



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS  
FARMACÊUTICAS**

**LARISSA SABO MÜLLER**

**ANÁLISE CROMATOGRÁFICA E ELETROFORÉTICA DE  
FÁRMACOS EM SUPLEMENTOS ALIMENTARES E AVALIAÇÃO DE  
INTERAÇÕES MEDICAMENTOSAS *IN SILICO***

Santa Maria, RS, Brasil  
2018



**Larissa Sabo Müller**

**ANÁLISE CROMATOGRÁFICA E ELETROFORÉTICA DE FÁRMACOS EM  
SUPLEMENTOS ALIMENTARES E AVALIAÇÃO DE INTERAÇÕES  
MEDICAMENTOSAS *IN SILICO***

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Doutor em Ciências Farmacêuticas**.

Orientador: Prof. Dr. Leandro Machado de Carvalho

Santa Maria, RS, Brasil  
2018



Universidade Federal de Santa Maria  
Centro de Ciências da Saúde  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

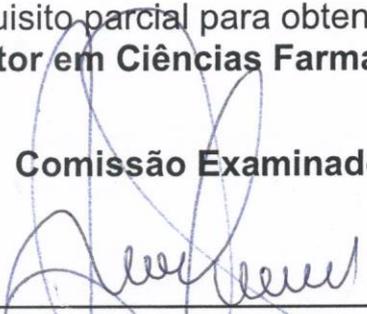
A Comissão Examinadora, abaixo assinada,  
aprova a Tese de Doutorado

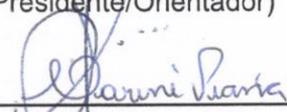
**ANÁLISE CROMATOGRÁFICA E ELETROFORÉTICA DE  
FÁRMACOS EM SUPLEMENTOS ALIMENTARES E AVALIAÇÃO  
DE INTERAÇÕES MEDICAMENTOSAS *IN SILICO***

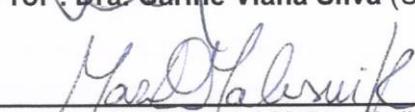
elaborada por  
**Larissa Sabo Müller**

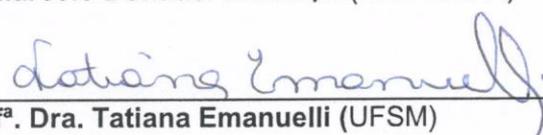
como requisito parcial para obtenção do grau de  
**Doutor em Ciências Farmacêuticas**

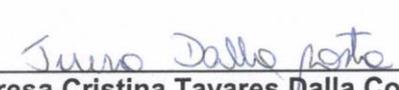
**Comissão Examinadora:**

  
\_\_\_\_\_  
**Prof. Dr. Leandro Machado de Carvalho**  
(Presidente/Orientador)

  
\_\_\_\_\_  
**Prof.ª Dra. Carine Viana Silva (UFSM)**

  
\_\_\_\_\_  
**Prof. Dr. Marcelo Donadel Malesuk (UNIPAMPA)**

  
\_\_\_\_\_  
**Prof.ª Dra. Tatiana Emanuelli (UFSM)**

  
\_\_\_\_\_  
**Prof.ª Dra. Teresa Cristina Tavares Dalla Costa (UFRGS)**

Santa Maria, 2 de março de 2018.



## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Leandro Machado de Carvalho, por todo aprendizado, por todas as oportunidades, por todas as conquistas divididas. Por ter me acolhido por 10 anos e por sempre ter acreditado no meu potencial. Pelo convívio, pelas cobranças, pelo empenho na realização dos meus sonhos profissionais. Muito obrigada.

Aos meus pais Lauri e Lisiane, que me permitiram escolher o meu caminho profissional sem restrições, e me deram o suporte e todas as oportunidades possíveis para que eu pudesse construir minha carreira. Obrigada por terem ajudado a moldar a pessoa que sou hoje, por terem me guiado sempre para o caminho do bem e da honestidade. Por terem sonhado comigo os meus sonhos. Sem vocês nada disso seria possível. Vocês são a minha referência e eu os amo muito.

Aos meus irmãos Lauriane, Letícia e Lourenço, obrigada por serem a minha família, meu aconchego. Obrigada por torcerem pela minha felicidade de forma genuína e por estarem, hoje, vibrando essa conquista junto comigo.

Às minhas sobrinhas Maria e Ana, crianças maravilhosas, sensíveis e que enchem os meus dias de alegria. Com vocês aprendo mais do que vocês podem imaginar.

Às minhas amigas do coração, Moni, Mari, Gabi, Gé, Lu e Ana, que tornaram essa caminhada mais leve, que me deram suporte, motivação, e sempre fizeram com que eu acreditasse em mim em momentos difíceis. O convívio com vocês foi especial e seremos para sempre uma grande família. Ana, minha companheira de vida e meu abraço apertado mesmo longe. Lu, minha conselheira, que tem o dom de me ensinar a pensar. Gé, minha confidente, que transforma angústias e receios em aprendizado e inspiração, que ficou comigo até o fim e que me ajuda a desenvolver a minha resiliência todos os dias. Amo muito vocês.

Ao meu casal preferido, Lucas e Marcella, que tanto me apoia e torce por mim. Que me faz perceber que o bem que fazemos retorna sempre em dobro. Sou abençoada por tê-los em minha vida.

Ao quarteto Ananda, Alex, Bruna e Thaís, que me “adotou” e sempre me fez sentir acolhida e amada. Vocês são especiais.

À minha amiga Ray, um ser humano único, que mesmo longe consegue se fazer presente todos os dias. Obrigada por torcer pela minha felicidade de forma tão sincera, tu é muito especial pra mim.

À minha amiga e conterrânea Pati, pelas tantas risadas, conselhos e companheirismo nas idas e vindas de quem mora longe dos pais.

Às minhas amigas Laís e Lyndsey, que me acolheram na minha chegada aos EUA de forma carinhosa e única, e que foram a minha família por 5 meses.

Aos demais amigos e colegas do LACHEM, que tanto me ensinaram, que tantos risos trouxeram aos meu dias ao longo de 10 anos. Meus parceiros e companheiros, vocês vão deixar muita saudade. Saibam que levo comigo um pedacinho de cada um, pois hoje sou um pedacinho de cada um de vocês.

À Prof<sup>a</sup>. Dra. Letícia Cruz, coordenadora do PPGCF, que não desistiu do meu sonho de cursar o doutorado sanduíche, e lutou por ele junto comigo até o fim.

Ao professor Hartmut Derendorf e à Universidade da Flórida, pelo acolhimento e por me permitirem ter acesso a tanto conhecimento.

À UFSM, minha casa por 12 anos, que me fez farmacêutica, mestre e doutora.

À banca avaliadora, pela disponibilidade e contribuições dadas a este trabalho.

À CAPES, pela concessão da bolsa de doutorado sanduíche, um dos meus maiores sonhos até hoje realizados.

A Deus, por ser o meu guia nos bons e maus momentos, e por não me deixar desistir nem por um minuto sequer de todos os sonhos que moram em mim.

*A vida não é sobre metas,  
conquistas e linhas de chegada.  
É sobre quem você se torna  
nessa caminhada.*



## RESUMO

### ANÁLISE CROMATOGRÁFICA E ELETROFORÉTICA DE FÁRMACOS EM SUPLEMENTOS ALIMENTARES E AVALIAÇÃO DE INTERAÇÕES MEDICAMENTOSAS *IN SILICO*

AUTORA: Larissa Sabo Müller  
ORIENTADOR: Leandro Machado de Carvalho

O aumento da procura de suplementos alimentares nos últimos anos leva a um cenário alarmante em relação à eficácia e segurança destes produtos. A falta de uma categoria específica para registro destes produtos propicia a prática da adulteração dos mesmos com fármacos sintéticos, o que propiciaria um efeito mais eficaz num curto espaço de tempo. Ainda, o número de usuários que consome suplementos concomitantemente com fármacos sintéticos tem aumentado muito nos últimos anos, o que pode causar sérias interações. Essa associação pode ser responsável por casos de falha terapêutica ou efeitos colaterais inesperados, além de riscos indiretos à saúde, o que ocorre quando o paciente utiliza o suplemento para fins terapêuticos apesar da falta de evidência de benefícios. Este trabalho descreve o desenvolvimento de dois métodos analíticos para a determinação de 10 fármacos (fluoxetina, paroxetina, cafeína, sinefrina, fenoltaleína, anfepramona, amilorida, clortalidona, hidroclorotiazida e furosemida) em 114 amostras de suplementos alimentares comercializados no Brasil. O primeiro método, empregando eletroforese capilar de zona (CZE) com detecção UV e C<sup>4</sup>D simultaneamente permite a determinação simultânea de antidepressivos, laxante, anorexígeno e diuréticos nas condições otimizadas: eletrólito de trabalho tampão fosfato 20 mmol L<sup>-1</sup> (pH 9,2) contendo 30% de metanol (v/v), potencial de separação -15 kV, temperatura 25 °C; injeção hidrodinâmica por gravidade em 20 cm durante 60 s. O método foi validado nos parâmetros de linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, precisão e exatidão. O método foi capaz de identificar os adulterantes presentes nas amostras com alta seletividade e sensibilidade. O segundo método, empregando HPLC com detecção amperométrica pulsada permite a detecção de estimulantes e diuréticos nas seguintes condições: fase móvel tampão fosfato 5 mmol L<sup>-1</sup> (pH 4,5) contendo SDS 0,3 mmol L<sup>-1</sup> e 50% de metanol (v/v); coluna C18; potencial de amostragem de +0,8V; potenciais de limpeza de -0,2V e +1,0V; fluxo de 1,0 mL/min. Foi realizada ainda uma simulação utilizando modelo *in silico* para a previsão de interação medicamentosa entre sertralina e cafeína e sertralina e sildenafil. Os métodos analíticos foram capazes de detectar a presença de estimulantes e diuréticos nas amostras analisadas, sendo que em cerca de 18% das amostras os níveis de cafeína estavam acima do limite diário máximo recomendado. Hidroclorotiazida e/ou furosemida foram encontradas em 12% das amostras de suplemento. Em relação aos estudos de interação medicamentosa, a sertralina não interagiu farmacocineticamente com a cafeína, porém aumentou a ASC do sildenafil em 72% no regime de dose única e em 138% no estudo de *steady state* pelo período de 30 dias.

Palavras-chave: Suplementos alimentares. Adulteração. Eletroforese Capilar. Detecção Amperométrica. Interações Medicamentosas. *In silico*.



## ABSTRACT

### CHROMATOGRAPHIC AND ELECTROPHORETIC ANALYSIS OF DRUGS IN DIETARY SUPPLEMENTS AND *IN SILICO* EVALUATION OF DRUG-DRUG INTERACTIONS

AUTHOR: LARISSA SABO MÜLLER  
ADVISOR: LEANDRO MACHADO DE CARVALHO

The increased demand for dietary supplements in recent years leads to an alarming scenario regarding the efficacy and safety of these products. The lack of a specific category for registration of these products leads to the practice of adulteration them with synthetic drugs, which would provide a better effectiveness in a short period of time. Still, the number of patients consuming supplements concomitantly with synthetic drugs has increased greatly in recent years, which can cause serious interactions. This association may be responsible for cases of unexpected therapeutic failure or side effects, as well as indirect health risks, which occur when the patient uses the supplement for therapeutic purposes despite the lack of evidence of benefits. This work describes the development of two analytical methods for the determination of 10 drugs (fluoxetine, paroxetine, caffeine, synephrine, phenolphthalein, amfepramone, amiloride, chlorthalidone, hydrochlorothiazide and furosemide) in 114 samples of dietary supplements marketed in Brazil. The first method, using capillary zone electrophoresis (CZE) with UV and C<sup>4</sup>D detection simultaneously allows the simultaneous determination of antidepressants, laxative, anorectic and diuretics under optimized conditions: working electrolyte 20 mmol L<sup>-1</sup> phosphate buffer (pH 9.2) containing methanol 30% (v / v), separation potential -15 kV, temperature 25 ° C; hydrodynamic injection by gravity at 20 cm for 60 s. The method was validated in the parameters of linearity, limit of detection, limit of quantification, precision and accuracy. The method was able to identify the adulterants present in the samples with high selectivity and sensitivity. The second method employing HPLC with pulsed amperometric detection allows the detection of stimulants and diuretics under the following conditions: mobile phase phosphate buffer 5 mmol L<sup>-1</sup> (pH 4.5) containing SDS 0.3 mmol L<sup>-1</sup> and 50% methanol v / v); C18 column; sampling potential of + 0.8V; cleaning potentials of -0.2V and + 1.0V; flow rate of 1.0 mL / min. Also, a simulation was performed using an *in silico* model to predict drug interaction between sertraline and caffeine and sertraline and sildenafil. The analytical methods were able to detect the presence of stimulants and diuretics in the analyzed samples, and in ca. 18% of the samples the caffeine levels were above the maximum recommended daily limit. Hydrochlorothiazide and / or furosemide were found in 12% of the supplement samples. Regarding drug interaction studies, sertraline did not interact pharmacokinetically with caffeine, but increased sildenafil ASC by 72% in the single dose regimen and 138% in the steady state study over the 30 day period.

**Keywords:** Food supplements. Adulteration. Capillary Electrophoresis. Amperometric Detection Drug-drug Interactions. *In silico*.



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Fórmula estrutural da cafeína e alguns suplementos à base de cafeína disponíveis no mercado brasileiro.....	29
Figura 2 - Fórmula estrutural da creatina e alguns suplementos à base de creatina disponíveis no mercado brasileiro.....	30
Figura 3 - Fórmula estrutural da arginina e alguns suplementos à base de arginina disponíveis no mercado brasileiro.....	31
Figura 4 - Fórmula estrutural da $\beta$ -alanina e alguns suplementos à base de $\beta$ -alanina disponíveis no mercado brasileiro.....	31
Figura 5 - Fórmula estrutural do picolinato de cromo e alguns suplementos à base de picolinato de cromo disponíveis no mercado brasileiro.....	32
Figura 6 - Fórmula estrutural da maltodextrina e alguns suplementos à base de maltodextrina disponíveis no mercado brasileiro.....	33
Figura 7 - Fórmula estrutural da fenilalanina e alguns suplementos à base de fenilalanina disponíveis no mercado brasileiro.....	33
Figura 8 - Fórmula estrutural da quitosana e alguns suplementos à base de quitosana disponíveis no mercado brasileiro.....	34
Figura 9 - Alguns suplementos à base de psyllium disponíveis no mercado brasileiro.....	35
Figura 10 - Fórmula estrutural dos aminoácidos de cadeia ramificada e alguns suplementos de BCAA disponíveis no mercado brasileiro.....	35
Figura 11 - Trechos de alguns websites utilizados para a aquisição dos suplementos alimentares analisados neste trabalho.....	36
Quadro 1 - Métodos analíticos descritos na literatura para a determinação de adulterantes em suplementos alimentares nos últimos anos.....	43
Quadro 2 – Categorias para registro dos suplementos alimentares comercializados no Brasil.....	49
Figura 12 - Esquema das variáveis envolvidas na previsão do comportamento farmacocinético de drogas pelo Simcyp®: interação entre fatores genéticos, demográficos, anatômicos, fisiológicos e específicos. (B:P: taxa de partição sangue:plasma; fu: fração livre da droga no plasma; $K_m$ : constante Michaelis; PSA: área de superfície polar; $V_{max}$ : velocidade da reação catalisada por enzima na concentração infinita de substrato).....	54
Quadro 3 - Fármacos em estudo neste trabalho e suas respectivas estruturas moleculares.....	58
Quadro 4 - Suplementos alimentares adquiridos como amostras para a realização desta pesquisa...60	
Figura 13 – Esquema do equipamento de CE construído em laboratório.....	67
Figura 14 – Eletrodo de ouro utilizados nas determinações por HPLC-PAD.....	68
Figura 15 – <i>Printscreen</i> da interface para entrada de parâmetros do composto no Simcyp.....	70
Figura 16 - Eletroferograma dos analitos estudados (1) fluoxetina 100 mg L <sup>-1</sup> , (2) paroxetina 100 mg L <sup>-1</sup> (3) amilorida 100 mg L <sup>-1</sup> , (4) anfepramona 100 mg L <sup>-1</sup> , (5) clortalidona 200 mg L <sup>-1</sup> , (6) fenolftaleína	

200 mg L<sup>-1</sup>, (7) hidroclorotiazida 100 mg L<sup>-1</sup> e (8) furosemida 100 mg L<sup>-1</sup>. Condições: eletrólito de trabalho tampão fosfato 20 mmol L<sup>-1</sup> (pH 9,2) contendo metanol 30% (v/v), potencial de separação de -15 Kv, capilar de sílica fundida 75 µm x 360 µm x 68 cm (46 cm até o detector); detecção indireta por C<sup>4</sup>D operando em 400 kHz; temperatura 25°C; injeção hidrodinâmica por gravidade de 20 cm durante 60s.....72

Figura 17 - Eletroferograma dos analitos estudados: fluoxetina, paroxetina, amilorida, anfepramona, clortalidona, fenolftaleína, hidroclorotiazida e furosemida 150mg L<sup>-1</sup>. Condições: eletrólito de trabalho tampão fosfato 20 mmol L<sup>-1</sup> (pH 9,2) contendo metanol 30% (v/v), potencial de separação de -15Kv, capilar de sílica fundida 75 µm x 360 µm x 68 cm (46 cm até o detector); detecção ultravioleta com comprimento de onda de 210nm (A) e 229nm (B); temperatura 25°C; injeção hidrodinâmica por gravidade d 20 cm durante 60s.....74

Figura 18 - Eletroferograma dos analitos estudados: fluoxetina, paroxetina, amilorida, anfepramona, clortalidona, fenolftaleína, hidroclorotiazida e furosemida 150 mg L<sup>-1</sup>. Condições: eletrólito de trabalho tampão fosfato 20 mmol L<sup>-1</sup> (pH 9,2) contendo diferentes concentrações de metanol, potencial de separação de -15Kv, capilar de sílica fundida 75 µm x 360 µm x 68 cm (46 cm até o detector); detecção ultravioleta com comprimento de onda de 210 nm (A) e 229 nm (B); temperatura 25°C; injeção hidrodinâmica por gravidade de 20 cm durante 60s.....75

Figura 19 - Eletroferograma dos analitos estudados: fluoxetina, paroxetina, amilorida, anfepramona, clortalidona, fenolftaleína, hidroclorotiazida e furosemida 150 mg L<sup>-1</sup>. Condições: eletrólito de trabalho tampão fosfato 20 mmol L<sup>-1</sup> (pH 9,2) contendo diferentes concentrações de acetonitrila, potencial de separação de -15Kv, capilar de sílica fundida 75 µm x 360 µm x 68 cm (46 cm até o detector); detecção ultravioleta com comprimento de onda de 210 nm (A) e 229 nm (B); temperatura 25°C; injeção hidrodinâmica por gravidade de 20 cm durante 60s.....76

Figura 20 - Eletroferograma dos analitos estudados (1) amilorida 100 mg L<sup>-1</sup>, (2) anfepramona 100 mg L<sup>-1</sup>, (3) clortalidona 200 mg L<sup>-1</sup>, (4) fenolftaleína 200 mg L<sup>-1</sup>, (5) hidroclorotiazida 100 mg L<sup>-1</sup> e (6) furosemida 100 mg L<sup>-1</sup>. Condições: eletrólito de trabalho tampão fosfato 20 mmol L<sup>-1</sup> (pH 9,2) contendo metanol 30% (v/v), potencial de separação de -15 Kv, capilar de sílica fundida 75 µm x 360 µm x 68 cm (46 cm até o detector); detecção UV em 260 nm; temperatura 25°C; injeção hidrodinâmica por gravidade de 20 cm durante 60s.....77

Figure 21 - Eletroferogramas da amostra 38 contendo hidroclorotiazida como adulterante. Detecção por CZE-C<sup>4</sup>D-UV: **(A)** C<sup>4</sup>D em 400 kHz e **(B)** UV em 260 nm. Outras condições estão descritas na figura 16.....81

Figura 22 - Eletroferogramas da amostra 47 contendo hidroclorotiazida e furosemida como adulterantes. Detecção por CZE-C<sup>4</sup>D-UV: **(A)** C<sup>4</sup>D em 400 kHz e **(B)** UV em 260 nm. Outras condições estão descritas na figura 16.....82

Figura 23 - Cromatograma dos adulterantes (20 mg L<sup>-1</sup>) (1) hidroclorotiazida, (2) clortalidona e (3) furosemida. Condições: fase móvel tampão fosfato 5 mmol L<sup>-1</sup> (pH 4,5) contendo SDS 0,3 mmol L<sup>-1</sup> e metanol 50% (v/v); coluna C18; potencial de amostragem de +0,8V; potenciais de limpeza de -0,2V e +1,0V; fluxo de 1,0 mL/min.....83

Figura 24 - Voltamogramas dinâmicos no eletrodo de ouro para hidroclorotiazida, clortalidona, furosemida, cafeína e sinefrina (1 mmol L<sup>-1</sup>). Eletrólito suporte: tampão fosfato 5 mmol L<sup>-1</sup> (pH 4,5). Eletrodo de referência: eletrodo de hidrogênio em fase sólida.....84

Figura 25 - Cromatograma dos adulterantes (20 mg L<sup>-1</sup>) (HCTZ) hidroclorotiazida, (CAF) cafeína, (CLT) clortalidona, (FUR) furosemida e (SIN) sinefrina. Condições: fase móvel tampão fosfato 5 mmol L<sup>-1</sup> (pH 4,5) contendo SDS 0,3 mmol L<sup>-1</sup> e metanol 50% (v/v); coluna C18; potencial de amostragem de +0,8V; potenciais de limpeza de -0,2V e +1,0V; fluxo de 1,0 mL/min.....86

Figura 26. Distribuição do teor de cafeína nas amostras de suplementos alimentares por faixa de concentração. Os resultados foram obtidos através do método HPLC-PAD.....	91
Figura 27 - Cromatograma da amostra 1B contendo hidroclorotiazida e cafeína. Detecção por HPLC-DAD. Outras condições estão descritas na figura 25.....	94
Figura 28 - Fluxograma com as características comuns e específicas dos métodos de HPLC com detecção amperométrica, CZE com detecção UV e CZE com detecção C <sup>4</sup> D.....	96
Figura 29 - Perfis de concentração plasmática para sertralina (100 mg) e seu metabólito ativo. Sertralina (● e ○) e N-desmetilsertralina (■ e □) para dados preditos e observados, respectivamente.....	99
Figura 30 - Previsão do efeito da sertralina no perfil farmacocinético da cafeína para dose única e doses contínuas pelo período de 30 dias, respectivamente. O traço contínuo representa o perfil farmacocinético da cafeína e o traço segmentado se refere ao perfil farmacocinético da cafeína após ingestão de cafeína e sertralina.....	101
Figura 31 - Distribuição da participação das enzimas CYP no metabolismo da cafeína.....	103
Figura 32 - Previsão do efeito da sertralina no perfil farmacocinético do sildenafil para dose única e doses contínuas pelo período de 30 dias, respectivamente. O traço contínuo representa o perfil farmacocinético do sildenafil e o traço segmentado se refere ao perfil farmacocinético do sildenafil após ingestão de sildenafil e sertralina.....	104
Figura 33 - Distribuição da participação das enzimas CYP no metabolismo do sildenafil.....	106



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Figuras de mérito do método por eletroforese capilar com detecção C <sup>4</sup> D-UV para a determinação de fármacos em amostras de suplementos alimentares.....	79
Tabela 2 - Resultados da análise das formulações de suplementos alimentares por CZE-C <sup>4</sup> D-UV com os adulterantes encontrados e suas quantidades segundo a ingestão diária recomendada pelo fabricante.....	80
Tabela 3 - Figuras de mérito do método HPLC-PAD para determinação de diuréticos e estimulantes em suplementos alimentares.....	87
Tabela 4 - Resultados da análise das formulações de suplementos alimentares por HPLC-DAD com os fármacos encontrados e suas quantidades segundo a ingestão diária recomendada pelo fabricante.....	88
Tabela 5 - Parâmetros de entrada utilizados na simulação para a sertralina e seu metabólito ativo <i>N</i> -desmetilsertralina.....	97
Tabela 6 - Parâmetros de eliminação e interação utilizados na simulação para a sertralina e seu metabólito ativo <i>N</i> -desmetilsertralina.....	98
Tabela 7. Dados preditos e observados para a exposição à sertralina (100 mg).....	99
Tabela 8 - Dados farmacocinéticos previstos para a cafeína sem e com interação com a sertralina em dose única e doses subsequentes por um período de 30 dias.....	102
Tabela 9 - Dados farmacocinéticos previstos para o sildenafil sem e com interação com a sertralina em dose única e doses subsequentes por um período de 30 dias.....	105



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADME	Absorção, Distribuição, Metabolismo e Excreção
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOAC	Métodos Oficiais de Análise
ASC	Área Sob a Curva
BCAA	Aminoácido de Cadeia Ramificada
B/P	Razão de Concentração do Fármaco entre Sangue e Plasma
C <sup>4</sup> D	Detecção por Condutividade sem Contato
CE	Eletroforese Capilar
C <sub>max</sub>	Concentração Máxima
CNPq	Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento
CZE	Eletroforese Capilar de Zona
CV	Coeficiente de Variação
DPR	Desvio Padrão Relativo
EOF	Fluxo Eletrosmótico
F <sub>a</sub>	Fração Absorvida
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
f <sub>u</sub>	Fração Livre da Droga no Plasma
F <sub>U<sub>gut</sub></sub>	Fração Não Ligada nos Enterócitos Intestinais
F <sub>U<sub>mic</sub></sub>	Fração Livre do Fármaco no Microsomo
F <sub>U<sub>plasma</sub></sub>	Fração Livre do Fármaco no Plasma
GC	Cromatografia Gasosa
GMPc	Monofosfato Cíclico de Guanosina
IMC	Índice de Massa Corporal
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
k <sub>a</sub>	Constante da Taxa de Absorção
K <sub>i</sub>	Constante de Inibição do Fármaco em Relação a Determinada Enzima
<i>K<sub>m</sub></i>	Concentração do Fármaco na qual a Taxa de Eliminação é $\frac{1}{2} V_{max}$
LC	Cromatografia Líquida
LD	Limite de Detecção
LogP	Coeficiente de Partição
LQ	Limite de Quantificação
MS	Massas
MS/MS	Massas Tandem
NaOH	Hidróxido de Sódio
PAD	Detecção Amperométrica Pulsada
PBPK	Modelo Farmacocinético Baseado na Fisiologia
PDE5	Fosfodiesterase Tipo 5
pK <sub>a</sub>	Constante de Dissociação
PSA	Área de Superfície Polar
SBAN	Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
T <sub>max</sub>	Tempo Máximo
UV	Ultravioleta
V <sub>max</sub>	Velocidade de Reação Catalisada por Enzima
V <sub>ss</sub>	Volume de Distribuição no <i>Steady State</i>
WHO	Organização Mundial da Saúde



# SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>23</b>
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>25</b>
2.1 OBJETIVO GERAL .....	25
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	25
<b>3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>27</b>
3.1 OBESIDADE E A BUSCA PELO CORPO IDEAL .....	27
3.2 SUPLEMENTOS ALIMENTARES.....	27
3.2.1 <i>Cafeína</i> .....	28
3.2.2 <i>Creatina</i> .....	29
3.2.3 <i>Arginina</i> .....	30
3.2.4 <i>β-Alanina</i> .....	30
3.2.5 <i>Picolinato de cromo</i> .....	32
3.2.6 <i>Maltodextrina</i> .....	32
3.2.7 <i>Fenilalanina</i> .....	33
3.2.8 <i>Quitosana</i> .....	34
3.2.9 <i>Psyllium</i> .....	34
3.2.10 <i>Aminoácidos de cadeia ramificada</i> .....	35
3.2.11 <i>Riscos associados ao uso de suplementos alimentares</i> .....	36
3.3 A PRÁTICA DA ADULTERAÇÃO DE SUPLEMENTOS ALIMENTARES.....	38
3.3.1 <i>Anorexígenos</i> .....	40
3.3.2 <i>Antidepressivos</i> .....	40
3.3.3 <i>Laxantes</i> .....	41
3.3.4 <i>Diuréticos</i> .....	41
3.3.5 <i>Estimulantes sexuais</i> .....	42
3.3.6 <i>Estimulantes</i> .....	42
3.4 METODOLOGIAS ANALÍTICAS ENVOLVIDAS NA AVALIAÇÃO DE SUPLEMENTOS ALIMENTARES.....	43
3.4.1 <i>Eletroforese Capilar</i> .....	45
3.4.2 <i>Cromatografia de Par Iônico</i> .....	45
3.5 LEGISLAÇÃO DE SUPLEMENTOS.....	46
3.6 INTERAÇÕES MEDICAMENTOSAS .....	50
3.7 METODOLOGIA <i>IN SILICO</i> PARA PREVER INTERAÇÕES MEDICAMENTOSAS.....	52
3.7.1 <i>Simcyp</i> .....	53
3.8 INTERAÇÕES SERTRALINA <i>VERSUS</i> CAFEÍNA E SILDENAFIL .....	55
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>57</b>
4.1 INSTRUMENTAÇÃO .....	57
4.2 REAGENTES E SOLUÇÕES.....	57
4.3 PROCEDIMENTOS ANALÍTICOS .....	59
4.3.1 <i>Amostras de Suplementos Alimentares</i> .....	59
4.3.2 <i>Determinações por Eletroforese Capilar com Detecção por Condutividade sem contato e UV (CE-C<sup>4</sup>D/UV)</i> .....	66
4.3.3 <i>Determinações por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detecção Amperométrica Pulsada (HPLC-PAD)</i> .....	67
4.3.4 <i>Modelagem farmacocinética para o estudo de interações medicamentosas</i> .....	68
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>71</b>
5.1 DETERMINAÇÃO DE ADULTERANTES EM SUPLEMENTOS ALIMENTARES POR ELETROFORESE CAPILAR COM DETECÇÃO SEQUENCIAL POR CONDUTIVIDADE SEM CONTATO E ULTRAVIOLETA (CE-C <sup>4</sup> D/UV) .....	71

5.1.1 Otimização da separação eletroforética .....	71
5.1.2 Validação.....	74
5.1.3 Aplicação do método às amostras de suplementos alimentares.....	78
5.2 DETERMINAÇÃO DE ADULTERANTES EM SUPLEMENTOS ALIMENTARES POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA COM DETECÇÃO AMPEROMÉTRICA PULSADA (HPLC-PAD) .....	83
5.2.1 Otimização da separação cromatográfica .....	83
5.2.2 Validação.....	86
5.2.3 Aplicação a amostras de suplementos alimentares.....	88
5.3 AVALIAÇÃO DE INTERAÇÕES MEDICAMENTOSAS ATRAVÉS DE MODELAGEM FARMACOCINÉTICA .....	95
5.3.1 Modelagem para previsão do perfil farmacocinético da sertralina e seu metabólito .....	95
5.3.2 Previsão da interação medicamentosa entre sertralina e cafeína.....	99
5.3.3 Previsão da interação medicamentosa entre sertralina e sildenafil .....	101
<b>6. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>107</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>109</b>
<b>APÊNDICE A – ARTIGO 1 .....</b>	<b>123</b>
<b>APÊNDICE B – ARTIGO 2 .....</b>	<b>138</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A obesidade é provavelmente o mais antigo distúrbio metabólico do mundo e recentemente tornou-se a mais importante desordem nutricional nos países desenvolvidos, tendo em vista o aumento de sua incidência: acredita-se que atinja 10% da população desses países, distribuindo-se em quase todas as raças e sexos, e atingindo principalmente a população de 25 a 44 anos de idade (FRANCISCHI et al., 2000). Diversos são os fatores que contribuem para o aumento da obesidade no mundo; os principais estão relacionados à genética e ao estilo de vida atual, baseado na má alimentação e falta de exercícios físicos (sedentarismo). Como resultado, os consumidores buscam tratamentos alternativos, que incluem o consumo de suplementos alimentares para perda de peso, principalmente aqueles à base de plantas ou compostos naturais, onde se supõe a ausência de efeitos colaterais.

Além disso, mesmo entre a população que não apresenta sinais de obesidade, a busca por um corpo esteticamente perfeito e a falta de uma rotina saudável de exercícios físicos aliados a má alimentação têm levado ao consumo abusivo dessas substâncias, que prometem potencializar no menor espaço de tempo possível o resultado desejado. A popularização dos suplementos, em especial, tem um destaque primordial, talvez por falta de uma legislação rigorosa que proíba sua venda sem receita médica, ou devido às indústrias lançarem constantemente no mercado produtos ditos ergogênicos prometendo efeitos imediatos e eficazes (SANTOS; SANTOS, 2002).

Infelizmente, o perfil tóxico da maior parte desses produtos não é conhecido e a utilização inadequada de um produto, mesmo de baixa toxicidade, pode induzir problemas graves, principalmente na presença de outros fatores de risco tais como contra-indicações (perfil individual do paciente/histórico de doenças) ou uso concomitante de outros medicamentos (SILVEIRA et al., 2008).

Este risco também pode ser observado quando consideramos outro problema de saúde pública: um expressivo número de casos de adulteração relacionados a formulações farmacêuticas e suplementos dietéticos preparados a partir de plantas medicinais foram relatados nas últimas quatro décadas (MOREIRA et al., 2014). Esta prática recorrente, vista também em produtos sintéticos, baseia-se na adição

de fármacos como laxantes e diuréticos, por exemplo, de forma não-declarada à formulação, objetivando assim um resultado mais rápido e eficaz ao consumidor. As classes farmacêuticas mais descritas na literatura como adulterantes são os anti-inflamatórios, anorexígenos, diuréticos, laxativos, analgésicos, hipoglicemiantes, estimulantes e antidepressivos (CARVALHO et al., 2011; CARVALHO et al., 2012).

No Brasil não há uma categoria específica para o registro de suplementos alimentares na Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), o que leva os fabricantes a, muitas vezes, registrar erroneamente seus produtos afim de evitar uma inspeção rigorosa antes de sua comercialização. Essa falta de controle sobre o registro de produtos facilita ainda mais a prática da adulteração.

Ainda, o número de usuários que consome suplementos concomitantemente com fármacos sintéticos tem aumentado muito nos últimos anos, o que pode causar interações medicamentosas. Essa associação pode ser responsável por casos de falha terapêutica ou efeitos colaterais inesperados, além de riscos indiretos à saúde, o que ocorre quando o paciente utiliza o suplemento para fins terapêuticos apesar da falta de evidência de benefícios (VÉGH et al., 2014).

Desta forma, esse trabalho se propõe a investigar, através de diferentes métodos de separação, a presença de adulterantes em amostras de suplementos alimentares que visam o emagrecimento e/ou, aumento de massa magra, queima de gordura, aceleração de metabolismo e melhora do desempenho durante atividade física disponíveis para compra no mercado nacional. Além disso, propõe-se a investigação de possíveis interações farmacocinéticas envolvendo este tipo de produto, para que se possa dimensionar as consequências da adulteração de suplementos alimentares.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar, através de métodos analíticos, a presença de adulterantes em amostras de suplementos alimentares comercializados no Brasil com apelo para perda de peso, queima de gordura, aceleração de metabolismo e melhora do desempenho durante atividade física, bem como avaliar possíveis interações farmacocinéticas decorrentes do uso destes produtos.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Otimizar e validar método para o estudo de fármacos diuréticos, anorexígenos e laxantes empregando eletroforese capilar com detecção simultânea por condutividade sem contato e absorção no ultravioleta.

- Otimizar e validar método para o estudo de fármacos diuréticos e estimulantes por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção amperométrica em eletrodo de ouro.

- Aplicar as metodologias desenvolvidas na investigação da adulteração de suplementos alimentares comercializados no Brasil.

- Desenvolver *in silico* (utilizando o software Simcyp®) um modelo farmacocinético baseado na fisiologia (PBPK) para obter o perfil farmacocinético do antidepressivo sertralina e de seu metabólito ativo *N*-desmetilsertralina a partir de dados obtidos na literatura

- Simular *in silico* (utilizando o software Simcyp®), a administração simultânea da sertralina e da cafeína, um dos compostos de maior popularidade em suplementos alimentares, e avaliar o resultado obtido.

- Simular *in silico* (utilizando o software Simcyp®), a administração simultânea da sertralina e do estimulante sexual sildenafil, muitas vezes presente como adulterante em suplementos alimentares, e avaliar o resultado obtido.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 OBESIDADE E A BUSCA PELO CORPO IDEAL

Segundo a Organização Mundial de Saúde (WHO), a obesidade é definida como o acúmulo de gordura anormal ou excessivo, que apresente algum tipo de risco à saúde. Geralmente está associada ao surgimento de várias doenças crônicas, como diabetes, doenças cardiovasculares e câncer, e já não é mais predominante somente em países de alta renda, estando em ascensão em países de baixa e média renda (WHO, 2015). Dados do ano de 2014 estimam que, no mundo todo, cerca de 39% das pessoas acima de 18 anos estejam acima do peso, e 13% delas sejam consideradas obesas (WHO, 2015). A obesidade pode e deve ser considerada um problema de saúde pública, por sua vez, negligenciado.

Além disso, os padrões de beleza atuais, normalmente impostos pela mídia, fazem alusão a um corpo estritamente magro. Estudo realizado na Universidade Pública de Navarra, na Espanha, relata que 47,8% da população universitária daquele local se considera acima do peso, dado que não confere com o índice de massa corporal (IMC) dos estudantes, considerado normal dentro da faixa de avaliação (RUIZ et al., 2015). O culto ao corpo não está associado apenas à saúde, mas ao que ele pode trazer ao indivíduo que o exercer: sucesso, autocontrole e aceitação. A publicidade estimula o ideal de que todos podem alcançar seu objetivo, sem considerar fatores fisiológicos e genéticos (BROWNELL, 1991).

Dessa forma, com a intenção de alcançar o “corpo perfeito” em pouco tempo, homens e mulheres se condicionam a dietas e treinamentos físicos sem acompanhamento de profissionais adequados, muitas vezes associando esse estilo de vida à ingestão de suplementos e hormônios (RUIZ et al., 2015).

#### 3.2 SUPLEMENTOS ALIMENTARES

De acordo com a Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição (SBAN), suplementos alimentares são produtos que têm por finalidade complementar a alimentação de indivíduos saudáveis, não tendo, portanto, a cura ou tratamento de doenças como objetivo. Podem, porém, apresentar efeitos nutricionais, metabólicos e/ou fisiológicos no organismo e dessa forma auxiliar na redução do risco de

doenças (ALMEIDA, 2014). São geralmente constituídos por vitaminas, minerais, fibras, proteínas, aminoácidos, ácidos graxos, ervas e extratos, probióticos, bem como outras substâncias (SBAN, 2015). Os suplementos alimentares, assim como os alimentos funcionais, são considerados nutracêuticos, pois podem oferecer compostos bioativos em quantidades que excedem aquelas que poderiam ser obtidas de alimentos (PHILLIPS; RIMMER, 2013).

A procura por este tipo de suplementação está geralmente ligada a fatores como: estilo de vida atual (ausência de tempo para o preparo de refeições), preferência pelo sabor de determinados alimentos (ingestão inadequada de nutrientes) e fases específicas (período de lactação, gestação ou pós-cirúrgico) (SBAN, 2015). Além disso, há uma grande procura deste tipo de substância por indivíduos que praticam atividade física, seja para o aumento da performance, obtenção de resultados a curto prazo ou para a perda de gordura corporal. Tendo como objetivo a busca do “corpo perfeito”, mesmo entre pessoas sedentárias os suplementos são vistos como uma alternativa rápida e simples quando comparados à dietas e mudanças no estilo de vida. Nos EUA, esses produtos são consumidos por até metade da população adulta e entre os mais populares estão os suplementos à base de vitaminas e minerais, ácidos graxos ômega 3, luteína e fibras (DICKINSON; MACKAY, 2014). Dentre os suplementos alimentares indicados para emagrecimento, aumento de performance na prática de exercícios ou ganho de massa muscular, que são o foco deste trabalho, alguns ingredientes se destacam na composição dos produtos:

### **3.2.1 Cafeína**

Também conhecida como trimetilxantina, a cafeína é um estimulante presente em vários alimentos como cafés, chás, refrigerantes, energéticos e chocolates, bem como um dos ingredientes mais comuns encontrados em suplementos pré-treino. Após ingestão oral a cafeína é rapidamente absorvida pelo trato gastrintestinal. Seu mecanismo de ação envolve um estímulo no sistema nervoso central, causando a liberação de endorfina e hormônios, o que altera a sensibilidade à dor por esforço físico. Também aumenta o estado de alerta, energia e concentração mental (EUDY et al., 2013).

A cafeína é metabolizada por enzimas do citocromo P450 para uma variedade de metabólitos de xantina, sendo que apenas de 1 a 3% é excretada como cafeína livre na urina. Portanto, fatores como disfunção hepática, polimorfismo de nucleotídeos, uso de anticoncepcionais orais e outros fármacos podem alterar o metabolismo e a excreção de cafeína (TARNOPOLSKI, 2010).

Até 2004, a substância constava na lista de substâncias proibidas do Comitê Olímpico Internacional em concentrações acima de 12 mg L<sup>-1</sup>, considerada infração de doping. No entanto, foi removida pelo fato de que os níveis ergogênicos obtidos pelo baixo consumo de cafeína poderiam ser obtidos também com o consumo de muitos alimentos comuns na dieta. Além disso, a dose de cafeína livre monitorada para cada indivíduo sofria variações consideráveis para a mesma dose ingerida (TARNOPOLSKI, 2010). Sua fórmula estrutural e exemplos de suplementos à base de cafeína podem ser encontrados na Figura 1.

Figura 1 - Fórmula estrutural da cafeína e alguns suplementos à base de cafeína disponíveis no mercado brasileiro.



Fonte: autor

### 3.2.2 Creatina

A creatina é um derivado natural de aminoácidos produzido pelos rins e fígado. Seu mecanismo de ação envolve a produção de ATP, fonte inicial de energia na contração muscular. Além disso, atua na extração de água das células musculares, resultando em hipertrofia muscular (EUDY et al., 2013). Na década de 1990, a creatina tornou-se um suplemento popular utilizado pelos atletas para aumentar o treinamento de resistência, somente depois sendo reconhecida por

demonstrar benefícios em treinamentos de força, com exercícios curtos e de alta intensidade (VANDENBERGHE et al., 1997). O principal efeito tóxico deste tipo de suplementação envolve o prejuízo da função renal, já que a creatina é excretada pelos rins (HALL; TROJIAN, 2013). Sua fórmula estrutural e exemplos de suplementos à base de creatina podem ser encontrados na Figura 2.

Figura 2 - Fórmula estrutural da creatina e alguns suplementos à base de creatina disponíveis no mercado brasileiro.



Fonte: autor

### 3.2.3 Arginina

A arginina é um aminoácido disponível em vários alimentos como nozes, peixes, frango, carne de porco, produtos lácteos e ovos. Os mamíferos sintetizam arginina nos rins, no entanto a taxa de síntese não se equivale à adquirida através de dieta, levando à justificativa do uso de suplementos por atletas. A arginina exógena é convertida no organismo em óxido nítrico, que é um potente vasodilatador e pode potencialmente aumentar o fluxo sanguíneo e a entrega de nutrientes para o músculo esquelético. Além disso, a arginina mostrou aumentar a secreção de hormônio de crescimento humano (EUDY et al., 2013). Sua fórmula estrutural e exemplos de suplementos à base de arginina podem ser encontrados na Figura 3.

### 3.2.4 $\beta$ -Alanina

Aminoácido produzido no fígado, a  $\beta$ -alanina é obtida na dieta a partir de alimentos ricos em proteínas, como frango, carne bovina, porco e peixe. Ela se liga à

histidina produzindo carnosina dentro das células musculares. A carnosina é um dipeptídeo citoplasmático localizado no tecido do músculo esquelético que atua como um tampão intramuscular de íons de hidrogênio, evitando acidose excessiva e retardando a fadiga durante as contrações musculares. Isso pode resultar em maior desempenho no exercício, incluindo aumento de potência e resistência aeróbica e anaeróbica (EUDY et al., 2013). Sua fórmula estrutural e exemplos de suplementos à base de  $\beta$ -alanina podem ser encontrados na Figura 4.

Figura 3 - Fórmula estrutural da arginina e alguns suplementos à base de arginina disponíveis no mercado brasileiro.



Fonte: autor

Figura 4 - Fórmula estrutural da  $\beta$ -alanina e alguns suplementos à base de  $\beta$ -alanina disponíveis no mercado brasileiro.

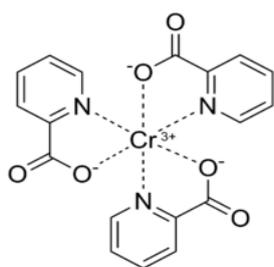


Fonte: autor

### 3.2.5 Picolinato de cromo

É considerado um cofator para a melhor atividade da insulina, dessa forma facilitando a receptação de glicose pelo tecido muscular e conseqüentemente aumentando a massa magra e a taxa metabólica e diminuindo a porcentagem de gordura corporal (PITTLER; SCHIMDT; ERNST, 2005). Sua fórmula estrutural e exemplos de suplementos à base de picolinato de cromo podem ser encontrados na Figura 5.

Figura 5 - Fórmula estrutural do picolinato de cromo e alguns suplementos à base de picolinato de cromo disponíveis no mercado brasileiro.



Fonte: autor

### 3.2.6 Maltodextrina

A maltodextrina é um carboidrato polissacarídeo, polímero de D-glicose com unidades de D-glicose unidas por ligação alfa 1,4, podendo ter de 3 a 19 unidades. É comumente adicionado a bebidas esportivas e alimentos processados. Sua função em suplementos alimentares, segundo especialistas, seria beneficiar o desempenho do atleta antes e durante a prática do exercício de alta intensidade, e também contribuir para a reposição de carboidratos após o exercício. Acredita-se que uma dieta com alto teor de glicose após a prática auxiliaria a síntese mais efetiva do glicogênio muscular e conseqüentemente a recuperação do atleta (CANTORI; SORDI; NAVARRO, 2009).

