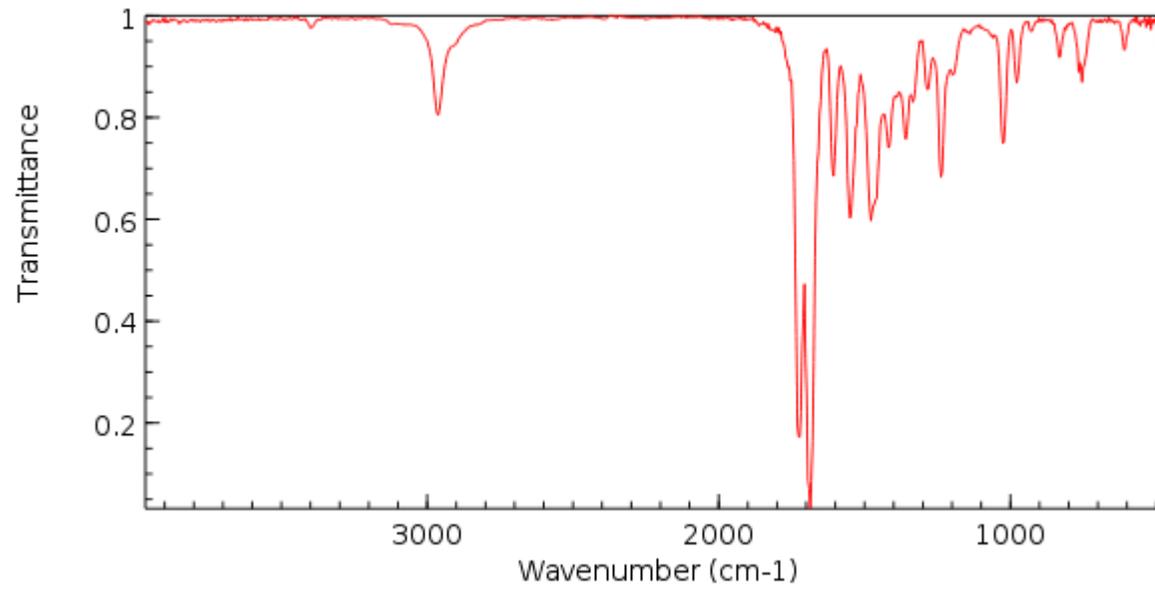
DIURÉTICOS - Espectro de massas da Furosemida



ESTIMULANTES – UV da Cafeína

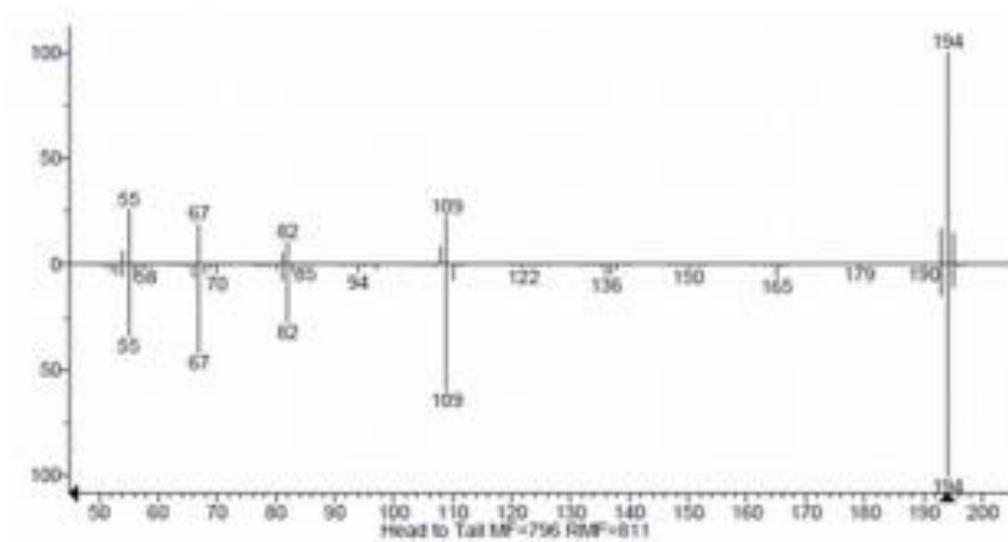
Fonte: Showkat Ahmad Bhawani, Sim Siong Fong, and Mohamad Nasir Mohamad Ibrahim, "Spectrophotometric Analysis of Caffeine," *International Journal of Analytical Chemistry*, vol. 2015, Article ID 170239, 7 pages, 2015. doi:10.1155/2015/170239

ESTIMULANTES- Espectro de infravermelho da Cafeína



Fonte: NIST Chemistry WebBook (<http://webbook.nist.gov/chemistry>).

ESTIMULANTES – Espectro de massas da Cafeína



Fonte: PRASNIEWSKI; AGUIAR; OLDONI, 2015.

PRASNIEWSKI, A.; AGUIAR, L. M.; OLDONI, T. L. C. Determinação de cafeína em chá preto (*Camellia sinensis*) por métodos cromatográficos: CCD, CLAE-DAD e CG-EM. *Syn. scy. UTFPR, Pato Branco*, v. 10, n. 1, p. 108–115, 2015.