

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

JÉSSICA LAPINSKI

**AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE AMINAS ESTIMULANTES,
DIURÉTICAS E ANOREXÍGENAS EM SUPLEMENTOS ALIMENTARES
EMPREGANDO ELETROFORESE CAPILAR**

Santa Maria, RS, Brasil

2021

JÉSSICA LAPINSKI

**AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE AMINAS ESTIMULANTES, DIURÉTICAS E
ANOREXÍGENAS EM SUPLEMENTOS ALIMENTARES EMPREGANDO
ELETROFORESE CAPILAR**

Dissertação 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 **Mestre em Ciências Farmacêuticas**

Orientador: Prof. Dr. Leandro Machado de Carvalho

Santa Maria, RS, Brasil

2021

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001

Lapinski, Jéssica
Avaliação da presença de aminas estimulantes,
diuréticas e anorexígenas em suplementos alimentares
empregando a eletroforese capilar / Jéssica Lapinski.-
2021.
89 p.; 30 cm

Orientador: Leandro Machado de Carvalho
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós
Graduação em Ciências Farmacêuticas, RS, 2021

1. Suplementos alimentares 2. Adulteração 3.
Eletroforese capilar 4. Cromatografia eletrocínética
micelar I. Machado de Carvalho, Leandro II. Título.

Sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFSM. Dados fornecidos pelo autor(a). Sob supervisão da Direção da Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central. Bibliotecária responsável Paula Schoenfeldt Patta CRB 10/1728.

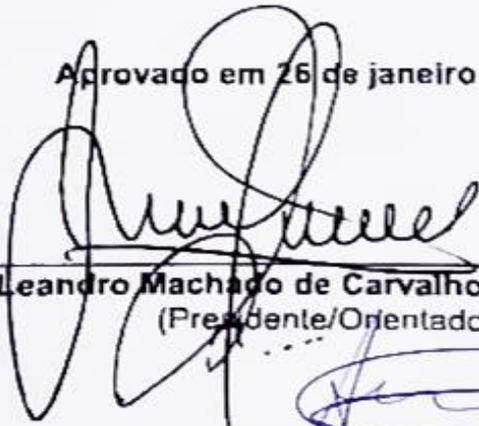
Declaro, JÉSSICA LAPINSKI, para os devidos fins e sob as penas da lei, que a pesquisa constante neste trabalho de conclusão de curso (Dissertação) foi por mim elaborada e que as informações necessárias objeto de consulta em literatura e outras fontes estão devidamente referenciadas. Declaro, ainda, que este trabalho ou parte dele não foi apresentado anteriormente para obtenção de qualquer outro grau acadêmico, estando ciente de que a inveracidade da presente declaração poderá resultar na anulação da titulação pela Universidade, entre outras consequências legais.

Jéssica Lapinski

AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE AMINAS ESTIMULANTES, DIURÉTICAS E ANOREXÍGENAS EM SUPLEMENTOS ALIMENTARES EMPREGANDO ELETROFORESE CAPILAR

Dissertação 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 **Mestre em Ciências Farmacêuticas**

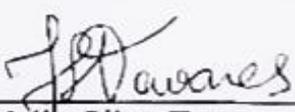
Aprovado em 26 de janeiro de 2021



Leandro Machado de Carvalho Dr. (UFSM)
(Presidente/Orientador)



André Valle de Bairros Dr. (UFSM)



Idylla Silva Tavares Dra. (IPC/PB)

Santa Maria – RS
2021

AGRADECIMENTOS

Inicialmente agradeço ao Prof. Dr. Leandro Machado de Carvalho, meu orientador por ter aberto as portas da UFSM novamente, me concedido a oportunidade de iniciar o mestrado no Lachem, após meu afastamento depois da graduação, acreditar na minha capacidade, no meu trabalho e colaborar para o meu crescimento profissional. Obrigada pela orientação, por ter vestido o jaleco e me acompanhado no laboratório quando precisei, pelos ensinamentos, amizade e preocupação com o grupo neste ano atípico que estamos vivendo.