Figura 6 - Fórmula estrutural da maltodextrina e alguns suplementos à base de maltodextrina disponíveis no mercado brasileiro.



Fonte: autor

### 3.2.7 Fenilalanina

Aminoácido natural, a fenilalanina é encontrada tanto em proteínas vegetais como animais. Faz parte da composição das células do corpo humano, além de ser componente essencial dos tecidos corporais. Sua ingestão é importante, visto que está envolvida em processos de produção de adrenalina e tirosina, e o organismo não é capaz de produzir. Sua presença em suplementos alimentares se justifica por seu possível efeito emagrecedor, através da diminuição da sensação de fome e repositor de energia. Dentre os alimentos que contém fenilalanina estão peixes, frango, arroz e feijão.

Figura 7 - Fórmula estrutural da fenilalanina e alguns suplementos à base de fenilalanina disponíveis no mercado brasileiro.

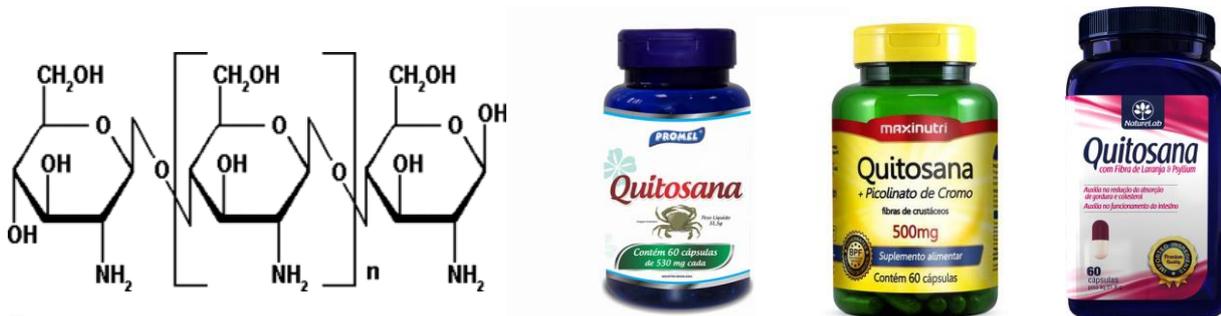


Fonte: autor

### 3.2.8 Quitosana

Principal componente do exoesqueleto de crustáceos e insetos, a quitina é o polissacarídeo mais abundante na natureza depois da celulose. A quitosana pode ser obtida a partir da quitina por desacetilação ou estar presente naturalmente em fungos. A redução de peso associada à administração de quitosana está ligada ao fato de a substância ser um polímero catiônico, sendo solúvel no estômago (pH 1-3) e insolúvel no intestino (pH 6,5). Através dessas características físico-químicas, a quitosana interfere na emulsificação de lipídeos e, ao chegar no intestino, o complexo não é absorvido devido à precipitação (SILVA; SANTOS; FERREIRA, 2006).

Figura 8 - Fórmula estrutural da quitosana e alguns suplementos à base de quitosana disponíveis no mercado brasileiro.



Fonte: autor

### 3.2.9 Psyllium

Fonte de fibras dietéticas solúveis, o psyllium deriva da casca de sementes de *Plantago ovata*. É considerado útil para a terapia dietética e para o tratamento de hipercolesterolemia (RIBAS et al., 2015). Seu efeito emagrecedor está associado à alta capacidade de absorção de água, aumentando de tamanho quando em contato com líquidos e gerando, assim, uma sensação de saciedade.

Figura 9 - Alguns suplementos à base de psyllium disponíveis no mercado brasileiro.

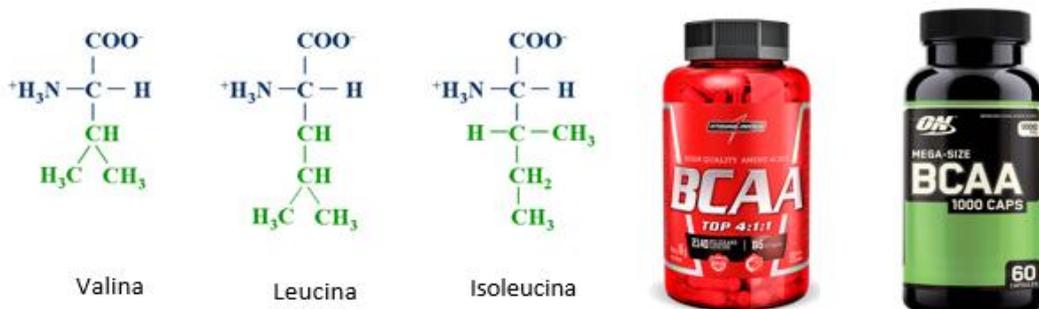


Fonte: autor

### 3.2.10 Aminoácidos de cadeia ramificada

Também conhecidos por BCAAs, são aminoácidos essenciais responsáveis por aumento da síntese de proteínas musculares e redução de sua degradação. Acredita-se também que possam encurtar o tempo de recuperação dos músculos após o exercício, diminuir a fadiga e prover energia através da preservação do glicogênio muscular. Suas ações estão associadas à manutenção da funcionalidade do ciclo de Krebs, através da síntese de alanina e glutamina (LANCHA JR, 2004). Os aminoácidos de cadeia ramificada encontrados com mais frequência em suplementos alimentares são valina, leucina e isoleucina.

Figura 10 - Fórmula estrutural dos aminoácidos de cadeia ramificada e alguns suplementos de BCAA disponíveis no mercado brasileiro.



Fonte: autor

### 3.2.11 Riscos associados ao uso de suplementos alimentares

Acredita-se que o mercado de suplementos alimentares faça girar em torno de 46 bilhões de dólares anualmente em todo mundo, tendo apresentado crescimento de 11% nas vendas entre os anos de 2011 e 2012 (SILVA; FERREIRA, 2014). No entanto, alguns desses suplementos não tem eficácia comprovada e não são seguros para o consumo, podendo resultar em efeitos tóxicos e disfunções metabólicas. Muitos produtos trazem no próprio rótulo – ou no website - a promessa de efeitos rápidos e eficazes, o que aumenta ainda mais seu uso indiscriminado. A Figura 11 foi confeccionada com trechos de alguns websites utilizados para compra dos suplementos analisados neste trabalho. Nota-se que os apelos são abusivos, fazendo referência a promessas muitas vezes inatingíveis.

Figura 11 - Trechos de alguns websites utilizados para a aquisição dos suplementos alimentares analisados neste trabalho.

O [redacted] é um suplemento que reúne em sua fórmula nutrientes ativos que ajudam no tratamento da celulite e atuam no bom funcionamento das células, melhorando, principalmente, a microcirculação, diminuindo o inchaço e a retenção de líquidos. O resultado é a eliminação das gorduras abdominais, favorecendo uma cintura afinada e uma pele mais firme. [redacted] também promove a redução do efeito "casca de laranja" e possui vitaminas e outros ingredientes fundamentais que atuam no processo de beleza de dentro para fora. Produto enriquecido com extrato de café verde e picolinato de cromo.

[redacted] é um termogênico extremamente potente, de rápida e excelente absorção. Atua na queima de gorduras e consequente emagrecimento.

A apresentação de [redacted] é em forma de cápsulas líquidas, que fazem com que seu efeito seja maior e mais eficaz, devido a rápida absorção. [redacted] proporciona resultados rápidos na queima de gorduras e aumento da massa magra.

- Queimador de gordura eficaz
- Redutor de Appetite
- Energia Explosiva para seus treinos
- Sensação de satisfação completa
- Melhora de humor e bem estar
- Resultados rápidos, impactantes e duradouros

**São vários benefícios:**

- Acelera o metabolismo
- Emagrece
- Faz você perder gordura corporal
- Dá disposição para exercer atividades físicas
- Faz a pessoa perder até 8kgs por mês

- Ajuda a manter um nível de água saudável e reduzir drasticamente o excesso de líquido por baixo da pele.
- Suporte e equilíbrio de eletrólitos celular.
- Elimina o excesso de água
- Comprime - Modela - Define.
- Potássio Adicionado para a segurança.
- Ajuda a reduzir a gordura corporal.
- Fornece energia.
- Não contém glúten.

Fonte: autor

Neste contexto, diversos casos de efeitos colaterais e tóxicos relacionados ao uso de suplementos alimentares para perda de peso têm sido relatados na literatura

(KNEE, 2007; KARTH et al., 2010; AKINYEMI et al., 2011; PENDLETON et al., 2013). KNEE, em 2007, relatou o desenvolvimento de rabdomiólise, um tipo de síndrome grave derivada de lesões musculares, em paciente obeso usuário de suplemento alimentar para emagrecimento composto por uma associação de sinefrina e cafeína, ingredientes comumente adicionados a este tipo de produto. O indivíduo admitiu a ingestão de Lipo 6<sup>®</sup> duas vezes ao dia nos três meses antecedentes ao aparecimento dos sintomas da doença, que incluem fadiga, tonturas e mialgias, seguidas de comprometimento hepático e renal. O mesmo não apresentava nenhum sintoma antes do uso do produto (KNEE, 2007).

Em 2010, distúrbios nos batimentos cardíacos foram relatados em usuária de Hydroxycut<sup>®</sup>, suplemento à base de epigalocatequina, componente farmacologicamente ativo do extrato de chá verde. O produto foi ingerido por duas semanas até que a paciente apresentasse os primeiros sinais da disfunção. Acredita-se que a epigalocatequina prolongue o potencial de ação atrial no coração, o que explicaria o surgimento da doença. Além disso, estudos recentes indicaram que a substância não tem qualquer associação à perda de peso, como relatado no rótulo (KARTH et al., 2010).

O uso de suplemento à base de tiroxina, que teoricamente só deve ser consumido sob orientação médica, resultou em paralisia periódica hipocalêmica tireotóxica em duas pacientes que fizeram uso do produto por duas semanas. A doença abrange síndrome muscular e fraqueza, associada a hipocalcemia e hipotireoidismo. Em casos graves, pode causar arritmias e levar à morte (AKINYEMI et al., 2011).

Outrossim, algumas substâncias comuns no dia a dia da maioria das pessoas podem estar presentes nos suplementos alimentares e causarem danos à saúde, por serem ingeridas indiscriminadamente e sem orientação profissional. É o caso da já citada cafeína, por exemplo, que pode ser encontrada em vários produtos indicados para aumento de performance e supressão do apetite. Seu uso contínuo e em alta concentração está associado a anorexia, agitação, náuseas e taquicardia, devido a seu alto poder vasodilatador e agonista dos receptores beta-1 e beta-2. Recente estudo apresentou caso de paciente de 38 anos com queixa de visão turva e ansiedade, sintomas iniciados após ingestão do suplemento Zantrex-3<sup>®</sup>, composto de cafeína associado a outros estimulantes, por dois meses (PENDLETON et al., 2013).

Em todos os casos relatados os produtos foram adquiridos sem receita médica e sem a indicação/orientação de um profissional qualificado. Além disso, todos os suplementos alimentares apresentavam em sua embalagem apelos de marketing como os relatados na Figura 11, prometendo “rápida perda de gordura”, “energia incrível”, “perda de até 8 kg em 30 dias” e “100% seguro e saudável”, o que possivelmente estimulou ainda mais seu consumo abusivo.

### 3.3 A PRÁTICA DA ADULTERAÇÃO DE SUPLEMENTOS ALIMENTARES

Além do problema envolvendo o uso indiscriminado de suplementos alimentares, outro fator de extrema importância e preocupação deve ser investigado: os recorrentes casos de adulteração destes produtos (NEVES; CALDAS, 2015). A adulteração consiste em adicionar substâncias de forma proposital à embalagem sem declarar no rótulo, e geralmente envolve matérias-primas que vão potencializar o efeito proposto, inibir os efeitos colaterais, ou até mesmo serão as únicas responsáveis pelos resultados.

As substâncias normalmente utilizadas como adulterantes em suplementos alimentares que visam o emagrecimento englobam uma série de classes de fármacos. Dessa forma, anorexígenos como o femproporex e a anfepramona, são normalmente utilizados para induzir a perda de apetite e aumentar a sensação de saciedade. Benzodiazepínicos, como o diazepam e o lorazepam, podem diminuir a ansiedade, sintoma comum na obesidade, além de minimizar os efeitos colaterais resultantes dos anorexígenos. Antidepressivos, diuréticos e laxativos, como a fluoxetina, a furosemida e a fenolftaleína, respectivamente, também estão entre os mais utilizados como adulterantes (CARVALHO et al., 2011).

Ademais, entre atletas o uso de suplementação é mais comum, fazendo com que grande parte destes produtos seja também adulterada com estimulantes e hormônios, como a cafeína e a testosterona, o que forneceria mais energia e resistência durante competições e crescimento mais rápido dos músculos (GEYER et al., 2008). Ainda que a cafeína não seja uma substância proibida e esteja presente em vários suplementos, nem sempre a dosagem indicada no rótulo é a mesma contida na embalagem. Além disso, muitas indústrias utilizam fontes naturais de cafeína, como o guaraná, sem saber exatamente a dose total contida no produto final (GEYER et al., 2008). É comum, também, a prática da associação de dois ou

mais fármacos como adulterantes, onde os efeitos tóxicos das interações dessas matérias primas podem ser ainda maiores (NEVES; CALDAS, 2015).

Desta forma, existem diversos relatos recentes na literatura envolvendo a adulteração de suplementos alimentares, dentro e fora do país (ALMEIDA et al., 2007; CHEN et al., 2009; CARVALHO et al., 2010; LANZAROTTA et al., 2012; DOMÉNECH-CARBÓ et al., 2013). Almeida *et al.*, em 2007, analisou 20 amostras de produtos para emagrecimento comercializadas no Brasil (Araraquara, SP), das quais 40% apresentaram anorexígenos e/ou diazepam. Ainda, 20% estariam adulteradas com fenolftaleína. Em 2009, Chen et al., realizou estudo com número maior de amostras, 105, adquiridas no comércio local da China e apresentadas em várias formas farmacêuticas. Destas, 35 apresentavam algum tipo de adulteração, a maioria com fármacos para redução de peso e aumento do desempenho sexual masculino, sendo que 16 das amostras positivas continham os fármacos em níveis próximos da dose efetiva de ação da droga. Entre as 12 amostras analisadas em outro estudo, quatro estavam adulteradas com ansiolíticos, da classe dos benzodiazepínicos. Os produtos haviam sido adquiridos no comércio local da cidade de Santa Maria (RS) e eram produzidos e embalados em farmácias de manipulação (CARVALHO et al., 2010).

Em todos os exemplos citados, o adulterante estava presente na parte interior da cápsula, quando esta era a forma farmacêutica do suplemento. Porém, em 2012, Lanzarotta et al., nos Estados Unidos, relatou a presença do fármaco no invólucro da cápsula, material geralmente descartado neste tipo de análise. A mesma continha tadalafil, substância utilizada para aumentar o desempenho sexual, demonstrando de forma clara a intenção de mascarar a adulteração do produto.

Todos os produtos utilizados como amostras nos estudos citados eram produzidos a partir de ingredientes naturais e vendidos como tal, o que passa ao consumidor a ideia de que o suplemento não apresentará nenhum efeito adverso e não conterá fármacos sintéticos.

Ainda, dois casos de adulteração envolvendo suplementos alimentares fabricados no Brasil no ano de 2009 foram reportados nos Estados Unidos. Os usuários dos produtos relataram sintomas como dor de cabeça, palpitação, insônia, náusea e fadiga, o que levou o FDA a abrir uma investigação sobre o caso. Uma das formulações continha ilegalmente femproporex e clordiazepóxido, e a outra,

femproporex e fluoxetina (COHEN, 2009). Dunn et al. (2012) também reportaram a presença de sibutramina e fenolftaleína em um mesmo suplemento alimentar.

A seguir são destacadas as principais características a respeito das classes de adulterantes investigadas neste trabalho.

### **3.3.1 Anorexígenos**

Também conhecidos como supressores de apetite, os anorexígenos promovem a perda de peso através da redução do apetite e aumento da sensação de plenitude. O mecanismo envolve o aumento da serotonina ou das catecolaminas, neurotransmissores que afetam o estado emocional e a saciedade (NAPPO et al., 1993). Em 2011, a venda e comercialização da anfepramona, anorexígeno objeto de estudo deste trabalho, foram proibidas pela ANVISA. A justificativa era a de que este medicamento apresentaria graves riscos cardiopulmonares e no sistema nervoso central (BRASIL, 2011). Em 2017, porém, a agência publicou uma nota oficial lamentando a autorização do uso da substância, concedida novamente por lei no mesmo ano. A anfepramona é vendida nos EUA, no entanto, não é aprovada na Europa (ANVISA, 2017).

### **3.3.2. Antidepressivos**

Descobertos na década de 50, os antidepressivos são classificados de acordo com sua estrutura química e propriedades farmacológicas. Os antidepressivos inibidores seletivos da recaptção de serotonina, classe à qual pertence a sertralina, investigada nesse trabalho a respeito de possíveis interações medicamentosas, e a fluoxetina e a paroxetina, investigadas como adulterantes em ambos os métodos, começaram a ser utilizados no início da década de 80. São conhecidos em razão do seu perfil menos agressivo de efeitos colaterais quando comparados às demais classes de antidepressivos. Seu mecanismo de ação, como o nome da classe já diz, é a inibição potente e seletiva da receptação de serotonina (MORENO et al., 1999).

### 3.3.3 Laxantes

Os laxantes são medicamentos que estimulam a defecação e seu uso abusivo está relacionado a casos de pacientes anoréxicos e bulímicos. A fenolftaleína, estudada como adulterante neste trabalho, foi retirada do mercado em 2002, por apresentar propriedades cancerígenas. Em 2014 a ANVISA divulgou um alerta a respeito da presença não declarada de fenolftaleína em produtos à base de pólen de abelha fabricados nos EUA e comercializados no Brasil. Segundo a nota, “a fenolftaleína é um ingrediente usado como laxante, e pode ocasionar distúrbios gastrointestinais potencialmente graves, batimentos cardíacos irregulares e câncer com o uso a longo prazo” (ANVISA, 2014).

### 3.3.4 Diuréticos

Os diuréticos são medicamentos cujo mecanismo básico é inibir a reabsorção tubular de sódio e água. Sua propriedade é causar aumento do volume urinário. Seu uso clínico mais comum está associado ao tratamento da hipertensão e edemas (MARTELLI; LONGO; SERIANI, 2008), o que justificaria seu uso como adulterante em suplementos indicados para a perda de peso. Os diuréticos analisados neste trabalho pertencem a diferentes classes, sendo a amilorida um diurético poupador de potássio; a clortalidona um diurético tiazídico; e a furosemida pertencente à classe dos diuréticos de alça (SILVA, 2006).

Diuréticos poupadores de potássio reduzem a atividade da Na/K<sup>+</sup> ATPase, o que reduz o transporte de potássio para as células diminuindo sua secreção para o líquido tubular. Já os tiazídicos bloqueiam o cotransportador de sódio-cloreto na membrana luminal das células tubulares, fazendo com que 5 a 10% do filtrado glomerular passe para a urina. Os diuréticos de alça diminuem a reabsorção ativa no segmento ascendente espesso da alça de Henle ao bloquear um cotransportador localizado na membrana luminal das células epiteliais (MARTELLI; LONGO; SERIANI, 2008).

### 3.3.5 Estimulantes sexuais

Também chamados de inibidores da fosfodiesterase-5 (PDE5), os estimulantes sexuais são análogos estruturais do monofosfato de guanosina cíclico (GMPc), responsável pelo relaxamento do músculo liso, aumentando o fluxo sanguíneo e promovendo a ereção. Eles são capazes de potencializar esse processo por inibirem a PDE5, enzima responsável pela degradação do GMPc no corpo cavernoso (VILELA et al., 2016).

Inibidor específico de PDE5, o sildenafil é prescrito para disfunção erétil, bem como hipertensão pulmonar, sintomas do trato urinário inferior e ejaculação precoce. A PDE5 é expressa em todos os tecidos contrácteis do trato reprodutivo masculino, geralmente aumentando a contratilidade. Alguns inibidores de PDE5 tendem a aumentar um pouco os níveis de testosterona circulante (DROBNIS; NANGIA, 2017).

Para que se possa dimensionar o uso de estimulantes sexuais como adulterantes em suplementos, o FDA divulgou dados de produtos adulterados entre 2007 e 2012. Destes, 95% eram comercializados como suplemento de aprimoramento sexual, porém rotulados como “naturais”. A maior parte deles estava adulterada com sildenafil, tadalafil e vardenafil, adquiridos somente com receita médica nos Estados Unidos. Ainda, alguns estavam adulterados com análogos destes fármacos, onde pequenas modificações na estrutura original foram realizadas (GILARD et al., 2015).

### 3.3.6 Estimulantes

Muitos suplementos termogênicos contêm compostos como sinefrina e cafeína. A sinefrina é um protoalcalóide primário derivado dos frutos imaturos de *Citrus aurantium*, também conhecido como laranja amarga ou laranja de Sevilha, podendo ainda ser encontrada em outras espécies relacionadas. Acredita-se que seus efeitos termogênicos estejam relacionados à ativação de adrenorreceptores  $\beta$ -3, levando ao aumento da taxa metabólica, lipólise e possível redução da ingestão alimentar. Comparada à outros estimulantes como efedrina e a fenilefrina, a sinefrina exibe pouca ou nenhuma estimulação cardiovascular (RATAMESS et al., 2015; STOHS; PREUSS; SHARA, 2011).

### 3.4 METODOLOGIAS ANALÍTICAS ENVOLVIDAS NA AVALIAÇÃO DE SUPLEMENTOS ALIMENTARES

A presença de produtos adulterados no mercado é um problema mundial e seu consumo representa riscos à saúde do consumidor. Assim, métodos analíticos que permitam uma avaliação rápida e confiável destes produtos quanto à presença de drogas sintéticas são necessários para abordar tais práticas. Na literatura, muitos métodos são descritos para detectar e quantificar adulterantes em suplementos, sendo os mais comuns envolvendo cromatografia líquida, com detecção UV (ULLOA et al., 2015) ou acoplada à espectrofotômetro de massas (KIM et al., 2014), espectroscopia, UV-Vis e infravermelho (DECONINCK et al., 2014), e eletroforese capilar.

No Quadro 1 encontra-se um resumo dos principais métodos descritos na literatura nos últimos anos, especificando os analitos e tipos de detectores envolvidos na técnica. Em seguida, são descritas as principais características das metodologias utilizadas neste trabalho.

Quadro 1 - Métodos analíticos descritos na literatura para a determinação de adulterantes em suplementos alimentares nos últimos anos.

<b>DROGA (A) ESTUDADA (S)</b>	<b>TÉCNICA UTILIZADA</b>	<b>REFERÊNCIA</b>
Sibutramina	Espectroscopia de infravermelho	DECONINCK et al., 2014
Acetaminofeno e 16 antiinflamatórios não-esteroidais	LC-MS/MS	KIM et al., 2014
28 compostos narcóticos	LC-MS/MS	CHOI et al., 2015
17 diuréticos	HPLC-UV e LC-MS/MS	WOO et al., 2013
29 drogas para perda de peso	LC-MS/MS	KIM et al., 2014 (b)
Efedrina, norefedrina, cafeína e furosemida	CE-DAD	CIANCHINO et al., 2008

20 supressores de appetite	CE-MS/MS	AKAMATSU; MITSUHASHU, 2014
Anfetamina e derivados	CE-MS/MS	DOS SANTOS et al., 2016
Sedativo-hipnóticos	UHPLC-Orbitrap-MS	JIANG et al., 2015
Análogo de tadalafil	HPLC-DAD	LEE et al., 2015
Fenfluramina, fenolftaleína, Desmetil-sibutramina, didesmetil-sibutramina, sibutramina e orlistat	LC-MS	WANG; CHEN; YAO, 2008
23 fármacos anti-hipertensivos, hipoglicemiantes, hipocolesterolemiantes, ansiolíticos, estimulantes e emagrecedores	LC-MS/MS	CHEN et al., 2009
Bumetanida, clopamida, furosemida, hidroclorotiazida e sibutramina	HPLC-UV	WANG et al., 2009
Efedrina, norpseudoefedrina, fenfluramina, sibutramina, clopamida, emodin, reína, crisofanol	HPLC-MS/MS	SHI et al., 2011
Sibutramina, fenolftaleína, fenitoína, bumetanida e rimonabant	HPLC-MS, GC-MS	KHAZAN et al., 2014
Estimulantes, anorexígenos e estimulantes sexuais	LC-MS	STRANO-ROSSI et al., 2015

CE – Eletroforese Capilar

DAD – Detecção por arranjo de diodos

GC – Cromatografia Gasosa

HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

LC – Cromatografia Líquida

MS – Massas

MS/MS – Massas tandem

UV - Ultravioleta

Fonte: autor

### 3.4.1 Eletroforese Capilar

A eletroforese capilar (CE) é uma evolução instrumental das tradicionais técnicas de eletroforese em gel. Desde sua introdução, a CE tem demonstrado um grande potencial não somente na análise de biopolímeros, na qual a eletroforese vem sendo aplicada há muito tempo, mas também em áreas onde a técnica eletroforética nunca havia sido utilizada (TAGLIARO et al., 1998).

A CE apresenta inúmeras vantagens sobre os demais métodos analíticos e por esse motivo tem sido muito empregada na determinação de uma variedade de amostras complexas. Suas características mais relevantes são a alta eficiência de separação, baixo consumo de reagentes e amostras, tempos de análise reduzidos, simplicidade do equipamento utilizado e alto grau de automação (CARVALHO et al., 2009).

É uma técnica de separação que se baseia na migração de compostos iônicos ou ionizáveis em um campo elétrico (TAVARES, 1996). A separação é conduzida em tubos (capilares) preenchidos com um eletrólito condutor (TAVARES, 1997). O fluxo eletrosmótico, o EOF (fluxo de solução induzido pelo campo elétrico), também afeta a migração dos compostos e confere à técnica parte de suas características de alta eficiência. A presença do EOF é muito importante uma vez que diminui consideravelmente o tempo de análise de compostos que possuam mobilidade no mesmo sentido da mobilidade do fluxo e permite que moléculas neutras se movam no interior do capilar (SILVA, 2001).

Os analitos são separados em capilar de pequeno diâmetro (20 a 100cm de comprimento e 25 a 100  $\mu\text{m}$  de diâmetro interno) sob a influência de um campo elétrico de alta voltagem (10-30kV). As amostras são introduzidas tanto por técnica eletrocínética como por via hidrodinâmica. Um sistema de detecção é empregado no final do capilar para quantificação ou identificação dos compostos separados (BOONE et al., 1999).

### 3.4.2 Cromatografia de Par Iônico

Um dos mais eficientes métodos cromatográficos, a cromatografia líquida de alta eficiência permite a injeção de volumes cada vez menores de amostras no sistema, baseando-se em um processo dinâmico onde moléculas de analito se

movem através de uma coluna por ação da fase móvel. A separação vai depender, então, da afinidade do material com a fase estacionária (TONHI et al., 2002).

Na cromatografia de par iônico a fase móvel é composta por tampão aquoso com um solvente orgânico e um composto iônico que contém um contra íon de carga oposta à do analito. Forma-se então um par de íons não carregados, que pode ser retardado na fase estacionária, permitindo a separação de moléculas com estrutura química semelhante. O mecanismo de retenção torna-se, assim, uma mistura das interações de fase reversa e troca iônica (SNYDER; KIRKLAND; DOLAN, 2010).

### 3.5 LEGISLAÇÃO DE SUPLEMENTOS

Para que exista controle sobre os produtos fabricados e comercializados, cada país possui um órgão responsável e sua legislação específica. As diferenças entre as regulamentações de cada Estado fazem com que, por exemplo, um suplemento vendido livremente nos Estados Unidos seja ilegal no Brasil. No período de 2007 a 2013, a polícia federal brasileira apreendeu cerca de 5.470 produtos, sendo que 92% deles eram de origem americana (NEVES; CALDAS, 2015).

Nos Estados Unidos, a primeira referência feita aos alimentos para uso especial foi em 1938, através da promulgação de uma lei federal. Naquela ocasião, estabeleceu-se uma categoria de alimentos para uso dietético especial, exigindo que os fabricantes adicionassem ao rótulo do produto informações sobre a presença de substâncias como vitaminas e minerais (GERSHWIN et al., 2010). Já em 1994, o congresso americano aprovou o DSHE (Dietary Supplement Health Education Act), estabelecendo que todos os suplementos alimentares fossem tratados como alimento, ainda que em sua formulação estivessem contidas substâncias como vitaminas, minerais, ervas, aminoácidos, ou até mesmo fármacos sintéticos e antibióticos (DSHE, 1994). Dessa forma, a FDA (Food and Drug Administration), órgão regulamentador do país, deveria provar os efeitos negativos desses produtos com recursos próprios, caso optasse por retirá-los do mercado, visto que o fabricante não era obrigado a provar a eficácia e segurança de seu produto. Ainda, os únicos casos em que os fabricantes deveriam notificar a FDA a respeito da confecção de suplementos alimentares, seriam quando o produto apresentasse algum ingrediente alimentar novo, que não estivesse sendo comercializado no país antes de 1994. Somente mais tarde, em 2011, agentes do FDA foram autorizados a

retirar do mercado qualquer produto suspeito de adulteração, caso que suspendeu a produção e comercialização do OxyElite Pro no país (NEVES; CALDAS, 2015).

Na União Europeia, os produtos são geralmente divididos em alimentos e fármacos e há legislações específicas para cada classe. Porém, existem os produtos que estão na chamada “border line”, ou linha de fronteira, que contém drogas em concentrações abaixo da dose terapêutica ou fármacos cujo fabricante não pôde comprovar a qualidade, eficácia e segurança. Estes, portanto, podem ser comercializados como suplemento alimentar. O problema, porém, é em relação a produtos botânicos ou naturais, visto que cada país da União Europeia decide se ele será considerado alimento, fármaco ou suplemento alimentar (NEVES; CALDAS, 2015; CE, 2008).

No Brasil, ainda não há uma categoria denominada “suplementos alimentares”. Dessa forma, os produtos regularizados pela ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), órgão responsável pela regulamentação, controle e fiscalização de alimentos no país, estão enquadrados em diferentes categorias. Este enquadramento é de responsabilidade do fabricante que, através dos requisitos e exigências de cada categoria, escolherá aquela que melhor se adapta a seu suplemento. Porém, o mercado de suplementos é formado por produtos com diferentes níveis de risco e forte assimetria de informações em relação aos benefícios e riscos e que misturam características de alimentos e medicamentos. As categorias geralmente utilizadas pelas empresas para regulamentação dos produtos são: Suplementos Vitamínicos e/ou Minerais (Portaria MS nº 32/1998); Novos Alimentos (Resolução ANVISA nº 16/1999); Alimentos com Alegações de Propriedades Funcionais e/ou de Saúde (Resolução nº 19/1999); Substâncias Bioativas e Probióticos Isolados com Alegações de Propriedade Funcional (RDC nº 02/2002) e Alimentos para Atletas (RDC nº 18/2010) (SVS/MS, 1998; BRASIL, 1999; BRASIL, 1999b; BRASIL, 2002; BRASIL, 2010). Muitas vezes o produto não atende aos requisitos definidos no regulamento, no entanto as empresas “forçam” o enquadramento devido às facilidades oferecidas por uma outra categoria. No quadro 2 encontram-se algumas informações a respeito da exigência de cada classe no caso de cadastramento.

Segundo a RDC nº 27/2010 (BRASIL, 2010b), que define as categorias de produtos com obrigatoriedade ou isentos de registro, os alimentos para atletas e os suplementos vitamínicos e minerais não precisam do protocolo. O fabricante deve

apenas preencher um documento denominado “Comunicação de Início de Fabricação”, que deve ser entregue ao órgão de vigilância sanitária local e não precisa esperar a aprovação prévia para iniciar a comercialização.

Já no caso das demais categorias, há obrigatoriedade de registro, sendo que a empresa fabricante deve protocolar o pedido na ANVISA e apresentar a documentação que comprove o atendimento à legislação sanitária. A aprovação ou não do registro é publicado posteriormente no Diário Oficial da União. Em caso positivo, o número de registro deve constar no rótulo do suplemento.

Considerando as categorias e suas especificações, muitas vezes o produto não atende aos requisitos definidos pela lei, levando os fabricantes a omitir informações a respeito de sua composição. No caso da adulteração por fármacos, a empresa estaria evitando a burocracia exigida no registro de medicamentos, além de proporcionar ao consumidor resultados rápidos, aumentando as vendas e gerando lucro. Neste contexto, a ANVISA lançou juntamente com o CNPq (Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento), em 2014, um edital público (Chamada CNPq/ANVISA No 05/2014 – Pesquisas em Vigilância Sanitária) com o objetivo de fomentar pesquisas em vigilância sanitária e que tem como uma de suas linhas temáticas “**Estudos de controle de qualidade, aspectos nutricionais e de rotulagem de alimentos**” sendo que um dos subitens é a “**presença de substâncias anorexígenas, psicotrópicas e diuréticas em alimentos (suplementos alimentares)**”, ao qual este projeto de doutorado está vinculado.

Em junho de 2017, a ANVISA divulgou material online justificando a importância da unificação de uma categoria para registro de suplementos alimentares. Nele, a agência evidencia que a busca por uma categoria única provém de fatores como constante inovação neste tipo de produto, o forte apelo publicitário envolvendo suplementação e o crescimento comercial atingido pelo setor industrial. Alega ainda que essa situação prejudicaria o controle sanitário e a gestão do risco de suplementos, além de criar insegurança jurídica e obstáculos à comercialização (ANVISA, 2017 (b)).

Quadro 2 – Categorias para registro dos suplementos alimentares comercializados no Brasil.

<b>Categoria</b>	<b>Especificações</b>	<b>Exemplos</b>	<b>Documento</b>
Suplementos Vitamínicos e/ou Minerais	Não podem apresentar indicações terapêuticas. Compostos de vitaminas isoladas, minerais isolados, associação de vitaminas e minerais ou produtos fontes naturais de vitaminas. Devem conter no mínimo 25% e no máximo 100% da ingestão diária recomendada.	Centrum <sup>®</sup> , Poliseng <sup>®</sup> , Medivita <sup>®</sup>	Portaria nº 32/1998
Novos Alimentos	Alimentos sem histórico de consumo no país ou substâncias já consumidas em níveis muito superiores do habitual.	Óleo de peixe, lecitina de soja, extrato de guaraná em cápsulas	Resolução nº 16/1999
Alimentos com Alegações de Propriedades Funcionais e/ou de Saúde	Alimentos com ação metabólica ou fisiológica no crescimento, manutenção e outras funções normais do organismo. Alimentos aos quais se associa condição relacionada à saúde.	Quitosana, ômega-3	Resolução nº 19/1999
Substâncias Bioativas e Probióticos Isolados com Alegação de Propriedade Funcional	Nutrientes e não-nutrientes que possuem ação metabólica ou fisiológica específica. Microrganismos vivos capazes de melhorar o equilíbrio intestinal. Não pode ter finalidade medicamentosa ou terapêutica.	Carotenoides, flavonoides, polifenóis	RDC nº 02/2002
Alimentos para Atletas	Alimentos especialmente formulados para auxiliar atletas a atender suas necessidades nutricionais e auxiliar no desempenho do exercício.	Whey Protein, creatina, cafeína	RDC nº 18/2010

Fonte: autor

### 3.6 INTERAÇÕES MEDICAMENTOSAS

Através da avaliação do cenário anteriormente exposto, podemos considerar a ocorrência de três situações. A primeira, quando o consumidor ingere um suplemento alimentar adulterado com fármacos sintéticos e já faz uso de outros fármacos, prescritos ou não. A segunda situação remete ao uso de um suplemento alimentar adulterado com mais de um fármaco (COHEN, 2009; DUNN et al., 2012). Na terceira situação, o consumidor pode ingerir suplementos alimentares adulterados com fármacos que interagem no metabolismo de componentes naturalmente presentes nos suplementos ou vice-versa. Nas três situações, a consequência seria uma possível interação medicamentosa.

As interações medicamentosas podem ser divididas em farmacocinéticas e farmacodinâmicas. Assim, interações farmacodinâmicas são aquelas envolvidas em efeitos farmacológicos aditivos ou antagonistas, e que influenciam a eficácia do medicamento. Já as interações farmacocinéticas estão relacionadas a mudanças na absorção, distribuição, metabolismo e eliminação do fármaco (TANNENBAUM; SHEEHAN, 2014). A fase farmacocinética, porém, exerce também profundo impacto sobre o efeito farmacológico, uma vez que os processos de ADME (absorção, distribuição, metabolismo e eliminação) determinam a concentração e o tempo despendido das moléculas do fármaco no seu local de ação. Durante as pesquisas realizadas no processo de descoberta de novos fármacos, a previsão dos processos de ADME logo nos estágios iniciais é de extrema importância (PEREIRA, 2007).

A família de enzimas do citocromo P450 é clinicamente relevante para o metabolismo dos fármacos e por esse motivo está envolvida em diversos casos de interação medicamentosa. Dentre as mais citadas na literatura estão: CYP1A2, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP3A4 e CYP3A5 (HUANG *et al.*, 2008). Elas estão relacionadas à processos como oxidação e redução de fármacos afim de ativar um pró-fármaco ou converter medicamentos em metabólitos ativos ou inativos para serem eliminados, sendo suas atividades em cada indivíduo influenciadas por alimentação, fatores ambientais e genéticos (TANNENBAUM; SHEEHAN, 2014).

Dessa forma, o ciprofloxacino, por exemplo, quando coadministrado com a teofilina aumenta em duas vezes sua toxicidade por ser um inibidor da 1A2, principal enzima responsável pelo metabolismo da teofilina (ANTONIOU et al., 2011). Do

mesmo modo a rifampicina não deve ser administrada concomitantemente com contraceptivos orais por induzir a enzima responsável por seu metabolismo e diminuir sua concentração na corrente sanguínea, levando a uma perda significativa da eficácia contraceptiva (LEBEL et al., 1998; BARDITCH-CROVO et al., 1999). Se analisarmos o caso da amicacina, indicada no tratamento a curto prazo de infecções graves causadas por cepas sensíveis de bactérias Gram-negativas, e o *Ginkgo biloba*, verificamos um aumento da toxicidade do antibiótico. O ginkgo parece acelerar a ototoxicidade induzida pela amicacina por um mecanismo desconhecido (MIMAN et al., 2002). Ainda, a redução dos níveis de ciclosporina quando associada ao hipérico, por exemplo, retrata um problema grave por ocasionar a rejeição de transplantes em alguns casos. O hipérico induz a isoenzima CYP3A4 que metaboliza a ciclosporina (RUSCHITZKA et al., 2000).

Quando faz-se o uso de suplementos à base de plantas, devemos considerar também que extratos de plantas diferem de medicamentos convencionais, visto que são misturas de vários compostos bioativos e estão suscetíveis a uma grande variação, mesmo quando padronizados para um ou mais dos seus constituintes. As diversas substâncias contidas na formulação podem afetar diferentes enzimas metabólicas. Há ainda o fator preparo, que pode afetar diretamente sua composição visto que engloba fatores como época de colheita, manipulação e estocagem (CHAVEZ; JORDAN; CHAVEZ, 2006).

A significância clínica de uma interação dependerá de vários fatores como o índice terapêutico do fármaco que será atacado, a concentração do inibidor ou indutor, a proporção do fármaco vítima que será afetado, a biodisponibilidade do fármaco vítima e outros parâmetros farmacocinéticos e farmacodinâmicos. Porém, poucos estudos de interação medicamentosa são conduzidos em populações significativas de pacientes ou são suficientemente longos para avaliar completamente o desenvolvimento de efeitos adversos (TANNENBAUM; SHEEHAN, 2014).

### 3.7 METODOLOGIA *IN SILICO* PARA PREVER INTERAÇÕES MEDICAMENTOSAS

Os eventos adversos causados por interações medicamentosas são cada vez mais evitados com o desenvolvimento de técnicas que permitem prever essas interações no início do desenvolvimento de fármacos. No entanto, surgem desafios significativos na avaliação e/ou previsão de interações complexas causadas por fármacos e metabólitos que afetam não apenas uma, mas múltiplas vias de eliminação dos fármacos (VARMA et al., 2015). Os estudos *in silico* são modelos matemáticos desenvolvidos em um computador, concebidos afim de mimetizar o comportamento do organismo (COLQUITT; COLGUHOUN; THIELE, 2011). Para prever possíveis interações entre misturas complexas, um modelo computadorizado é composto por três elementos principais: a interação entre os dois fármacos contidos na mistura, a interação obtida em exposições sequenciais e o modo de ação de cada um deles separadamente.

O modelo mais comumente usado é o PBPK (Physiologically Based Pharmacokinetic / Pharmacodynamic model) (WATERBEEMD & GIFFORD, 2003), que fornece uma previsão mais realista das interações medicamentosas quando comparada às abordagens estáticas tradicionalmente utilizadas, considerando múltiplos fatores e mecanismos envolvidos na interação. As modelagens PBPK consideram propriedades específicas do sistema, como a massa ou volume dos órgãos, fluxo sanguíneo e parâmetros relacionados ao fármaco. Além disso, o modelo estrutural abrange a disposição anatômica dos tecidos e órgãos do corpo humano como entidades distintas que estão ligadas pela perfusão sanguínea, codificada por equações diferenciais capazes de acompanhar a concentração do fármaco no organismo ao longo do tempo.

Assim, a modelagem envolve o desenvolvimento de equações para descrever os processos de ADME dos fármacos em termos físico-químicos, bioquímicos e fisiológicos, simulando os mais variados tecidos e condições do corpo humano (WATERBEEMD; GIFFORD, 2003). Além disso, os modelos também têm a capacidade de simular a concentração do fármaco que atinge o alvo, o que é determinante para a avaliação da toxicidade. Esses estudos são importantes pois preveem riscos que não podem ser detectados ao observar apenas os dados farmacocinéticos individuais de cada fármaco e, principalmente, têm a capacidade

de responder perguntas para as quais a realização de experimentos seria complexa e de alto custo (TAN et al., 2011).

Para se ter a real dimensão do uso de sistemas computadorizados, estima-se que até 2020 novas tecnologias criarão uma maior compreensão da biologia das doenças, permitindo a evolução de um “homem virtual” para aumentar a previsão dos efeitos das drogas antes de serem administradas a seres humanos reais (JAMEI et al., 2009). Ao longo dos últimos anos vários softwares foram desenvolvidos para facilitar a modelagem e simulação de modelos farmacocinéticos e farmacodinâmicos, sendo os mais conhecidos: MATLAB®, NONMEM®, WinNonLin®, PK-Sim®, Gastroplus™ e Simcyp® (DONG et al., 2008).

### 3.7.1. Simcyp

O software utilizado para prever possíveis interações medicamentosas ao longo da realização deste trabalho foi o Simcyp®. O simulador de absorção, distribuição, metabolismo e excreção Simcyp® é uma plataforma que combina dados experimentais gerados rotineiramente durante a descoberta e desenvolvimento pré-clínicos de medicamentos a partir de sistemas enzimáticos e celulares *in vitro* com informações demográficas, fisiológicas e genéticas de diferentes populações de pacientes (JAMEI et al., 2009). Na Figura 12 é possível visualizar as variáveis envolvidas no software e os parâmetros necessários para seu funcionamento. O uso e a funcionalidade do simulador são reforçados através de parcerias com órgãos reguladores de drogas e centros acadêmicos de excelência ao redor do mundo.

A estrutura do software é baseada em métodos de Monte Carlo associados a outras equações afim de que seu uso se torne o mais exato e simples possível. O simulador pode ser utilizado em desktops, online ou até mesmo como um mecanismo sem interface adaptado a um sistema maior (JAMEI et al., 2009).

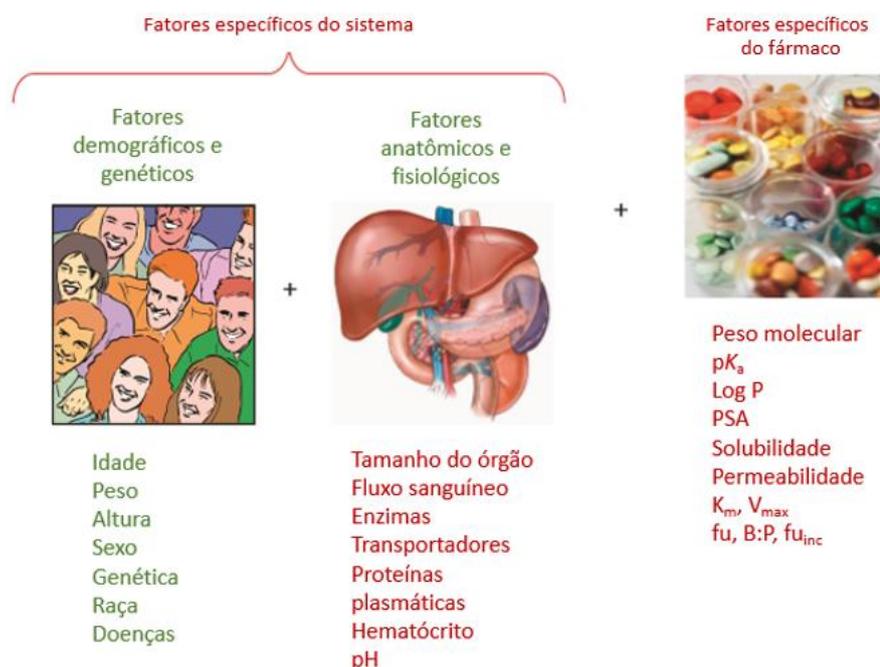
As capacidades funcionais do Simcyp® estão descritas a seguir.

#### *Metabolismo*

Identificação da variabilidade da população no metabolismo do fármaco *in vivo* a partir de dados gerados *in vitro* utilizando dados como microsomas de

fígado, intestino e rins humanos, hepatócitos e enzimas recombinantes CYP e UDP-glicuroniltransferase.