Ao grupo de pesquisa Lachem, a todas as pessoas que passaram pelo meu caminho neste período. Por todas as palavras e ações de carinho, ajuda, compreensão e companheirismo. No dia a dia dividimos nossa vida, preocupações e angústias uns com os outros, afinal ninguém é feliz sozinho e descobrimos que a pesquisa também não faz sozinha. Agradeço ao Luis Ferraz, por estar disposto a sempre resolver os problemas do laboratório quando precisei, as conversas, histórias engraçadas e conselhos compartilhados diariamente. A Sandra que acompanhou boa parte da minha graduação, sendo eu sua IC, obrigada pela preocupação e carinho com todos do laboratório. Em especial um muito obrigada a Patrícia Schmidt, Gabriela Leal, Rejane Cargnin, Carolina Dolwitsch, Patrícia Mattiazzi e Diana Muratt, por serem mais que colegas e sim amigas que posso levar para a vida, além das paredes do laboratório, que sempre estiveram prontas para dividir momentos felizes e tristes e sempre ofereceram mais que uma mão amiga para ajudar.

Sou grata por ter meus pais, César e Maristela, que nunca mediram esforços para eu ter uma educação de qualidade, sem vocês nada do que eu vivo seria possível. Nunca foi fácil, mas quero conseguir retribuir pelo menos um pouco do que já fizeram por mim. Se me tornei a pessoa que sou, e se luto pelos meus objetivos foi graças a vocês, que sempre me ensinaram que com trabalho e dedicação tudo é possível. Obrigada ao Júnior pelo carinho e compreensão dos momentos em tive que me fazer ausente, pelas palavras e incentivo de que eu iria dar conta de tudo, já faz toda a diferença na minha vida.

À Universidade Federal de Santa Maria pela oportunidade de realizar um mestrado com um ensino público de qualidade. Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas por todo o suporte recebido. A CAPES pelo apoio e suporte financeiro.

*Mesmo quando tudo parece desabar,
cabe a mim decidir entre rir ou chorar,
ir ou ficar, desistir ou lutar;
porque descobri, no caminho da vida,
que o mais importante é decidir.*

Cora Carolina

RESUMO

AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE AMINAS ESTIMULANTES, DIURETICAS E ANOREXIGENAS EM SUPLEMENTOS ALIMENTARES EMPREGANDO ELETROFORESE CAPILAR

AUTORA: Jéssica Lapinski

ORIENTADOR: Leandro Machado de Carvalho

O consumo de suplementos alimentares vem aumentando nos últimos anos, fato ligado à sua fácil aquisição tanto em lojas físicas quanto em websites. O que nos mostra isso são os faturamentos bilionários do mercado global de suplementos alimentares. Assim, novos produtos são lançados com frequência e cada vez mais apelativos quanto a sua rápida eficácia relacionada à queima de gordura e perda de peso, o que leva a um cenário alarmante em relação à segurança destes produtos, visto que as fraudes e adulterações nas formulações são bastante recorrentes. Neste contexto, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) publicou há poucos anos o marco regulatório dos suplementos alimentares com o objetivo de padronizar, regularizar e estreitar as lacunas existentes na legalização destes produtos. Diante disto, faz-se necessário a existência de métodos analíticos rápidos, sensíveis e seletivos de análise de misturas prováveis de fármacos como potenciais adulterantes. Este trabalho propôs o desenvolvimento de um método analítico empregando eletroforese capilar com detecção UV e C⁴D baseado na técnica de cromatografia eletrocínética micelar (MEKC) para o estudo e a determinação de 10 fármacos (cafeína, sinefrina, ioimbina, femproporex, anfepramona topiramato, sibutramina, hidroclorotiazida, furosemida e amilorida). Por critérios de seletividade, foi realizada a validação do método para 5 fármacos estudados na mistura hipotética inicial (cafeína, sinefrina, ioimbina, hidroclorotiazida e femproporex). O método foi aplicado no estudo de 20 amostras de suplementos alimentares comercializados no Brasil nas condições analíticas otimizadas: eletrólito de trabalho tampão fosfato 50 mmol L⁻¹ (pH 9,6) contendo acetonitrila 20% (v/v) e dodecil sulfato de sódio (SDS) 50 mmol L⁻¹, potencial de separação -15 kV, temperatura 25°C, injeção hidrodinâmica por gravidade em 20 cm durante 50 s. O método foi validado de acordo com os parâmetros de linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, precisão e exatidão. Nas amostras estudadas, foi possível detectar que 20 % das amostras continham a hidroclorotiazida como fármaco diurético e 5% apresentavam uma concentração de cafeína acima da considerada aceitável e sem declaração prévia. Dos 5 fármacos validados no método por MEKC, cafeína, sinefrina, hidroclorotiazida e ioimbina foram detectados e quantificados nas amostras estudadas. O método se mostrou eficaz na identificação de estimulantes, diuréticos e anorexígenos como adulterantes presentes em suplementos alimentares com boa seletividade e sensibilidade de detecção.

Palavras-chave: Suplementos alimentares. Eletroforese Capilar. MEKC. Adulteração

ABSTRACT

EVALUATION OF THE PRESENCE OF STIMULANT, DIURETIC AND ANOREXIC AMINES IN DIETARY SUPPLEMENTS BY CAPILLARY ELECTROPHORESIS

AUTHOR: Jéssica Lapinski

ADVISOR: Leandro Machado de Carvalho

The consumption of dietary supplements has been increasing in recent years, due to its easy acquisition in both physical stores and websites. It is demonstrated mainly by the billionnaire income of the global market involving dietary supplements. Thus, new products are launched frequently and increasingly appealing as to their rapid effectiveness related to fat burning and weight loss. It leads to an alarming scenario in relation to the safety of these products, since fraud and adulteration in the formulations are quite recurrent. In this context, the National Health Surveillance Agency (Anvisa) published a few years ago the regulatory framework for dietary supplements in order to standardize, regularize and narrow the gaps in the legalization of these products. Thus, it is necessary to have fast, sensitive and selective analytical methods for investigating the most probable mixtures of drugs as potential adulterants. This work proposed the development of an analytical method employing capillary electrophoresis with UV and C⁴D detection based on the micellar electrokinetic chromatography (MEKC) technique for the study and determination of 10 drugs (caffeine, synephrine, yohimbine, fenproporex, amfepramone topiramate, sibutramine, hydrochlorothiazide, furosemide and amiloride). From selectivity criteria, the method was validated for 5 drugs studied in the initial hypothetical mixture (caffeine, synephrine, yohimbine, hydrochlorothiazide and femproporex). The method was applied in the study of 20 samples of dietary supplements marketed in Brazil using the following optimized analytical conditions: working electrolyte phosphate buffer 50 mmol L⁻¹ (pH 9.6) containing 20% acetonitrile (v/v) and sodium dodecyl sulfate (SDS) 50 mmol L⁻¹, separation potential -15 kV, temperature 25 °C, hydrodynamic injection by gravity at 20 cm for 50 s. The method was validated according to the parameters of linearity, limit of detection, limit of quantification, precision and accuracy. In the studied samples, it was possible to detect that 20% of the samples contained hydrochlorothiazide as a diuretic drug and 5% had a caffeine concentration above that considered acceptable doses. Of the 5 drugs validated in the method by MEKC, caffeine, synephrine, hydrochlorothiazide and yohimbine were detected and quantified in the studied samples. The method proved to be effective in identifying stimulants, diuretics and anorectic as adulterants present in dietary supplements with good selectivity and detection sensitivity.