Figura 12 - Esquema das variáveis envolvidas na previsão do comportamento farmacocinético de fármacos pelo Simcyp®: interação entre fatores genéticos, demográficos, anatômicos, fisiológicos e específicos. (B:P: taxa de partição sangue:plasma; fu: fração livre da droga no plasma;  $K_m$ : constante Michaelis; PSA: área de superfície polar;  $V_{max}$ : velocidade da reação catalisada por enzima na concentração infinita de substrato).



Fonte: adaptado de JAMEI *et al.*, 2009.

### *Perfis farmacocinéticos*

Simulação dos perfis concentração *versus* tempo de fármacos e metabólitos. Previsão do volume de distribuição com base em parâmetros de lipofilicidade, ionização, ligação a proteínas e composição de tecido.

### *Interações fármaco-fármaco*

Previsão da extensão de interações medicamentosas permitindo levar em conta fatores como inibição competitiva de enzimas, mecanismos de inibição

enzimática, indução enzimática e interações múltiplas envolvendo até quatro fármacos e dois metabólitos.

### *Absorção*

O software é capaz de incorporar fatores que influenciam a taxa e a extensão da absorção oral do fármaco, como taxa de esvaziamento gástrico e tempo de trânsito intestinal; o pH luminal específico de acordo com a idade (pelo mesmo afetar fatores como ionização, solubilidade, estabilidade química, permeabilidade, dissolução e precipitação); área da superfície do trato gastrintestinal e variação regional na permeabilidade e na densidade de enzimas e transportadores; volume e dinâmica do fluido luminal; estado de jejum *versus* alimentado. Além disso, permite a avaliação de formulações de liberação imediata ou modificada e o impacto do tamanho de partícula na taxa de dissolução.

### *Populações virtuais de pacientes*

As bases de dados incluem caucasianos da Europa, japoneses, coreanos, voluntários saudáveis, bem como obesos, pacientes com insuficiência renal e com cirrose hepática. Há ainda um segundo software, especialmente desenvolvido para populações pediátricas, incluindo neonatos.

### *Design de teste*

As opções disponíveis para a execução de um teste incluem diferentes rotas de administração e opções de dosagem (dose única, múltipla ou escalonamento de doses) (JAMEI *et al.*, 2009).

## 3.8 INTERAÇÕES SERTRALINA *VERSUS* CAFÉINA E SILDENAFIL

A seleção dos fármacos para a avaliação de possíveis interações medicamentosas envolvendo suplementos alimentares baseou-se não só nos casos de adulteração envolvendo essas substâncias, mas também no popular uso das mesmas nos dias de hoje. No contexto deste trabalho, a sertralina, por exemplo, é

eficaz e muitas vezes utilizada no tratamento de transtorno compulsivo alimentar e mostrou resultados satisfatórios no auxílio da redução de peso (CALANDRA; RUSSO; LUCA, 2012; McELROY et al., 2000), sendo muitas vezes prescrita. Além disso, está envolvida em casos de interação medicamentosa com suplementos alimentares em relatos recentes (PATEL & MARZELLA, 2017; RUSSO *et al.*, 2016).

A cafeína, presente em muitos suplementos alimentares de forma legal, está muitas vezes contida em concentrações muito superiores à declarada no rótulo (NEVES; CALDAS, 2017; VIANA et al., 2016), levando o consumidor a ingerir quantidades desconhecidas da substância. Dessa forma, a ocorrência de interações medicamentosas se torna ainda mais relevante, ao passo que qualquer diminuição no metabolismo da cafeína acarretaria em níveis sanguíneos exacerbados do fármaco, aumentando seus efeitos farmacológicos e/ou tóxicos.

Da mesma forma, é extenso o número de publicações que remetem à presença ilegal de sildenafil em suplementos (FEJÖS et al., 2014; DAMIANO et al., 2014; SHI et al., 2014). Ainda, além de seu uso terapêutico, os inibidores da PDE5 tornaram-se fármacos populares para melhorar a performance sexual masculina (SMITH; ROMANELLI, 2005) e, por serem comercializados sem receita médica, são de fácil aquisição no mercado brasileiro.

Farmacocineticamente a sertralina é absorvida lentamente após administração oral, sendo que o pico de concentração plasmática ocorre de 4 a 8 horas após a ingestão da dose. É altamente ligada à proteínas plasmáticas e o volume de distribuição estimado é de 25 L kg<sup>-1</sup>, sendo que as concentrações no steady-state são atingidas após 4 a 5 dias de tratamento. É extensivamente metabolizada pelo fígado, gerando um metabólito principal, a desmetilsertralina. Apesar do menor efeito farmacológico em relação ao fármaco mãe, a desmetilsertralina é equipotente à sertralina em termos de inibição das enzimas CYP2D6, além de apresentar meia-vida três vezes maior, prolongando o efeito inibidor (McRAE; BRADY, 2001.) A sertralina é também um inibidor competitivo fraco da CYP3A4, e tem sido reportada por aumentar a concentração plasmática de pimozida, fármaco metabolizado principalmente pela mesma enzima (TEMPLETON et al., 2016).

Neste contexto, tanto a cafeína quanto o sildenafil apresentam algum grau de metabolização pela CYP3A4 (KU et al., 2008; HA et al., 1996), propiciando o risco de interações medicamentosas envolvendo esses fármacos.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 INSTRUMENTAÇÃO

No método analítico desenvolvido para a determinação de adulterantes por eletroforese capilar foi utilizado equipamento de eletroforese capilar construído em laboratório (CARVALHO et al., 2009) acoplado a dois detectores: detector por condutividade sem contato (CE-C<sup>4</sup>D) com gerador de funções BK Precision, modelo 4013 DDS e detector UV-Vis (OceanOptics Spectrometer USB2000+) com lâmpada de Deutério e Tungstênio (DT-Mini-2) e Software Spectrasuite (Ocean Optics).

Já no método desenvolvido por cromatografia líquida foi utilizado cromatógrafo líquido de alta eficiência com sistema de separação isocrático modelo 882 Compact IC Plus acoplado a detector por amperometria pulsada (HPLC-PAD) modelo 871 Advanced Bioscan e Interface 771 IC Compact, Metrohm<sup>®</sup> (Suíça) com coluna analítica C18 de dimensões 4,6mm x 150mm x 5µm (Dionex) e eletrodo de ouro.

Foram utilizados ainda balança analítica Sartorius<sup>®</sup> (Alemanha) com quatro casas de precisão, pHmetro digital Metrohm<sup>®</sup> 827 pHlab (Suíça) com eletrodo de vidro combinado, sistema de purificação de água Milli-Q Millipore Synergy<sup>®</sup> UV (resistividade de 18,2 MΩ.cm@25°C), sistema de filtração a vácuo com filtro de acetato de celulose 0,45 µm Sartorius<sup>®</sup> (Alemanha), banho de ultrassom Bandelin Sonorex<sup>®</sup> RK 510 H (Alemanha) e bomba de vácuo Primatec<sup>®</sup> 131/132 (Brasil).

Todas as medidas espectrofotométricas foram realizadas em espectrofotômetro da marca Hewlett Packard<sup>®</sup> (HP 8453) com arranjo de diodos utilizando uma cubeta de quartzo com caminho óptico de 10 mm.

Para a previsão de interações medicamentosas foi utilizado o software Simcyp<sup>®</sup>, um simulador comercialmente disponível para modelagem que integra a variabilidade interindividual de populações virtuais para a geração de resultados.

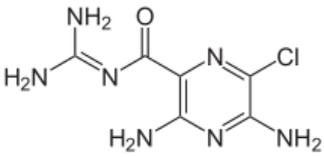
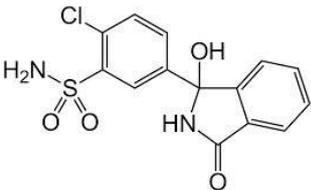
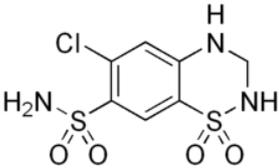
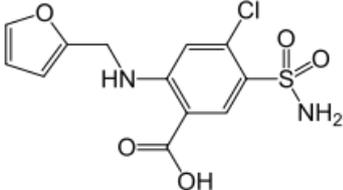
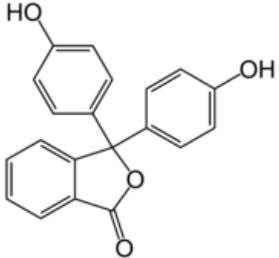
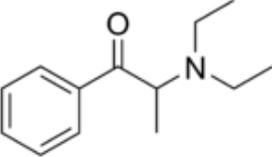
### 4.2 REAGENTES E SOLUÇÕES

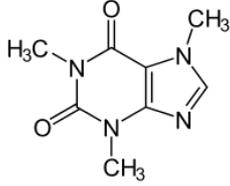
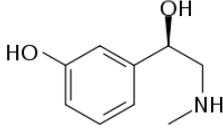
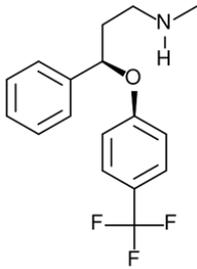
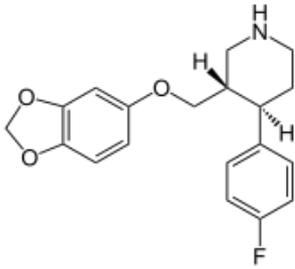
Como substâncias químicas de referência foram empregadas matérias-primas de grau farmacêutico, obtidas de distribuidoras de insumos farmacêuticos e

farmácias de manipulação acompanhadas de certificados de análises do controle de qualidade. Os fármacos em estudo (Quadro 3) são antidepressivos (fluoxetina e paroxetina), diuréticos (amilorida, clortalidona, hidroclorotiazida e furosemida), laxantes (fenolftaleína), anorexígenos (anfeparamona) e estimulantes (sinefrina e cafeína).

Foram utilizados ainda metanol e acetonitrila grau HPLC Tedia®, fosfato de sódio Merck®, hidróxido de sódio Vetec®, ácido fosfórico 85% e dodecil sulfato de sódio Merck®.

Quadro 3 - Fármacos em estudo neste trabalho e suas respectivas estruturas moleculares.

Diuréticos	
 <p><b>Amilorida</b></p>	 <p><b>Clortalidona</b></p>
	 <p><b>Hidroclorotiazida</b></p>
	 <p><b>Furosemida</b></p>
Laxante	Anorexígeno
 <p><b>Fenolftaleína</b></p>	 <p><b>Anfeparamona</b></p>

Estimulantes	
 <p><b>Cafeína</b></p>	 <p><b>Sinefrina</b></p>
Antidepressivos	
 <p><b>Fluoxetina</b></p>	 <p><b>Paroxetina</b></p>

Fonte: autor

### 4.3 PROCEDIMENTOS ANALÍTICOS

#### 4.3.1 Amostras de Suplementos Alimentares

As amostras analisadas neste trabalho incluem suplementos alimentares comercializados como produtos para emagrecimento, aumento de massa magra ou para maior disposição e energia durante as atividades físicas. As formulações foram adquiridas em território nacional através de websites e lojas físicas, somando um total de 114 amostras, sendo 82 distintas e 32 do mesmo produto, porém de lote distinto. Dentre as 82 amostras, as formas farmacêuticas encontradas foram: 49 como cápsulas contendo pó, 26 como pó (24 à granel e duas em sachê) e sete como comprimidos revestidos.

Os principais componentes encontrados nas formulações, segundo os rótulos confeccionados pelos fabricantes foram picolinato de cromo, cafeína, guaraná, vitaminas, minerais, triglicerídeos de cadeia média, antioxidantes, maltodextrina, laranja amarga, chá verde, extrato de acerola, goji berry, psyllium, quitosana, amido

de milho e proteína do soro do leite hidrolisada. O Quadro 4 apresenta a composição declarada das 82 amostras.

Quadro 4 - Suplementos alimentares adquiridos como amostras para a realização desta pesquisa.

<b>Número</b>	<b>Composição declarada</b>	<b>Forma farmacêutica</b>	<b>Posologia</b>
1	Guaraná, mate, mix de vitaminas e minerais (cálcio, colina, cromo, niacina, ácido pantotênico, vitamina B2 e vitamina B1)	Cápsula em gelatina dura contendo pó	4 cápsulas ao dia
2	Guaraná em pó, dióxido de silício	Cápsula em gelatina dura contendo pó	2 cápsulas ao dia
3	Maltodextrina (carboidrato de absorção gradativa), fenilalanina	Pó	40 g
4	Maltodextrina, guaraná, laranja amarga, chá verde, cromo, niacina, vitamina C	Pó	4 g duas vezes ao dia
5	Extrato de acerola, extrato de café verde, extrato de chá verde, extrato de goji berry, vitamina C, vitamina A, vitamina E, picolinato de cromo, selênio quelato, zinco quelato	Cápsula em gelatina dura contendo pó	1 cápsula 2 vezes ao dia
6	Extrato de acerola, café verde, picolinato de cromo, vitamina C, amido de milho, vitamina A, vitamina E, selênio quelato, zinco quelato	Cápsula em gelatina dura contendo pó	2 cápsulas 2 vezes ao dia
7	Cafeína anidra, fibra de laranja, psyllium, quitosana, vitaminas e minerais	Cápsula em gelatina dura contendo pó	2 cápsulas incolores duas vezes ao dia + 1 cápsula vermelha 1 vez ao dia
8	Amido de milho ceroso (carboidrato complexo)	Pó	30 g 2 vezes ao dia
9	Proteína hidrolisada e isolada	Pó	100 mg
10	Proteína do soro do leite isolada e hidrolisada	Pó	31 g
11	Cafeína 220 mg	Comprimido revestido	1 cápsula ao dia
12	Guaraná, colina, psyllium, vitaminas	Cápsula em gelatina dura contendo pó	2 cápsulas duas vezes ao dia

13	Maltodextrina, suplemento à base de colina, magnésio, vitaminas, cromo, ácido fólico, extrato de chá verde, extrato de guaraná, extrato de laranja amarga, extrato de canela	Cápsula em gelatina dura contendo pó	2 cápsulas duas vezes ao dia
14	Suplemento 100% cafeína para atletas	Cápsula em gelatina dura contendo pó	1 cápsula uma vez ao dia
15	Quitosana, psyllium, farelo de aveia	Cápsula em gelatina dura contendo pó	2 cápsulas duas vezes ao dia
16	Não declarada	Cápsula em gelatina dura contendo pó	1 cápsula duas vezes ao dia
17	Guaraná em pó com alta concentração de cafeína, citrus, café verde, picolinato de cromo, suplemento vitamínico e mineral. Em 4 cápsulas: 280 mg de cafeína, 364 mg de <i>Citrus aurantium</i> , 1254 mg de guaraná, 281 mg de chá verde, cromo e biotina	Cápsula em gelatina dura contendo pó	4 cápsulas ao dia
18	Psyllium, abacaxi, acerola, açaí, amora, ameixa, banana, laranja, maçã, mamão, morango, maracujá, tamarindo, uva, berinjela, beterraba, brócolis, cenoura, espinafre, tomate, guaraná, cogumelo <i>Agaricus blazei</i> , germen de soja, aveia, trigo, linhaça, gergelim, cacau, alho	Cápsula em gelatina dura contendo pó	2 a 3 cápsulas 3 vezes ao dia
19	L-valina, L-leucina, L-isoleucina, vitamina B6, arginina	Cápsula em gelatina dura contendo pó	4 cápsulas ao dia
20	Cromo, colina, cálcio, silício, zinco, magnésio, café verde, vitamina C, vitamina B3, ácido fólico	Cápsula em gelatina dura contendo pó	3 cápsulas ao dia
21	Chá verde, colágeno, inulina, gengibre, vitaminas e minerais	Pó	5 g após as refeições
22	Termogênico, cafeína, fosfato dicálcico, dióxido de silício, chá verde, leucina, tirosina, extrato de casca de pinheiro, garcinia	Comprimido revestido	2 comprimidos 2 vezes ao dia
23	Colágeno, betacaroteno, vitamina C	Pó	10 g
24	Fibra de laranja amarga	Cápsula em gelatina dura contendo pó	2 cápsulas duas vezes ao dia
25	Cafeína anidra	Cápsula em gelatina dura contendo pó	2 cápsulas ao dia

26	Cafeína anidra	Cápsula em gelatina dura contendo pó	2 cápsulas ao dia
27	Triglicerídeos de cadeia média	Pó	10 g
28	Aminopolissacarídeo	Cápsula em gelatina dura contendo pó	2 cápsulas três vezes ao dia
29	Proteína do soro do leite, albumina, caseína, L-leucina, L-valina, L-isoleucina	Pó	24,7 g
30	Chá branco, colágeno, <i>Phaseolus vulgaris</i> , cromo	Sachê em pó	5 g
31	Cafeína anidra	Comprimido revestido	2 comprimidos ao dia
32	Cafeína anidra	Cápsula em gelatina dura contendo pó	1 cápsula ao dia
33	Cafeína. 2 cápsulas contêm 420 mg de cafeína	Cápsula em gelatina dura contendo pó	2 cápsulas ao dia
34	Proteína do soro do leite isolada, peptídeos do soro do leite	Pó	32 g ao dia
35	Glutamina	Pó	5g ao dia
36	Cafeína anidra	Cápsula em gelatina dura contendo pó	2 cápsulas ao dia
37	Triglicerídeos de cadeia média	Pó	10 g
38	<i>Citrus aurantium</i> , chá verde, colina, cromo, magnésio, vitamina B3 e B6, vitamina C e ácido fólico	Cápsula em gelatina dura contendo pó	4 cápsulas ao dia
39	Chá verde, laranja amarga, guaraná, vitaminas e minerais	Sachê em pó	1 sachê antes das refeições
40	Colina, cromo, magnésio e <i>Citrus aurantium</i>	Cápsula em gelatina dura contendo pó	2 cápsulas ao dia
41	Aminoácidos de cadeia ramificada	Pó	13,37 g ao dia
42	Proteína de carne bovina hidrolisada e isolada, maltodextrina	Pó	31,3 g
43	Cafeína, taurina, chá verde, <i>Citrus aurantium</i> , gengibre e pimenta vermelha	Pó	2 doses de 6g ao dia
44	Quitosana	Cápsula em gelatina dura contendo pó	3 cápsulas duas vezes ao dia

45	Creatina, arginina, extrato de guaraná com alto teor de cafeína. Uma porção de 10 cápsulas corresponde a 3 g de creatina, 1 g de arginina e 220 mg de cafeína	Cápsula em gelatina dura contendo pó	Abaixo de 70 kg: 8 cápsulas ao dia; entre 70 e 90 kg: 9 cápsulas ao dia; acima de 90 kg: 10 cápsulas ao dia
46	Cafeína anidra 210 mg	Cápsula oleosa e em pó	1 cápsula em gelatina dura contendo pó e 2 cápsulas oleosas ao dia
47	Dextrose, maltodextrina, creatina, guaraná, cálcio arginina quelato, cálcio ornitina quelato, taurina	Pó	15 g 45 min antes do treino
48	Carnitina	Cápsula em gelatina dura contendo pó	1 a 2 cápsulas ao dia
49	Cafeína anidra. 210 mg de cafeína por cápsula	Cápsula em gelatina dura contendo pó	1 a 2 cápsulas ao dia antes do treino
50	Maltodextrina, soro de leite, leite em pó desnatado, proteína isolada de soja, fibra de aveia, vitaminas e minerais, ácido pantotênico, óleo vegetal de coco em pó	Pó	3 1/2 colheres de sopa
51	Cafeína 420 mg	Cápsula em gelatina dura contendo pó	1 cápsula ao dia antes do treino
52	Cafeína 420 mg	Comprimido	1 comprimido ao dia
53	Cafeína 420 mg	Cápsula em gelatina dura contendo pó	2 cápsulas ao dia
54	L-carnitina	Cápsula em gelatina dura contendo pó	2 a 4 cápsulas ao dia
55	Cafeína anidra 300 mg	Cápsula em gelatina dura contendo pó	1 cápsula ao dia
56	Complexo B, biotina, colina, cromo e vitamina C	Cápsula em gelatina dura contendo pó	4 cápsulas ao dia
57	Taurina, cafeína, picolinato de cromo, guaraná, laranja amarga, chá verde, café verde	Pó	5g ao dia
58	Psyllium ( <i>Plantago ovata</i> )	Cápsula em gelatina dura contendo pó	2 cápsulas 3 vezes ao dia
59	Guaraná, citrato de colina, cromo, nicotinamida, pantenoato de cálcio, tiamina. 4 cápsulas contém 210 mg de cafeína	Cápsula em gelatina dura contendo pó	4 cápsulas ao dia

60	Cafeína, n-acetyl-L-tirosina, niacina, vitamina B6 e B12, <i>Camellia sinensis</i>	Cápsula em gelatina dura contendo pó	1 cápsula em jejum e outra 5-6 horas mais tarde
61	Colágeno, polpa de frutas de <i>Bromelia ananás</i> L., flores de <i>Hibiscus sabdarriffa</i> L., folhas de <i>Cymbopogon citratus</i> Stapf, folhas e talos de <i>Ilex paraguariensis</i> , folhas de carqueja, folhas e talos de chá verde, folhas e talos de chá branco, óxido de magnésio, nicotinamida, maltodextrina, pantotenato de cálcio, cianocobalamina, picolinato de cromo, biotina	Pó	4 g
62	Cafeína 220 mg	Comprimido revestido	1 comprimido ao dia
63	Cafeína anidra 210 mg	Cápsula em gelatina dura contendo pó	1 cápsula ao dia
64	Quitossana, spirulina, acerola e biotina	Cápsula em gelatina dura contendo pó	7 cápsulas ao dia
65	Picolinato de cromo 200 mg	Cápsula em gelatina dura contendo pó	1 cápsula ao dia
66	Laranja amarga, guaraná, chá verde, erva mate, canela do ceilão, gengibre, abacaxi, framboesa, maltodextrina	Pó	5 g
67	Cafeína, extrato de café verde, extrato de <i>Caleus farskohlii</i> , extrato de cacau, extrato de yohimbe	Cápsula em gelatina dura contendo pó	Dias 1 e 2: 1 cápsula ao dia; dias 3 e 4: 2 cápsulas ao dia; dias 5 e 6: 2 cápsulas na 1ª refeição e 1 cápsula na 2ª refeição; dia 7 em diante: 2 cápsulas duas vezes ao dia
68	Maca peruana, acerola, vitamina E, vitamina A, zinco, picolinato de cromo, selênio	Cápsula em gelatina dura contendo pó	2 cápsulas ao dia
69	Proteína do leite concentrada, proteína de soro do leite isolada, albumina, leite desnatado, triglicerídeos de cadeia média, cloreto de sódio, caseinato de sódio, óleo de girassol, óleo de canola, caseína, cacau em pó com álcalis	Pó	1 colher média
70	Mistura de proteínas do soro do leite, glicina, creme de leite vegetal, cacau	Pó	37,8 g
71	Laranja amarga, beterraba, chá verde, mate, guaraná, feno grego, açafraão, alecrim	Pó	3 g

72	Quitosana, composto de laranja, guaraná, psyllium, vitamina C, cromo. 50 mg de cafeína a cada 5 cápsulas	Cápsula em gelatina dura contendo pó	2 cápsulas antes do café da manhã; 2 cápsulas antes do almoço; 1 cápsula antes do jantar
73	Complexo de magnésio, zinco e vitamina B6	Cápsula em gelatina dura contendo pó	2 cápsulas ao dia
74	Psyllium, lecitina de soja	Cápsula em gelatina dura contendo pó	2 cápsulas antes dos exercícios físicos
75	Creatina, beta-alanina	Pó	5,6 g 30 min antes da atividade física
76	360 mg de cafeína	Cápsula em gelatina dura contendo pó	1 cápsula ao dia
77	Cafeína anidra	Cápsula em gelatina dura contendo pó	1 cápsula ao dia
78	Vitamina C e picolinato de cromo, aromatizantes naturais (chá verde, guaraná, laranja amarga, ginseng e gengibre)	Cápsula em gelatina dura contendo pó	2 cápsulas ao dia 30 min antes da atividade física
79	Proteína do soro do leite, fígado bovino, maltodextrina, carbonato de cálcio, óleo de linhaça, citrato de colina, óleo de palma, óxido de magnésio, ácido fólico, vitamina C, vitamina B3, vitamina E, óxido de zinco, sulfato de manganês, biotina, picolinato de cromo	Comprimido revestido	11 comprimidos ao dia
80	Picolinato de cromo 35 mg	Cápsula em gelatina dura contendo pó	1 cápsula ao dia
81	320 mg de cafeína, carbonato de cálcio, maltodextrina, estearato de magnésio, dióxido de silício	Comprimido revestido	1 comprimido ao dia
82	Cafeína, carbonato de cálcio, maltodextrina, estearato de magnésio, dióxido de silício	Cápsulas em pó	Como suplemento dietético: 3 cápsulas ao dia; Programa de treinamento intensivo: 3 cápsulas duas vezes ao dia

Fonte: autor

Para o preparo das amostras em cápsulas, o conteúdo da mesma foi retirado. Os comprimidos foram macerados utilizando gral e pistilo. O peso médio

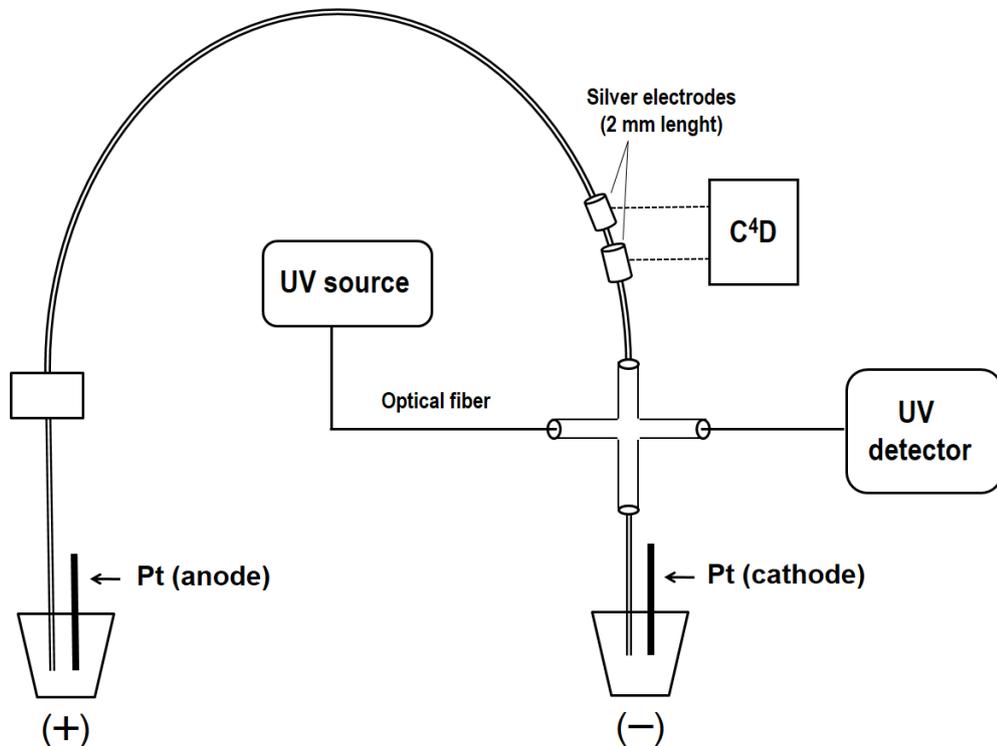
correspondente a uma unidade de cápsula ou comprimido foi dissolvido em balão volumétrico de 25 mL com metanol, sonificado por 30 minutos e filtrado em algodão e em membrana de acetato de celulose 0,45  $\mu\text{m}$  antes de ser diluído e injetado no sistema, partindo de um pool de 10 unidades. Para as amostras à granel foram pesados 0,5 g do produto e efetuado o mesmo procedimento descrito acima.

#### **4.3.2 Determinações por Eletroforese Capilar com Detecção por Condutividade sem contato e UV (CE-C<sup>4</sup>D/UV)**

As análises foram realizadas utilizando ambos os detectores do equipamento, condutividade e UV, sequencialmente na mesma corrida (Figura 13). A fonte de alta tensão utilizada foi configurada para detecção indireta dos fármacos na forma catiônica, com injeção anódica e detecção catódica. Utilizou-se capilar de sílica fundida (Polymicro, Phoenix/AZ, USA) com 68 cm de comprimento (46 cm até o primeiro detector), 75  $\mu\text{m}$  de diâmetro interno e 360  $\mu\text{m}$  de diâmetro externo. O capilar novo foi condicionado lavando-se com NaOH 1 mol L<sup>-1</sup> por 40 minutos, seguido de água ultrapura por 15 minutos e por fim eletrólito de trabalho por 30 minutos, empregando vácuo em pressão constante de -600 mmHg. No início de cada dia o capilar foi lavado com NaOH 0,1 mol L<sup>-1</sup> e com água ultrapura por 15 minutos cada, seguido de eletrólito por 30 minutos. Entre as injeções, lavou-se por 5 minutos com o eletrólito de trabalho e ao fim do dia 20 minutos com o eletrólito e 10 minutos com água ultrapura.

Para injeção das amostras utilizou-se sistema hidrodinâmico, que consistiu na elevação de uma das extremidades do capilar até uma altura de 20cm por 60s, provocando, assim, a entrada de determinado volume. As análises foram realizadas em temperatura de 25°C. Na fonte de alta tensão manteve-se o potencial de separação de -15 kV e a frequência de 400 kHz, de acordo com Moreira et al. (2013). Para a detecção UV foram avaliados os espectros dos fármacos para a escolha do melhor comprimento de onda, fixado em 260 nm ao final da otimização. O eletrólito de trabalho constituiu-se de tampão fosfato 20 mmol L<sup>-1</sup> com pH 9,2 contendo 30% de metanol (v/v) e foi preparado diariamente com posterior filtração em membrana 0,45  $\mu\text{m}$ .

Figura 13 – Esquema do equipamento de CE construído em laboratório.



Fonte: autor

#### 4.3.3 Determinações por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detecção Amperométrica Pulsada (HPLC-PAD)

Nas determinações por HPLC, a coluna foi diariamente condicionada com a fase móvel, constituída de tampão fosfato 5 mmol L<sup>-1</sup> em pH 4,5 contendo 0,3 mmol L<sup>-1</sup> de SDS e 50% de metanol (v/v), por aproximadamente 30 minutos, no fluxo de análise, 1 mL/minuto. Após o período de estabilização as soluções de trabalho foram injetadas de forma manual utilizando-se a alça de 20 µL. Ao final de cada dia, a coluna foi lavada com água ultrapura por uma hora em fluxo 0,5 mL/minuto seguido de uma solução de acetonitrila:água ultrapura (90:10) por 30 minutos, também em fluxo 0,5 mL/minuto. O potencial de amostragem foi mantido em +0,8V e os potenciais de limpeza do eletrodo em -0,2 V e +1,0 V, conforme referência (Moreira, 2012).

A separação dos analitos neste método ocorre por par iônico, através da adição do surfactante aniônico (SDS) à fase móvel. Juntamente com os íons do analito de carga oposta, as moléculas de SDS formam um par de íons não carregado, o qual pode ser retardado na fase estacionária, permitindo a separação. O mecanismo de retenção se torna uma mistura das interações de fase reversa e troca iônica. Na Figura 14 pode-se observar o eletrodo de ouro utilizado nas análises.

Figura 14 – Eletrodo de ouro utilizados nas determinações por HPLC-PAD.



Fonte: autor

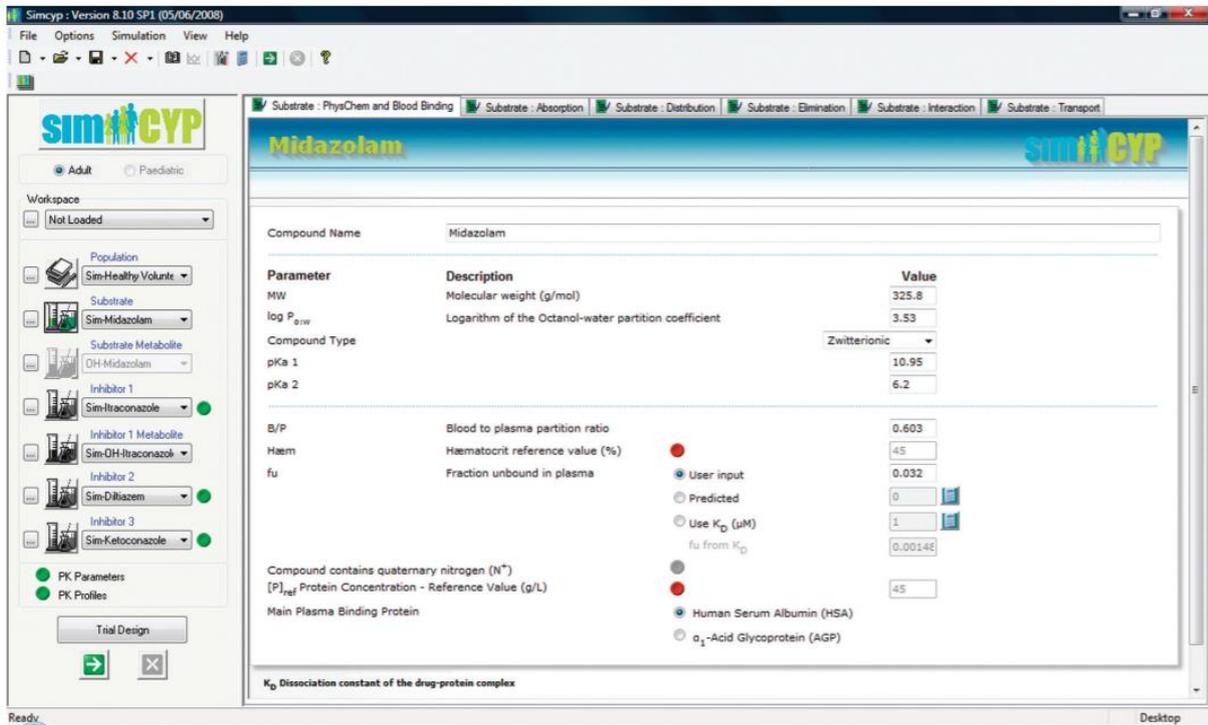
#### 4.3.4 Modelagem farmacocinética para o estudo de interações medicamentosas

A previsão de interações medicamentosas foi realizada *in silico* através de modelagens farmacocinéticas utilizando o software Simcyp® (Simcyp® Ltd, Certara Sheffield, UK; <http://www.simcyp.com>) versão 14.0.16. A realização deste capítulo da tese ocorreu durante o período de estágio sanduíche na Universidade da Flórida (Gainesville, FL, USA) sob supervisão do Prof. Dr. Hartmut Derendorf. Um modelo

farmacocinético baseado na fisiologia (PBPK) foi desenvolvido para a sertralina e seu metabólito ativo, n-desmetilsertralina. Além da base de dados populacional disponível na biblioteca do software, foram coletados dados de estudos *in vitro* e *in vivo* na literatura para traçar o perfil farmacocinético da sertralina e prever as interações medicamentosas entre sertralina e cafeína e sertralina e sildenafil. Foram realizados estudos de dose única e de *steady state* tanto para o perfil farmacocinético da sertralina e metabólito ativo quanto para as interações medicamentosas.

O modelo de comportamento farmacocinético desenhado para a sertralina e seu metabólito ativo foi realizado de acordo com os parâmetros de um estudo clínico já publicado (PATEL *et al.*, 2009). Para isso, foram considerados 32 voluntários caucasianos saudáveis do sexo masculino em estado de jejum dentro de uma faixa etária de 20 a 50 anos. A dose considerada foi de um comprimido de 100 mg de sertralina para o estudo de dose única e de um comprimido de 100 mg ao dia por 30 dias para o estudo de *steady state*. Para extração dos dados farmacocinéticos foi utilizada a ferramenta eletrônica WebPlotDigitizer.

Já para o desenho de estudo das interações farmacocinéticas foram considerados 200 indivíduos caucasianos saudáveis do sexo masculino em estado de jejum dentro de uma faixa etária de 20 a 50 anos. As doses consideradas para o estudo de interação entre sertralina e cafeína, sendo a sertralina o inibidor e a cafeína o substrato, foram de 200 e 300 mg, respectivamente, baseadas nas doses máximas utilizadas na terapêutica para cada um dos fármacos e sabendo-se que a farmacocinética da sertralina é linear. Para o estudo de interação entre sertralina e sildenafil, sendo a sertralina o inibidor e o sildenafil o substrato, foram consideradas doses de 200 e 100 mg, respectivamente. Para os estudos *steady state* foram consideradas as mesmas dosagens diárias, porém pelo período de 30 dias. Na Figura 15 está exposto um exemplo de tela inicial de trabalho do Simcyp para entrada de parâmetros do fármaco.

Figura 15 – *Printscreen* da interface para entrada de parâmetros do composto no Simcyp.

Fonte: JAMEI *et al.*, 2009

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste trabalho, um método eletroforético e um método cromatográfico para a detecção simultânea de fármacos foram desenvolvidos para a investigação da adulteração de suplementos alimentares. Os métodos foram aplicados em produtos comercializados no Brasil, adquiridos através de websites e lojas físicas. Os compostos escolhidos são alguns dos majoritários presentes como adulterantes em amostras de suplemento, segundo análise minuciosa da literatura. Foi investigada também a possibilidade de interação medicamentosa entre adulterantes e compostos naturalmente presentes neste tipo de produto.

### 5.1 DETERMINAÇÃO DE ADULTERANTES EM SUPLEMENTOS ALIMENTARES POR ELETROFORESE CAPILAR COM DETECÇÃO SEQUENCIAL POR CONDUTIVIDADE SEM CONTATO E ULTRAVIOLETA (CE-C<sup>4</sup>D/UV)

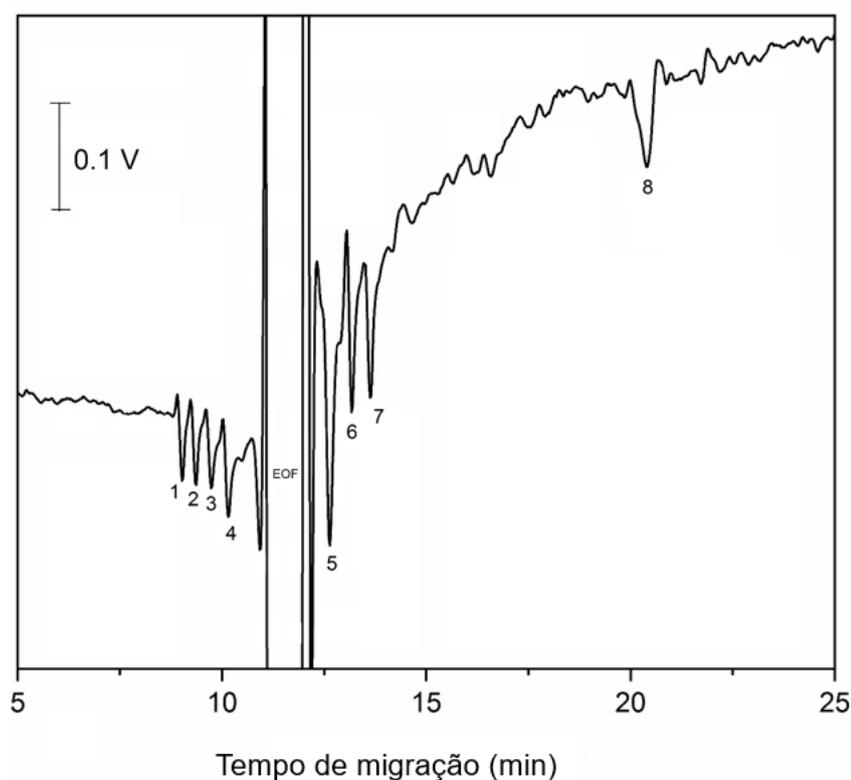
#### 5.1.1 Otimização da separação eletroforética

O método desenvolvido para a separação e detecção dos analitos fluoxetina, paroxetina, amilorida, anfepramona, clortalidona, fenolftaleína, hidroclorotiazida e furosemida por detecção de condutividade sem contato foi previamente otimizado e validado pelo grupo de pesquisa, sendo que as condições iniciais para o andamento desta tese foram mantidas de acordo com o trabalho publicado (MOREIRA et al., 2013). O trabalho foi desenvolvido para a detecção destes fármacos em produtos naturais, o que facilita sua aplicação em amostras de suplementos alimentares. O eletroferograma da Figura 16 ilustra o método em condições adequadas para análise.

Considerando que os fármacos estudados possuem vários grupos que são receptores de íons de hidrogênio, a fluoxetina, a paroxetina, a amilorida e a anfepramona ainda podem estar em forma protonada a pH 9,2, o que pode explicar a separação observada com a detecção no lado catódico do sistema CE. Contudo, a clortalidona, a fenolftaleína, a hidroclorotiazida e a furosemida são detectadas nas suas formas aniônicas porque migram após o pico eletro-osmótico (EOF), que é observado no primeiro passo de detecção usando C<sup>4</sup>D. Além disso, é bem sabido que a magnitude do EOF é maior acima de pH 8.0. Conseqüentemente, o EOF é

direcionado ao cátodo, e ambos os fármacos catiônicos e aniônicos também podem ser transportados para o capilar pelo EOF existente em direção ao cátodo.

Figura 16 - Eletroferograma dos analitos estudados (1) fluoxetina 100 mg L<sup>-1</sup>, (2) paroxetina 100 mg L<sup>-1</sup>, (3) amilorida 100 mg L<sup>-1</sup>, (4) anfepramona 100 mg L<sup>-1</sup>, (5) clortalidona 200 mg L<sup>-1</sup>, (6) fenolftaleína 200 mg L<sup>-1</sup>, (7) hidroclorotiazida 100 mg L<sup>-1</sup> e (8) furosemida 100 mg L<sup>-1</sup>. Condições: eletrólito de trabalho tampão fosfato 20 mmol L<sup>-1</sup> (pH 9,2) contendo metanol 30% (v/v), potencial de separação de -15 Kv, capilar de sílica fundida 75 µm x 360 µm x 68 cm (46 cm até o detector); detecção indireta por C<sup>4</sup>D operando em 400 kHz; temperatura 25°C; injeção hidrodinâmica por gravidade de 20 cm durante 60s.



Fonte: autor

A fim de aumentar a confiabilidade do método, resolveu-se então otimizar e validar um segundo método, utilizando o detector UV em corrida simultânea ao detector de condutividade, permitindo a detecção sequencial dos fármacos utilizando dois tipos de detectores em uma mesma corrida eletroforética. A separação foi realizada acoplado uma célula de fluxo ao sistema CE-C<sup>4</sup>D para detecção UV. Assim, o C<sup>4</sup>D e o detector UV são acoplados em linha e operados de forma

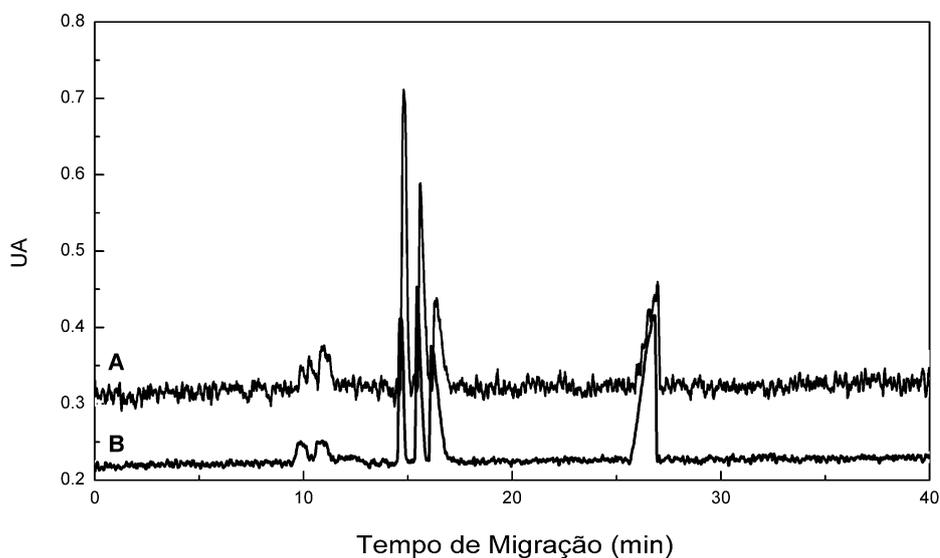
independente. No primeiro passo, os íons CE separados são detectados na célula de condutividade sem contato usando um detector caseiro. No segundo passo, os íons absorventes são detectados em uma célula de fluxo, onde o feixe de luz UV é focado através de um cabo de fibra óptica. Para isso, primeiramente foi realizada uma varredura dos espectros dos analitos, com o objetivo de escolher um comprimento de onda ideal para análise. A partir dos resultados, foram selecionados dois comprimentos de onda para uma primeira avaliação: 210 nm e 229 nm, o que resultou nos eletroferogramas da Figura 17.

Nota-se que os picos iniciais (fluoxetina, paroxetina, amilorida e anfepramona) não ficaram bem resolvidos, apresentando também uma suposta coeluição. Para resolver esse problema, optou-se pela tentativa de alterar a concentração do solvente e realizar também a tentativa com acetonitrila em diferentes concentrações. Os resultados estão expostos nas figuras 18 e 19.

Não houve, porém, uma melhora considerável nos eletroferogramas. Além disso, o tempo de análise aumentou com as variações de metanol e qualquer mudança nos parâmetros para a melhora do método pela detecção UV afetaria também o método com detecção por condutividade. Optou-se então por manter a concentração inicial de metanol e escolher um comprimento de onda onde, nem todos os analitos apresentassem o melhor sinal, porém a resolução dos picos fosse melhor do que inicialmente. O comprimento de onda escolhido foi 260 nm, resultando no eletroferograma da figura 20, o qual foi escolhido para iniciar a validação. Neste comprimento de onda, porém, não foi possível detectar o sinal de dois analitos: a fluoxetina e a paroxetina. Estes, por sua vez, foram excluídos do método, e considerados como não-interferentes na detecção ultravioleta. Os demais compostos foram separados, apresentando bons sinais no eletroferograma. Foram testados também outros possíveis interferentes, que não apresentaram sinal no comprimento de onda escolhido: sertralina, sibutramina, femproporex e bupropiona.

Embora os picos de fenolftaleína e hidroclorotiazida não apareçam totalmente separados durante a detecção UV, a seletividade do método não foi comprometida, uma vez que a ocorrência de ambos os fármacos como adulterantes em um suplemento é difícil. No entanto, se este caso ocorrer, a quantificação pode ser realizada pelo C<sup>4</sup>D, utilizando o detector UV apenas como um método de confirmação qualitativa. Um caso semelhante foi descrito por Makrlikova et al. (2015).

Figura 17 - Eletroferograma dos analitos estudados: fluoxetina, paroxetina, amilorida, anfepramona, clortalidona, fenolftaleína, hidroclorotiazida e furosemida 150mg L<sup>-1</sup>. Condições: eletrólito de trabalho tampão fosfato 20 mmol L<sup>-1</sup> (pH 9,2) contendo metanol 30% (v/v), potencial de separação de -15Kv, capilar de sílica fundida 75 µm x 360 µm x 68 cm (46 cm até o detector); detecção ultravioleta com comprimento de onda de 210nm (A) e 229nm (B); temperatura 25°C; injeção hidrodinâmica por gravidade de 20 cm durante 60s.

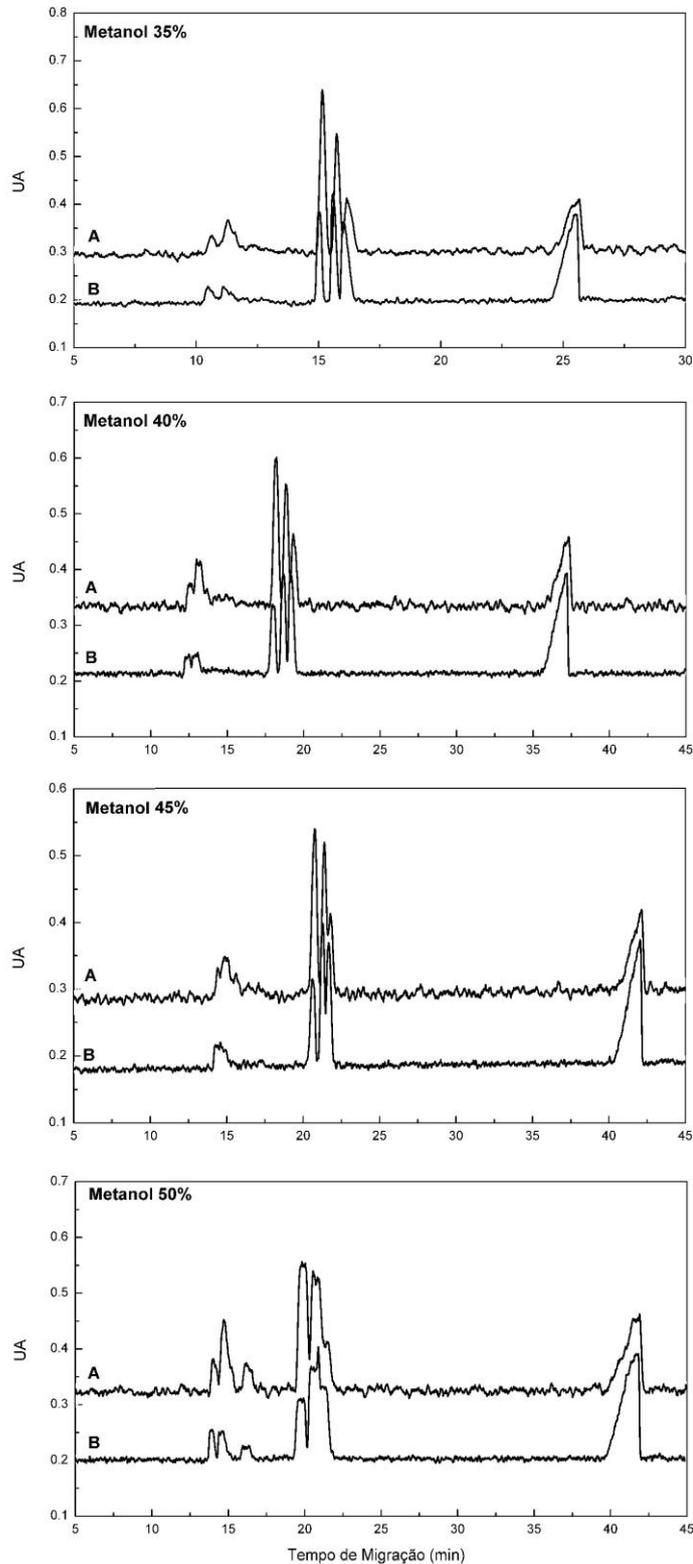


Fonte: autor.

### 5.1.2 Validação

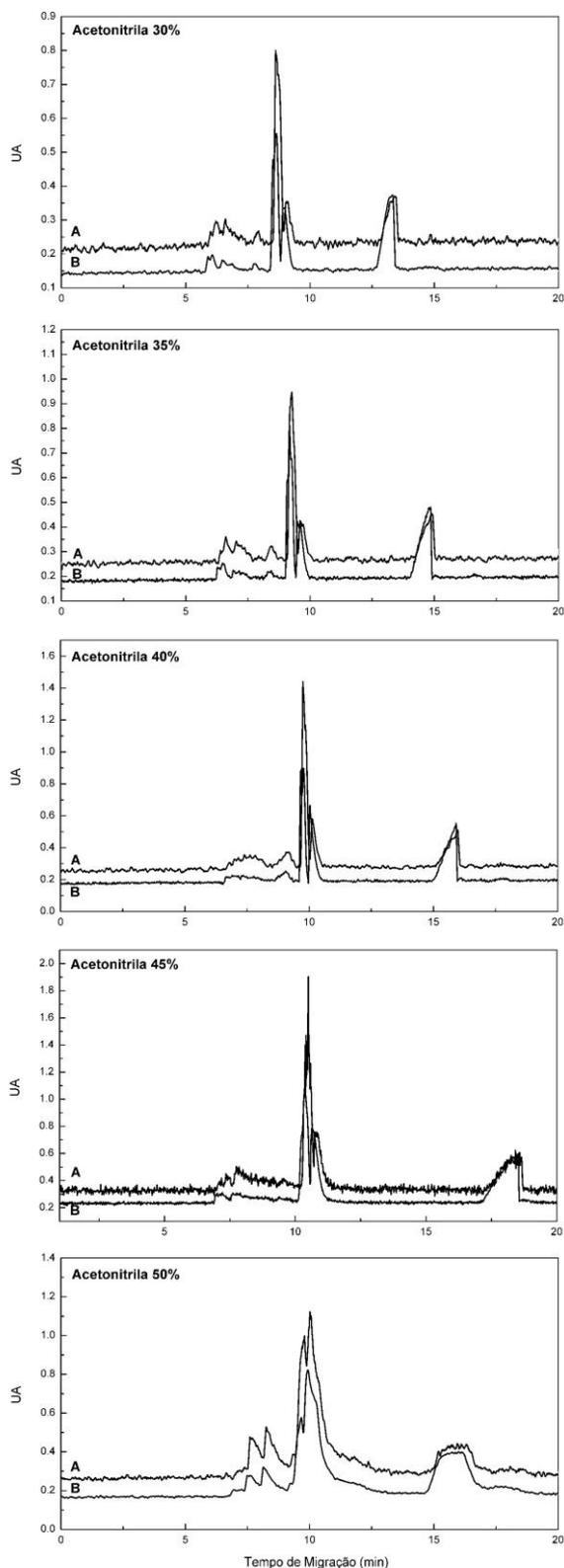
O método foi validado com base nos seguintes parâmetros: faixa linear, limite de detecção, limite de quantificação, precisão e exatidão. Os dados de linearidade foram validados pela análise de variância (ANOVA), que demonstrou uma relação linear e nenhum desvio significativo da linearidade ( $P < 0,05$ ).

Figura 18 - Eletroferograma dos analitos estudados: fluoxetina, paroxetina, amilorida, anfepramona, clortalidona, fenolftaleína, hidroclorotiazida e furosemida 150 mg L<sup>-1</sup>. Condições: eletrólito de trabalho tampão fosfato 20 mmol L<sup>-1</sup> (pH 9,2) contendo diferentes concentrações de metanol, potencial de separação de -15Kv, capilar de sílica fundida 75 µm x 360 µm x 68 cm (46 cm até o detector); detecção ultravioleta com comprimento de onda de 210 nm (A) e 229 nm (B); temperatura 25°C; injeção hidrodinâmica por gravidade de 20 cm durante 60s.



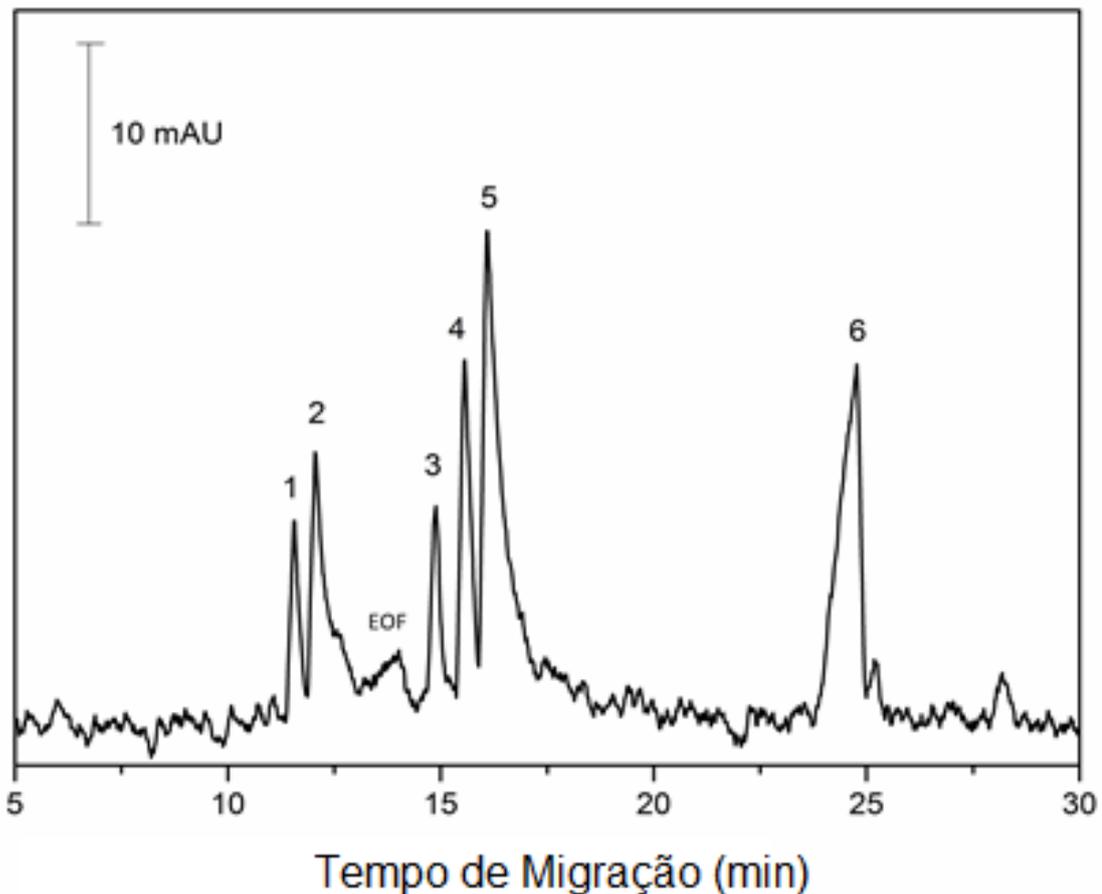
Fonte: autor

Figura 19 - Eletroferograma dos analitos estudados: fluoxetina, paroxetina, amilorida, anfepramona, clortalidona, fenolftaleína, hidroclorotiazida e furosemda 150 mg L<sup>-1</sup>. Condições: eletrólito de trabalho tampão fosfato 20 mmol L<sup>-1</sup> (pH 9,2) contendo diferentes concentrações de acetonitrila, potencial de separação de -15Kv, capilar de sílica fundida 75 µm x 360 µm x 68 cm (46 cm até o detector); detecção ultravioleta com comprimento de onda de 210 nm (A) e 229 nm (B); temperatura 25°C; injeção hidrodinâmica por gravidade de 20 cm durante 60s.



Fonte: autor

Figura 20 - Eletroferograma dos analitos estudados (1) amilorida 100 mg L<sup>-1</sup>, (2) anfepramona 100 mg L<sup>-1</sup>, (3) clortalidona 200 mg L<sup>-1</sup>, (4) fenolftaleína 200 mg L<sup>-1</sup>, (5) hidroclorotiazida 100 mg L<sup>-1</sup> e (6) furosemida 100 mg L<sup>-1</sup>. Condições: eletrólito de trabalho tampão fosfato 20 mmol L<sup>-1</sup> (pH 9,2) contendo metanol 30% (v/v), potencial de separação de -15 Kv, capilar de sílica fundida 75 µm x 360 µm x 68 cm (46 cm até o detector); detecção UV em 260 nm; temperatura 25°C; injeção hidrodinâmica por gravidade de 20 cm durante 60s.



Fonte: autor

A validação do método por detecção UV foi realizada de acordo com os parâmetros da AOAC para suplementos alimentares (AOAC, 2013). A faixa linear foi obtida pela injeção em triplicata de cada nível de concentração que variou de 50 a 1000 mg L<sup>-1</sup>, de acordo com a sensibilidade de cada analito. Os coeficientes de correlação foram todos acima de 0,99. Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) foram determinados pela razão sinal ruído da linha base (cinco replicatas). A estimativa do limite de detecção teve por base a relação de três vezes o ruído da linha de base, enquanto que a do limite de quantificação foi considerado dez vezes o ruído da linha de base.

A precisão foi avaliada através da injeção do ponto médio da faixa linear de cada composto e sua respectiva área em triplicata por três dias (inter-dia) e em seis replicatas no mesmo dia (intra-dia). O resultado foi expresso através do coeficiente de variação percentual (CV%). A exatidão foi calculada pelo método da adição de padrão, para o qual uma concentração conhecida do analito de interesse é adicionada a uma determinada amostra. À amostra “contaminada”, foram adicionadas quatro diferentes concentrações crescentes do mesmo analito, obtendo-se uma curva analítica na amostra. A concentração (x) encontrada pela equação da reta quando  $y = 0$  corresponde à recuperação alcançada de valor inicialmente adicionado à amostra. Os dados de validação, tanto os obtidos pela validação do método com o detector UV quanto os obtidos anteriormente pela validação do método com o detector de condutividade sem contato, são mostrados na Tabela 1.

### 5.1.3 Aplicação do método às amostras de suplementos alimentares

O método analítico validado em eletroforese capilar foi aplicado às amostras de suplementos alimentares. Primeiramente foi realizado um *screening* dos 114 produtos, afim de detectar algum dos analitos em questão. Nas amostras que apresentaram picos eletroforéticos semelhantes aos fármacos estudados, o método de adição padrão foi aplicado para confirmar a presença, bem como quantificar o fármaco suspeita. Os resultados encontram-se apresentados na Tabela 2.

Considerando todas as amostras ( $n = 114$ ) analisadas neste trabalho, cerca de 12% ( $n = 14$ ) foram adulteradas com diuréticos. Entre as amostras adulteradas, a hidroclorotiazida foi detectada em todas as 14 amostras e, em uma amostra, detectou-se a presença de furosemida além da hidroclorotiazida, mostrando o possível uso de dois fármacos diuréticos diferentes para intensificar o efeito por diferentes mecanismo de ação. A Figura 21 mostra os eletroferogramas ( $C^4D$  e UV) obtidos a partir da amostra 38, que contém hidroclorotiazida como um fármaco não declarado. A Figura 22 apresenta os eletroferogramas da amostra 47, que contém dois diuréticos associados (hidroclorotiazida e furosemida) na formulação.

Tabela 1 – Estudo comparativo das figuras de mérito do método por eletroforese capilar com detecção C<sup>4</sup>D-UV para a determinação de fármacos em amostras de suplementos alimentares.

Droga	Faixa linear (mg L <sup>-1</sup> )		LD (mg L <sup>-1</sup> )		LQ (mg L <sup>-1</sup> )		Precisão (%)		Exatidão (%)	
	C <sup>4</sup> D	UV	C <sup>4</sup> D	UV	C <sup>4</sup> D	UV	C <sup>4</sup> D	UV	C <sup>4</sup> D	UV
<b>Fluoxetina</b>	10 - 500	-	3,3	-	11,01	-	3,64	-	104,6	-
<b>Paroxetina</b>	10 - 500	-	2,81	-	9,37	-	6,00	-	114,2	-
<b>Amilorida</b>	10 – 500	50 – 1000	1,54	12,28	5,14	40,55	1,63	4,23	98,60	83,00
<b>Anfepramona</b>	10 – 500	50 – 1000	3,29	12,83	10,96	42,37	3,26	5,03	116,80	96,00
<b>Clortalidona</b>	10 – 500	50 – 1000	2,32	8,55	7,72	28,24	2,50	4,35	101,80	108,00
<b>Fenolftaleína</b>	10 – 500	50 – 1000	2,48	11,56	8,42	38,16	2,81	5,49	93,60	89,33
<b>Hidroclorotiazida</b>	10 – 500	50 – 1000	2,03	13,20	6,78	43,58	1,87	4,00	101,00	82,50
<b>Furosemida</b>	10 – 500	50 – 800	3,19	4,80	10,66	15,86	3,23	4,19	101,00	93,00

Fonte: (autor; Moreira et al., 2013).

Tabela 2 - Resultados da análise das formulações de suplementos alimentares por CZE-C<sup>4</sup>D-UV com os adulterantes encontrados e suas quantidades segundo a ingestão diária recomendada pelo fabricante.

Amostra	Fármaco encontrado	Dose (mg dia <sup>-1</sup> recomendado pelo fabricante)	
		Detector CE	
		C <sup>4</sup> D	UV
1	Hidroclorotiazida	48,79 <sup>a</sup>	46,89 <sup>a</sup>
		27,31 <sup>b</sup>	26,96 <sup>b</sup>
7	Hidroclorotiazida	17,65	16,69
13	Hidroclorotiazida	n.d. <sup>a</sup>	n.d. <sup>a</sup>
		87,49 <sup>b</sup>	85,36 <sup>b</sup>
19	Hidroclorotiazida	39,41	40,98
20	Hidroclorotiazida	31,17	29,69
38	Hidroclorotiazida	180,52	178,8
39	Hidroclorotiazida	94,69	92,58
40	Hidroclorotiazida	19,56	16,20
41	Hidroclorotiazida	72,8	74,51
47	Hidroclorotiazida	192,91	179,25
	Furosemida	91,5	89,41
60	Hidroclorotiazida	32,68	32,45
79	Hidroclorotiazida	95,63 <sup>a</sup>	94,3 <sup>a</sup>
		110,21 <sup>b</sup>	99,65 <sup>b</sup>

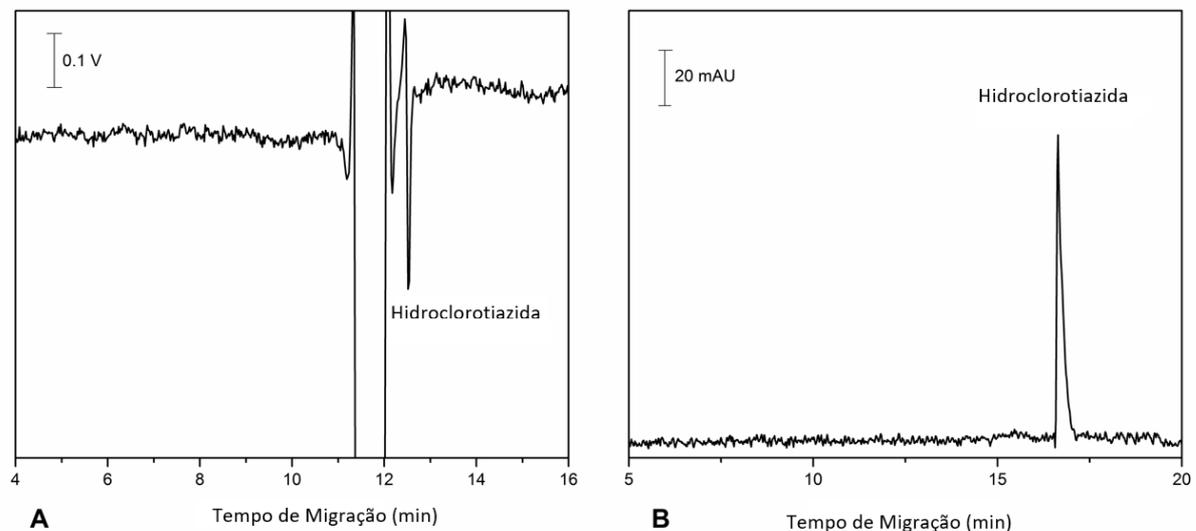
<sup>a</sup> Lote 1 ; <sup>b</sup> Lote 2

Fonte: autor

Como os diuréticos aumentam a excreção de água do corpo, acabam por vezes sendo adicionados ilegalmente aos suplementos utilizados para a perda efetiva de peso. Em relação às quantidades encontradas, sabe-se que os comprimidos comerciais de hidroclorotiazida estão geralmente disponíveis em doses de 25 ou 50 mg e a dose recomendada não excede 200 mg por dia. Se considerarmos esta dosagem, todas as amostras apresentaram quantidades de hidroclorotiazida menores que a dose máxima recomendada. No entanto, esses produtos não podem conter diuréticos em suas embalagens, o que pode levar o

consumidor a vários efeitos desconhecidos e possíveis interações com outros medicamentos. Os efeitos colaterais dos diuréticos tiazídicos incluem perda de apetite, coceira, visão turva, dor de cabeça, dor de estômago e fraqueza e também tonturas. Além disso, os diuréticos podem causar uma alteração nos níveis de potássio e outros eletrólitos no sangue (WEINER et al., 1990). Em relação à presença de furosemida na amostra 47, uma dose próxima à terapêutica (até 80 mg por dia) foi encontrada associada à hidroclorotiazida na formulação, possivelmente com a intenção de intensificar o efeito da diurese por diferentes mecanismos de ação. Estudos recentes também mostraram a presença não declarada de diuréticos em suplementos dietéticos, demonstrando claramente os casos crescentes desta prática (CARVALHO et al., 2011; WANG et al., 2003; LU et al., 2010).

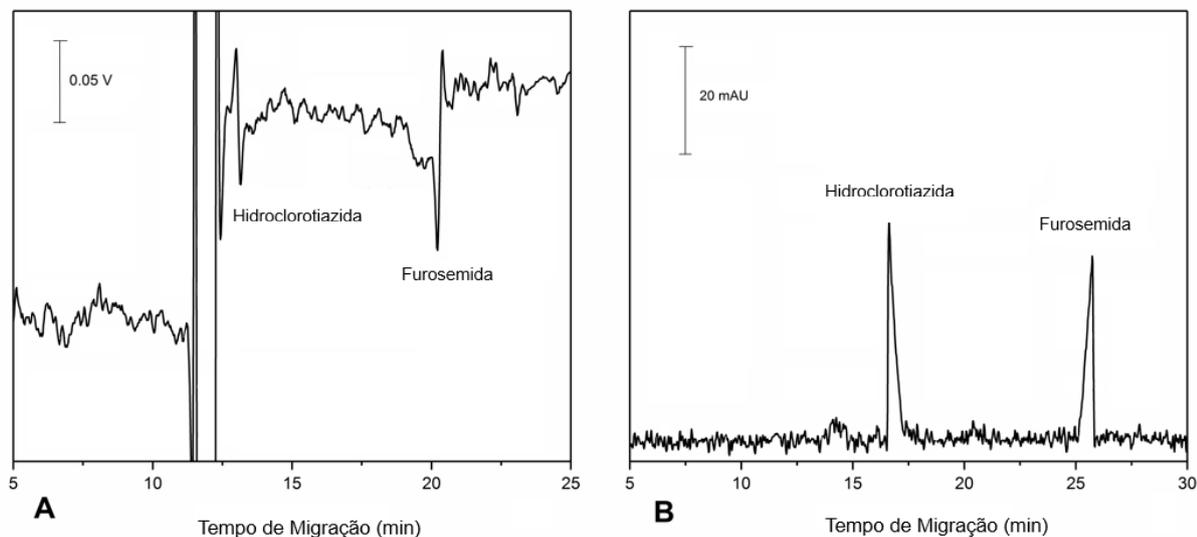
Figura 21 - Eletroferogramas da amostra 38 contendo hidroclorotiazida como adulterante. Detecção por CZE-C<sup>4</sup>D-UV: **(A)** C<sup>4</sup>D em 400 kHz e **(B)** UV em 260 nm. Outras condições estão descritas na figura 16.



Fonte: autor

Assim, esses resultados servem de alerta aos consumidores e agências reguladoras, visto que esses produtos podem ser registrados sob diferentes classificações sanitárias no Brasil, deixando uma lacuna nas especificações de regras para cada classe e facilitando casos de adulteração.

Figura 22 - Eletroferogramas da amostra 47 contendo hidroclorotiazida e furosemida como adulterantes. Detecção por CZE-C<sup>4</sup>D-UV: **(A)** C<sup>4</sup>D em 400 kHz e **(B)** UV em 260 nm. Outras condições estão descritas na figura 16.



Fonte: autor

Em relação ao uso de dois detectores em sequência no método, pode-se dizer que a prática permitiu um maior grau de confiança nos dados, já que todos os fármacos detectados utilizando o detector C<sup>4</sup>D também foram detectados com o detector UV. As quantidades de hidroclorotiazida e furosemida quantificadas usando os dois detectores também mostraram-se próximas, apresentando desvios mínimos.

Além disso, os antidepressivos com baixas características de absorção UV poderiam ter sido detectados usando C<sup>4</sup>D. É o caso observado para fluoxetina e paroxetina neste trabalho, mas pode ser aplicado a todos os casos em que os medicamentos não absorvem a radiação UV. Eles só podem ser detectados por C<sup>4</sup>D, provavelmente devido à ausência de C = O, C = N e O = S = O como sítios cromóforos comparativamente aos outros fármacos.

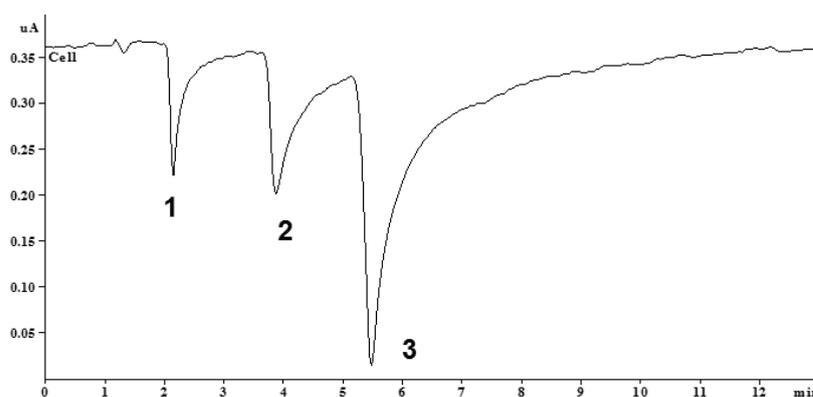
Ainda, qualquer investigação em matrizes complexas pode influenciar fortemente a estabilidade da linha de base nos eletroferogramas obtidos com C<sup>4</sup>D. Uma vez que os suplementos dietéticos têm diferentes componentes na formulação, o uso de um segundo detector UV com uma linha de base limpa e estável é vantajoso. As regiões próximas dos picos obtidos nas amostras detectadas pela absorção de UV são claramente melhores quando comparadas às linhas de base obtidas com C<sup>4</sup>D em amostras de suplementos dietéticos.

## 5.2 DETERMINAÇÃO DE ADULTERANTES EM SUPLEMENTOS ALIMENTARES POR CROMATOGRÁFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA COM DETECÇÃO AMPEROMÉTRICA PULSADA (HPLC-PAD)

### 5.2.1 Otimização da separação cromatográfica

No método analítico utilizado como base para este capítulo da tese (CARVALHO *et al.*, 2013), ocorria a separação de três diuréticos utilizando uma célula amperométrica contendo um eletrodo de ouro de 8 mm de diâmetro (Vario Cell®, Metrohm). O método permitiu a determinação dos fármacos, sendo que a análise da interferência de outras classes farmacológicas (anorexígenos, antidepressivos, laxantes e ansiolíticos) também foi investigada para o estudo de formulações fitoterápicas. No entanto, a possibilidade de determinar estimulantes na mesma corrida cromatográfica não foi investigada, uma vez que essas formulações não declararam o uso de qualquer fonte natural de cafeína e / ou outras aminas. Portanto, a determinação dos diuréticos mais importantes como candidatos a adulterantes (furosemida, hidroclorotiazida e clortalidona) na presença de cafeína e sinefrina foi investigada no presente trabalho. Em um primeiro momento, fez-se a tentativa de reprodução do trabalho inicial, onde obteve-se o cromatograma demonstrado na Figura 23.

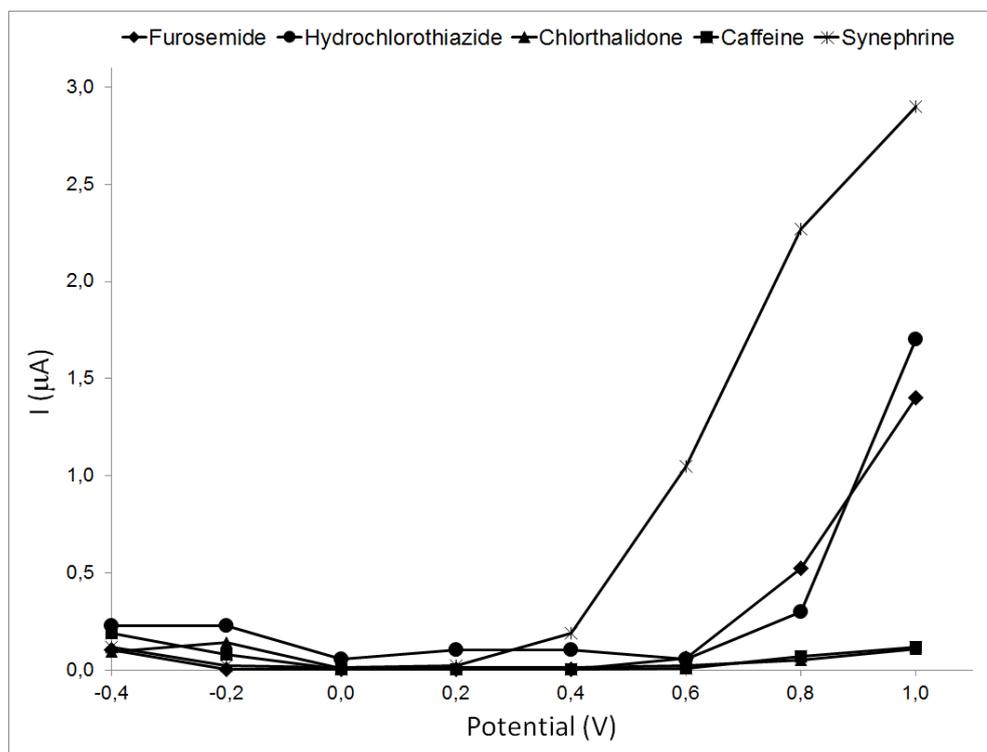
Figura 23 - Cromatograma dos adulterantes ( $20 \text{ mg L}^{-1}$ ) (1) hidroclorotiazida, (2) clortalidona e (3) furosemida. Condições: fase móvel tampão fosfato  $5 \text{ mmol L}^{-1}$  (pH 4,5) contendo SDS  $0,3 \text{ mmol L}^{-1}$  e metanol 50% (v/v); coluna C18; potencial de amostragem de  $+0,8\text{V}$ ; potenciais de limpeza de  $-0,2\text{V}$  e  $+1,0\text{V}$ ; fluxo de  $1,0 \text{ mL/min}$ .



Fonte: autor

Ao contrário da célula amperométrica utilizada no trabalho acima mencionado, neste foi aplicado um eletrodo de ouro de 3 mm de diâmetro para a detecção dos fármacos em uma célula amperométrica de novo design (Vario Cell®, Metrohm), que tem um volume de 0,29  $\mu\text{L}$ . Assim, a otimização do potencial de detecção da cafeína, sinefrina, hidroclorotiazida, clortalidona e furosemida na célula envolveu a obtenção de voltamogramas hidrodinâmicos em uma faixa potencial de -0,4 a +1,0 V. Como pode ser visto na Figura 24, furosemida, hidroclorotiazida, clortalidona e cafeína apresentaram processos de oxidação mais pronunciados entre +0,8 e +1,0 V. Além disso, a sinefrina mostrou o processo de oxidação mais pronunciado a partir de +0,4 V. Da mesma forma, a hidroclorotiazida também mostrou produtos de oxidação entre +0,2 e +0,4 V. Sobre os processos de redução observados no eletrodo de ouro, todos os fármacos estudados mostraram um comportamento voltamétrico semelhante entre -0,2 e -0,4 V, sendo que a hidroclorotiazida sofreu o processo de redução mais intenso na superfície do eletrodo nesta faixa.

Figura 24 - Voltamogramas dinâmicos no eletrodo de ouro para hidroclorotiazida, clortalidona, furosemida, cafeína e sinefrina ( $1 \text{ mmol L}^{-1}$ ). Eletrólito suporte: tampão fosfato  $5 \text{ mmol L}^{-1}$  (pH 4,5). Eletrodo de referência: eletrodo de hidrogênio em fase sólida.

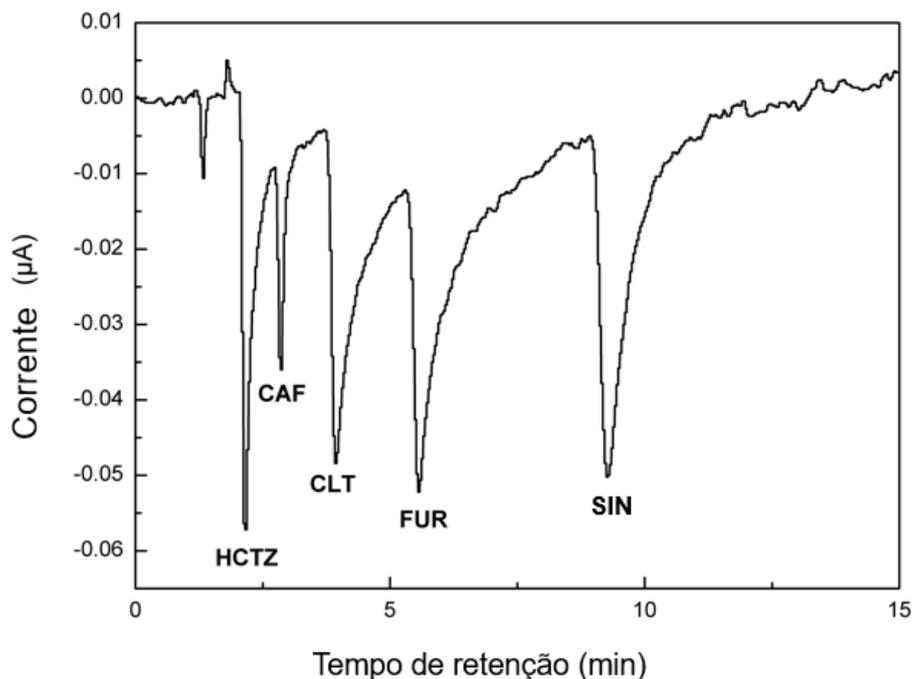


Fonte: autor

Considerando que a cafeína, a sinefrina, a hidroclorotiazida, a clortalidona e a furosemida demonstraram uma eletroatividade pronunciada no eletrodo de ouro na faixa de potencial de +0,8 e +1,0 V, um potencial de detecção de +0,8 V foi escolhido como potencial de medição em PAD após a separação cromatográfica. Embora a sinefrina, a furosemida e a hidroclorotiazida tenham processos de oxidação sensíveis em +1,0 V, os cromatogramas apresentaram melhores formas de pico e estabilização basal ao detectar os fármacos em +0,8 V. Quanto aos mecanismos eletroquímicos que ocorrem no eletrodo de ouro, os medicamentos sulfurados são adsorvidos e oxidados na superfície do ouro durante a varredura positiva. Além disso, os grupos amino presentes nas moléculas de todos os estimulantes e diuréticos estudados podem ocorrer na superfície do ouro. Portanto, todos esses processos de oxidação envolvendo grupos sulfatados e amino muito provavelmente justificam o aumento da corrente observada entre +0.4 e +1.0 V.

Por fim, o ciclo PAD dos fármacos estudados envolveu um potencial de oxidação (+1.0 V por 0,4 s) e um potencial de redução (-0.2 V por 1,2 s) na superfície do eletrodo de ouro como etapas de limpeza. Os fármacos foram detectados, como já mencionado, aplicando um pulso otimizado de +0,8 V por 0,4 s, completando o ciclo de detecção de 2 s aplicado ao eletrodo de ouro. As condições da fase móvel foram mantidas de acordo com o trabalho previamente publicado, no qual a variação da concentração de metanol de 10 a 50% (v / v) mostrou um efeito semelhante na resolução máxima dos diuréticos e estimulantes. Além disso, concentrações de SDS variando de 0,1 a 0,5 mmol L<sup>-1</sup> mostraram-se ideais para o equilíbrio de pares iônicos na fase móvel. Sendo assim, a composição da fase móvel com base em um tampão fosfato de 5 mmol L<sup>-1</sup> a pH 4,5 com 0,3 mmol L<sup>-1</sup> SDS e 50% (v/v) de metanol resultou em picos sensíveis nos cromatogramas também para os estimulantes estudados. Além disso, todos os medicamentos estudados estão em suas formas catiônicas a pH 4,5 e estabelecem um equilíbrio de pares iônicos com o surfactante aniônico (SDS). Esta composição da fase móvel leva ao melhor comprometimento entre a sensibilidade e a estabilidade da linha de base nos cromatogramas obtidos para os padrões. A Figura 25 mostra o cromatograma obtido para a separação de cafeína, sinefrina, hidroclorotiazida, clortalidona e furosemida por mecanismos de par iônico e detecção amperométrica pulsada no eletrodo de ouro de 3 mm de diâmetro em condições otimizadas.

Figura 25 - Cromatograma dos adulterantes ( $20 \text{ mg L}^{-1}$ ) (HCTZ) hidroclorotiazida, (CAF) cafeína, (CLT) clortalidona, (FUR) furosemida e (SIN) sinefrina. Condições: fase móvel tampão fosfato  $5 \text{ mmol L}^{-1}$  (pH 4,5) contendo SDS  $0,3 \text{ mmol L}^{-1}$  e metanol 50% (v/v); coluna C18; potencial de amostragem de  $+0,8\text{V}$ ; potenciais de limpeza de  $-0,2\text{V}$  e  $+1,0\text{V}$ ; fluxo de  $1,0 \text{ mL/min}$ .



Fonte: autor

### 5.2.2 Validação

O protocolo seguido para a validação foi o mesmo utilizado no método de eletroforese capilar com detecção UV, e foi realizado de acordo com os parâmetros da AOAC para suplementos alimentares.

A faixa linear foi obtida pela injeção em triplicata de cada nível de concentração que variou de  $0,5$  a  $100 \text{ mg L}^{-1}$ , de acordo com a sensibilidade de cada analito. Os coeficientes de correlação foram todos acima de 0,99. Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) foram determinados pela razão sinal ruído da linha de base (cinco replicatas). A estimativa do limite de detecção teve por base a relação de três vezes o ruído de linha de base, enquanto que a do limite de quantificação foi considerado dez vezes o ruído da linha de base.

A precisão foi avaliada através da injeção do ponto médio da faixa linear de cada composto e sua respectiva área em triplicata por três dias (inter-dia) e em seis replicatas no mesmo dia (intra-dia). O resultado foi expresso através do desvio

padrão relativo (DPR). A exatidão foi calculada pelo método da adição do padrão para o qual uma concentração conhecida do analito de interesse foi adicionada a uma determinada amostra. À amostra com adição do padrão, foram adicionadas quatro diferentes concentrações crescentes do mesmo analito, obtendo-se uma curva analítica na amostra. A recuperação foi obtida em um ponto inicial, em um ponto médio e em um ponto final da faixa linear de cada fármaco. A concentração (x) encontrada pela equação da reta quando  $y = 0$  corresponde à recuperação alcançada do valor inicialmente adicionado à amostra. Os dados de validação obtidos são mostrados na Tabela 3.

Tabela 3 - Figuras de mérito do método HPLC-PAD para determinação de diuréticos e estimulantes em suplementos alimentares

Analito	Faixa Linear (mg L <sup>-1</sup> )	LD (mg L <sup>-1</sup> )	LQ (mg L <sup>-1</sup> )	Precisão (RSD) <sup>a</sup> %		Exatidão (%)		
				Intra-dia	Inter-dia	Ponto inicial	Ponto médio	Ponto final
Hidroclorotiazida	1,0 – 30,0	0,17	0,53	5,23	5,42	108,00	88,40	89,40
Cafeína	5,0 – 100,0	0,19	0,65	1,66	5,35	112,70	85,45	89,70
Clortalidona	1,0 – 50,0	0,28	0,87	5,00	5,12	92,30	89,70	89,16
Furosemida	0,5 – 25,0	0,11	0,39	3,33	5,78	83,00	85,00	99,00
Sinefrina	0,5 – 25,0	0,10	0,34	2,23	3,18	120,00	119,66	83,10

<sup>a</sup> = desvio padrão relativo

Fonte: autor

Os dados obtidos encontram-se dentro dos limites estabelecidos pela AOAC, visto que os valores de exatidão estão entre 80 e 120% e a precisão não ultrapassa 6%.

### 5.2.3 Aplicação a amostras de suplementos alimentares

O método validado para detecção de diuréticos e estimulantes por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção amperométrica pulsada foi aplicado às 114 amostras de suplementos alimentares analisadas neste trabalho. As amostras foram preparadas conforme descrito anteriormente. Após, foi realizado um *screening* e, para as amostras positivas, os analitos detectados foram quantificados pelo método da adição de padrão, construindo-se uma curva na amostra. Os resultados encontram-se dispostos na Tabela 4.

Tabela 4 - Resultados da análise das formulações de suplementos alimentares por HPLC-DAD com os fármacos encontrados e suas quantidades segundo a ingestão diária recomendada pelo fabricante.

Amostra	Fármaco declarado pelo fabricante (mg por dose)		Fármaco encontrado (mg dia <sup>-1</sup> recomendado pelo fabricante)	
			Fármaco encontrado	Quantidade encontrada
1	Cafeína	225	Cafeína	901,76 <sup>a</sup>
			Cafeína	1131,88 <sup>b</sup>
			Hidroclorotiazida	50,04 <sup>a</sup>
				30,32 <sup>b</sup>
2	Cafeína	280	Cafeína	278,94 <sup>a</sup>
			Cafeína	265,88 <sup>b</sup>
4	n.d.	n.d.	Cafeína	318,4
5	n.d.	n.d.	Cafeína	53,64
7	n.d.	n.d.	Cafeína	140,6
			Hidroclorotiazida	19
11	Cafeína	220	Cafeína	121,14 <sup>a</sup>
			Cafeína	117,34 <sup>b</sup>
12	n.d.	n.d.	Cafeína	228,32 <sup>a</sup>
			Cafeína	168,36 <sup>b</sup>

13	n.d.	n.d.	Cafeína	n,d, <sup>a</sup> 366,04 <sup>b</sup>
			Hidroclorotiazida	n,d, <sup>a</sup> 85,48 <sup>b</sup>
14	Cafeína	420	Cafeína	462,02
17	Cafeína	280	Cafeína	330,44
			Sinefrina	50,08
19	n.d.	n.d.	Cafeína	167,88
			Hidroclorotiazida	39,64
20	n.d.	n.d.	Cafeína	64,65
			Hidroclorotiazida	33,51
22	n.d.	n.d.	Cafeína	132,2
25	Cafeína	420	Cafeína	489,54
26	Cafeína	420	Cafeína	470,9
31	Cafeína	420	Cafeína	449,6
32	Cafeína	300	Cafeína	339,1 <sup>a</sup>
			Cafeína	258,6 <sup>b</sup>
33	Cafeína	420	Cafeína	432,46 <sup>a</sup>
			Cafeína	482,62 <sup>b</sup>
36	Cafeína	420	Cafeína	456,9
38	n.d.	n.d.	Cafeína	112,87
			Sinefrina	34,5
			Hidroclorotiazida	170,52
39	n.d.	n.d.	Cafeína	551,36
			Sinefrina	129,68
			Hidroclorotiazida	94,24
40	n.d.	n.d.	Cafeína	250,98
			Hidroclorotiazida	18,52
41	n.d.	n.d.	Cafeína	289,46
			Hidroclorotiazida	71,66
43	Cafeína	140	Cafeína	172,86 <sup>a</sup>
			Cafeína	149,68 <sup>b</sup>
			Sinefrina	49,92 <sup>a</sup>
			Sinefrina	52,08 <sup>b</sup>

45	Cafeína	220	Cafeína	418,2
46	Cafeína	210	Cafeína	168,67 <sup>a</sup> 184,64 <sup>b</sup>
47	n.d.	n.d.	Cafeína	561
			Hidroclorotiazida	186,9
			Furosemida	92,7
49	Cafeína	420	Cafeína	423,2 <sup>a</sup> 424,28 <sup>b</sup>
51	Cafeína	420	Cafeína	419,1 <sup>a</sup> 423,8 <sup>b</sup>
52	Cafeína	420	Cafeína	390,2
53	Cafeína	420	Cafeína	421,75 <sup>a</sup> 391,2 <sup>b</sup>
55	Cafeína	300	Cafeína	310,16 <sup>a</sup> 314,78 <sup>b</sup>
56	n.d.	n.d.	Cafeína	424,8 <sup>a</sup> 445,96 <sup>b</sup>
57	Cafeína	n.d.	Cafeína	381,7 <sup>a</sup> 423 <sup>b</sup>
59	Cafeína	210	Cafeína	212,08
60	Cafeína	n.d.	Cafeína	318,38
			Hidroclorotiazida	34,42
62	Cafeína	220	Cafeína	196,33
63	Cafeína	210	Cafeína	109,24 <sup>a</sup> 104,47 <sup>b</sup>
67	Cafeína	540	Cafeína	496,48
71	n.d.	n.d.	Cafeína	179,22
			Sinefrina	24,72
72	Cafeína	50	Cafeína	103,65
75	n.d.	n.d.	Cafeína	640,3
76	Cafeína	360	Cafeína	121,2
77	Cafeína	320	Cafeína	313,73 <sup>a</sup> 355,43 <sup>b</sup>
78	n.d.	n.d.	Cafeína	355,8

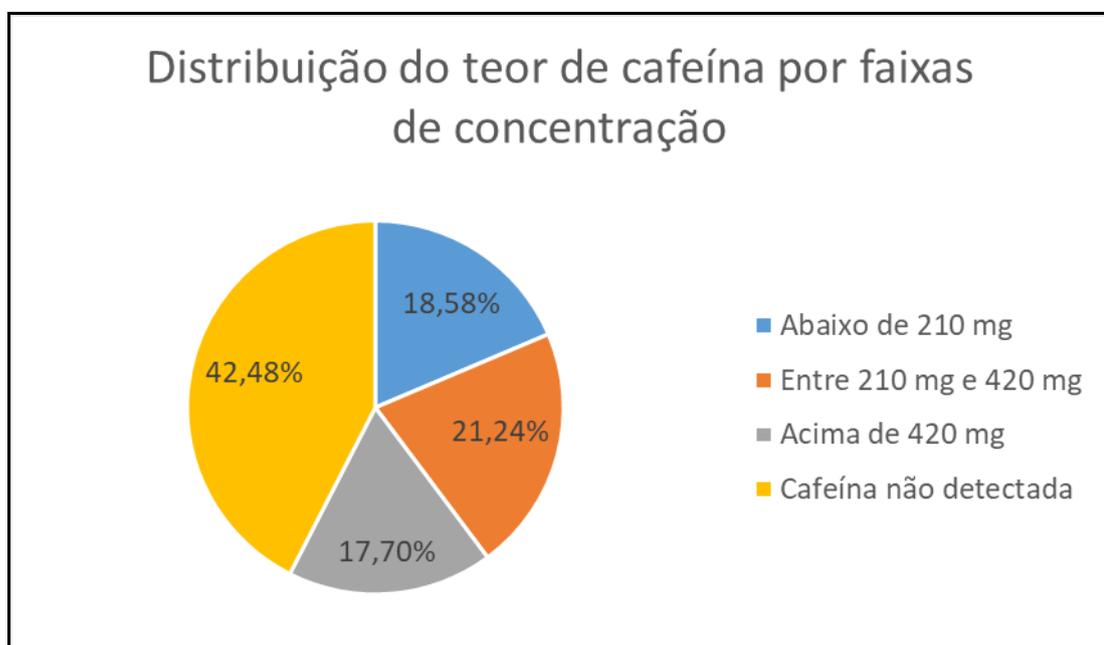
79	n.d.	n.d.	Cafeína	231,33 <sup>a</sup>
				215,92 <sup>b</sup>
			Hidroclorotiazida	96,14 <sup>a</sup>
				101,31 <sup>b</sup>
81	Cafeína	320	Cafeína	51,94 <sup>a</sup>
				56,16 <sup>b</sup>
			Sinefrina	3,04 <sup>a</sup>
				n.d. <sup>b</sup>

n.d.=não declarado/não detectado; <sup>a</sup> = lote 1; <sup>b</sup>= lote 2

Fonte: autor

Para que se pudesse ter uma melhor visualização dos resultados obtidos construiu-se um gráfico, especificando as faixas de concentração de cafeína encontradas nas amostras.

Figura 26. Distribuição do teor de cafeína nas amostras de suplementos alimentares por faixa de dose. Os resultados foram obtidos através do método HPLC-PAD.



Fonte: autor

Os níveis de cafeína do diagrama estão expressos em mg/dia segundo as recomendações dos fabricantes, isto é, as quantidades encontradas em cada

cápsula, comprimido ou porção foram multiplicadas pelo número de doses sugeridas no rótulo num período de 24 horas. Em quase metade das amostras ( $n = 49$ ) não foi possível detectar cafeína. Dentre estas, apenas uma (amostra 82) havia declarado a presença do estimulante no rótulo, porém sem concentração definida. Por outro lado, seis amostras que não apresentavam cafeína declarada na embalagem continham pelo menos uma matéria prima cuja presença de cafeína é vastamente conhecida na literatura (MACHADO et al., 2018; SEMEN et al., 2017; MAZZAFERA, 1997). Substâncias como café verde, guaraná, chá verde, chá branco e erva mate faziam parte de suas fórmulas, porém em quantidades não declaradas, o que impossibilita uma conclusão concreta a respeito da presença ou não desses componentes na formulação.

No Brasil, a cafeína pode ser comercializada como “suplemento de cafeína para atletas”, nos quais a quantidade da substância deve estar entre 210 e 420 mg por porção, razão pela qual o diagrama da Figura 26 foi dividido em função dessas faixas de concentração. Não existem especificações na resolução, porém, a respeito da dose máxima diária recomendada de cafeína (BRASIL, 2010). Na literatura não existem muitos relatos a respeito da quantificação de estimulantes em suplementos, sendo que os estudos que quantificaram cafeína neste tipo de amostra descreveram grandes variações entre os valores declarados e detectados. Ainda, reiterando os resultados obtidos nesta tese, em produtos que não declaravam o teor de cafeína, o composto estava presente em diferentes níveis ou mesmo ausente (NEVES; CALDAS, 2017).

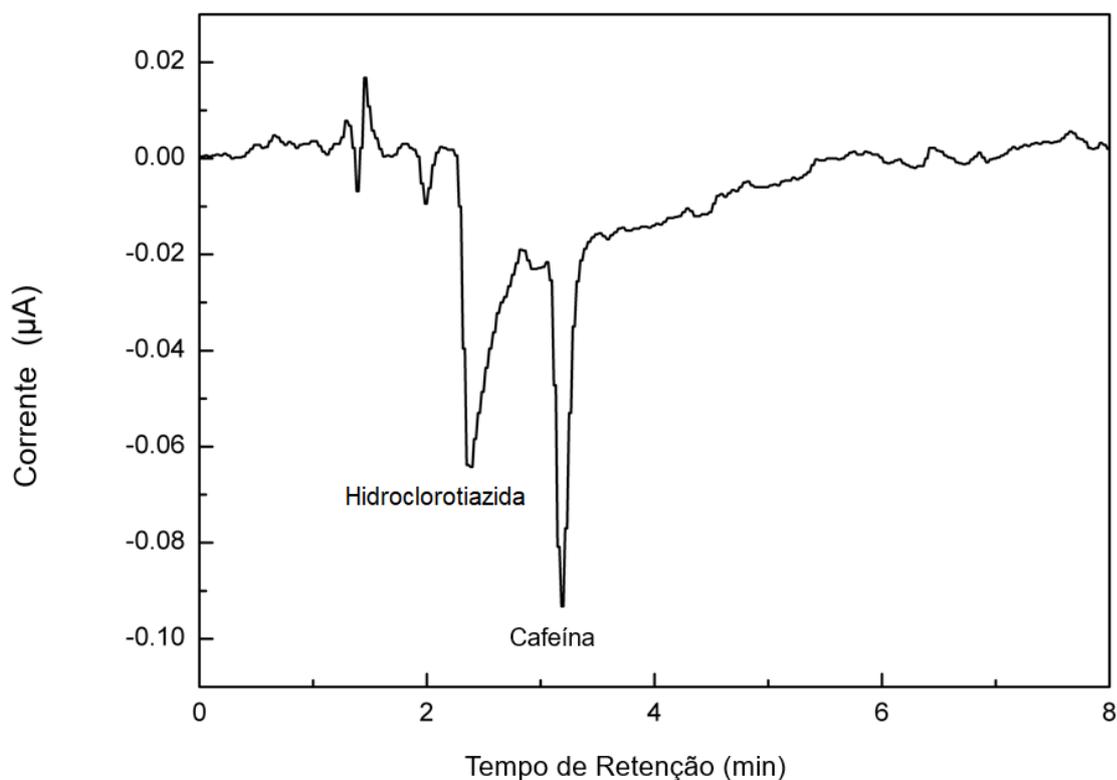
Através da análise dos dados é possível perceber que um número expressivo de amostras ( $n = 20$ ) contém quantidades de cafeína acima da faixa aceitável. Na literatura há controvérsias a respeito da quantidade considerada segura para a ingestão diária de cafeína. Enquanto algumas fontes sugerem que até 400 mg não acarretaria efeitos tóxicos relacionados à substância (EFSA, 2015), outras já preveem toxicidade com doses acima de 300 mg diárias, dependendo do peso corpóreo do indivíduo (LEVESQUE, 2011). As quantidades presentes em alimentos, a saber, são de aproximadamente 120 mg de cafeína em uma xícara de café de 150 mL, 70 mg em uma xícara de café instantâneo e 50 mg em chá preto. Ainda, refrigerantes em geral contém de 30 a 60 mg de cafeína a cada 360 mL, enquanto o chocolate contém 7 mg a cada 28 g (BENOWITZ, 1990).

Conforme mencionado anteriormente, o uso contínuo de cafeína em altas concentrações foi associado à anorexia, agitação, náuseas e taquicardia (PENDLETON et al., 2013). Estudos recentes mostraram que indivíduos que receberam altas doses de cafeína antes do exercício apresentaram frequência cardíaca, pressão arterial média e pressão arterial diastólica elevadas, fatores que podem estar conectados ao desenvolvimento de várias arritmias (ZULLI et al., 2016). Além disso, considerando um indivíduo de 70 kg, doses de cafeína de 210 mg já são capazes de ajudar a melhorar o desempenho físico, enquanto apenas os atletas profissionais devem consumir doses acima de 420 mg, ainda que considerando todos os efeitos colaterais envolvidos (PALLARÉS et al., 2013). Também é interessante enfatizar que algumas amostras que declararam certa quantidade de cafeína anidra continham mais fontes naturais de cafeína, aumentando sua concentração. Este é o caso da amostra '1b' (Figura 27) onde a maior concentração de cafeína foi encontrada, atingindo um nível muito maior do que o limite diário recomendado. Além disso, fontes de cafeína em conjunto com outros extratos botânicos podem apresentar propriedades farmacológicas difíceis de prever (CHOUDARKIS et al., 2010; GURLEY, STEELMAN, THOMAS, 2015).

Além disso, em relação às quantidades declaradas de cafeína, 4 amostras (1a, 1b, 45 e 72) apresentaram níveis superiores; 29 amostras (2a, 2b, 14, 17, 25, 26, 31, 32a, 32b, 33a, 33b, 36, 43a, 43b, 46a, 46b, 49a, 49b, 51a, 51b, 52, 53a, 53b, 55a, 55b, 59 e 62) apresentaram os níveis declarados, considerando uma margem de 80% a 120%; e 6 amostras (11a, 11b, 63a, 63b, 76, 81) apresentaram níveis abaixo do declarado.

Em relação à presença de diuréticos, hidroclorotiazida e furosemida foram detectadas em 14 amostras, ratificando os resultados obtidos no método eletroforético.

Figura 27 - Cromatograma da amostra 1B contendo hidroclorotiazida e cafeína. Detecção por HPLC-PAD. Outras condições estão descritas na Figura 25.



Fonte: autor.

Por fim, o estimulante sinefrina foi encontrado em sete amostras, porém nenhuma foi considerada acima do limite recomendado para o consumo diário (180 mg). A presença de sinefrina em suplementos dietéticos, embora permitida, tem sido associada a episódios de fibrilação ventricular (STEPHENSEN; SARLAY, 2009) e síndrome de balon apical, uma cardiomiopatia reversível que é frequentemente precipitada por estresse emocional ou físico (CHUNG et al., 2013).

Em algumas amostras, mais de um composto foi encontrado. Esse foi o caso da amostra 39, em que a hidroclorotiazida, a cafeína e a sinefrina foram detectadas em conjunto. Nestes casos, a potência dos fármacos pode ser alterada, resultando em efeitos colaterais desconhecidos (COHEN, 2014). Alguns estudos relataram as graves consequências das interações entre a cafeína e a sinefrina, o que pode levar a efeitos adversos graves como ansiedade, náuseas, aumento da pressão arterial e tremores (VIANA et al., 2016). Por outro lado, os efeitos tóxicos resultantes da associação de estimulantes e diuréticos não foram relatados até o momento.

Considerando as variáveis encontradas entre lotes, os níveis de discrepância entre um lote e outro variou de 0,25% (amostra 49) e 35,61% (amostra 12). Na amostra 13, porém, foi possível detectar cafeína e hidroclorotiazida no lote “b”, enquanto que no lote “a” nenhum desses fármacos foi detectado. Pelas quantidades encontradas, uma contaminação acidental é improvável.

Em relação à comparação dos dois métodos de análise utilizando três detectores, na Figura 28 está exposto um fluxograma resumindo as principais características e particularidades de cada um.

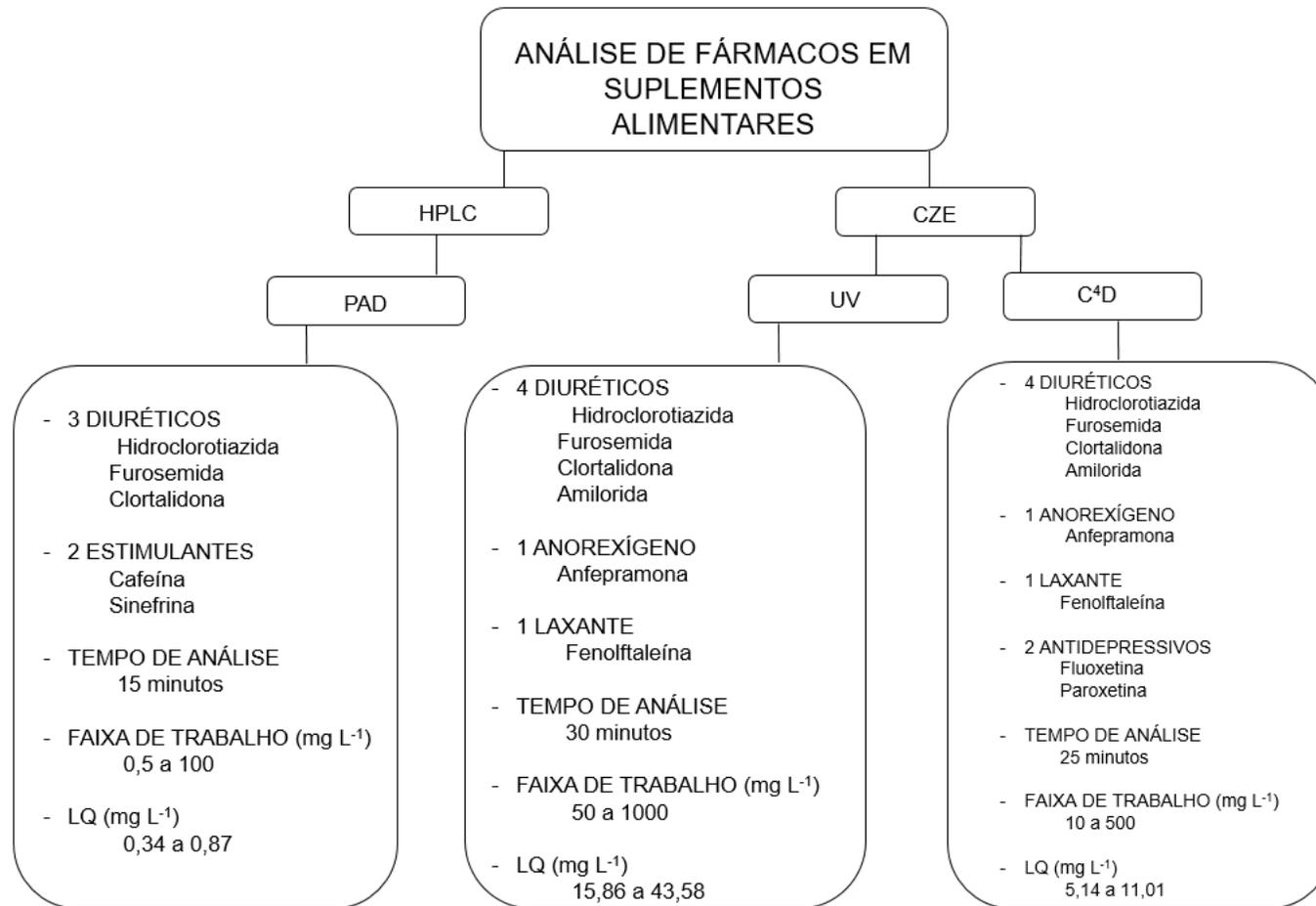
### 5.3 AVALIAÇÃO DE INTERAÇÕES MEDICAMENTOSAS ATRAVÉS DE MODELAGEM FARMACOCINÉTICA

#### 5.3.1 Modelagem para previsão do perfil farmacocinético da sertralina e seu metabólito

Os dados necessários para a confecção do perfil farmacocinético da sertralina e seu metabólito no software foram coletados da literatura, baseando-se em estudos *in vitro* e *in vivo* já publicados. Algumas informações, no entanto, foram calculadas ou preditas pelo Simcyp<sup>®</sup>. Na Tabela 5 estão dispostos todos os parâmetros utilizados e suas respectivas referências.

Peso molecular, coeficiente de partição (Log P), constante de dissociação (pKa), razão de concentração do fármaco entre sangue e plasma (B/P), fração livre do fármaco no plasma ( $F_{u, \text{plasma}}$ ), fração absorvida (Fa), constante da taxa de absorção ( $k_a$ ) e fração não ligada nos enterócitos intestinais ( $f_{u, \text{gut}}$ ) foram extraídos do trabalho de Templeton et al. (2016) e Drug Bank. Fluxo sanguíneo no intestino ( $Q_{\text{gut}}$ ) e volume de distribuição no ‘steady state’ ( $V_{ss}$ ) foram preditos pelo software, sendo o último calculado segundo equação de Rodgers e Rowland (método 2). Ainda, a permeabilidade aparente do fármaco foi avaliada em células de epitélio de rim canino (MDCK II) e descrita por Siccardi et al. (2013), através da qual o software pôde calcular a permeabilidade efetiva. Na Tabela 6 estão descritos os parâmetros de eliminação e interação da sertralina.

Figura 28 - Fluxograma com as características comuns e específicas dos métodos de HPLC com detecção amperométrica, CZE com detecção UV e CZE com detecção C<sup>4</sup>D.



Fonte: autor

Tabela 5 - Parâmetros de entrada utilizados na simulação para a sertralina e seu metabólito ativo *N*-desmetilsertralina.

Parâmetro de Entrada	Valor	Referência
<i>Sertralina</i>		
Peso molecular	306	Templeton <i>et al.</i> , 2016/Drug Bank
Log P	5,5	Templeton <i>et al.</i> , 2016
pKa	9,43	Templeton <i>et al.</i> , 2016
Razão B/P	1	Templeton <i>et al.</i> , 2016
Fu, plasma	0,023	Templeton <i>et al.</i> , 2016/Drug Bank
Fa	1	Templeton <i>et al.</i> , 2016
k <sub>a</sub> (h <sup>-1</sup> )	0,3	Templeton <i>et al.</i> , 2016
f <sub>ugut</sub>	1	Templeton <i>et al.</i> , 2016
Q <sub>gut</sub> (L/h)	1,82	Previsto pelo Simcyp
Permeabilidade (10 <sup>-6</sup> cm/s)	1,9	Siccardi <i>et al.</i> , 2013/Feng <i>et al.</i> , 2008
V <sub>ss</sub> (L/kg)	8,23	Previsto pelo Simcyp
<i>N-desmetilsertralina</i>		
Peso molecular	292	Templeton <i>et al.</i> , 2016
Log P	4,93	Templeton <i>et al.</i> , 2016
pKa	9,4	Templeton <i>et al.</i> , 2016
Razão B/P	0,86	Previsto pelo Simcyp
Fu, plasma	0,059	Previsto pelo Simcyp
f <sub>ugut</sub>	0,024	Previsto pelo Simcyp
V <sub>ss</sub> (L/kg)	70,59	Previsto pelo Simcyp

Fonte: autor

Os parâmetros de eliminação foram avaliados através de microsomas de fígado humano em trabalho descrito por Kobayashi e colaboradores. (1999). Os resultados estão expressos com base na equação de Michaelis-Menten, que descreve a taxa de reações enzimáticas.  $V_{max}$  se refere à taxa de eliminação máxima do fármaco enquanto  $K_m$  corresponde à concentração do fármaco na qual a taxa de eliminação é  $\frac{1}{2} V_{max}$ . O clearance do metabólito foi calculado utilizando o software Phoenix WinNonlin versão 6.4 com base em dados farmacocinéticos. Os parâmetros de interação tanto para a sertralina quanto para a *N*-desmetilsertralina se basearam no estudo de Templeton *et al.* (2016), onde  $K_i$  se refere à constante de inibição do

fármaco em relação a determinada enzima e  $Fu_{mic}$  corresponde à fração livre do fármaco no microsomo disponível pa

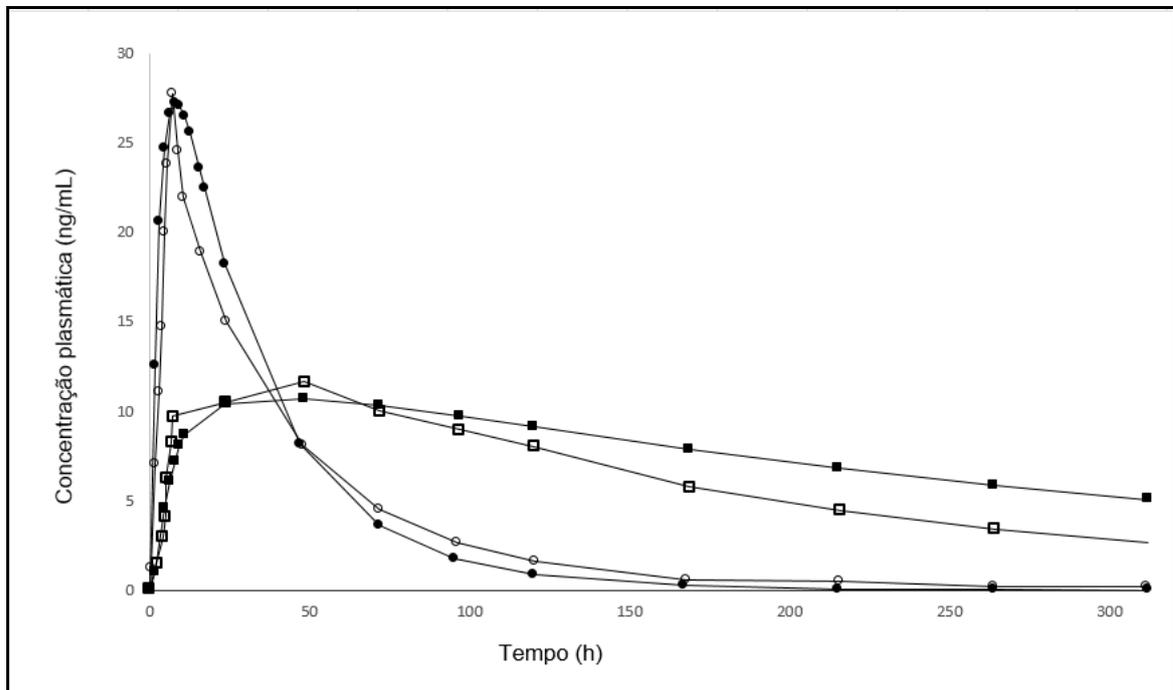
Tabela 6 - Parâmetros de eliminação e interação utilizados na simulação para a sertralina e seu metabólito ativo *N*-desmetilsertralina.

<b>Sertralina</b>		
<i>Eliminação</i>	$V_{max}$ (pmol/min/pmol CYP)	$K_m$ ( $\mu M$ )
CYP 2B6	2,04	30,7
CYP 2C9	1,73	30,3
CYP 2C19	1,11	9
CYP 2D6	0,79	2,6
CYP 3A4	0,57	45,3
<i>Interação</i>	$K_i$	$Fu_{mic}$
CYP 2D6	0,9	0,18
CYP 3A4	1,2	0,18
<b>N-desmetilsertralina</b>		
<i>Eliminação</i>		
Clearance (L/h)	27,63	
<i>Interação</i>	$K_i$	$Fu_{mic}$
CYP 2D6	21	0,022
CYP 3A4	1,4	0,08

Fonte: autor

O modelo PBPK desenvolvido para simular o perfil farmacocinético da sertralina e seu metabólito foi capaz de prever as concentrações plasmáticas após a administração de uma dose única de liberação imediata de 100 mg de sertralina com bom ajuste entre os perfis simulados e observados em estudo clínico, conforme a Figura 29. Os valores de área sob a curva (ASC), concentração ( $C_{max}$ ) e tempo ( $T_{max}$ ) máximos encontrados para o fármaco e seu metabólito estão na Tabela 7 e podem ser comparados com os valores que foram determinados no estudo clínico.

Figura 29 - Perfis de concentração plasmática para sertralina (100 mg) e seu metabólito ativo. Sertralina (● e ○) e *N*-desmetilsertralina (■ e □) para dados previstos e observados, respectivamente.



Fonte: autor

Tabela 7. Dados previstos e observados para a exposição à sertralina (100 mg).

<b>Sertralina</b>			
	$T_{max}$ (h)	$C_{max}$ (ng/mL)	ASC (h ng/mL)
Observado	7,0	22-29	1052
Previsto	7,8	27,27 ( $\pm$ 6,56)	1074,81
<b>N-desmetilsertralina</b>			
	$T_{max}$ (h)	$C_{max}$ (ng/mL)	ASC (h ng/mL)
Observado	39-53	12,4	2024
Predito	42,15	10,76 ( $\pm$ 3,31)	2491,66

Fonte: autor

### 5.3.2 Previsão da interação medicamentosa entre sertralina e cafeína

Para a simulação das possíveis interações medicamentosas foram utilizados dados disponíveis na biblioteca do Simcyp tanto para a cafeína quanto para o

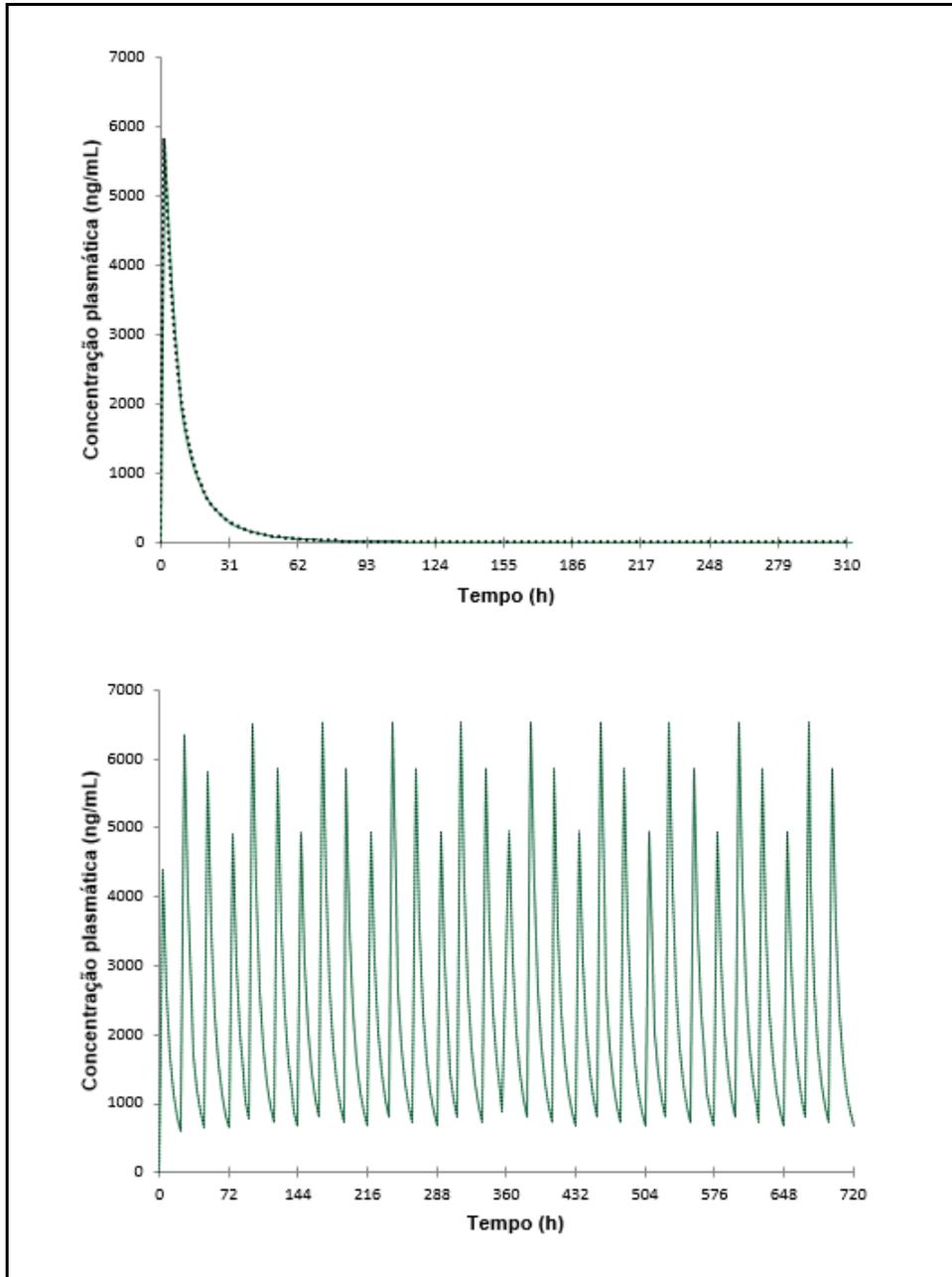
sildenafil. A ocorrência de interação medicamentosa foi determinada pela mudança nos dados de ASC, T<sub>max</sub> e C<sub>max</sub> comparando os dados obtidos para os fármacos antes e após a administração concomitante com sertralina. A mudança na exposição sistêmica à cafeína pode ser encontrada na Figura 30 e os valores dos dados antes e depois da interação podem ser vistos na Tabela 8. A saber, o tempo de meia vida da cafeína é de 3 a 7 horas em adultos, sua ligação a proteínas plasmáticas varia entre 25% e 36% e o volume de distribuição é de 0,6 L/kg.

De acordo com a análise dos resultados é possível perceber que não há previsão de interação medicamentosa decorrente do uso dos dois fármacos concomitantemente, tanto para a dose única quanto para o *steady state*. A curva farmacocinética manteve-se a mesma e os parâmetros apresentaram variação desconsiderável. Apesar de a sertralina ser um inibidor competitivo da CYP3A4 e ter sido reportada por aumentar a concentração plasmática de pimizida, fármaco metabolizado principalmente por essa enzima (TEMPLETON et al., 2016), a falta de interação com a cafeína pode ser explicada pelo grau de participação da CYP3A4 no metabolismo do fármaco (Figura 31).

O gráfico mostra que menos de 1% da cafeína é metabolizada pela CYP3A4, sendo que a maior parte do processo ocorre através da CYP1A2 (aproximadamente 98%). De fato, alguns estudos relatam que, devido à sua relativa facilidade de administração e segurança, a cafeína é a prova mais utilizada para medir a atividade da CYP1A2 e reiteram que, apesar da participação de outras enzimas, a conversão de cafeína a paraxantina, seu principal metabólito, é exclusivamente realizado via CYP1A2. As demais enzimas estariam relacionadas à formação de outros metabólitos primários como teobromina e teofilina, responsáveis pelo metabolismo de apenas 10,8% e 5,4% do fármaco ingerido, respectivamente (PERERA et al., 2011).

Ainda, apesar de existirem relatos confirmando a interação da sertralina com substratos da CYP3A4 (TEMPLETON et al., 2016; NEMEROFF et al., 1996), outros sugerem que é improvável que a sertralina apresente efeito clinicamente significativo quando esta isoenzima não for a principal responsável pelo metabolismo da droga vítima (CATTERSON; PRESKORN, 1996; DEVANE et al., 2004).

Figura 30 - Previsão do efeito da sertralina no perfil farmacocinético da cafeína para dose única e doses contínuas pelo período de 30 dias, respectivamente. O traço contínuo representa o perfil farmacocinético da cafeína e o traço segmentado se refere ao perfil farmacocinético da cafeína após ingestão de cafeína e sertralina.



Fonte: autor

### 5.3.3 Previsão da interação medicamentosa entre sertralina e sildenafil

Assim como na determinação de interação com a cafeína, a interação entre sertralina e sildenafil foi avaliada através da mudança nos dados de ASC,  $T_{max}$  e

$C_{max}$  do sildenafil antes e após a administração concomitante com sertralina. Os resultados da curva farmacocinética podem ser encontrados na Figura 32 e os valores dos dados antes e depois da interação podem ser vistos na Tabela 9. A saber, o tempo de meia vida do sildenafil é de 4 horas, sua ligação a proteínas plasmáticas é de aproximadamente 96%.

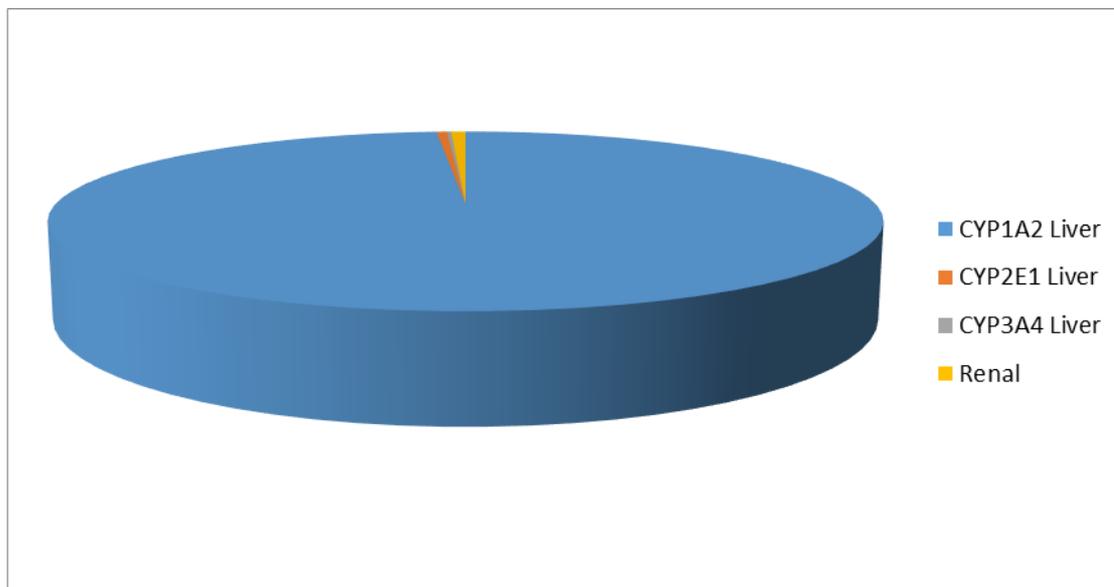
Ao contrário do resultado de interação farmacocinética entre cafeína e sertralina, a interação prevista com o sildenafil foi significativa. Observou-se um aumento de aproximadamente 62% na  $C_{max}$  e de 72% na ASC do sildenafil quando a administração simultânea com a sertralina em dose única foi simulada. No estudo envolvendo a administração diária dos fármacos por 30 dias os resultados foram ainda mais relevantes. A  $C_{max}$  aumentou em aproximadamente 107% e a ASC cresceu 138%. A discrepância entre os resultados de dose única e *steady state* pode estar relacionada ao maior envolvimento do metabólito ativo na interação. Este ficaria por mais tempo na corrente sanguínea na ingestão de doses diárias da sertralina, levando a uma concentração mais elevada em relação à droga mãe, já que sua meia vida é maior. A diferença entre os resultados em relação à interação com a cafeína pode ser explicada em parte pela alta contribuição das enzimas CYP3A4 no metabolismo do sildenafil, conforme a Figura 33.

Tabela 8 - Parâmetros farmacocinéticos previstos para a cafeína sem e com interação com a sertralina em dose única e doses subsequentes por um período de 30 dias.

<b>Dose única</b>			
	$T_{max}$ (h)	$C_{max}$ (ng/mL)	ASC (h ng/mL)
Cafeína	1,58	5840	5540
Cafeína + Sertralina	1,58	5840	5540
<b>Steady State</b>			
	$T_{max}$ (h)	$C_{max}$ (ng/mL)	ASC (h ng/mL)
Cafeína	3,6	5867,59	61151,63
Cafeína + Sertralina	3,6	5867	61300

Fonte: autor

Figura 31 - Distribuição da participação das enzimas CYP no metabolismo da cafeína.

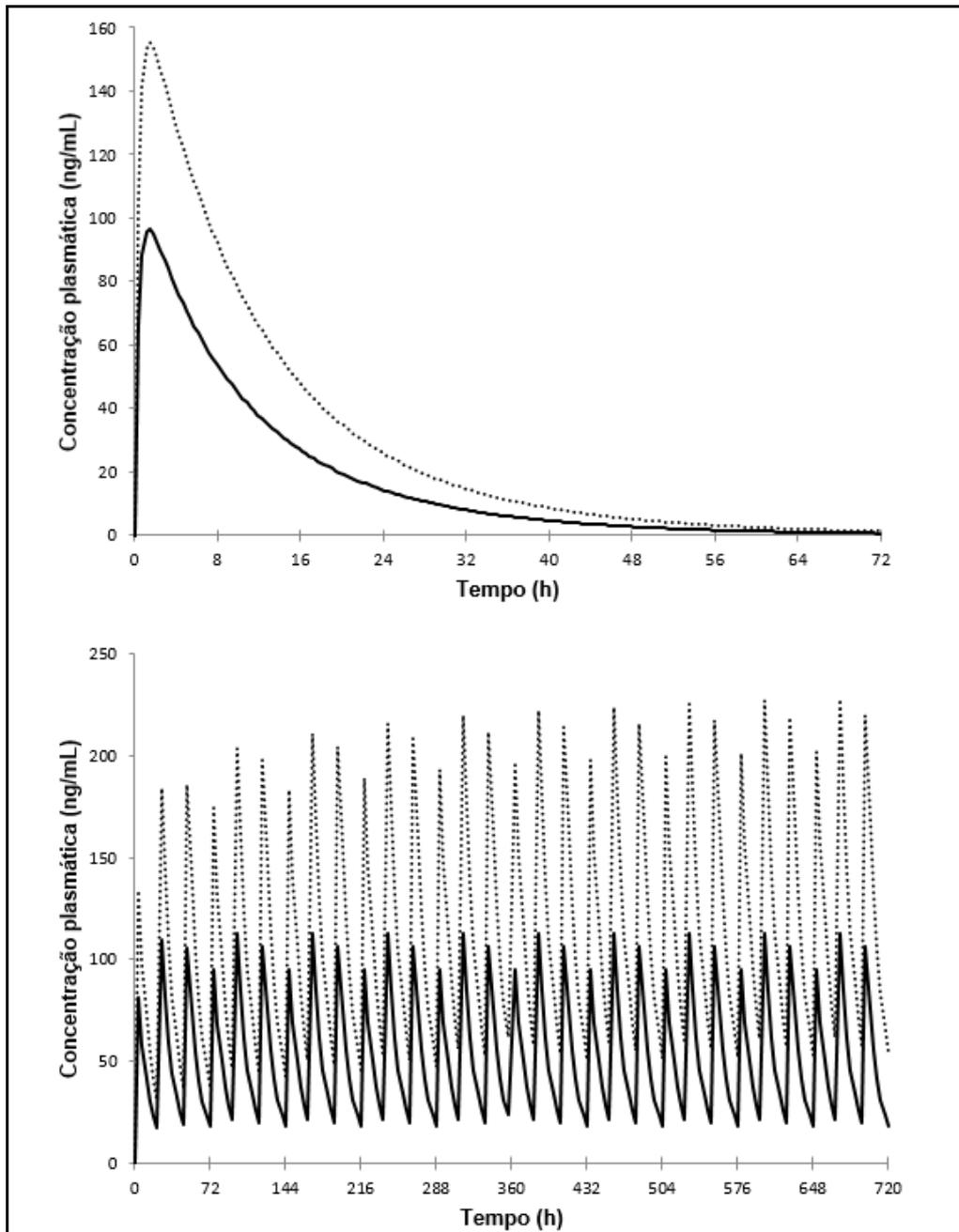


Fonte: Simcyp

De acordo com o gráfico é possível perceber que a enzima é responsável por aproximadamente 85% do processo de metabolização do sildenafil, o que corrobora o fato de que sua inibição pode gerar aumento das concentrações plasmáticas do fármaco. A possibilidade de interação entre o sildenafil e a sertralina já foi cogitada anteriormente em estudo de Socala et al., 2017. A pesquisa, porém, manteve o foco na influência dos efeitos do sildenafil na farmacologia da sertralina, e não o contrário. As interações foram de natureza farmacodinâmica, visto que o sildenafil não afetou as concentrações de sertralina no plasma de ratos mas influenciou seus efeitos farmacológicos (SOCALA et al., 2017). O perigo da associação dos dois fármacos está em seu recorrente uso para tratar pacientes com disfunção erétil. Acredita-se que a administração concomitante possa atenuar efeitos de stress e ansiedade, por exemplo (LU et al., 2009). O fato é que essas associações desconsideram a possibilidade de interação medicamentosa. Relacionando esse cenário ao uso de suplementos alimentares, a possibilidade é de que o consumidor esteja ingerindo estimulantes sexuais contidos indevidamente nas embalagens de suplementos enquanto já seja usuário de sertralina. Ainda, num pior caso, que o mesmo suplemento esteja contaminado com os dois fármacos. Em qualquer uma das situações o paciente estaria se expondo a concentrações plasmáticas muito

superiores às previstas para o efeito farmacológico do sildenafil o que poderia acarretar em efeitos tóxicos da droga.

Figura 32 - Previsão do efeito da sertralina no perfil farmacocinético do sildenafil para dose única e doses contínuas pelo período de 30 dias, respectivamente. O traço contínuo representa o perfil farmacocinético do sildenafil e o traço segmentado se refere ao perfil farmacocinético do sildenafil após ingestão de sildenafil e sertralina.



Fonte: autor

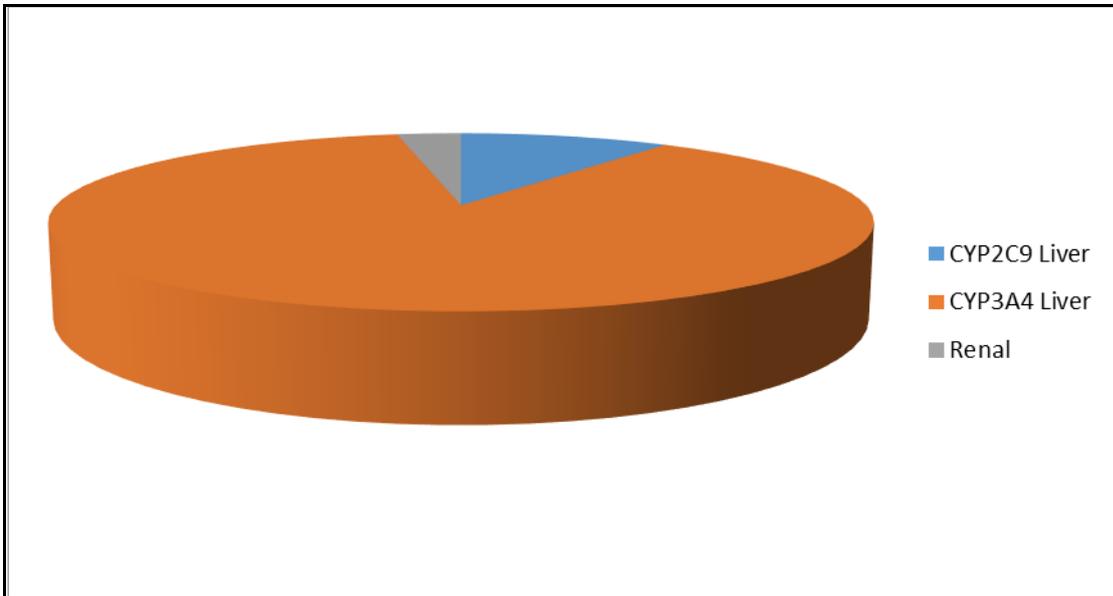
Nesse contexto, o perfil de segurança e efeitos adversos do sildenafil estão bem documentados. Os efeitos colaterais mais comuns com doses terapêuticas incluem dor de cabeça, rubor facial, dispepsia, tonturas, congestão nasal, visão anormal e palpitações. Esses efeitos, segundo a literatura, são leves e transitórios (RAO et al., 2015). Os casos de morte por problemas cardiovasculares associados ao consumo de sildenafil são muitas vezes justificados por doença prévia do usuário. No entanto, muitos homens não reportam o consumo ou efeitos adversos relacionados ao uso do fármaco por constrangimento, o que impossibilita um estudo mais aprofundado da sua real toxicidade (BERTERO; MONTORSI, 2014).

Tabela 9 - Parâmetros farmacocinéticos previstos para o sildenafil sem e com interação com a sertralina em dose única e doses subsequentes por um período de 30 dias.

<b>Dose única</b>			
	$T_{max}$ (h)	$C_{max}$ (ng/mL)	ASC (h ng/mL)
Sildenafil	1,47	96,38	1270
Sildenafil + Sertralina	1,47	155,38	2180
<b>Steady State</b>			
	$T_{max}$ (h)	$C_{max}$ (ng/mL)	ASC (h ng/mL)
Sildenafil	3,6	106,16	1358,65
Sildenafil + Sertralina	3,6	219,26	3237,69

Fonte: autor

Figura 33 - Distribuição da participação das enzimas CYP no metabolismo do sildenafil.



Fonte: Simcyp

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste trabalho foi realizada a avaliação de 114 amostras de suplementos alimentares comercializados no Brasil em relação à presença não declarada de fármacos e/ou fármacos declarados em doses acima das reportadas. As amostras foram adquiridas em websites e lojas físicas, e todas estavam relacionadas a emagrecimento, aumento de performance durante exercício, efeito termogênico ou aumento de massa muscular. Para isso, foram validados dois métodos analíticos. O primeiro, utilizando equipamento de eletroforese capilar acoplado a dois detectores, UV e C<sup>4</sup>D, foi capaz de detectar diuréticos não declarados (hidroclorotiazida e/ou furosemida) em 14 amostras. O segundo método, utilizando cromatografia de par iônico com detecção amperométrica, acusou a presença de cafeína em níveis acima dos considerados seguros em 20 amostras, além de confirmar a presença de diuréticos nas 14 amostras analisadas por eletroforese capilar. Os métodos demonstraram boa seletividade para os compostos investigados, fator importante na análise de fármacos com estrutura molecular semelhante e considerando-se o uso de amostras de alta complexidade. Além disso, o uso de dois métodos e três detectores foi um diferencial na confirmação dos resultados obtidos.

Ainda, foi avaliada a ocorrência de uma possível interação medicamentosa *in silico* envolvendo sertralina, sildenafil e cafeína em regimes de dose única e tratamento por 30 dias. O perfil farmacocinético da sertralina em modelo computacional, desenvolvido especialmente para este estudo, apresentou resultados satisfatórios, com valores próximos dos dados avaliados em estudo *in vivo*. Não houve interação entre a sertralina e a cafeína, porém a concentração plasmática de sildenafil aumentou consideravelmente ao predizer uma possível interação entre o fármaco e o antidepressivo. Como perspectivas futuras seria interessante avaliar o resultado dessa interação em termos farmacológicos, para que se possa ter uma real dimensão das consequências dos dados obtidos neste trabalho.

Os resultados demonstram claramente a necessidade de limitações e regras mais específicas para o registro e controle de suplementos alimentares no país. Através da amostragem utilizada neste trabalho, procura-se alertar os órgãos de fiscalização e os consumidores de que a cada ano novos casos de adulteração são descobertos em todo o mundo e o que realmente é analisado é apenas uma parte do todo. O alto consumo de suplementos alimentares e a extensa divulgação na

mídia de que esses produtos são seguros e provém resultados rápidos merece uma atenção especial a essa classe de substâncias, que ainda podem estar relacionadas a interações medicamentosas, conforme resultados apresentados.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKAMATSU, S.; MITSUHASHI, T. Simultaneous determination of pharmaceutical components in dietary supplements for weight loss by capillary electrophoresis tandem mass spectrometry. **Drug Testing and Analysis**, v. 6, n. 5, p. 426-433.

AKINYEMI, E. et al. Thyrotoxic hypokalemic periodic paralysis due to dietary weight-loss supplement. **American Journal of Therapeutics**, v. 18, p. 81-83, 2011.

ALMEIDA, A. E.; RIBEIRO, M. L.; POLESE, L. Determination of amfepramone hydrochloride, fenproporex, and diazepam in so-called "natural" capsules used in the treatment of obesity. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 23, n. 7, p. 1109-1118, 2007.

ALMEIDA, I. M. C. **Segurança e biodisponibilidade de suplementos alimentares**. 139 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade do Porto, Porto, 2014.

ANTONIOU, T. et al. Ciprofloxacin-induced theophylline toxicity: a population-based study. **European Journal of Clinical Pharmacology**, v. 67, n. 5, p. 521-526, 2011.

ANVISA, 2014. Alerta: presença não declarada de sibutramina e fenolftaleína em produtos. Disponível em: [http://portal.anvisa.gov.br/web/guest/noticias/-/asset\\_publisher/FXrpx9qY7FbU/content/alerta-presenca-nao-declarada-de-sibutramina-e-fenolftaleina-em-produtos/219201/pop\\_up?\\_101\\_INSTANCE\\_FXrpx9qY7FbU\\_viewMode=print&\\_101\\_INSTANCE\\_FXrpx9qY7FbU\\_languageId=pt\\_BR](http://portal.anvisa.gov.br/web/guest/noticias/-/asset_publisher/FXrpx9qY7FbU/content/alerta-presenca-nao-declarada-de-sibutramina-e-fenolftaleina-em-produtos/219201/pop_up?_101_INSTANCE_FXrpx9qY7FbU_viewMode=print&_101_INSTANCE_FXrpx9qY7FbU_languageId=pt_BR). Acessado em 12 Janeiro 2018

ANVISA, 2017. Medicamentos liberados por lei trazem risco à saúde. Disponível em: [http://portal.anvisa.gov.br/noticias/-/asset\\_publisher/FXrpx9qY7FbU/content/anvisa-lei-que-libera-anorexigenos-e-inconstitucional/219201/pop\\_up?inheritRedirect=false](http://portal.anvisa.gov.br/noticias/-/asset_publisher/FXrpx9qY7FbU/content/anvisa-lei-que-libera-anorexigenos-e-inconstitucional/219201/pop_up?inheritRedirect=false). Acessado em 12 Janeiro 2018

ANVISA, 2017 (b). Suplementos alimentares: documentos de base para discussão regulatória. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/219201/3322895/Documento+de+base+sobre+regulamenta%C3%A7%C3%A3o+de+suplementos+alimentares/2e334a9e-a456-48ef-981e-ef54f3b9029a>. Acessado em 14 Janeiro 2018.

AOAC (Association of Official Analytical Chemists), 2013. Guidelines for dietary supplements and botanicals. Disponível em: [http://www.eoma.aoac.org/app\\_k.pdf](http://www.eoma.aoac.org/app_k.pdf). Acessado em 08 Setembro 2015

BARDITCH-CROVO, P. et al. The effects of rifampin and rifabutin on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of a combination oral contraceptive. **Clinical Pharmacology and Therapeutics**, v. 65, n. 4, p. 428-438, 1999.

BENOWITZ, N. L. Clinical pharmacology of caffeine. **Annual Review of Medicine**, v. 41, p. 277-288, 1990.

BERTERO, E.; MONTORSI, F. Safety of sildenafil citrate: review of 67 double-blind placebo-controlled trials and the postmarketing safety database. **Journal of Sexual Medicine**, v. 11, p. 885-887, 2014.

BOONE, C. M.; WATERVAL, J. C. M.; LINGEMAN, H.; ENSING, K.; UNDERBERG, W. J. M. Capillary electrophoresis as a versatile tool for the bioanalysis of drugs – a review. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 20, p. 831-863, 1999.

BRASIL, 1999. Diário Oficial da União. ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). Resolução nº 16, de 30 de abril de 1999 – Aprova o Regulamento Técnico de Procedimentos para Registro de Alimentos e/ou Novos Ingredientes. Disponível em [http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/96fa548047458ef597fdd73fbc4c6735/RESOLUCAO\\_16\\_1999.pdf?MOD=AJPERES](http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/96fa548047458ef597fdd73fbc4c6735/RESOLUCAO_16_1999.pdf?MOD=AJPERES). Acessado em 03 Setembro 2015.

BRASIL, 1999b. Diário Oficial da União. ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). Resolução nº 19, de 30 de abril de 1999 – Aprova o Regulamento Técnico para Registro de Alimento com Alegação de Propriedades Funcionais e/ou de Saúde. Disponível em [http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/727a7f004745792d8641d63fbc4c6735/RESOLUCAO\\_19\\_1999.pdf?MOD=AJPERES](http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/727a7f004745792d8641d63fbc4c6735/RESOLUCAO_19_1999.pdf?MOD=AJPERES). Acessado em 03 Setembro 2015.

BRASIL, 2002. Diário Oficial da União. ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). RDC nº 2, de 7 de janeiro de 2002 – Aprova o Regulamento Técnico de Substâncias Bioativas e Probióticos Isolados com Alegação de Propriedades Funcional e/ou de Saúde. Disponível em [http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/1c77370047457bcc8888dc3fbc4c6735/RDC\\_02\\_2002.pdf?MOD=AJPERES](http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/1c77370047457bcc8888dc3fbc4c6735/RDC_02_2002.pdf?MOD=AJPERES). Acessado em 03 Setembro 2015.

BRASIL, 2010. Diário Oficial da União. ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). RDC nº 18, de 27 de abril de 2010 – Dispõe sobre Alimentos para Atletas. Disponível em <http://www.vigilanciasanitaria.sc.gov.br/index.php/download/category/181-alimentos-para-atletas>. Acessado em 04 Setembro 2015.

BRASIL, 2010b. Diário Oficial da União. ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). RDC nº 27 de 6 de agosto de 2010 – Dispõe sobre as Categorias de Alimentos e Embalagens Isentos e com Obrigatoriedade de Registro Sanitário. Disponível em [http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/b951e200474592159a81de3fbc4c6735/DIRETORIA\\_COLEGIADA\\_27\\_2010.pdf?MOD=AJPERES](http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/b951e200474592159a81de3fbc4c6735/DIRETORIA_COLEGIADA_27_2010.pdf?MOD=AJPERES). Acessado em 04 Setembro 2015

BRASIL, 2011. Diário Oficial da União. ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). RDC nº 52 de 6 de outubro de 2011 – Dispõe sobre a proibição do uso das substâncias anfepramona, femproporex e mazindol, seus sais e isômeros, bem como intermediários e medidas de controle da prescrição e dispensação de medicamentos que contenham a substância sibutramina, seus sais e isômeros, bem como intermediários e dá outras providências. Disponível em <http://www.anvisa.gov.br/hotsite/anorexigenos/pdf/RDC%2052->

[2011%20DOU%2010%20de%20outubro%20de%202011.pdf](#). Acessado em 12 Janeiro 2018.

BROWNELL, K. D. Dieting and the search for the perfect body: where physiology and culture collide. **Behavior Therapy**, v. 22, p. 1-12, 1991.

CALANDRA, C.; RUSSO, R. G.; LUCA, M. Bupropion versus sertraline in the treatment of depressive patients with binge eating disorder: retrospective cohort study. **The Psychiatric Quarterly**, v. 82, n. 2, p. 177-185, 2012.

CANTORI, A. M.; SORDI, M. F.; NAVARRO, A. C. Conhecimento sobre ingestão de suplementos por frequentadores de academias em duas cidades diferentes no sul do Brasil. **Revista Brasileira de Nutrição Esportiva**, v. 3, n. 15, p. 172-181, 2009.

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

CARVALHO, L. M. et al. A new method for the simultaneous determination of 1,4-benzodiazepines and amfepramone as adulterants in phytotherapeutic formulations by voltammetry. **Forensic Science International**, v. 202, n. 1-3, p. 75-81, 2010.

CARVALHO, L. M. et al. Presence of synthetic pharmaceuticals as adulterants in slimming phytoterapeutic formulations and their analytical determination. **Forensic Science International**, v. 204, n. 1, p. 6-12, 2011.

CARVALHO, L. M. et al. Determinação simultânea de cátions empregando eletroforese capilar com detecção condutométrica sem contato em equipamento construído em laboratório. **Química Nova**, v. 32, n. 8, p. 2203-2208, 2009.

CARVALHO, L. M. et al. Pulsed amperometric detection (PAD) of diuretic drugs in herbal formulations using a gold electrode following ion-pair chromatographic separation. **Journal of Solid State Electrochemistry**, v. 17, p. 1601-1608, 2013.

CATTERSON, M. L.; PRESKORN, S. H. Pharmacokinetics of selective serotonin reuptake inhibitors: clinical relevance. **Pharmacology & Toxicology**, v. 78, n. 4, 1996.

CE (Council of Europe), 2008. Homeostasis, a Model to Distinguish between Foods (Including Food Supplements) and Medicinal Products. Partial Agreement in the Social and Public Health Field. Council of Europe, Strasbourg, France.

CHAVEZ, M. L.; JORDAN, M. A.; CHAVEZ, P. I. Evidence-based drug-herbal interactions. **Life Sciences**, v. 78, n. 18, p. 2146-2157, 2006.

CHEN, Y. et al. Determination of synthetic drugs used to adulterate botanical dietary supplements using QTRAP LC-MS/MS. **Food Additives and Contaminants**, v. 26, n. 5, p. 595-603, 2009.

- CHOI J. Y. et al. Development and validation of an LC-MS/MS method for the simultaneous analysis of 28 specific narcotic adulterants used in dietary supplements. **Food Additives & Contaminants. Part A, Chemistry, Analysis, Control, Exposure & Risk Assessment**, v. 32, n. 7, p. 1029-1039, 2015.
- CHOUDARKIS, M. et al. Possible interactions with drugs of herbals used for weight loss enhancement. **Review of Clinical Pharmacology and Pharmacokinetics**, v. 24, p. 128-129, 2010.
- CHUNG, H. et al. Synephrine-containing dietary supplement precipitating apical ballooning syndrome in a young female. **The Korean Journal of Internal Medicine**, v. 28, p. 356-360, 2013.
- COHEN, P. A. How America's flawed supplement law creates the mirage of weight loss cures. **Harvard Public Health Review**, v. 2, n. 1, 2014. Disponível em <http://harvardpublichealthreview.org/how-americas-flawed-supplement-law-creates-the-mirage-of-weight-loss-cures/>. Acesso em 14 de julho de 2017.
- COHEN, P. A. Imported fenproporex-based diet pills from Brazil: a report of two cases. **Journal of General Internal Medicine**, v. 24, n. 3, p. 430-433, 2009.
- COLQUITT, R. B.; COLGUHOUN, D. A.; THIELE, R. H. In silico modelling of physiologic systems. **Best Practice and Research**, v. 25, n. 4, p. 499-510, 2011.
- CIANCHINO, V. et al. Analysis of potential adulteration in herbal medicines and dietary supplements for the weight loss control by capillary electrophoresis. **Food Chemistry**, v. 108, p. 1075-1081, 2008.
- DAMIANO, F. et al. Analysis of illicit dietary supplements sold in the Italian market: identification of a sildenafil thioderivative as adulterant using UPLC-TOF/MS and GC/MS. **Science & Justice: Journal of the Forensic Science Society**, v. 54, n. 3, p. 228-237, 2014.
- DECONINCK, E. et al. Detection of sibutramine in adulterated dietary supplements using attenuated total reflectance-infrared spectroscopy. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 100, p. 279-283, 2014.
- DEVANE, C. L. et al. Comparative CYP3A4 inhibitory effects of venlafaxine, fluoxetine, sertraline, and nefazodone in healthy volunteers. **Journal of Psychopharmacology**, v. 24, n. 1, 2004.
- DICKINSON, A.; MACKAY, D. Health habits and other characteristics of dietary supplement users: a review. **Nutrition Journal**, v. 13:14, doi <https://doi.org/10.1186/1475-2891-13-14>, 2014.
- Dietary Supplement Health and Education Act of 1994, Cap. 1. Disponível em <http://health.gov/dietsupp/ch1.htm>. Acesso em 2 de setembro de 2015.

DONG et al. Applications of computer-aided pharmacokinetic and pharmacodynamic methods from drug discovery through registration. **Current Computer-Aided Drug Design**, v. 4, p. 54-66, 2008.

DOS SANTOS, V. B. et al. Amphetamine and derivatives in natural weight loss pills and dietary supplements by capillary electrophoresis-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 1038, p. 10-25, 2016.

DROBNIS, E. Z; NANGIA, A. K. Phosphodiesterase inhibitors (PDE inhibitors) and male reproduction. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 1034, p. 29-38, 2017.

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.

EFSA. European Food Safety Authority. Scientific Opinion on the safety of caffeine. **The EFSA Journal**, v. 13, n.5, p. 4102, 2015.

EUDY, A. E. et al. Efficacy and safety of ingredients found in preworkout supplements. **Journal of the American Pharmacists Association**, v. 53, n. 3, p. 297-303, 2013.

FEJÖS, I. et al. Qualitative and quantitative analysis of PDE-5 inhibitors in counterfeit medicines and dietary supplements by HPLC-UV using sildenafil as a sole reference. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 98, p. 327-333, 2014.

FENG, B. et al. In vitro P-glycoprotein assays to predict the in vivo interactions of P-glycoprotein with drugs in the central nervous system. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 36, n. 2, p. 268-275, 2008.

FRANCISCHI, R. P. P. ET AL. Obesidade: atualização sobre sua etiologia, morbidade e tratamento. **Revista de Nutrição**, v. 13, n. 1, p. 17-28, 2000.

GERSHWIN, M. E. et al. Public safety and dietary supplementation. **Annals of the New York Academy of Science**, v. 1190, p. 104-117, 2010.

GEYER, H.; PARR, M. K.; KOEHLER, K.; MARECK, U.; SCHÄNZER, W.; THEVIS, M. Nutritional supplements cross-contaminated and faked with doping substances. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 43, n. 7, p. 892-902, 2008.

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

GURLEY, B. J.; STEELMAN, S. C.; THOMAS, S. L. Multi-ingredient, caffeine-containing dietary supplements: history, safety and efficacy. **Clinical Therapeutics**, v. 37, p. 275-301, 2015.

- HALLER, C. A.; DUAN, M.; BENOWITZ, N. L.; JACOB III, P. Concentrations of ephedra alkaloids and caffeine in commercial dietary supplements. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 28, n. 3, p. 145-151, 2004.
- HALL, M.; TROJIAN, T. H. Creatine supplementation. **Current Sports Medicine Reports**, v. 12, n. 4, p. 240-244, 2013.
- HA, H. R. et al. Biotransformation of caffeine by cDNA-expressed human cytochromes P-450. **European Journal of Clinical Pharmacology**, v. 49, n. 4, p. 309-315, 1996.
- HUANG S. M. et al. New era in drug interaction evaluation: US FDA update on CYP enzymes, transporters, and the guidance process. **Journal of Clinical Pharmacology**, v. 48, n. 6, p. 662-670, 2008.
- JAMEI, M. et al. The Simcyp population-based ADME simulator. **Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology**, v. 5, n. 2, p. 211-223, 2009.
- JIANG, S. et al. Development of an ultra-high-performance liquid chromatography coupled to high-resolution quadrupole-Orbitrap mass spectrometry method for the rapid detection and confirmation of illegal adulterated sedative-hypnotics in dietary supplements. **Food Additives & Contaminants. Part A, Chemistry, Analysis, Control, Exposure & Risk Assessments**, v. 32, n. 10, p. 1749-1759, 2015.
- KARTH, A. et al. A case report of atrial fibrillation potentially induced by hydroxycut: a multicomponent dietary weight loss supplement devoid of sympathomimetic amines. **Journal of Pharmacy Practice**, v. 23, n. 3, p. 245-249, 2010.
- KHAZAN, M. et al. Identification and determination of synthetic pharmaceuticals as adulterants in eight common herbal weight loss supplements. **Iranian Red Crescent Society**, v. 16, n. 3, 2014.
- KIM, H.J et al. Determination of non-opioid analgesics in adulterated food and dietary supplements by LC-MS/MS. **Food Additives & Contaminants. Part A, Chemistry, analysis, control, exposure & risk assessment**, v. 31, n. 6, p. 973-978, 2014.
- KIM, H. J. et al. Monitoring of 29 weight loss compounds in foods and dietary supplements by LC-MS/MS. **Food Additives & Contaminants. Part A, Chemistry, analysis, control, exposure & risk assessment**, v. 31, n. 5, p. 777-783, 2014 (b).
- KNEE, T. S. A case of severe exercise-induced rhabdomyolysis associated with a weight-loss dietary supplement. **Military Medicine**, v. 172, n. 6, p. 656-658, 2007.
- KOBAYASHI, K. et al. Sertraline *N*-demethylation is catalyzed by multiple isoforms of human cytochrome P-450 *in vitro*. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 27, n. 7, p. 763-766, 1999.
- KU, H. Y. et al. The contributions of cytochromes P450 3A4 and 3A5 to the metabolism of the phosphodiesterase type 5 inhibitors sildenafil, udenafil, and vardenafil. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 36, n. 6, p. 986-990, 2008.

LANCHA, JR., A. H. Suplementos Nutricionais. In :Hirschbruch MD, CARVALHO, JR. *Nutrição Esportiva – Uma visão prática*. Barueri : Editora Manole; 2002.

LANZAROTTA, A. et al. A multidisciplinary approach for the analysis of an adulterated dietary supplement where the active pharmaceutical ingredient was embedded in the capsule shell. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 67-68, p. 22-27, 2012.

LEBEL, M. et al. Effects of rifabutin and rifampicin on the pharmacokinetics of ethinylestradiol and norethindrone. **Journal of Clinical Pharmacology**, v. 38, n. 11, p. 1042-1050, 1998.

LEE, J. H. et al. Identification of a new tadalafil analogue in an adulterated dietary supplement: trans-bisphrehomotadalafil. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 115, p. 352-358, 2015.

LEVESQUE, R. J. R. Caffeine intoxication. In: **Encyclopedia of Adolescence**. Berlin: Springer, p. 365, 2011.

LU, S. et al. Combined use of phosphodiesterase-5 inhibitors and selective serotonin reuptake inhibitors for temporary ejaculation failure in couple undergoing assisted reproductive technologies. **Fertility and Sterility**, v. 91, n. 5, p. 1806-1808, 2009.

LU, Y. L. et al. Detection of adulteration of anty-hipertension dietary supplements and traditional Chinese medicines with synthetic drugs using LC/MS. **Food Additives & Contaminants Part A**, v. 27, p. 893-902, 2010.

MACHADO, K. C. et al. A rapid simultaneous determination of methylxanthines and proanthocyanidins in Brazilian guaraná (*Paullinia cupana* Kunth.) **Food Chemistry**, v. 239, p. 180-188, 2018.

MAKRLIKOVA, A. et al. Pressure-assisted introduction of urine samples into a short capillary for electrophoretic separation with contactless conductivity and UV spectrometry detection. **Electrophoresis**, v. 36, p. 1962-1968, 2015.

MARTELLI, A.; LONGO, M. A. T.; SERIANI, C. Aspectos clínicos e mecanismos de ação das principais classes farmacológicas usadas no tratamento da hipertensão arterial sistêmica. **Revista Estudos de Biologia**, v. 70/71/72, p. 149-156, 2008.

MARTINI, M. Determinação de fármacos sintéticos em formulações farmacêuticas empregando métodos eletroquímicos e de separação. **Tese de Doutorado**, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria/RS, 2014.

MAZZAFERA, P. Maté drinking: caffeine and phenolic acid intake. **Food Chemistry**, v. 60, n. 1, p. 67-71, 1997.

McELROY S. L. et al. Placebo-controlled trial of sertraline in the treatment of binge eating disorder. **American Journal of Psychiatry**, v. 157, p. 1004–1006, 2000.

McRAE, A. L.; BRADY, K. T. Review of sertraline and its clinical applications in psychiatric disorders. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, v. 2, n. 5, p. 883-892, 2001.

MIMAN, M. C. et al. Amikacin ototoxicity enhanced by *Gingko biloba* extract (EGb 761). **Hearing Research**, v. 169, n. 1-2, p. 121-129, 2002.

MOREIRA, A. P. L. Determinação cromatográfica e eletroforética de diuréticos e laxantes em formulações farmacêuticas à base de plantas medicinais. **Dissertação de Mestrado**, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria/RS, 2012.

MOREIRA, A. P. L.; MARTINI, M.; CARVALHO, L. M. Capillary electrophoretic methods for the screening and determination of pharmacologic adulterants in herbal-based pharmaceutical formulations. **Electrophoresis**, v. 35, n. 21-22, p. 3212-3230, 2014.

MOREIRA, A. P. L. et al. Determination of diuretics and laxatives as adulterants in herbal formulations for weight loss. **Food Additives & Contaminants: Part A**, v. 30, n. 7, p. 1230-1237, 2013.

MORENO, R. A.; MORENO, D. H.; SOARES, M. B. M. Psicofarmacologia de antidepressivos. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 21, p. 24-40, 1999.

NAPPO, S. A.; CARLINI, E. A. Revisão: medicamentos anorexígenos. **Infarma**, p. 6-9, 1993.

NEMEROFF, C. B. Newer antidepressants and the cytochrome P450 system. **The American Journal of Psychiatry**, v. 153, n. 3, p. 311-320, 1996.

NEVES, D. B. D. J.; CALDAS, E. D. Determination of caffeine and identification of undeclared substances in dietary supplements and caffeine dietary exposure assessment. **Food and Chemical Toxicology: an International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association**, v. 105, p. 194-202, 2017.

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.

PALLARÉS, J. G. Neuromuscular responses to incremental caffeine doses: performance and side effects. **Medicine & Science in Sports & Exercise**, v. 45, p. 2184-2192, 2013.

PATEL, B. N. et al. Analysis of second-generation antidepressant drug, sertraline and its active metabolite, *N*-desmethyl sertraline in human plasma by a sensitive and selective liquid chromatography-tandem mass spectrometry method. **Journal of Chromatography B**, v. 877, p. 221-229, 2009.

PATEL, Y. A.; MARZELLA, N. Dietary supplement-drug interaction-induced serotonin syndrome progressing to acute compartment syndrome. **The American Journal of Case Reports**, v. 18, p. 926-930, 2017.

PENDLETON, M. et al. Potential toxicity of caffeine when used as a dietary supplement for weight loss. **Journal of Dietary Supplements**, v. 10, n. 1, p. 1-5, 2013.

PEREIRA, D. G. Importância do metabolismo no planejamento de fármacos. **Química Nova**, v. 30, n. 1, p. 171-177, 2007.

PERERA, V. et al. Pharmacokinetics of caffeine in plasma and saliva, and the influence of caffeine abstinence on CYP1A2 metrics. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 63, p. 1161-1168, 2011.

PHILLIPS, M. M.; RIMMER, C. A. Functional foods and dietary supplements. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 405, n. 13, p. 4323-4324, 2013.

PITTLER, M. H.; SCHIMDT, K.; ERNST, E. Adverse events of herbal food supplements for body weight reduction: systematic review. **Obesity Reviews**, v. 6, n. 2, p. 93-111, 2005.

RAO, T. S. S. et al. Prolonged, longstanding, ultra-high-dose abuse of sildenafil. **Indian Journal of Psychiatry**, v. 57, n. 3, p. 311-312, 2015.

RATAMESS, N. A. et al. The effects of supplementation with P-Syneprhine alone and in combination with caffeine on resistance exercise performance. **Journal of the International Society of Sports Nutrition**, v. 12, n. 35, 2015.

RIBAS, S. A. et al. Effects of psyllium on LDL-cholesterol concentrations in Brazilian children and adolescents: a randomized, placebo-controlled, parallel clinical trial. **British Journal of Nutrition**, v. 113, p. 134-141, 2015.

RUIZ, M. N. S. et al. Análisis de la percepción de la imagen corporal que tienen los estudiantes universitarios de Navarra. **Nutrición Hospitalaria**, v. 31, n. 5, p. 2269-2275, 2015.

RUSCHITZKA, F. et al. Acute heart transplant rejection due to Saint John's wort. **The Lancet**, v. 355, n. 9203, p. 548-549, 2000.

RUSSO, R. et al. When nutraceuticals reinforce drugs side effects: a case report. **Current Drug Safety**, v. 11, n. 3, p. 264-266, 2016.

SANTOS, M. A. A.; SANTOS, R. P. Uso de suplementos alimentares como forma de melhorar a performance nos programas de atividade física em academias de ginástica. **Revista Paulista de Educação Física**, v. 16, n. 2, p. 174-185, 2002.

SBAN, Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição. Disponível em: [http://www.sban.org.br/por\\_dentro/informativos/142/o-quanto-voce-realmente-sabe-](http://www.sban.org.br/por_dentro/informativos/142/o-quanto-voce-realmente-sabe-)

sobre-suplementos-alimentares-dos-aspectos-basicos-a-necessidade-de-regulamentacao. Acessado em 13 Agosto 2015.

SEMEN, S. et al. Elemental composition of green coffee and its contribution to dietary intake. **Food Chemistry**, v. 215, p. 92-100, 2017.

SHI, F. et al. Application of a high resolution benchtop quadrupole-Orbitrap mass spectrometry for the rapid screening, confirmation and quantification of illegal adulterated phosphodiesterase-5 inhibitors in herbal medicines and dietary supplements. **Journal of Chromatography A**, v. 30, n. 1344, p. 91-98, 2014.

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

SICCARDI, M. et al. Prediction of drug-drug interactions between various antidepressants and efavirenz or boosted protease inhibitors using a physiologically based pharmacokinetic modelling approach. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 52, p. 583-592, 2013.

SILVA, H. S. R. C.; SANTOS, K. S. C. R.; FERREIRA, E. I. Quitosana: derivados hidrossolúveis, aplicações farmacêuticas e avanços. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 776-785, 2006.

SILVA, J.A.F da. Detecção condutométrica sem contato (oscilométrica) para eletroforese capilar de zona e cromatografia micelar eletrocínética, **Tese (Doutorado em Química)** – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.

SILVA, L. F. M.; FERREIRA, K. S. Segurança alimentar de suplementos comercializados no Brasil. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 20, n. 5, 2014.

SILVA, P. **Farmacologia**. 7ª Ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 2006.

SILVEIRA, P. F.; BANDEIRA, M. A. M.; ARRAIS, P. S. D. Farmacovigilância e reações adversas às plantas medicinais e fitoterápicos: uma realidade. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 4, p. 618-626, 2008.

SMITH, K. M.; ROMANELLI, F. Recreational use and misuse of phosphodiesterase 5 inhibitors. **Journal of the American Pharmacists Association**, v. 45, n. 1, p. 63-75, 2005.

SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; DOLAN, J. Introduction to modern liquid chromatography. 3a Ed., **A. John Wiley & Sons, Inc., Publication**, 2010.

SOCALA, K. et al. Effect of sildenafil on the activity of some antidepressant drugs and electroconvulsive shock treatment in the forced swim test in mice. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 390, n. 4, p. 339-349, 2017.

STEPHENSEN, T. A.; SARLAY, R. Ventricular fibrillation associated with use of synephrine containing dietary supplement. **Military Medicine**, v. 174, p. 1313-1319, 2009.

STOHS, S. J.; PREUSS, H. G.; SHARA, M. A review of the receptor-binding properties of *p*-synephrine as related to its pharmacological effects. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, p. 1-9, 2011.

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

SVS/MS, 1998 (Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância Sanitária). Portaria nº 32, de 13 de janeiro de 1998 - Aprova o Regulamento Técnico para Suplementos Vitamínicos e/ou de Minerais. Disponível em: [http://cn3.org.br/legislacao/doc/PORTARIA\\_32\\_1998.pdf](http://cn3.org.br/legislacao/doc/PORTARIA_32_1998.pdf). Acessado em 03 Setembro 2015.

TAGLIARO, F. et al. A brief introduction to capillary electrophoresis. **Forensic Science International**, v. 92, p. 75-88, 1998.

TARNOPOLSKI, M. A. Caffeine and creatine use in sport. **Annals of Nutrition & Metabolism**, v. 57, n. 2, p. 1-8, 2010.

TANNENBAUM, C; SHEEHAN, N. L. Understanding and preventing drug-drug and drug-gene interactions. **Expert Review of Clinical Pharmacology**, v. 7, n. 4, p. 533-544, 2014.

TAN, Y. et al. Evaluating pharmacokinetic and pharmacodynamic interactions with computational models in supporting cumulative risk assessment. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 8, n. 5, p. 1613-1630, 2011.

TAVARES, M. F. M. Eletroforese capilar: conceitos básicos. **Química Nova**, v. 19, n. 2, p. 173-181, 1996

TAVARES, M. F. Mecanismos de separação em eletroforese capilar. **Química Nova**, v. 20, n. 5, p. 493-511, 1997.

TEMPLETON, I. E. et al. Quantitative prediction of drug-drug interactions involving inhibitory metabolites in drug development: how can physiologically based pharmacokinetic modeling help? **Pharmacometrics & Systems Pharmacology**, v. 5, n. 10, p. 505-515, 2016.

TONHI, E. et al. Fases estacionárias para cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE-FR) baseadas em superfícies de óxidos inorgânicos funcionalizados. **Química Nova**, v. 25, n. 4, p. 616-623, 2002.

ULLOA, J. et al. Detection of a tadalafil analogue as an adulterant in a dietary supplement for erectile dysfunction. **The Journal of Sexual Medicine**, v. 12, n. 1, p. 152-157, 2015.

VANDENBERGHE, K. et al. Long-term creatine intake is beneficial to muscle performance during resistance training. **Journal of Applied Physiology**, v. 83, p. 2055-2063, 1997.

VARMA, M. V. et al. Dealing with the complex drug-drug interactions: towards mechanistic models. **Biopharmaceutic & Drug Disposition**, v. 36, n. 2, p. 71-92, 2015.

VÉGH, A. et al. Identification and evaluation of drug-supplement interactions in Hungarian hospital patients. **International Journal of Clinical Pharmacy**, v. 36, n. 2, p. 451-459, 2014.

VIANA, C. et al. Liquid chromatographic determination of caffeine and adrenergic stimulants in food supplements sold in Brazilian e-commerce for weight loss and physical fitness. **Food Additives & Contaminants**, v. 33, n. 1, p. 1-9, 2016.

VILELA, V. R. et al. Inibidores de fosfodiesterase tipo 5: conceitos e uso terapêutico. **Revista de Saúde e Biologia**, v. 11, n. 3, p. 45-51, 2016.

WANG, J. et al. Simultaneous of illegal additives of dietary supplements and traditional medicines by high performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 113, n. 1, p. 227-232, 2009.

WANG, J.; CHEN, B.; YAO, S. Analysis of six synthetic adulterants in herbal weight-reducing dietary supplements by LC electrospray ionization-MS. **Food Additives and Contaminants. Part A, Chemistry, analysis, control, exposure and risk assessment**, v. 25, n. 7, p. 822-830, 2008.

WANG, Q. et al. Determination of hydrochlorothiazide and rutin in Chinese herb medicines and human urine by capillary zone electrophoresis with amperometric detection. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 30, p. 1507-1514, 2003.

WATERBEEMND, H. V.; GIFFORD, E. ADMET *in silico* modelling: towards prediction paradise? **Nature Reviews**, v. 2, p. 192-204, 2003.

WEINER, I. M. et al. Goodman and Gilman's pharmacological basis of therapeutics. New York (NY): Pergamon, 1990.

WHO, World Health Organization. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>. Acessado em 05 Agosto 2015

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

ZULLI, A. et al. Caffeine and cardiovascular diseases: critical review of current research. **European Journal of Nutrition**, v. 55, p. 1331-1343, 2016.



**APÊNDICE A – ARTIGO 1**

DETERMINATION OF STIMULANTS AND DIURETICS IN  
DIETARY SUPPLEMENTS FOR WEIGHT LOSS AND  
PHYSICAL FITNESS BY ION-PAIR CHROMATOGRAPHY  
AND PULSED AMPEROMETRIC DETECTION (PAD)

**Reference#:** BSP-CAC-2017-762

**Submission Title:** Determination of Stimulants and Diuretics in Dietary Supplements for Weight Loss and Physical Fitness by Ion-pair Chromatography and Pulsed Amperometric Detection (PAD)

Dear Dr. Leandro Machado Carvalho,

I am pleased to inform you that your article entitled "**Determination of Stimulants and Diuretics in Dietary Supplements for Weight Loss and Physical Fitness by Ion-pair Chromatography and Pulsed Amperometric Detection (PAD)**" has been accepted for publication in "**Current Analytical Chemistry**" after independent peer review.

Please note the figures provided in color will be published against payment. For further details, please refer to the Instruction for Authors at <http://benthamscience.com/journal/authors-guidelines.php?journalID=cac#top>

You may wish to request your Librarian to subscribe to the journal so that your work gets maximum exposure among your colleagues, researchers and readers in the field.

Bentham also has a special limited time offer in this connection: If your Librarian decides to subscribe to this journal, you will be eligible to an optional offer which will allow free Open Access to this article as well as any other articles that you submit and which are accepted after peer review during the next 2 years.

We are eager to share with you all the research articles published in Bentham Science journals that are relevant to your field of interest. For future article alerts, we request you to provide keywords and fields of your choice. Please e-mail your selections for future article alerts to Mr. F. Haq, Manager Marketing: [faizan@benthamscience.org](mailto:faizan@benthamscience.org)

Bentham Science strives to promote your article to a huge audience relevant to your research, using a variety of Marketing tools and platforms. For a detailed view of all the promotional activities please visit here. <http://benthamscience.com/journal-files/AUTHORS-BENEFITS-GUIDE-BSP.pdf>

We wish to thank you for submission of the manuscript to Current Analytical Chemistry and look forward to continued collaboration in future.

With warm regards,

Editorial Office

Bentham Science Publishers

Current Analytical Chemistry

<http://bsp-cms.eurekaselect.com/index.php/CAC>

## Determination of stimulants and diuretics in dietary supplements for weight loss and physical fitness by ion-pair chromatography and pulsed amperometric detection (PAD)

Larissa Sabo Müller<sup>a</sup>, Thais Ramos Dal Molin<sup>b</sup>, Diana Tomazi Muratt<sup>c</sup>, Gabriela Camera Leal<sup>a</sup>, Carolina Gonzalez Urquhart<sup>a</sup>, Carine Viana<sup>a</sup>, Leandro Machado de Carvalho<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup> Graduate Program in Pharmaceutical Sciences, Federal University of Santa Maria (UFSM), Santa Maria-RS, Brazil; <sup>b</sup> Department of Chemistry, Federal University of Santa Maria (UFSM), Santa Maria-RS, Brazil.

### Abstract:

Stimulant and diuretic drugs are commonly added to formulations of dietary supplements. Although some of them are not banned additives, their dosage on the label may not match the actual content. This paper describes the study of caffeine, synephrine, hydrochlorothiazide, chlorthalidone and furosemide in 78 dietary supplements marketed for weight loss and physical fitness in Brazil. The optimized analytical method involved the separation of the compounds by ion-pair chromatography with pulsed amperometric detection (IPC-PAD) using a gold disc as the working electrode (at +0.8V). The mobile phase was composed of 5 mmol L<sup>-1</sup> phosphate buffer and 0.3 mmol L<sup>-1</sup> sodium dodecyl sulfate in H<sub>2</sub>O/methanol, 50/50% (v/v) (pH 4.5). The method was validated in terms of linear range, detection limit, quantification limit, precision, and accuracy. Caffeine was found to be present in 50% of the studied samples and about 20% of them presented caffeine levels above the quantity considered safe for daily intake. In addition, hydrochlorothiazide and furosemide were found as diuretics in the formulations. Hydrochlorothiazide was found as diuretic in amounts higher than the therapeutic dose in circa 5% of the samples, being that the same incidence found for the stimulant synephrine in the analyzed samples.

**Keywords:** Amperometric detection; Ion-pair chromatography; Dietary supplements; Diuretics; Stimulants.

### 1. INTRODUCTION

Dietary supplements are products that aim to complement the diet of healthy individuals, and may show nutritional, metabolic and physiological effects. Thus, they are generally composed of vitamins, minerals, fibers, proteins, amino acids, fatty acids, herbs and plant extracts, probiotics and other substances. This kind of supplementation is usually sought by individuals who practice physical activity, with the aim of increasing performance, obtaining short-term results or even the loss of body fat. Recent research has shown that the dietary supplement market is worth around 46 billion dollars annually worldwide, presenting an increase of 11% between 2011 and 2012 [1]. Nevertheless, several cases of side and toxic effects related to the use of weight loss supplements have been reported in the literature [2-5]. Many of these products contain substances commonly present in human diet, such as caffeine, which can cause health problems if ingested indiscriminately. Indicated for increased performance and appetite suppression by manufacturers, prolonged caffeine use at high concentrations has been associated with anorexia, agitation, nausea and tachycardia due to its strong vasodilatory capacity and its activation of beta-1 and beta-2 receptors [5]. Although caffeine is not a banned additive, its dosage on the label may not match the product contents [6].

Tel/Fax: +55-55-3220-8870; E-mails: [lemacarvalho@gmail.com](mailto:lemacarvalho@gmail.com); [leandrocarvalho@pq.cnpq.br](mailto:leandrocarvalho@pq.cnpq.br)

In addition to problems involving the widespread use of dietary supplements, another factor of great importance has been the recurrent pharmacologic adulteration of the products [7]. The most used adulterants in food supplements aiming at weight loss include several drugs. Thus, anorexics such as amfepramone and femproporex are employed to induce loss of appetite and increase the feeling of satiety; benzodiazepines such as diazepam and lorazepam can decrease anxiety, common symptoms in obesity, and also minimize the side effects of the anorexics; antidepressants, diuretics and laxatives such as fluoxetine, furosemide and phenolphthalein, are also commonly added as adulterants [8].

Therefore, to carry out appropriate control of these products, each country has its own regulatory agency. In Brazil, the National Health Surveillance Agency (ANVISA) is responsible for the regulation, control and inspection of foods, which are classified in different categories. However, since there is no specific category for dietary supplements, these products are usually marketed by manufacturers in one of the following categories: vitamins and/or mineral supplements, new food and new food ingredients, food with functional properties or with health benefits, bioactive substances and probiotics with functional properties or health benefits, and food for athletes. Frequently, a product that does not meet the requirements for regulation in a particular category is placed

\*Address correspondence to this author at the Department of Chemistry, Federal University of Santa Maria (UFSM), Santa Maria-RS, Brazil.

in a different category to facilitate its marketing [7]. Thus, there is a clear necessity for simple, easy-to-use and inexpensive routine methods to screen and determine adulterants and other substances in suspicious preparations. Towards this end, amperometric electrochemical detection coupled to HPLC can offer advantages over UV detection due to its capacity to detect electroactive species of interest without the use of any derivatization procedure [9]. This is also an advantage for the selectivity of the method, mainly due to the application of time-controlled pulse potentials associated to potential cycling cleaning steps of the electrode surface [10].

Amperometric detection has been successfully exploited for pharmaceutical analysis, such as the determination of polar nonsteroidal pharmaceuticals [11], benzoyl peroxide [12], tetracycline antibiotics [13] and anesthetics [14]. In addition, analysis of organic compounds in diverse complex matrices have been performed by HPLC coupled to pulsed amperometric detection [15–21]. Herein, vegetables, cosmetics, and synthetic chemicals have been studied by using different chromatographic and amperometric approaches. However, no study has been performed so far for detecting synthetic drugs as adulterants in food supplements by pulsed amperometry as a detection tool. In a previous work [10], we described the separation of three diuretics using amperometric detection for the analysis in herbal-based formulations produced and marketed by compounding pharmacies. Hydrochlorothiazide and furosemide were found to be present as additives (declared or not) of samples containing different plant species.

Beyond diuretic drugs, formulations marketed for weight loss or thermogenic action contain often stimulants in their composition. Thus, caffeine, synephrine, ephedrine as well as other biogenic amines are expected in association with other synthetic drugs, once dietary supplementation is performed by aiming weight loss mainly through diuresis and thermogenesis. Therefore, the simultaneous determination of these two pharmacologic classes in dietary supplements is very important from an analytical point of view. The aim of this study was to develop and apply a method to the rapid identification and quantification of diuretics (hydrochlorothiazide, chlorthalidone and furosemide) and stimulants (caffeine and synephrine) by using ion-pair chromatography with pulsed amperometric detection in dietary supplements marketed for weight loss and increased performance in physical activities.

## 2. MATERIALS AND METHOD

### 2.1. Chemicals and reagents

Standards of hydrochlorothiazide, chlorthalidone and furosemide were of pharmaceutical grade and were obtained with certificates of analysis. Caffeine and synephrine were purchased from Sigma-Aldrich (Munich, Germany) and were of analytical grade, with at least 98% purity, used without further purification. Water was purified using a Milli Q Ultra Pure Water System (Millipore Synergy® UV, Bedford, USA). Phosphoric acid (85%) and sodium dodecyl

sulfate were obtained from Merck® (Darmstadt, Germany). Methanol grade HPLC Tedia® (Fairfield, CT, USA) was also used.

Stock solutions (1 g L<sup>-1</sup>) of each analyte were prepared in methanol. Mixtures of lower concentration standard solutions were prepared via dilution of the stock solutions with the mobile phase.

The mobile phase consisted of 5 mmol L<sup>-1</sup> sodium phosphate and 0.3 mmol L<sup>-1</sup> sodium dodecyl sulfate in 50% (v/v) methanol. The pH of the mobile phase was adjusted to 4.5 using 1.0 and 0.1 mol L<sup>-1</sup> phosphoric acid solutions. The eluent was filtered through a 0.45-µm membrane filter (Sartorius) and sonicated for 1 h prior to use.

### 2.2. Apparatus

Analyses were performed using a high performance liquid chromatography system with isocratic separation (model 882 Compact IC Plus), coupled with a pulsed amperometric detector (model 871 Advanced Bioscan) and an Interface 171 IC Compact Interface, Metrohm® (Herisau, Switzerland). For electrochemical detection (Vario Cell Bioscan Metrohm®), a gold disc was used as the working electrode (3 mm diameter), steel as the auxiliary electrode and solid-phase hydrogen as a reference electrode (Metrohm®). Separations were carried out using a C18 analytical column (Thermo®) with dimensions 4.6 mm x 150 mm x 5 µm.

### 2.3. Sample preparation

Dietary supplements were purchased online from randomly chosen Brazilian websites and from physical stores in the country. Considering the scope of this work, the search was restricted to products that advertise and market food supplements with claims of weight loss, fat burning, appetite reduction or metabolism acceleration (thermogenics). Based on this search, 78 products were acquired, 66 of them with different compositions and 12 repeated samples from different batches. The samples were supplied as powders in capsule, tablet or bulk forms.

For encapsulated and tablet samples, a pool of 10 items was prepared in order to obtain homogeneous material for analysis. The average weight of each sample (or 0.5 g for samples in bulk) was weighed, dissolved in 25 mL of methanol and sonicated for 30 minutes. The sample was then filtered through cotton and regenerated cellulose acetate membrane (0.45 µm). Finally, the extract was diluted at least 100-fold in the mobile phase before injection into the chromatographic system.

## 3. EXPERIMENTAL

The chromatographic column (C18) was conditioned daily with the mobile phase for 60 min prior to use in experiments. Working solutions were manually injected using a 20-µL loop injection. At the end of the day, the column was washed with ultrapure water for 40 min at a flow rate of 1.0 mL/min and

with a solution of acetonitrile containing ultrapure water (90:10) for 20 min at a flow rate of 1.0 mL/min.

The pulsed amperometric detection consisted of three steps: the detection potential (E1), the oxidation potential (E2) and the reduction potential (E3). To optimize the potential for the determination of the drugs, the direct current (DC) mode was employed. Using the DC mode, a constant potential is applied to the working electrode when the mobile phase is constantly flowing through the amperometric cell. Therefore, the analytes are oxidized or reduced based on their electrochemical properties. The analytes are injected into this flow, which results in an increase in the current relative to the baseline current recorded for the mobile phase. This current difference ( $\Delta I$ ) is plotted as a function of the applied potential to obtain the hydrodynamic voltammograms.

The method was validated according to the following operational characteristics: linearity, limit of quantification, limit of detection, precision and accuracy. The linearity was evaluated using six-point calibration curves from data collected on three different days for each analyte. The limit of detection (LOD) and the limit of quantification (LOQ) were calculated from the equations:  $LOD = 3.3 \times Sa/b$ , and  $LOQ = 10 \times Sa/b$ , where  $Sa$  = standard deviation of the intercept,  $b$  = slope. The intraday precision or repeatability of the procedures was evaluated by analyzing the results for six samples spiked with a known concentration of standard measured on the same day and under the same experimental conditions. The interday precision was evaluated by repeating this procedure on three consecutive days. The accuracy was evaluated as the percentage recovery obtained from the analysis of spiked samples. The identification and quantification of the active compounds in the samples was performed using the standard addition method ( $n = 3$ ).

#### 4. RESULTS AND DISCUSSIONS

##### 3.1 Separation and detection of diuretics and stimulants by ion-pair chromatography with pulsed amperometric detection

In a previous work [10], we described the separation and detection of four diuretics using an amperometric cell containing a gold disc electrode of 8 mm diameter (Vario Cell<sup>®</sup>, Metrohm). The method allowed the determination of the drugs and interferences from other pharmacologic classes (anorectics, antidepressants, laxatives, and anxiolytics) were also investigated for the study of herbal formulations. However, the possibility of determining stimulants in the same chromatographic run was not investigated, since those formulations did not declare the use of any synthetic or natural sources of caffeine and/or other amines. Therefore, the determination of the most important diuretics as adulterant candidates (furosemide, hydrochlorothiazide, and chlorthalidone) in the presence of caffeine and synephrine was investigated in the present work. Considering that these stimulants are the most common found in dietary supplements composed for thermogenesis, physical fitness activities and weight loss [8], the chromatographic and

electrochemical behavior of caffeine and synephrine in the presence of the diuretics were investigated in a first step of this work.

Unlike the amperometric cell used in the aforementioned work [10], a gold disc electrode of 3 mm diameter was applied in this work to the detection of the drugs in a new-designed amperometric cell (Vario Cell<sup>®</sup>, Metrohm), which has a volume of 0.29  $\mu$ L. Thus, the optimization of the detection potential for caffeine, synephrine, hydrochlorothiazide, chlorthalidone and furosemide in the cell involved the obtaining of hydrodynamic voltammograms in a potential range from -0.4 to +1.0 V. As can be seen in Figure 1, furosemide, hydrochlorothiazide, chlorthalidone and caffeine exhibited more pronounced oxidation processes between +0.8 and +1.0 V. In addition, synephrine showed the most pronounced oxidation process starting at +0.4 V. Similarly, hydrochlorothiazide also showed oxidation products occurring between +0.2 and +0.4 V. Concerning the reducing processes observed at the Au electrode, all the studied drugs showed a similar voltammetric behavior between -0.2 and -0.4 V, whereas hydrochlorothiazide underwent the most intense reduction process at the electrode surface in this range.

Considering that caffeine, synephrine, hydrochlorothiazide, chlorthalidone and furosemide demonstrated a pronounced electroactivity at the gold electrode in the potential range from +0.8 and +1.0 V, a detection potential of +0.8 V was chosen as the measuring potential in PAD after chromatographic separation. Although synephrine, furosemide and hydrochlorothiazide showed sensitive oxidation processes at +1.0 V, the chromatograms showed better peak shapes and baseline stabilization when detecting the drugs at +0.8 V. Concerning the electrochemical mechanisms occurring at the gold electrode, the sulfured drugs are adsorbed and oxidized at the gold surface during the positive scan, as observed in previous works [10, 22–24]. Furthermore, the amino groups present in the molecules of all the studied stimulants and diuretics may occur at the gold surface [14–31]. Therefore, all these oxidation processes involving sulfured and amino groups are very likely related to the increasing of the current observed between +0.4 and +1.0 V.

Lastly, the PAD cycle of the studied drugs involved an oxidation (+1.0 V for 0.4 s) and a reducing potential (-0.2 V for 1.2 s) on the gold electrode surface as a cleaning step. In addition, the drugs were detected by applying an optimized pulse of +0.8 V for 0.4 s, completing the 2 s detection cycle applied to the gold electrode.

**Figure 1** – Hydrodynamic voltammograms at the gold electrode for hydrochlorothiazide, chlorthalidone, furosemide, caffeine and synephrine (1.0 mmol L<sup>-1</sup>). Supporting electrolyte: 5 mmol L<sup>-1</sup> phosphate buffer (pH 4.5). Reference electrode: solid phase hydrogen electrode.

The optimized electrochemical parameters for PAD were applied to the detection of the studied drugs after ion-pair chromatographic separation. As already observed in a previous work [10], a mobile phase composed of 5 mmol L<sup>-1</sup> sodium phosphate using 0.3 mmol L<sup>-1</sup> sodium dodecyl

sulfate as ion-pairing reagent and 50% (v/v) methanol as organic additive lead to the efficient separation of hydrochlorothiazide, chlorthalidone, furosemide, and amiloride. Herein, the variation of methanol concentration from 10 to 50% (v/v) showed a similar effect on the peak resolution for the diuretics, caffeine, and synephrine. Furthermore, SDS concentration varying from 0.1 to 0.5 mmol L<sup>-1</sup> showed to be optimal for ion-pair equilibrium in the mobile phase. The optimal mobile phase composition based on a 5 mmol L<sup>-1</sup> phosphate buffer at pH 4.5 with 0.3 mmol L<sup>-1</sup> SDS and 50% (v/v) methanol resulted in more sensitive peaks in the chromatograms obtained for the studied stimulants as well. Additionally, all the studied drugs are in their cationic forms at pH 4.5 and establish an ion-pair equilibrium with the anionic surfactant (SDS). This mobile phase composition lead to the best compromise between sensitivity and baseline stability in the chromatograms obtained for the standards. Figure 2 shows the chromatogram obtained for the separation of caffeine, synephrine, hydrochlorothiazide, chlorthalidone and furosemide by ion-pair mechanisms and pulsed amperometric detection at the 3 mm diameter gold disc under optimized conditions.

**Figure 2** - Ion-pair chromatogram of diuretics and stimulants (20mg L<sup>-1</sup>): (HCT) hydrochlorothiazide, (CAF) caffeine, (CLT) chlorthalidone, (FUR) furosemide and (SYN) synephrine. Conditions: mobile phase phosphate buffer 5 mmol L<sup>-1</sup> (pH 4.5) containing SDS 0.3 mmol L<sup>-1</sup> in 50 % methanol (v/v); C18 column; detection potential: +0.8 V (0.4 s); cleaning potentials: +1.0 V (0.4 s) and -0.2 V (1.2 s). Flow rate: 1.0 mL/min.

### 3.2 Validation of the IPC-PAD method

After optimization of the separation and detection of the drugs by IPC-PAD, the method was validated based on primary analytical validation parameters: linear range, detection limit, quantification limit, precision, and accuracy. Linearity data was validated using analysis of variance (ANOVA), which demonstrated a linear relationship and no significant deviation from linearity ( $P < 0.05$ ). The linearity of the method was evaluated by constructing triplicate calibration curves using individual standard concentrations of each analyte. Precision was evaluated by triplicate injections for each compound at the midpoint of its linear range and the corresponding area for three consecutive days (inter-day), and six replicates on the same day (intra-day). The result was expressed by the coefficient of variation (CV%). Accuracy was evaluated using the standard addition technique. This approach involves adding known amounts of the analyte to known amounts of sample prior to its preparation for analysis, and constructing a calibration curve correlating the quantity added to the sample recovered (comparing the respective areas). The method proved to be robust, since reproducibility was not affected by small variations in pH or reagent concentrations. The results obtained for the validation experiments are summarized in Table 1. The precision ranged from 3.18% to 5.78% (inter-day), and the accuracy from 83.0% to 119.7%. Herein, initial point corresponds to the recovery of 1 mg L<sup>-1</sup> for hydrochlorothiazide and chlorthalidone, 5 mg L<sup>-1</sup> for caffeine

and 0.5 mg L<sup>-1</sup> for furosemide and synephrine; medium point corresponds to 20 mg L<sup>-1</sup> for hydrochlorothiazide and chlorthalidone, 40 mg L<sup>-1</sup> for caffeine and 10 mg L<sup>-1</sup> for furosemide and synephrine; and final point corresponds to 30 mg L<sup>-1</sup> for hydrochlorothiazide, 50 mg L<sup>-1</sup> for chlorthalidone, 100 mg L<sup>-1</sup> for caffeine and 25 mg L<sup>-1</sup> for furosemide and synephrine. The values are in accordance with the AOAC [32] requirements for validation experiments in botanicals and dietary supplements, considering the studied concentration levels.

**Table 1**

### 3.3. Study of adulteration of dietary supplements by the proposed IPC-PAD method

The proposed IPC-PAD method was employed for the analysis of 78 samples of dietary supplements. The high diversity expected for dietary supplements in terms of sample composition may imposes an analytical difficulty considering the interfering possibilities from matrix components (e.g. proteins, amino acids, minerals, plant extracts). For this purpose, all the samples were firstly dissolved in methanol, filtered and diluted at least 100 times before injecting in the chromatographic system. Considering that all the studied drugs are well-soluble in polar solvents and expected at concentrations close to therapeutic doses, the sample dilution and the use of the standard addition method for calibration on the sample condition circumvent the matrix interferences. Thus, an analytical screening was always performed for each sample after a 100-fold dilution in order to identify the possible adulteration of the samples within the studied drugs. In some products, stimulants were mentioned on the label. Hence, in these cases, the goal was to quantify these drugs and compare the results obtained with the stated composition. For positive samples with concentrations higher than the working range, the final sample solution was diluted to produce responses within the working range.

Considering all the samples (n=78) analyzed in this work, 50% of them presented caffeine in their composition, as described in Table 2, which also shows the formulation composition/origin and dosage forms of the products. Only 26% had declared the caffeine on the label. In some cases, products listed medicinal plants that naturally contain caffeine in their composition. Sixteen samples (1a, 1b, 6b, 7, 11, 12a, 15, 17, 19, 22a, 22b, 23, 25, 27, 29, 30) presented caffeine levels above the quantity considered safe for daily intake, which ranges from 250 to 300 mg [33]. To the best of our knowledge, a cup of coffee (150 mL) has 120 mg of caffeine, instant coffee 70 mg and black tea 50 mg. Soft drinks (360 mL) contain approximately 30–60 mg, while chocolate contains 7 mg per 28 g [34].

As mentioned above, the continued use of caffeine in high concentrations has been associated with anorexia, agitation, nausea and tachycardia [5]. Recent studies have shown that individuals who received high doses of caffeine prior to exercise presented heart rate, mean arterial pressure and diastolic blood pressure that were elevated afterwards, which is known to be connected to the development of various

arrhythmias [35]. Furthermore, considering a 70 kg individual, caffeine doses of 210 mg are already capable of helping to improve physical performance while only professional athletes should consume doses above 420 mg, even considering all of the side effects involved [36]. It is also interesting to emphasize that some samples that declared certain amount of anhydrous caffeine contained further natural sources of caffeine, increasing its concentration. This is the case for sample '1b' (Figure 3) where the highest concentration of caffeine was found, reaching a much higher level than the recommended daily limit. Furthermore, caffeine sources in conjunction with other botanical extracts may present pharmacologic properties that are difficult to predict [37, 38].

Table 2

Figure 3 - Chromatogram obtained from sample '1b' containing caffeine and hydrochlorothiazide. Declared composition of sample is described in Table 2. Other conditions are as described in Figure 2.

Regarding the presence of diuretics, hydrochlorothiazide and chlortalidone were found in 14 samples. Considering the maximum daily therapeutic dose of hydrochlorothiazide (80 mg), four samples were above this limit. However, the presence of these drugs was not declared, and they are not allowed in this kind of product. Recent studies have shown the undeclared presence of diuretics in dietary supplements [8, 10, 39, 40], clearly demonstrating the high number of cases of this practice.

Finally, the stimulant synephrine was found in four samples and only one was considered above the recommended limit for daily consumption. The presence of synephrine in dietary supplements has been associated with episodes of ventricular fibrillation [41] and apical ballooning syndrome, a reversible cardiomyopathy that is frequently precipitated by emotional or physical stress [42].

In some samples, more than one compound was found. That was the case for sample '15', wherein hydrochlorothiazide, caffeine and synephrine were detected together. In these cases, the potency of the drugs can be altered, resulting in unknown side effects [43]. Some studies have reported the severe consequences of interactions between caffeine and synephrine, which can lead to serious adverse effects like anxiety, nausea, increased blood pressure and tremors [44]. On the other hand, toxic effects resulting from the association of stimulants and diuretics have not been reported to date.

## CONCLUSION

A new IPC-PAD method using an amperometric cell with a gold disc electrode (3 mm diameter) enabled the simultaneous separation and sensitive detection of the diuretics hydrochlorothiazide, chlortalidone and furosemide in the presence of the stimulants caffeine and synephrine. The optimized method allows a rapid screening and determination of

the drugs in dietary supplement samples after dissolution, filtration, and dilution steps for minimizing possible matrix interferences. Caffeine was found to be present as a stimulant in 50% of the studied samples available as encapsulated or bulk forms from different websites and physical stores. Furthermore, about 20% of the samples presented caffeine levels above than the quantity considered safe for daily intake. Beyond caffeine, synephrine was found as stimulant in circa 5% of the studied samples. Lastly, hydrochlorothiazide was found in amounts above the therapeutic dose in 5% of the samples.

## CONFLICT OF INTEREST

All authors declare no conflicts of interest. This study was supported by the Brazilian foundations National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), and Research Support Foundation of the State of Rio Grande do Sul (FAPERGS).

## ACKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to acknowledge the financial support given by the Brazilian foundations CNPq, FAPERGS, and CAPES. The authors specially thank CAPES for the concession of a PDSE scholarship to L.S. Müller.

## REFERENCES

- [1] Silva, L.F.M.; Ferreira, K.S. Segurança alimentar de suplementos alimentares comercializados no Brasil. *Ver. Bras. Med. Esporte*, 2014, 20, 374-378.
- [2] Knae, T.S. A case of severe exercise-induced rhabdomyolysis associated with a weight-loss dietary supplement. *Mil. Med.*, 2007, 172, 656-658.
- [3] Karth, A.; Holoshitz, N.; Kavinsky, C.J.; Throshan, R.; McBride, B.F. A case report of atrial fibrillation potentially induced by hydroxybut: a multicomponent dietary weight loss supplement devoid of sympathomimetic amines. *J. Pharm. Pract.*, 2010, 23, 245-249.
- [4] Akinyemi, E.; Bercovici, S.; Niranjana, S.; Paul, N.; Hemavathy, B.; Thyrotic hypokalemic periodic paralysis due to dietary weight-loss supplement. *Am. J. Ther.*, 2011, 18, 81-83.
- [5] Pendleton, M.; Brown, S.; Thomas, C.M.; Odle, B. Potential toxicity of caffeine when used as a dietary supplement for weight loss. *J. Diet. Supp.*, 2013, 10, 1-5.
- [6] Geyser, H.; Parr, M.K.; Koehler, K.; Mareck, U.; Schänzer, W.; Thevis, M. Nutritional supplements cross-contaminated and faked with doping substances. *J. Mass. Spectrom.*, 2008, 43, 892-902.
- [7] Neves, D.B.J.; Caldas, E.D. Dietary supplements: international legal framework and adulteration profiles, and characteristics of products on the Brazilian clandestine market. *Regul. Toxicol. Pharm.*, 2015, 73, 93-104.
- [8] Carvalho, L.M.; Martini, M.; Moreira, A.P.L.; Lima, A.P.S.; Correia, D.; Falcão, T.; Garcia, S.C.; Baires, A.V.; Nascimento, P.C.; Bohrer, D. Presence of synthetic pharmaceuticals as adulterants in slimming phytoterapeutic formulations and their analytical determination. *Forensic Sci. Int.*, 2011, 204, 6-12.
- [9] Casella, I.G.; Colonna, C.; Contursi, M. Electroanalytical Determination of Some Phenolic Acids by High-performance Liquid Chromatography at Gold Electrodes. *Electroanal.*, 2007, 19, 1503-1508.
- [10] Carvalho, L.M.; Viana, C.; Moreira, A.P.L.; Nascimento, P.C.; Bohrer, D.; Motta, M.J.; Silveira, G.D. Pulsed amperometric detection (PAD) of diuretic drugs in herbal formulations using a

- gold electrode following ion-pair chromatographic separation. *J. Solid State Electr.*, 2013, 17, 1601-1608.
- [11] Zheng, M.; Wu, Y.; Lu, L.; Ding, K.; Tang, F.; Lin, Z.; Wu, X. Simultaneous analysis of acetaminophen, p-aminophenol and aspirin metabolites by hydrophilic interaction and strong anion exchange capillary liquid chromatography coupled to amperometric detection. *J. Sep. Sci.*, 2011, 34, 2072-2078.
- [12] Kozan, J.V.; Silva, R.P.; Serrano, S.H.; Lima, A.W.; Angnes, L. Amperometric detection of benzoyl peroxide in pharmaceutical preparations using carbon paste electrodes with peroxidases naturally immobilized on coconut fibers. *Biosens Bioelectron.*, 2010, 25, 1143-1148.
- [13] Kazemifard, A.G.; Moore, D. E. Evaluation of amperometric detection for the liquid-chromatographic determination of tetracycline antibiotics and their common contaminants in pharmaceutical formulations. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 1997, 16, 689-696.
- [14] Fikalek, Z.; Backzynski, E.; Piwonka, A.; Warowna-Grzeskiewicz, M. Determination of local anesthetics and their impurities in pharmaceutical preparations using HPLC method with amperometric detection. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2005, 37, 913-918.
- [15] Booya, G.; Gismera, M.J.; Sevilla, M.T.; Procopio, J.R. Selective method based on electrochemical detection coupled HPLC for determination of the allergens atranol and chlorostranol. *Electroanalysis*, 2017, 29, 116-122.
- [16] Bottelli, S.; Grillo, G.; Barindelli, E.; Nencioni, A.; Di Maria, A.; Fossati, T. Validated high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection method for the determination of residual keratan sulfate and other glucosamine impurities in sodium chondroitin sulfate. *J. Chromatogr. A*, 2017, 1505, 43-49.
- [17] Yan, W.; Wang, N.; Zhang, P.; Zhang, J.; Wu, S.; Zhu, Y. Analysis of sucrose acetates in a crude 6-O-acetyl sucrose product by on-line hydrolysis-high performance liquid chromatography with pulsed amperometric detection. *J. Chromatogr. A*, 2016, 1449, 71-77.
- [18] Santos, J.R.; Rangel, A.O.S.S. Development of a chromatographic low pressure flow injection system using amperometric detection: Application to the analysis of niacin in coffee. *Food Chem.*, 2015, 187, 152-158.
- [19] Pöhl, T.; Bötcher, C.; Schulz, H.; Stürtz, M.; Widder, S.; Carle, R.; Schweiggert, R.M. Comparison of high performance anion exchange chromatography with pulsed amperometric detection (HPAEC-PAD) and ultra-high performance liquid chromatography with evaporative light scattering (UHPLC-ELSD) for the analyses of fructooligosaccharides in onion (*Allium cepa* L.). *J. Food. Comp. Anal.*, 2017, 63, 148-156.
- [20] Sakai, Y.; Kotani, A.; Umemura, T.; Mori, Y.; Kusa, F.; Yamamoto, K.; Hakamata, H. Electrochemical determination of synephrine by hydrophilic interaction liquid chromatography using a zwitterionic monolith column. *Electroanalysis*, 2016, 28, 1947-1950.
- [21] Kusu, F.; Matsumoto, K.; Arai, K.; Takamura, K. Determination of synephrine enantiomers in food and conjugated synephrine in urine by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *Anal. Biochem.*, 1996, 235, 191-194.
- [22] Lee, J-W.; Yeo, I-H. Integrated pulsed amperometry for the analysis of organic compounds. *Microchem. J.*, 2001, 70, 173-177.
- [23] LaCourse, W.R.; Dasenbrock, C.O. Pulsed electrochemical detection of sulfur-containing antibiotics following high performance liquid chromatography. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 1999, 19, 239-252.
- [24] LaCourse, W.R.; Owens, G.S. Pulsed electrochemical detection of thiocarbonyl compounds following microchromatographic separations. *Anal. Chim. Acta*, 1995, 307, 301-319.
- [25] Malode, S.J.; Abbar, J.C.; Shetti, N.P.; Nandibewoor, S.T. Voltammetric oxidation and determination of loop diuretic furosemide at a multi-walled carbon nanotubes paste electrode. *Electrochim. Acta*, 2012, 60, 95-101.
- [26] Wang, Q.; Ding, F.; Li, H.; He, P.; Fang, Y. Determination of hydrochlorothiazide and rutin in Chinese herb medicines and human urine by capillary zone electrophoresis with amperometric detection. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2003, 30, 1507-1514.
- [27] Baranowska, I.; Markowski, P.; Gerle, A.; Baranowski, J. Determination of selected drugs in human urine by differential pulse voltammetry technique. *Bioelectrochem.*, 2008, 73, 5-10.
- [28] Guzman, A.; Agüa, L.; Pedrero, M.; Yañez-Sedeño, P.; Pingarrón, J.M. Flow injection and HPLC determination of furosemide using pulsed amperometric detection at microelectrodes. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2003, 33, 923-933.
- [29] Kazak, O.A. Electrochemical study of hydrochlorothiazide and its determination in urine and tablets. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2004, 34, 433-440.
- [30] Trojanowicz, M. Recent developments in electrochemical flow detections-A review Part II. Liquid chromatography. *Anal. Chim. Acta*, 2011, 688, 8-35.
- [31] Svorec, L. Determination of caffeine: a comprehensive review on electrochemical methods. *Int. J. Electrochem.*, 2013, 8, 5755-5773.
- [32] AOAC - Guidelines for dietary supplements and botanicals. Appendix K. Rockville (MD): AOAC Official methods (2013).
- [33] Levesque, R.J.R. Caffeine intoxication. In: *Encyclopedia of Adolescence*. Berlin: Springer, 2011, pp. 365.
- [34] Benowitz, N.L. Clinical pharmacology of caffeine. *Annu. Rev. Med.*, 1990, 41, 277-288.
- [35] Zulli, A.; Smith, R.M.; Kubatka, P.; Novak, J.; Uehara, Y.; Loftus H.; Qaradakh, T.; Pohanka, M.; Kobylak, N.; Zagatina, A.; Klimas, J.; Hayes, A.; La Rocca, G.; Soucek, M.; Kruzliak, P. Caffeine and cardiovascular diseases: critical review of current research. *Eur. J. Nutr.*, 2016, 55, 1331-1343.
- [36] Pallares, J.G.; Fernandez-Elias, V.E.; Ortega, J.F.; Muñoz, G.; Muñoz-Guerra, J.; Mora-Rodríguez, R. Neuromuscular responses to incremental caffeine doses: performance and side effects. *Med. Sci. Sport Exerc.*, 2013, 45, 2184-2192.
- [37] Chondarkis, M.; Kellidou, S.; Pappas, G.; Sardeli, C.; Argyrion, A.; Kouvelas, D. Possible interactions with drugs of herbals used for weight loss enhancement. *Rev. Clin. Pharm. Pharmacokin.*, 2010, 24, 128-129.
- [38] Gurley, B.J.; Steelman, S.C.; Thomas, S.L. Multi-ingredient, caffeine-containing dietary supplements: history, safety and efficacy. *Clin. Ther.*, 2015, 37, 275-301.
- [39] Wang, Q.; Ding, F.; Li, H.; He, P.; Fang, Y. Determination of hydrochlorothiazide and rutin in Chinese herb medicines and human urine by capillary zone electrophoresis with amperometric detection. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2003, 30, 1507-1514.
- [40] Lu, Y.L.; Zhou, N.L.; Liao, S.Y.; Su, N.; He, D.X.; Tian, Q.Q.; Chen, B.; Yao, S.Z. Detection of adulteration of anti-hypertension dietary supplements and traditional Chinese medicines with synthetic drugs using LC/MS. *Food Addit. Contam. A*, 2010, 27, 893-902.
- [41] Stephensen, T.A.; Sarlay, Jr. R. Ventricular fibrillation associated with use of synephrine containing dietary supplement. *Mil. Med.*, 2009, 174, 1313-1319.
- [42] Chung, H.; Kwon, S.W.; Kim, T.H.; Yoon, J.H.; Ma, D.W.; Park, Y.M.; Hong, B.K. Synephrine-containing dietary supplement precipitating apical ballooning syndrome in a young female. *The Korean J. Int. Med.*, 2013, 28, 356-360.
- [43] Cohen, P.A. How America's flawed supplement law creates the mirage of weight loss cures. *Harvard Public Health Rev* 2014;2:1. <http://harvardpublichealthreview.org/how-americas-flawed-supplement-law-creates-the-mirage-of-weight-loss-cures/>. (Accessed July 14, 2017).
- [44] Viana, C.; Zemolin, G.M.; Müller, L.S.; Dal Molin, T.R.; Seiffert, H.; Carvalho, L.M. Liquid chromatographic determination of caffeine and adrenergic stimulants in food supplements sold in Brazilian e-commerce for weight loss and physical fitness. *Food Addit. Contam. A*, 2016, 33, 1-9.

**Table 1 – Figures of merit of the IPC-PAD method for the determination of diuretics and stimulants in dietary supplements**

Analyte	Linear Range (mg L <sup>-1</sup> )	LOD (mg L <sup>-1</sup> )	LOQ (mg L <sup>-1</sup> )	Precision RSD <sup>a</sup> (%)		Accuracy (%)		
				Intra- Day	Inter- Day	Initial Point	Medium point	Final point
Hydrochlorothiazide	1 – 30	0.17	0.53	5.23	5.42	108.0	88.4	89.4
Caffeine	5 – 100	0.19	0.65	1.66	5.35	112.7	85.4	89.7
Chlorthalidone	1 – 50	0.28	0.87	5.00	5.12	92.3	89.7	89.2
Furosemide	0.5 – 25	0.11	0.39	3.33	5.78	83.0	85.0	99.0
Synephrine	0.5 – 25	0.10	0.34	2.23	3.18	120.0	119.7	83.1

<sup>a</sup> Relative Standard Deviation

**Table 2 – Analysis of formulations and information on dosage form and labelled amount per day of stimulants.**

Sample	Formulation description	Dosage form	Serving per day	Labeled per day (mg)		Drug found and calculated ingested doses (mg day <sup>-1</sup> )	
1	"Guarana", "mate", mix of vitamins and minerals (calcium, choline, chromium, niacin, pantothenic acid, vitamin B2 and vitamin B1)	Capsule	4	Caffeine	225	Caffeine	901.8 <sup>a</sup> 1131.9 <sup>b</sup>
						Hydrochlorothiazide	50.0 <sup>a</sup> 30.3 <sup>b</sup>
2	"Guarana" powder, silicon dioxide	Capsule	2	Caffeine	280	Caffeine	278.9 <sup>a</sup> 265.9 <sup>b</sup>
3	Acerola extract, green coffee extract, green tea extract, goji berry extract, vitamin C, vitamin A, vitamin E, chromium picolinate, selenium chelate, zinc chelate	Capsule	2	ND	ND	Caffeine	53.6
4	Anhydrous caffeine, orange fiber, psyllium, chitosan, vitamins and minerals	Capsule	5	ND	ND	Hydrochlorothiazide	19.0
						Caffeine	140.6
5	"Guarana", hill, psyllium, vitamins	Capsule	4	ND	ND	Caffeine	228.3 <sup>a</sup> 168.4 <sup>b</sup>
6	Maltodextrin, choline, magnesium, vitamins, chromium, folic acid, green tea extract, "guarana" extract, bitter orange extract, cinnamon extract	Capsule	4	ND	ND	Caffeine	n.d. <sup>a</sup> 366.0 <sup>b</sup>
						Hydrochlorothiazide	n.d. <sup>a</sup> 85.5 <sup>b</sup>
7	"Guarana" powder with a high concentration of caffeine, citrus, green coffee, chromium picolinate, vitamin and mineral supplement	Capsule	4	Caffeine	280	Caffeine	330.4
						Synephrine	50.1
8	L-valine, L-leucine, L-isoleucine, vitamin B6, arginine	Capsule	4	ND	ND	Hydrochlorothiazide	39.6
						Caffeine	167.9
9	Chromium, choline, calcium, silicon, zinc,	Capsule	3	ND	ND	Hydrochlorothiazide	33.5

	magnesium, green coffee, vitamin C, vitamin B3, folic acid					Caffeine	64.7
10	Thermogenic, caffeine, dicalcium phosphate, silicon dioxide, green tea, leucine, tyrosine, pine bark extract, Garcinia	Tablet	4	Caffeine	ND	Caffeine	132.2
11	Caffeine anhydrous	Capsule	2	Caffeine	420	Caffeine	370.9
12	Caffeine anhydrous	Capsule	2	Caffeine	300	Caffeine	339.1 <sup>a</sup> 258.6 <sup>b</sup>
13	Caffeine anhydrous	Capsule	2	Caffeine	420	Caffeine	256.9
14	Citrus aurantium, green tea choline, chromium, magnesium, vitamin B3 and B6, vitamin C and folic acid	Capsule	4	ND	ND	Hydrochlorothiazide	170.5
						Synephrine	34.5
15	Green tea, bitter orange, "guarana", vitamins and minerals	Sachets	4 g	ND	ND	Hydrochlorothiazide	94.2
						Caffeine	551.4
						Synephrine	129.7
16	Branched chain amino acids	Bulk	13.37 g	ND	ND	Hydrochlorothiazide	71.7
						Caffeine	289.6
17	Creatine, arginine, guarana extract with high caffeine content	Capsule	10	Caffeine	220	Caffeine	418.2
18	Caffeine anhydrous	Capsule	1	Caffeine	210	Caffeine	168.7 <sup>a</sup> 84.6 <sup>b</sup>
19	Dextrose, maltodextrin, creatine, "guarana", calcium chelate arginine, ornithine chelate calcium, taurine	Bulk	15 g	ND	ND	Hydrochlorothiazide	186.9
						Caffeine	561
20	Caffeine anhydrous	Capsule	2	Caffeine	420	Caffeine	82.3 <sup>a</sup> 245.3 <sup>b</sup>
21	Carnitine	Capsule	4	ND	ND	Chlorthalidone	n.d. <sup>a</sup> 3.4 <sup>b</sup>
22	B complex, biotin, choline, chromium and vitamin C	Capsule	4	ND	ND	Caffeine	424.8 <sup>a</sup> 446.0 <sup>b</sup>
23	Taurine, caffeine, chromium picolinate, "guarana", bitter orange, green tea,	Bulk	5 g	Caffeine	ND	Caffeine	381.7 <sup>a</sup> 230 <sup>b</sup>

	green coffee						
24	"Guarana", choline citrate, chromium, nicotinamide, calcium pantothenate, thiamine	Capsule	4	Caffeine	210	Caffeine	123
25	Caffeine, N-acetyl-L-tyrosine, niacin, vitamin B6 and B12, Camellia sinensis	Capsule	2	Caffeine	320	Hydrochlorothiazide	34.4
						Caffeine	318.4
26	Caffeine	Tablet	1	Caffeine	220	Caffeine	196.3
27	Caffeine, green coffee extract, Coleus forskohlii extract, cocoa extract, yohimbe extract	Capsule	4	Caffeine	540	Caffeine	396.5
28	Chitosan, orange, "guarana", psyllium, vitamin C, chrome	Capsule	5	Caffeine	50	Caffeine	103.7
29	Creatine, beta-alanine	Bulk	5.6 g	ND	ND	Caffeine	640.3
30	Vitamin C and chromium picolinate, natural flavors (green tea, "guarana", bitter orange, ginseng and ginger)	Capsule	2	ND	ND	Caffeine	355.8
31	Whey protein, bovine liver, maltodextrin, calcium carbonate, linseed oil, choline citrate, palm oil, magnesium oxide, folic acid, vitamin C, B3 and E, zinc oxide, manganese sulfate, biotin, chromium picolinate	Tablet	11	ND	ND	Hydrochlorothiazide	96.1 <sup>a</sup> 101.3 <sup>b</sup>
						Caffeine	231.3 <sup>a</sup> n.d. <sup>b</sup>
32	Caffeine, calcium carbonate, maltodextrin, magnesium stearate, silicon dioxide	Tablet	1	Caffeine	320	Caffeine	51.9 <sup>a</sup> 6.2 <sup>b</sup>
						Synephrine	n.d. <sup>a</sup> 3.0 <sup>b</sup>

ND = not declared; n.d. = not detected; a = batch 1; b = batch 2

Figure 1

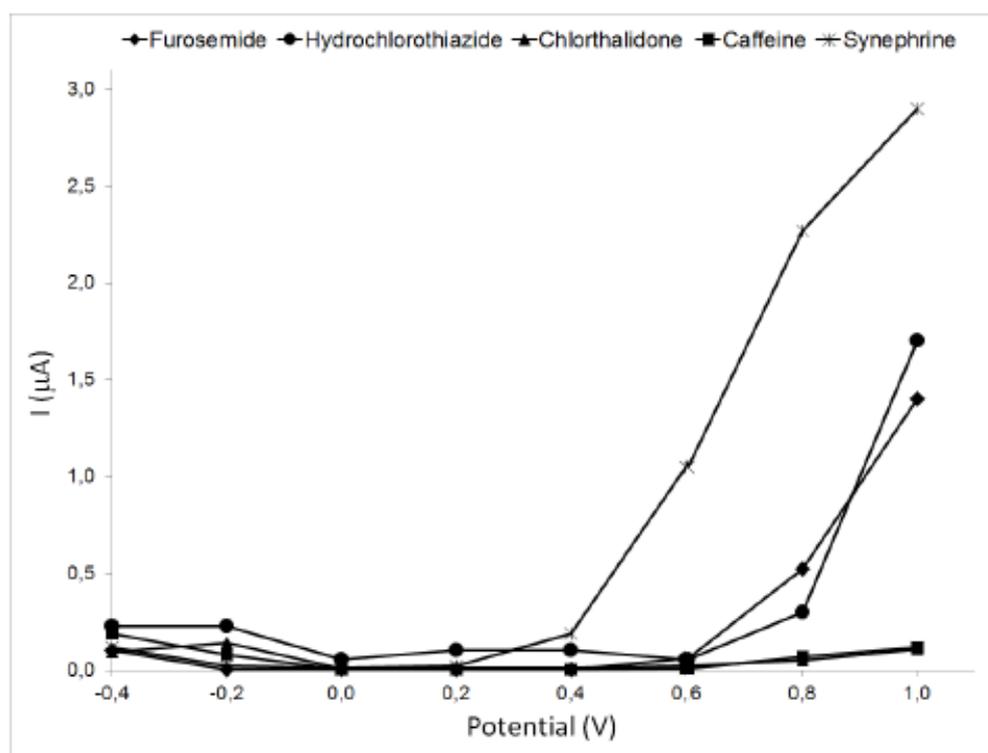


Figure 2

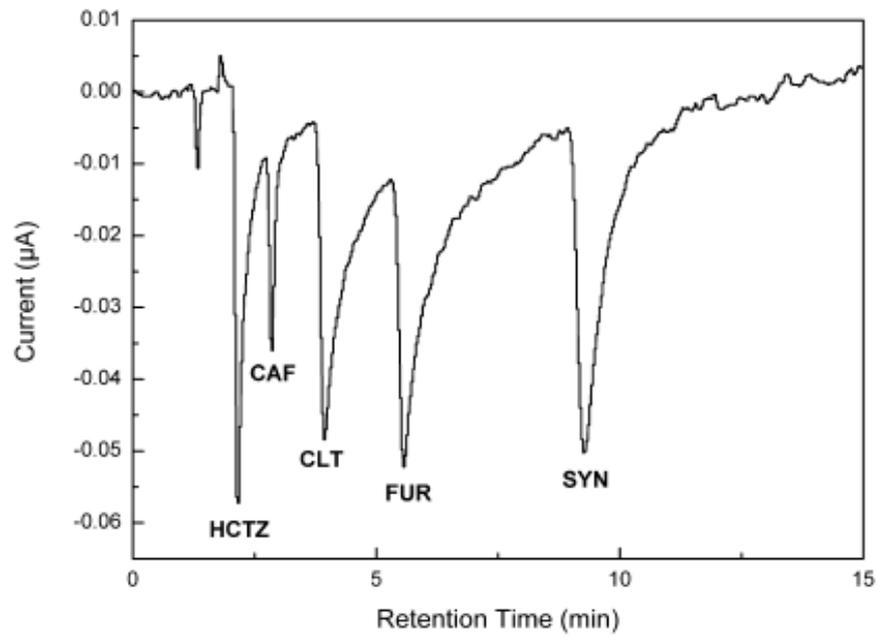
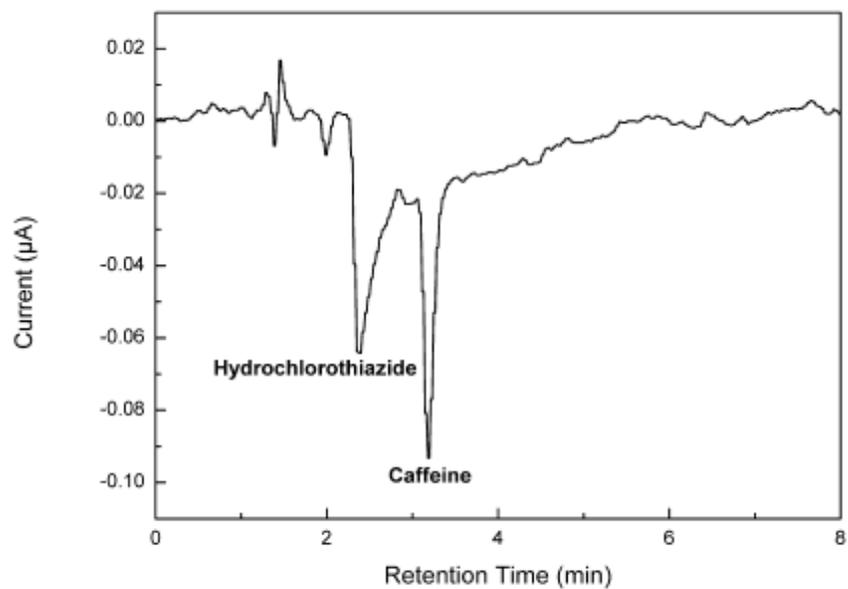


Figure 3



**APÊNDICE B – ARTIGO 2**

**ANALYSIS OF PHARMACOLOGIC ADULTERATION IN  
DIETARY SUPPLEMENTS BY CAPILLARY ZONE  
ELECTROPHORESIS USING SIMULTANEOUS  
CONTACTLESS CONDUCTIVITY AND UV DETECTION**

Ref.: Ms. No. CHRO-D-17-00652R2

Analysis of pharmacologic adulteration in dietary supplements by capillary zone electrophoresis using simultaneous contactless conductivity and UV detection

Chromatographia

Dear Prof. Dr. Carvalho,

I am pleased to tell you that your work has now been accepted for publication in Chromatographia.

Your manuscript is being type-set and we will be able to send you proof pages, by e-mail attachment as PDF- or HTML- file, for correction within the next few weeks. Dispatch of the proofs by e-mail will help to expedite the process. The text should be carefully checked if the editing has not changed the original meaning.

Thank you for submitting your work to this journal.

With kind regards,

Petra Russkamp

Managing Editor Chromatographia



## Analysis of Pharmacologic Adulteration in Dietary Supplements by Capillary Zone Electrophoresis Using Simultaneous Contactless Conductivity and UV Detection

Larissa Sabo Müller<sup>1</sup> · Diana Tomazi Muratt<sup>2</sup> · Thaís Ramos Dal Molin<sup>1</sup> · Carolina Gonzalez Urquhart<sup>1</sup> · Carine Viana<sup>1</sup> · Leandro Machado de Carvalho<sup>1,2</sup>

Received: 28 October 2017 / Revised: 19 February 2018 / Accepted: 21 February 2018  
© Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2018

### Abstract

The consumption of dietary supplements is increasing every year all over the world. In addition, the consumption has been accompanied by the increased frequency of adulteration of the products with synthetic pharmaceuticals. Analytical methods that allow testing the presence of synthetic drugs in dietary supplements are needed to detect such fraudulent practices. This paper describes the study of furosemide, hydrochlorothiazide, chlorthalidone and amiloride (diuretics), fluoxetine and paroxetine (antidepressants), and phenolphthalein (laxative) and amfepramone (anorexic) in dietary supplements marketed in Brazil for weight loss and physical fitness claims. A total of 113 products were acquired from websites and physical stores. The analytical method applied in this work involved the separation of the compounds by capillary zone electrophoresis in a working electrolyte consisting of 30% (v/v) methanol in a 20-mmol L<sup>-1</sup> phosphate buffer (pH 9.2) and capacitively coupled contactless conductivity detection and UV detection simultaneously. The method was validated in accordance with the appropriate guideline of the Association of Analytical Communities (AOAC) and was successfully applied to the analysis of the samples of dietary supplements. Hydrochlorothiazide was present in 14 of the studied samples. One sample presented furosemide beyond hydrochlorothiazide as diuretics.

**Keywords** Dietary supplements · Adulterants · Capillary electrophoresis · Conductivity detection · UV detection

### Introduction

Dietary supplements have been gaining increasing prominence in e-commerce worldwide. Although they can present serious health risks, a high number of supplements have been selling freely and indiscriminately through the Internet, drugstores, supermarkets, and specialty stores [1, 2]. However, there are several reports linking these products to adulteration with prohibited substances, controlled drugs, and other hazardous chemicals [3, 4]. The first report of dietary supplement adulteration occurred in the USA in 2002, and from there, several countries have reported increasing

numbers of this practice [2, 5, 6]. Most marketing appeals involve promises of weight loss and perfect body building in a short-time period. In general, the drugs used as adulterants include diverse pharmaceutical classes, such as anorexics, anxiolytics, antidepressants, diuretics, and laxatives [3].

Even though each country has its own rules regarding the registration of these products before they are marketed, control is still difficult. In Brazil, for example, there is no category officially named “dietary supplement”. In this way, the products fall under other categories, which do not always reflect the actual contents of the packaging [2]. Thus, several analytical approaches have been developed for pharmacologic adulterant determination in dietary supplements. A high-performance liquid chromatography (HPLC) method was developed to detect diuretics in dietary supplements [7]. The same work also describes a liquid chromatography tandem-mass spectrometry (LC-MS/MS) method for the same compounds. In addition, LC/MS-MS methods were also used to investigate narcotic adulterants [8], non-opioid analgesics [9],

✉ Leandro Machado de Carvalho  
lemacvalho@gmail.com

<sup>1</sup> Graduate Program in Pharmaceutical Sciences, Federal University of Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, Brazil

<sup>2</sup> Department of Chemistry, Federal University of Santa Maria (UFSM), PO Box 5051, Santa Maria, RS 97105-970, Brazil

54 phosphodiesterase type 5 inhibitors [10], and weight loss  
55 compounds [11] in dietary supplements. Furthermore, the  
56 use of gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS)  
57 has already been reported [12, 13]. Ultra-high-perfor-  
58 mance liquid chromatography and quadrupole Orbitrap  
59 high-resolution mass spectrometry (UHPLC-Q-Orbitrap  
60 HR MS) were used to analyze the presence of antidiabetic  
61 drugs [14], sedative hypnotics [15], and phosphodiester-  
62 ase-5 inhibitors [16]. Another study compared the advan-  
63 tages between HPLC and high-performance thin-layer  
64 chromatography (HPTLC) by analyzing sibutramine [17].

65 Capillary electrophoresis (CE) can also be used for the  
66 quantitative analysis of drugs in dietary supplements [18],  
67 offering some advantages over other techniques such as high-  
68 resolution power, short analysis time, and low consumption  
69 of chemicals [19–21]. The CE system can be coupled to  
70 various types of detectors such as diode arrays (DAD), a UV  
71 absorption (UV) detector, and a capacitively coupled con-  
72 tactless conductivity detector (C<sup>4</sup>D) [3, 19, 20] in the screen-  
73 ing for adulterants in phytochemicals and dietary supple-  
74 ments. C<sup>4</sup>D is preferable when the compounds are molecules  
75 with no or weak chromophores and their detection through  
76 optical systems might not be possible [22]. Alternatively, if  
77 the compound presents chromophore groups and charges at  
78 certain pH values, the simultaneous use of conductivity and  
79 spectrophotometric detectors can improve CE detection once  
80 UV detection provides information about changes in the UV  
81 absorption on the migration of established zones [23].

82 Thus, considering the increasing demand for dietary supple-  
83 ments and the need for quality control of these products,  
84 we present a novel method based on separation by CZE  
85 using an in-line C<sup>4</sup>D and UV detector for the simultane-  
86 ous evaluation of diuretics, laxatives, antidepressants, and  
87 anorexics that can be present as adulterants in these com-  
88 pounds. In this way, the previous publications have previ-  
89 ously reported the use of two detectors simultaneously.  
90 The C<sup>4</sup>D and UV detector were coupled to a CE system  
91 to determine  $\gamma$ -hydroxybutyric acid in saliva samples [24].  
92 Moreover, a dual contactless conductivity/UV spectromet-  
93 ric detector has been used for bioanalysis in urine, thereby  
94 enabling the detection of small organic and inorganic ions  
95 and aromatic structures [25]. A two-detector system has  
96 also been used to evaluate noncovalent interactions between  
97 dextran sulfate and inorganic/organic cations, where organic  
98 molecules could be detected by both detectors [26]. Further-  
99 more, the C<sup>4</sup>D and UV detector systems were coupled to an  
100 isotachopheresis system, which allowed the determination  
101 of dyes in samples of leather, red wine, cherry juice, and  
102 an apple drink [27] and are still several more reports in the  
103 literature [23, 28]. Basically, the choice to use two detec-  
104 tors simultaneously in all cases comes down to the fact that  
105 both chromophoric and non-chromophoric molecules can  
106 be detected, and if molecules are detected on both detectors,

107 then a comparison between the results increases the reliabil-  
108 ity of the method. There are still no reports in the literature  
109 regarding the use of two detectors in the same CE technique  
110 for the study of drug adulteration in dietary supplements.  
111 Thus, this work describes the CZE separation of the most  
112 common drugs normally added illegally to dietary supple-  
113 ments for diuretic, laxative, antidepressant, and anorexic  
114 effects. The method was optimized for the separation of  
115 drugs using a fully automated homemade CE system and  
116 simultaneous detection in two in-line coupled C<sup>4</sup>D/UV sys-  
117 tems. The system was applied to the investigation of the  
118 pharmacologic adulteration of 113 formulations of dietary  
119 supplements marketed for weight loss, fat burning, appetite  
120 reduction, or metabolism acceleration (thermogenics).

## 121 Materials and Methods

### 122 Reagents and Chemicals

123 All chemicals used in this investigation were of analytical-  
124 grade purity. The water was purified by a Milli-Q Ultrapure  
125 water system (Millipore Synergy<sup>®</sup> UV, Bedford, USA).  
126 Standards of hydrochlorothiazide, chlorthalidone, amfepra-  
127 mone, amiloride, furosemide, fluoxetine, and paroxetine  
128 were of pharmaceutical grade and were obtained with cer-  
129 tificates of analysis. Phenolphthalein and phosphoric acid  
130 (85%) were obtained from Merck<sup>®</sup> (Darmstadt, Germany).  
131 Sodium hydroxide was obtained from Vetec (Rio de Janeiro,  
132 Brazil). Methanol grade HPLC Tedia<sup>®</sup> (Fairfield, CT, USA)  
133 was also used.

134 Stock solutions (1 and 5 g L<sup>-1</sup>) of diuretics (furose-  
135 mide, hydrochlorothiazide, chlorthalidone, and amiloride),  
136 laxatives (phenolphthalein), antidepressants (fluoxetine and  
137 paroxetine), and anorexic (amfepramone) were prepared  
138 in methanol. Mixtures of the lower concentration standard  
139 solutions were prepared via the dilution of the stock solu-  
140 tions with ultrapure water (Milli-Q).

141 The working electrolyte solutions were prepared daily  
142 and consisted of 30% (v/v) methanol in a 20-mmol L<sup>-1</sup>  
143 phosphate buffer. The pH of the working electrolyte solu-  
144 tion was adjusted to 9.2 with 1.0-mol L<sup>-1</sup> sodium hydroxide  
145 solutions. The working electrolyte solutions were filtered  
146 through a 0.45- $\mu$ m membrane filter (Sartorius, Gottingen,  
147 Germany) prior to use.

### 148 Apparatus

149 The capillary electrophoretic measurements were performed  
150 in a homemade system equipped with a capacitively cou-  
151 pled contactless conductivity detector (C<sup>4</sup>D) and a UV  
152 detection system, as described in Fig. 1. The homemade  
153 CE system was based on a previous instrumental layout

154 built for the C<sup>4</sup>D method in a fully automated CE system  
 155 [29, 30]. Briefly, the system consisted basically of a high-  
 156 voltage-power supply 0–30 kV (Bertan ARM-30, Spellman,  
 157 New York, USA), a function generator (BK Precision), a  
 158 homemade system for the temperature control, a PCI-1711  
 159 interface (Advantech, DA&C Driver version 2.3), a home-  
 160 made C<sup>4</sup>D system, and an interfaced microcomputer. The  
 161 UV detection system was coupled sequentially to the C<sup>4</sup>D  
 162 system using a UV detection cell supplied by Ocean Optics  
 163 (Dunedin, USA). In this cell, the capillary was positioned  
 164 along the UV light path, after burning the external capillary  
 165 wall in a 1-cm portion for eliminating its polyimide cover-  
 166 ing. The optical fiber cables were connected to the detection  
 167 cell to allow the UV radiation from the source to focus on  
 168 the capillary detection window. Regarding the automation  
 169 of the CE system, the interface PCI-1711 has the function  
 170 of acquiring the signal from the detector (in volts) and oper-  
 171 ating of all the components of the system through the PC  
 172 Software (Fig. 1). All experiments were conducted at 25 °C.

173 The separations were performed with detection at the  
 174 cathode side using an uncoated fused-silica capillary tube  
 175 with dimensions of 68 cm × 75 μm i.d. × 360 μm o.d. (Pol-  
 176 ymicro, Phoenix/AZ, USA) with a 15 kV applied voltage and  
 177 a sinusoidal wave generator operating at 400-kHz frequency,  
 178 as described elsewhere [19]. UV detection was performed  
 179 at 260 nm using an Ocean Optics USB2000 Spectrometer  
 180 (Ocean Optics, Dunedin, USA) with both deuterium and  
 181 tungsten–halogen light sources (DT-Mini-2) controlled via  
 182 SpectraSuite software (Ocean Optics, Dunedin, USA).

## 183 Sample Preparation

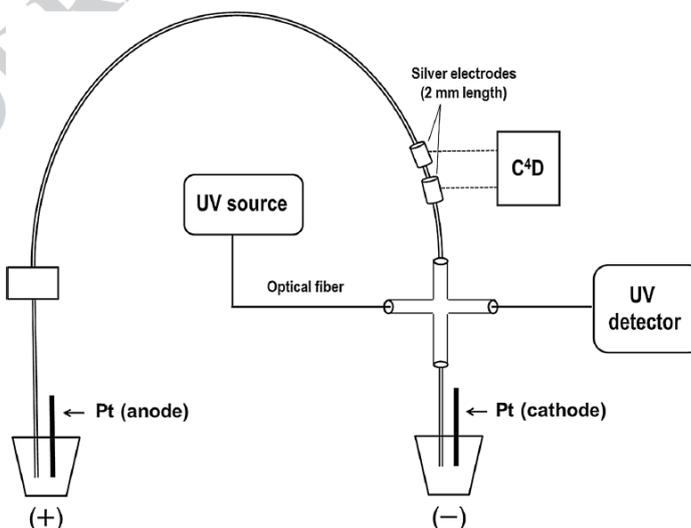
184 The dietary supplements were purchased online at Brazil-  
 185 ian websites chosen randomly and in physical stores in  
 186 Brazil. Considering the scope of this work, the search was  
 187 restricted to products that advertise and market dietary  
 188 supplements with claims of weight loss, fat burning, appe-  
 189 tite reduction, or metabolism acceleration (thermogenics).  
 190 Based on this search, 113 products were acquired, 81 of  
 191 them had different compositions, and 32 products were  
 192 repeated but originated from different batches. The sam-  
 193 ples were supplied as powder in capsules, tablets, or bulk  
 194 forms.

195 For the encapsulated and tablet samples, a pool of ten  
 196 items was prepared to obtain a homogeneous material for  
 197 analysis. The average weight of each sample (or 0.5 for sam-  
 198 ples in bulk) was determined. The sample was then dissolved  
 199 in 25 mL of methanol and sonicated for 30 min. Next, the  
 200 sample was filtered through cotton and a regenerated cel-  
 201 lulose acetate membrane (0.45 μm). Finally, the extract was  
 202 diluted in ultrapure water before injection into the electro-  
 203 phoretic system.

## 204 Analytical Procedures

205 At the beginning of each day, the silica capillary was  
 206 rinsed with 0.1-mol L<sup>-1</sup> sodium hydroxide solution for  
 207 15 min and with water for 15 min before equilibrating  
 208 with the working electrolyte solution for 30 min. After

Fig. 1 Schematic representation of the detection system using simultaneous capacitively coupled contactless conductivity (C<sup>4</sup>D) and UV absorption in the homemade CE equipment



each electrophoretic separation, the capillary was rinsed for 5 min with the working electrolyte solution. For optimization of the CE method, the wavelength for UV detection and C<sup>4</sup>D operational parameters were optimized [19]. The combined C<sup>4</sup>D and UV detection method was validated according to the following operational characteristics: linearity, limit of quantification, limit of detection, precision, and accuracy. The linearity was evaluated using six-point calibration curves from data collected on three different days for each analyte. The limit of detection (LOD) and the limit of quantification (LOQ) were calculated from the equations:  $LOD = 3.3 \times Sa/b$ , and  $LOQ = 10 \times Sa/b$ , where  $Sa$  is the standard deviation of the intercept and  $b$  is the slope. The intra-day precision or repeatability of the procedures was evaluated by analyzing results for six samples spiked with a known concentration of standard on the same day and under the same experimental conditions. The accuracy was evaluated as the percentage recovery obtained from the analysis of the spiked samples. For this purpose, an exact amount of sample was weighted (close to the average weight of the capsules) and dissolved in 25 mL of methanol. In a subsequent step, this solution containing the sample was added of a known concentration of each respective drug in three concentration levels within the working analytical range (Table 1). All the solutions (sample and spiked samples) were sonicated for 30 min and filtered through cotton and a regenerated cellulose acetate membrane (0.45 μm). Finally, the extracts were diluted in ultrapure water before injection into the electrophoretic system. The identification and quantification of the active compounds in the samples were performed using the standard addition method ( $n = 3$ ) after obtaining the calibration curves for each sample.

## Results and Discussion

### Separation of Adulterant Drugs by Capillary Zone Electrophoresis Using an In-Line C<sup>4</sup>D and UV Absorption (CZE–C<sup>4</sup>D–UV) System

The separation of diuretics, laxatives, antidepressants, and anorexics has been optimized using a homemade CE system previously described [19]. In this work, the working electrolyte containing 20 mmol L<sup>-1</sup> phosphate buffer at pH 9.2 was used to optimize the separation of amiloride, amfepramone, chlorthalidone, phenolphthalein, hydrochlorothiazide, and furosemide. Thus, the C<sup>4</sup>D and the UV detector are in-line coupled and operated independently. In the first step, the CE separated ions are detected in the contactless conductivity cell using a homemade detector. In the second step, the absorbing ions are detected in a flow cell, where the UV light beam is focused through an optical fiber cable. Figure 1 shows the detection system using a commercial flow cell (Ocean Optics) and the homemade C<sup>4</sup>D cell. The separation was performed by coupling a flow cell to the CE–C<sup>4</sup>D system for UV detection. Beyond diuretics, laxatives, and anorexics, the antidepressants fluoxetine and paroxetine could be separated in the same CZE run. However, neither fluoxetine nor paroxetine possessed a measurable UV absorption at 260 nm and were, consequently, absent in the second electropherogram obtained in the proposed CZE–C<sup>4</sup>D–UV system. Figure 2 shows the influence of acetonitrile and methanol as solvent additives in the working electrolyte. As can be observed, the migration times increased significantly after the addition of 40% (v/v) solvent to the final composition of both electrolytes. Furosemide was highly influenced by the addition of methanol, possibly due to the more pronounced change in its ionic radius in

**Table 1** Figures of merit of the CZE–C<sup>4</sup>D–UV method for the determination of drugs in dietary supplements

Drugs	Linear range (mg L <sup>-1</sup> )		Working range (mg L <sup>-1</sup> )		<i>r</i>		LOD (mg L <sup>-1</sup> )		LOQ (mg L <sup>-1</sup> )		Inter-day precision (%)		Accuracy (%)	
	C <sup>4</sup> D	UV	C <sup>4</sup> D	UV	C <sup>4</sup> D	UV	C <sup>4</sup> D	UV	C <sup>4</sup> D	UV	C <sup>4</sup> D	UV	C <sup>4</sup> D	UV
Fluoxetine	10–500	–	10–100	–	0.9997	–	3.30	–	11.01	–	3.64	–	104.6	–
Paroxetine	10–500	–	10–100	–	0.9965	–	2.81	–	9.37	–	6.00	–	114.2	–
Amiloride	10–500	50–1000	10–100	100–500	0.9955	0.9959	1.54	12.28	5.14	40.55	1.63	4.23	98.60	83.00
Amfepramone	10–500	50–1000	10–100	100–500	0.9993	0.9955	3.29	12.83	10.96	42.37	3.26	5.03	116.80	96.00
Chlorthalidone	10–500	50–1000	10–100	100–500	0.9995	0.9980	2.32	8.55	7.72	28.24	2.50	4.35	101.80	108.00
Phenolphthalein	10–500	50–1000	10–100	100–500	0.9984	0.9964	2.48	11.56	8.42	38.16	2.81	5.49	93.60	89.33
Hydrochlorothiazide	10–500	50–1000	10–100	100–500	0.9987	0.9953	2.03	13.20	6.78	43.58	1.87	4.00	101.00	82.50
Furosemide	10–500	50–800	10–100	100–300	0.9994	0.9985	3.19	4.80	10.66	15.86	3.23	4.19	101.00	93.00

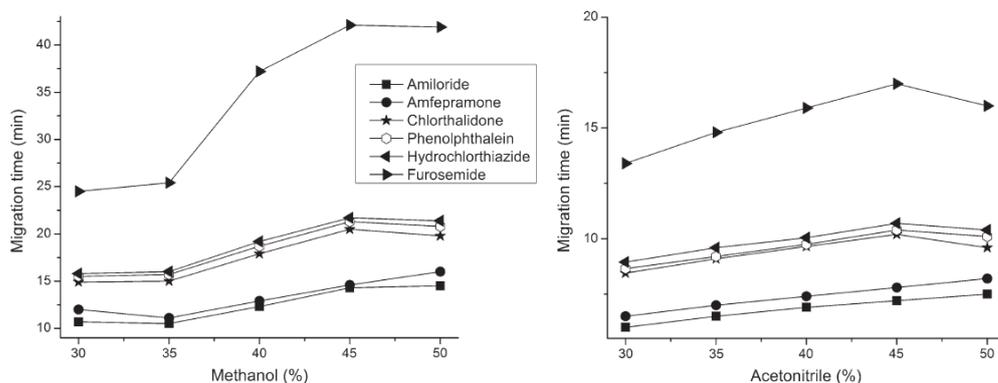


Fig. 2 Effect of methanol and acetonitrile as organic additives on the separation of amiloride, amfepramone, chlorthalidone, phenolphthalein, hydrochlorothiazide, and furosemide in a working electrolyte

containing  $\text{H}_3\text{PO}_4$  20  $\text{mmol L}^{-1}$  and  $\text{NaOH}$  40  $\text{mmol L}^{-1}$  (pH 9.2) and UV detection at 260 nm

275 its anionic form at pH 9.2. Furthermore, methanol caused a  
276 more pronounced increase in migration times due to its  
277 higher viscosity compared to acetonitrile. Since the peak  
278 resolution was not strongly changed with the addition of  
279 both solvents in the studied concentration range, 30% (v/v)  
280 methanol was chosen as the additive as a compromise of  
281 selectivity and analysis time. To select the optimal wave-  
282 length for UV detection, a scan was performed for each ana-  
283 lyte, which revealed a higher absorbance and an improved  
284 peak shape at 260 nm for most of the compounds. Figure 3  
285 shows the electropherograms obtained for the separation of

the studied drugs by simultaneous detection using  $\text{C}^4\text{D}$  and  
UV absorption at 260 nm.

286  
287  
288 Considering that the studied drugs have several groups  
289 that are hydrogen ion acceptors, fluoxetine, paroxetine, ami-  
290 loride, and amfepramone may still be in a protonated form  
291 at pH 9.2, which may explain the observed separation with  
292 detection at the cathode side of the CE system. However,  
293 chlorthalidone, phenolphthalein, hydrochlorothiazide, and  
294 furosemide are detected in their anionic forms, because  
295 they migrate after the electro-osmotic flow (EOF) peak,  
296 which is observed in the first detection step using  $\text{C}^4\text{D}$ . The

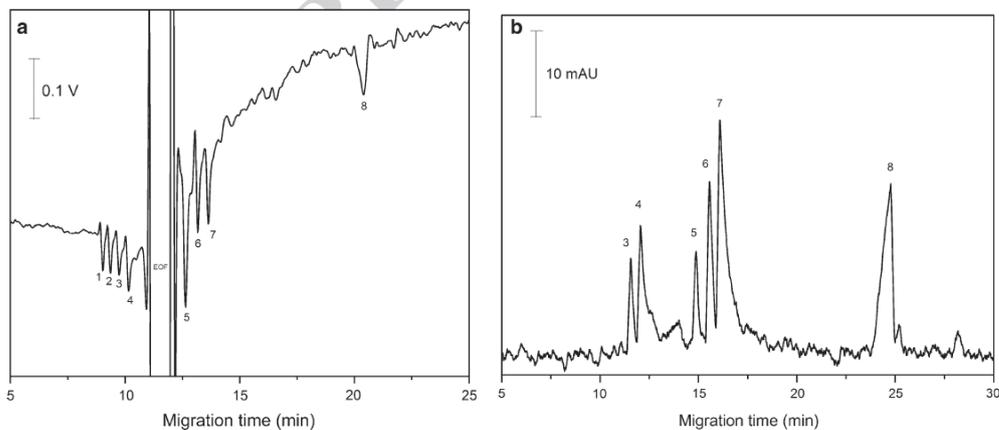


Fig. 3 Electropherograms of the separation of the studied adulterants (100  $\text{mg L}^{-1}$  each) using (a)  $\text{C}^4\text{D}$  at 400 kHz and (b) UV detection at 260 nm: (1) fluoxetine, (2) paroxetine, (3) amiloride, (4) amfepra-

mone, (5) chlorthalidone, (6) phenolphthalein, (7) hydrochlorothiazide, and (8) furosemide. Working electrolyte:  $\text{H}_3\text{PO}_4$  20  $\text{mmol L}^{-1}$ ,  $\text{NaOH}$  40  $\text{mmol L}^{-1}$ , and 30% methanol (v/v) at pH 9.2

297 identification of the broad electrophoretic band related to  
 298 the water plug permits the EOF marking in every run with  
 299 conductivity detection. Thus, C<sup>4</sup>D allows the identification  
 300 of the ionic forms of the studied drugs, since cationic drugs  
 301 migrate before the EOF. In opposite, all species migrating  
 302 after the EOF are in their anionic forms. These electropho-  
 303 retic characteristics cannot be observed in the UV detection  
 304 mode, since EOF is not marked in the electropherograms.  
 305 Furthermore, it is well known that the magnitude of the EOF  
 306 is higher above pH 8.0. Consequently, the EOF is directed  
 307 to the cathode, and both the cationic and anionic drugs can  
 308 also be carried into the capillary by the existent EOF towards  
 309 the cathode.

310 Although the peaks of phenolphthalein and hydrochloro-  
 311 thiiazide do not appear totally separated during UV detec-  
 312 tion, the method selectivity was not compromised, since the  
 313 appearance of both drugs as adulterants in a supplement is  
 314 unlikely. However, if this unlikely case occurs, the quanti-  
 315 fication can be performed by the C<sup>4</sup>D, using the UV detec-  
 316 tor only as a qualitative confirmatory method. A similar  
 317 case was described by Makrlikova et al. [25]. Finally, it is  
 318 important to highlight that another advantage in association  
 319 of two detection modes over the same CZE run lies on the  
 320 possibility of detecting charged species in a universal way.  
 321 It means that low-conducting species can be detected if they  
 322 present chromophore sites in their structures. From another  
 323 side, species having weak absorption in UV/Vis region can  
 324 be detected if they are ions or molecules that increase or  
 325 decrease the basal conductivity of the working electrolyte  
 326 in C<sup>4</sup>D (e.g., fluoxetine and paroxetine). In this work, all  
 327 the studied drugs are anionic and cationic species with con-  
 328 ductivities lower than the background electrolyte, so that a  
 329 decrease in the baseline is registered in the electrophero-  
 330 grams (Fig. 3a). Since the background electrolyte is a non-  
 331 absorbing mixture at 260 nm, all the detected drugs give rise  
 332 to positive electrophoretic peaks due to their chromophore  
 333 sites (C=O, C=N, O=S=O, and benzene ring). Considering  
 334 the separation of the antidepressants fluoxetine and paroxe-  
 335 tine, they can be detected only by C<sup>4</sup>D (Fig. 3a), probably  
 336 due to the absence of C=O, C=N, and O=S=O as chromo-  
 337 phore sites comparatively to the other drugs.

338 The method was validated based on the primary analy-  
 339 tical validation parameters: linear range, detection limit,  
 340 quantification limit, precision, and accuracy. The linearity  
 341 data were validated by the analysis of variance (ANOVA),  
 342 which demonstrated a linear relationship and no significant  
 343 deviation from linearity ( $P < 0.05$ ). The linearity of the  
 344 method was evaluated by constructing triplicate calibra-  
 345 tion curves using individual concentration levels for each  
 346 analyte. The precision was evaluated by triplicate injections  
 347 for each compound at the midpoint of its linear range. In  
 348 addition, the corresponding area for three consecutive days  
 349 (inter-day) and six replicates on the same day (intra-day)

350 were also evaluated. The result was expressed by the coeffi-  
 351 cient of variation (CV %). The accuracy was evaluated using  
 352 the standard addition technique. This approach involves the  
 353 addition of known amounts of the respective analyte to a  
 354 known amount of sample prior to its preparation step. After-  
 355 wards, a calibration curve is constructed over the sample and  
 356 the quantity added to the sample is calculated as a percent-  
 357 age value relative to the initial concentration. The results  
 358 obtained for the validation experiments are summarized in  
 359 Table 1. As seen, the precision ranged from 1.63% to 5.49%  
 360 (inter-day), and the accuracy ranged from 82.50 to 116.80%.  
 361 These values are in agreement with the AOAC [31] require-  
 362 ments for validation experiments in botanicals and dietary  
 363 supplements, considering the studied concentration levels.  
 364 Finally, high baseline noise (about 1 mAU) observed in  
 365 Fig. 3b might explain the high LODs and LOQs given for  
 366 the UV detection method (Table 1).

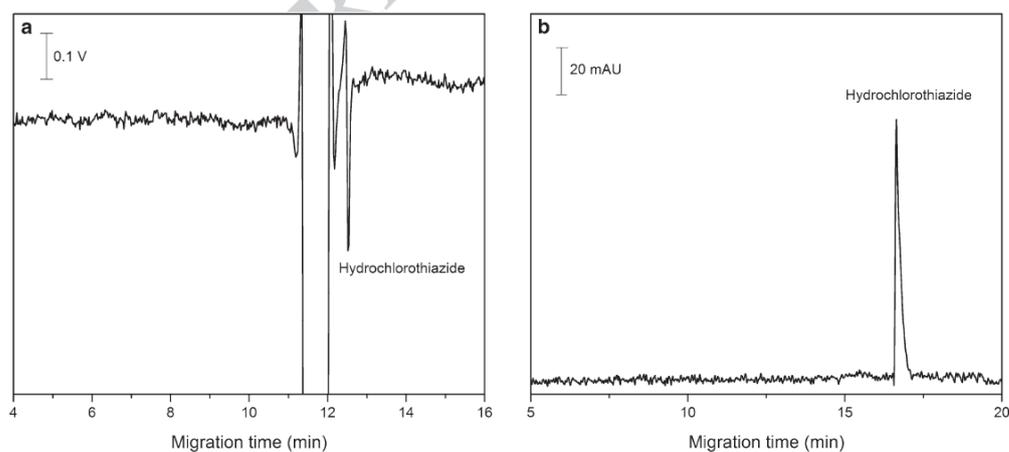
### 367 Analytical Application of the CZE-C<sup>4</sup>D-UV Method 368 to Dietary Supplements

369 The proposed method was employed for the analysis of  
 370 113 samples of dietary supplements. For each sample, an  
 371 analytical screening was performed to identify the possible  
 372 adulteration of the samples with the studied drugs. In the  
 373 samples that presented electrophoretic peaks similar to the  
 374 studied drugs, the standard addition method was applied to  
 375 confirm the presence of the suspected drug. The quantifica-  
 376 tion of each identified drug was based on the standard addi-  
 377 tion method ( $n = 3$ ). Beyond the identification of the drugs  
 378 based on the peak increasing after the addition of known  
 379 amounts of standards over the sample solution, this method  
 380 allows the minimization of interferences from sample com-  
 381 position. Thus, any change in the baseline characteristics or  
 382 peak shape caused by matrix composition will be the same  
 383 for standards and sample.

384 Considering all the samples ( $n = 113$ ) analyzed in this  
 385 work, circa 12% ( $n = 14$ ) were found to be adulterated  
 386 with diuretics, as described in Table 2, which also shows  
 387 the formulation composition and dosage forms of the prod-  
 388 ucts. Among the adulterated samples, hydrochlorothiazide  
 389 was detected in all the 14 samples and in one sample was  
 390 detected the presence of furosemide beyond hydrochloro-  
 391 thiazide, showing the possible use of two different diuretic  
 392 drugs for intensifying the effect by different mechanism  
 393 actions. Figure 4 shows the electropherograms (C<sup>4</sup>D and  
 394 UV) obtained from sample 45, which contains hydrochloro-  
 395 thiazide as a non-declared drug. Figure 5 presents the elec-  
 396 tropherograms of sample 55, which contains two associated  
 397 diuretics (hydrochlorothiazide and furosemide) in the formu-  
 398 lation not declared on the label. It is one of the few works  
 399 showing the association of diuretics in dietary supplements.  
 400 The use of two detectors is an important tool to confirm the

**Table 2** Analysis of formulations of dietary supplements by CZE-C<sup>4</sup>D-UV, information on formulation and dosage form, and diuretics determined as adulterants

Sample	Formulation description	Origin	Dosage form	Serving per day	Drug determined	Concentration (as mg day <sup>-1</sup> consumption)	
						CE detector	
						C <sup>4</sup> D	UV
1	"Guarana", "mate", mix of vitamins and minerals (calcium, choline, chromium, niacin, pantothenic acid, vitamin B2 and vitamin B1)	Brazil	Capsule	4	Hydrochlorothiazide	48.79 <sup>a</sup> 27.31 <sup>b</sup>	46.89 <sup>a</sup> 26.96 <sup>b</sup>
8	Anhydrous caffeine, orange fiber, psyllium, chitosan, vitamins and minerals	Brazil	Capsule	5	Hydrochlorothiazide	17.65	16.69
17	Maltodextrin, choline, magnesium, vitamins, chromium, folic acid, green tea extract, "guarana" extract, bitter orange extract, cinnamon extract	Brazil	Capsule	4	Hydrochlorothiazide	n.d. <sup>a</sup> 87.49 <sup>b</sup>	n.d. <sup>a</sup> 85.36 <sup>b</sup>
24	L-Valine, L-leucine, L-isoleucine, vitamin B6, arginine	Brazil	Capsule	4	Hydrochlorothiazide	39.41	40.98
25	Chromium, choline, calcium, silicon, zinc, magnesium, green coffee, vitamin C, vitamin B3, folic acid	Brazil	Capsule	3	Hydrochlorothiazide	31.17	29.69
45	<i>Citrus aurantium</i> , green tea choline, chromium, magnesium, vitamin B3 and B6, vitamin C and folic acid	Brazil	Capsule	4	Hydrochlorothiazide	180.52	178.8
46	Green tea, bitter orange, "guarana", vitamins and minerals	Brazil	Sachets	4	Hydrochlorothiazide	94.69	92.58
47	Choline, chromium, magnesium and <i>Citrus aurantium</i>	Brazil	Capsule	2	Hydrochlorothiazide	19.56	16.20
48	Branched chain amino acids	Brazil	Bulk	13.37	Hydrochlorothiazide	72.8	74.51
55	Dextrose, maltodextrin, creatine, "guarana", calcium chelate arginine, ornithine chelate calcium, taurine	Brazil	Bulk	15	Hydrochlorothiazide	192.91	179.25
71	Caffeine, N-acetyl-L-tyrosine, niacin, vitamin B6 and B12, <i>Camellia sinensis</i>	EUA	Capsule	2	Furosemide Hydrochlorothiazide	91.50 32.68	89.41 32.45
91	Whey protein, bovine liver, maltodextrin, calcium carbonate, linseed oil, choline citrate, palm oil, magnesium oxide, folic acid, vitamin C, B3 and E, zinc oxide, manganese sulfate, biotin, chromium picolinate	Brazil	Tablet	11	Hydrochlorothiazide	95.63 <sup>a</sup> 110.21 <sup>b</sup>	94.3 <sup>a</sup> 99.65 <sup>b</sup>

<sup>a</sup>Batch 1<sup>b</sup>Batch 2**Fig. 4** Electropherograms of sample 45 containing hydrochlorothiazide as adulterant detected by the CZE-C<sup>4</sup>D-UV method: **a** C<sup>4</sup>D at 400 kHz and **b** UV detection at 260 nm. Other conditions are described in Fig. 2

401 presence of the drugs. In addition, antidepressants with low  
 402 UV absorption characteristics can be detected using C<sup>4</sup>D  
 403 based on the decrease of the working electrolyte conductiv-  
 404 ity. It is the case observed for fluoxetine and paroxetine in  
 405 this work, but it may be applied to every case, where the  
 406 drugs do not absorb UV radiation. Furthermore, conducting  
 407 species in complex matrices can strongly influence the base-  
 408 line stability in the electropherograms obtained with C<sup>4</sup>D.  
 409 Since dietary supplements have different components in the  
 410 formulation (unpredictable), the use of a second UV detector  
 411 with a clean and stable baseline is advantageous. Finally, the  
 412 regions close to the peaks obtained in the samples detected  
 413 by UV absorption are clearly better if compared to baselines  
 414 obtained with C<sup>4</sup>D in dietary supplement samples (Fig. 5).

415 Because diuretics increase the excretion of water from the  
 416 body, they are often illegally added to dietary supplements  
 417 used for effective weight loss. Commercial hydrochloro-  
 418 thiazide tablets are usually available with dosages of 25 or  
 419 50 mg and the recommended dose does not exceed 200 mg  
 420 per day. If we consider this dosage, all samples presented  
 421 hydrochlorothiazide amounts within recommended dose  
 422 range. However, these products are not allowed to contain  
 423 diuretics in their packaging, which may lead the consumer to  
 424 several unknown effects and possible interactions with other  
 425 drugs. The side effects of thiazide diuretics include loss of  
 426 appetite, itching, blurred vision, headache, stomach upset,  
 427 and weakness and can also be associated with dizziness.  
 428 Furthermore, diuretics may cause a change in the levels of  
 429 potassium and other electrolytes in the blood [32]. Regarding  
 430 the presence of furosemide in sample 55, expected thera-  
 431 peutic dose of furosemide (up to 80 mg per day) was found

432 associated with hydrochlorothiazide in the formulation for  
 433 intensifying the effect of diuresis by different action mecha-  
 434 nisms. Recent studies have also shown the undeclared pres-  
 435 ence of diuretics in dietary supplements, clearly demonstrat-  
 436 ing the increasing cases of this practice [3, 33, 34].

437 Thus, these results serve as a warning to consumers and  
 438 regulatory agencies as these products can be registered under  
 439 different sanitary classifications in Brazil, leaving a gap in  
 440 the rule specifications for each class and in this way facilitat-  
 441 ing cases of adulteration. In addition, USA dietary supple-  
 442 ments are considered unique hybrid between foods and  
 443 drugs and can only be removed from the market after they  
 444 have caused some injury [35].

445 Finally, the use of two detectors in-line allowed a  
 446 greater degree of confidence in the data, since all the sus-  
 447 pected drugs detected using the C<sup>4</sup>D method were also  
 448 detected with the UV detector. The hydrochlorothiazide  
 449 and furosemide amounts quantified using the two detec-  
 450 tors were also in good agreement, presenting minimal  
 451 deviations. Furthermore, six investigated analytes could  
 452 be detected in both detection modes, since they present  
 453 chromophore groups and conducting cationic or anionic  
 454 forms at pH 9.2.

## 455 Conclusions

456 In this paper, a new CZE–C<sup>4</sup>D–UV method is described  
 457 for the simultaneous determination of amiloride, hydro-  
 458 chlorothiazide, chlorthalidone, furosemide, amfepramone,  
 459 phenolphthalein, fluoxetine, and paroxetine. The optimized

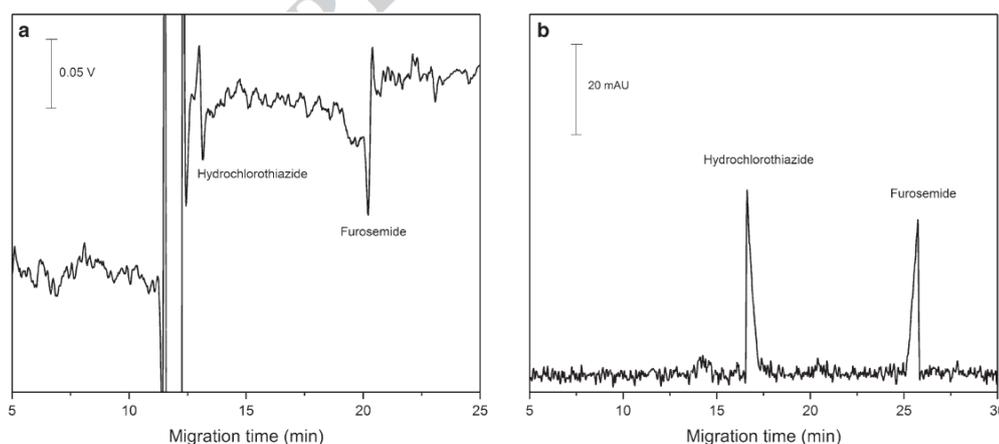


Fig. 5 Electropherograms of sample 55 containing both hydrochlorothiazide and furosemide as diuretic adulterants detected by the CZE–C<sup>4</sup>D–UV method: **a** C<sup>4</sup>D at 400 kHz and **b** UV detection at 260 nm. Other conditions are described in Fig. 2

460 method using both electrochemical and optical detection  
461 allows the rapid screening and determination of the drugs  
462 in dietary supplements, which contribute to the control of  
463 illegal adulteration of these products in a quick and effective  
464 way. Hydrochlorothiazide was found to be present as  
465 an adulterant in 14 of the studied samples marketed as  
466 encapsulated or bulk forms from different websites and  
467 physical stores. One of the samples presents expected therapeutic  
468 dose of furosemide concomitantly with hydrochlorothiazide  
469 as diuretics. The association of C<sup>4</sup>D and UV detection systems  
470 was successfully performed during the capillary zone electrophoretic  
471 separation of the drugs. This detector association is a useful tool  
472 in the analysis of complex samples when it is difficult for an individual  
473 detector to accomplish the determination of all the components.  
474 Furthermore, the use of both detectors brings information on matrix  
475 interferences, where C<sup>4</sup>D seems to be more susceptible to baseline  
476 oscillation due to multiple conducting and molecular species.

479 **Acknowledgements** The authors wish to acknowledge the financial  
480 support given by the Brazilian foundations CNPq, FAPERGS, and  
481 CAPES. The authors specially thank CAPES for the concession of a  
482 PDSE scholarship to L.S. Müller.

#### 483 Compliance with Ethical Standards

484 **Funding** This study was funded by CAPES, FAPERGS, and CNPq  
485 (Grant Numbers 440132/2014-2 and 312181/2013-2).

486 **Conflict of interest** The authors declare that they have no conflict of  
487 interest.

488 **Ethical approval** This article does not contain any studies with human  
489 participants or animals performed by any of the authors.

#### 490 References

- 491 1. Austin SB, Yu K, Liu SH, Dong F, Tefft N (2017) Household  
492 expenditures on dietary supplements sold for weight loss, muscle  
493 building, and sexual function: disproportionate burden by gender  
494 and income. *Prev Med Rep* 6:236–241
- 495 2. Neves DBF, Caldas ED (2015) Dietary supplements: international  
496 legal framework and adulteration profiles, and characteristics of  
497 products on the Brazilian clandestine market. *Regul Toxicol Pharmacol*  
498 73:93–104
- 499 3. Carvalho LM, Martini M, Moreira APL, Lima APS, Correia D,  
500 Falcão T, Garcia Bairos AV, Nascimento PC, Bohrer D (2011)  
501 Presence of synthetic pharmaceuticals as adulterants in slimming  
502 phytotherapeutic formulations and their analytical determination.  
503 *Forensic Sci Int* 204:6–12
- 504 4. Tainted products marketed as dietary supplements (2010) U.S.  
505 food and drug administration. <http://www.fda.gov/ForConsumers/ConsumerUpdates/ucm236774.htm>. Accessed 11 Apr 2017
- 507 5. Geyer H, Parr MK, Koehler K, Mareck U, Schänzer W, Thevis  
508 M (2008) Nutritional supplements cross-contaminated and faked  
509 with doping substances. *J Mass Spectrom* 43:892–902

6. Marcus DM (2016) Dietary supplements: what's in a name? 510  
What's in the bottle? *Drug Test Anal* 8:410–412 511
7. Woo H, Kim JW, Han KM, Lee JH, Hwang IS, Lee JH, Kim J,  
512 Kweon SJ, Cho S, Chae KR, Han SY, Kim J (2012) Simultaneous  
513 analysis of 17 diuretics in dietary supplements by HPLC  
514 and LC–MS/MS. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control  
515 Expo Risk Assess* 30:209–217 516
8. Choi JY, Heo S, Yoo GJ, Park SK, Yoon CY, Baek SY (2015)  
517 Development and validation of an LC–MS/MS method for the  
518 simultaneous analysis of 28 specific narcotic adulterants used  
519 in dietary supplements. *Food Addit Contam Part A Chem Anal  
520 Control Expo Risk Assess* 32:1029–1039 521
9. Kim HJ, Lee JH, Park HJ, Kim JY, Cho S, Kim WS (2014)  
522 Determination of non-opioid analgesics in adulterated food and  
523 dietary supplements by LC–MS/MS. *Food Addit Contam Part  
524 A Chem Anal Control Expo Risk Assess* 31:973–978 525
10. Campbell N, Clark JP, Stecher VJ, Thomas JW, Callanan AC,  
526 Donnelly BF, Goldstein I, Kamnitsky JC (2013) Adulteration  
527 of purported herbal and natural sexual performance enhancement  
528 dietary supplements with synthetic phosphodiesterase type  
529 5 inhibitors. *J Sex Med* 10:1842–1849 530
11. Kim HJ, Lee JH, Park HJ, Cho SH, Cho S, Kim WS (2014)  
531 Monitoring of 29 weight-loss compounds in foods and dietary  
532 supplements by LC–MS/MS. *Food Addit Contam Part A Chem  
533 Anal Control Expo Risk Assess* 31:777–783 534
12. Vaclavik L, Krynitsky AJ, Rader JI (2014) Mass spectrometric  
535 analysis of pharmaceutical adulterants in products labeled as  
536 botanical dietary supplements or herbal remedies: a review.  
537 *Anal Bioanal Chem* 406:6767–6790 538
13. Mokhtar SU, Chin ST, Kee CL, Low MY, Drummer OH, Marriott  
539 PJ (2016) Rapid determination of sildenafil and its analogues  
540 in dietary supplements using gas chromatography-triple quad-  
541 rupole mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal* 121:188–196  
542
14. Guo C, Shi F, Jiang S, Gong L, Zhao Y, Zhang J, Zeng S (2014)  
543 Simultaneous identification, confirmation and quantitation of  
544 illegal adulterated antidiabetics in herbal medicines and dietary  
545 supplements using high-resolution benchtop quadrupole-  
546 Orbitrap mass spectrometry. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*  
547 967:174–182 548
15. Jiang S, Tan H, Guo C, Gong L, Shi F (2015) Development of  
549 an ultra-high-performance liquid chromatography coupled to  
550 high resolution quadrupole-Orbitrap mass spectrometry method  
551 for the rapid detection and confirmation of illegal adulterated  
552 sedative-hypnotics in dietary supplements. *Food Addit Contam  
553 Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess* 32:1749–1759 554
16. Shi F, Guo C, Gong L, Li J, Dong P, Zhang J, Cui P, Jiang  
555 S, Zhao Y, Zeng S (2014) Application of a high resolution  
556 benchtop quadrupole-Orbitrap mass spectrometry for the rapid  
557 screening, confirmation and quantification of illegal adulterated  
558 phosphodiesterase-5 inhibitors in herbal medicines and dietary  
559 supplements. *J Chromatogr A* 1344:91–98 560
17. Ariburnu E, Uludag MF, Yalcinkaya H, Yesilada E (2012) Com-  
561 parative determination of sibutramine as an adulterant in natural  
562 slimming products by HPLC and HPTLC densitometry. *J Pharm  
563 Biomed Anal* 64:77–81 564
18. Sombra LL, Gomez MR, Olsina R, Martinez LD, Silva MF  
565 (2005) Comparative study between capillary electrophoresis  
566 and high performance liquid chromatography in 'guarana' based  
567 phytopharmaceuticals. *J Pharm Biomed Anal* 36:989–994 568
19. Moreira APL, Motta MJ, Dal Molin TR, Viana C, Carvalho LM  
569 (2013) Determination of diuretics and laxatives as adulterants  
570 in herbal formulations for weight loss. *Food Addit Contam Part  
571 A Chem Anal Control Expo Risk Assess* 30:1230–1237 572
20. Cianchino V, Acosta G, Ortega C, Martinez LD, Gomez MR  
573 (2008) Analysis of potential adulteration in herbal medicines  
574

- 575 and dietary supplements for the weight control by capillary  
576 electrophoresis. *Anal Methods* 108:1075–1081
- 577 21. Carvalho LM, Cohen PA, Silva CV, Moreira APL, Falcão TM, Dal  
578 Molin TR (2012) A new approach to determining pharmacologic  
579 adulteration of herbal weight loss products. *Food Addit Contam*  
580 *Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess* 29:1661–1667
- 581 22. Kuban P, Hauser PC (2017) Contactless conductivity detection for  
582 analytical techniques—developments from 2014 to 2016. *Electro-*  
583 *phoresis* 38:95–114
- 584 23. Petr J, Maier V, Horakova J, Sevcik J (2006) Simultaneous con-  
585 tactless conductivity detection and UV detection for the study of  
586 separation of tamsulosin enantiomers in discontinuous electrolyte  
587 systems by CE. *Electrophoresis* 27:4735–4745
- 588 24. Mazina J, Saar-Reismaa P, Kulp M, Kaljurand M, Vaher M (2015)  
589 Determination of  $\gamma$ -hydroxybutyric acid in saliva by capillary  
590 electrophoresis coupled with contactless conductivity and indirect  
591 UV absorbance detectors. *Electrophoresis* 36:3042–3049
- 592 25. Makrlíkova A, Opekar F, Tuma P (2015) Pressure-assisted intro-  
593 duction of urine samples into a short capillary for electrophoretic  
594 separation with contactless conductivity and UV spectrometry  
595 detection. *Electrophoresis* 36:1962–1968
- 596 26. Jensen H, Ostergaard J, Thomsen AE, Hansen SH (2007) CE fron-  
597 tal analysis based on simultaneous UV and contactless conductiv-  
598 ity detection: a general setup for studying noncovalent interac-  
599 tions. *Electrophoresis* 28:322–327
- 600 27. Koczka PI, Bodor R, Masár M, Gáspár A (2016) Application of  
601 isotachopheresis in commercial capillary electrophoresis instru-  
602 ment using C<sup>4</sup>D and UV detection. *Electrophoresis* 37:2384–2392
- 603 28. Lopez-Avila V, van der Goor T, Bohuslav G, Coufal P (2003)  
604 Separation of haloacetic acids in water by capillary zone  
605 electrophoresis with direct UV detection and contactless conduc-  
606 tivity detection. *J Chromatogr A* 993:143–152
- 607 29. Carvalho LM, Martini M, Moreira AP, Garcia SC, Nascimento  
608 PC, Bohrer D (2010) Determination of synthetic pharmaceuti-  
609 cals in phytotherapeutics by capillary zone electrophoresis with  
610 contactless conductivity detection (CZE-C<sup>4</sup>D). *Microchem J*  
611 96:114–119
- 612 30. Carvalho LM, Spengler C, Lima APS, Raabe A, Martini M, Nas-  
613 cimento PC, Bohrer D (2009) Determinação simultânea de cátions  
614 empregando eletroforese capilar com detecção condutométrica  
615 sem contato em equipamento construído em laboratório. *Quím*  
616 *Nova* 32:2203–2208
- 617 31. AOAC (2013) Guidelines for dietary supplements and botanicals.  
618 Appendix K. AOAC Official Methods, Rockville
- 619 32. Weiner IM, Goodman Gilman A, Rall TW, Nies AS, Taylor P  
620 (1990) Goodman and Gilman's pharmacological basis of thera-  
621 peutics. Pergamon, New York
- 622 33. Wang Q, Ding F, Li H, He P, Fang Y (2003) Determination of  
623 hydrochlorothiazide and rutin in Chinese herb medicines and  
624 human urine by capillary zone electrophoresis with amperometric  
625 detection. *J Pharm Biomed Anal* 30:1507–1514
- 626 34. Lu YL, Zhou NL, Liao SY, Su N, He DX, Tian QQ, Chen B, Yao  
627 SZ (2010) Detection of adulteration of anti-hypertension dietary  
628 supplements and traditional Chinese medicines with synthetic  
629 drugs using LC/MS. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Con-*  
630 *trol Expo Risk Assess* 27:893–902
- 631 35. Cohen PA (2014) Hazards of hindsight—monitoring the safety of  
632 nutritional supplements. *N Engl J Med* 370:1277–1280