Keywords: Food supplements. Capillary Electrophoresis. MEKC. Adulteration

LISTA DE FIGURAS

Quadro 1 - Especificações das categorias anteriormente utilizadas para registro dos suplementos alimentares comercializados no Brasil.....	22
Quadro 2- Legislação Brasileira vigente para suplementos alimentares.....	23
Figura 1 - Estrutura química da cafeína.	31
Figura 2 - Estrutura química da sinefrina.	32
Figura 3 – Estrutura química da ioimbina.....	33
Figura 4- Estrutura química da hidroclorotiazida.	34
Figura 5 - Estrutura química da furosemida.	35
Figura 6– Estrutura química da amilorida.....	36
Figura 7- Estrutura química do femproporex.....	37
Figura 8 - Estrutura química da anfepramona.....	38
Figura 9 - Estrutura química da sibutramina	39
Figura 10- Estrutura química do topiramato.....	40
Quadro 3 – Métodos analíticos descritos na literatura para a determinação de adulterantes em suplementos alimentares recentemente.....	41
Figura 11 - Representação esquemática da separação por MEKC usando micelas aniônicas.....	45
Figura 12- Foto do equipamento de eletroforese capilar construído em laboratório.....	47
Quadro 4 - Amostras de suplementos alimentares selecionados para esta pesquisa.....	49
Figura 13- Esquema de preparo das amostras de suplementos alimentares em laboratório.....	52
Figura 14 - Esquema do equipamento de CE construído em laboratório.....	54
Figura 15 - Eletroferograma dos analitos primeiramente selecionados por CZE: (1)cafeína, (2)sinefrina + (3)amilorida, (4) topiramato + (5) furosemida, (6) ioimbina + (7) hidroclorotiazida, (8) femproporex + (9) anfepramona, (10) sibutramina, (150mg L ⁻¹). Condições: eletrólito de trabalho tampão fosfato 20 mmol L ⁻¹ (pH 9,2) contendo metanol 30% (v/v), potencial de separação de -15Kv, capilar de sílica fundida 75µm x 360 µm x 68 cm; detecção ultravioleta com comprimento de onda de 210nm, temperatura 25°C, injeção hidrodinâmica por gravidade de 20cm durante 50s.	59

Figura 16 - Eletroferograma dos analitos primeiramente selecionados por CZE: (1)cafeína + (2)sinefrina, (3)ioimbina + (4)topiramato +(5)furosemida, (6)amilorida + (7)femproporex + (8)anfepiramona, (9)hidroclorotiazida, (10)sibutramina Condições: eletrólito de trabalho tampão fosfato 20 mmol L⁻¹ (pH 9,2) contendo metanol 60% (v/v), potencial de separação de -15Kv, capilar de sílica fundida 75µm x 360 µm x 68 cm; detecção ultravioleta com comprimento de onda de 210nm, temperatura 25°C, injeção hidrodinâmica por gravidade de 20cm durante 50s.....59

Figura 17 – Eletroferograma da provável sequência dos 10 analitos analisados por MEKC: (1) cafeína + (2) amilorida, (3) sinefrina, (4) topiramato, (5) furosemida + (6) ioimbina, (7) hidroclorotiazida, (8) fenproporex, (9) sibutramina, (10) anfepiramona. Condições: eletrólito de trabalho tampão fosfato 50 mmol L⁻¹ (pH 9,2) contendo metanol 30% (v/v) e SDS 50 mM, potencial de separação de -15Kv, capilar de sílica fundida 75µm x 360 µm x 68 cm; detecção ultravioleta com comprimento de onda de 210nm, temperatura 25°C, injeção hidrodinâmica por gravidade de 20cm durante 50s, detecção catódica.60

Figura 18 - Representação esquemática da estrutura química interna do capilar de sílica modificado à base de álcool polivinílico (PVA).....62

Figura 19 - Eletroferograma dos 9 analitos por CZE: sinefrina, cafeína, ioimbina, anfepiramona, fenproporex, sibutramina, furosemida, hidroclorotiazida e amilorida (150 mg L⁻¹). Condições: eletrólito de trabalho tampão fosfato 50 mmol L⁻¹ (pH 9,2) contendo acetonitrila 30% (v/v), potencial de separação de -15Kv, capilar revestido com PVA 100µm x 60 cm; detecção ultravioleta com comprimento de onda de 210nm, temperatura 25°C, injeção hidrodinâmica por gravidade de 20cm durante 50s, detecção catódica.63

Figura 20 - Eletroferogramas das sucessivas injeções dos 9 analitos por MEKC: sinefrina, cafeína, ioimbina, anfepiramona, fenproporex, sibutramina, furosemida, hidroclorotiazida e amilorida (150 mg L⁻¹). Condições: eletrólito de trabalho tampão fosfato 50 mmol L⁻¹ (pH 9,2) contendo acetonitrila 30% (v/v) e SDS 50mM, potencial de separação de -15Kv, capilar revestido com PVA 100µm x 60 cm; detecção ultravioleta com comprimento de onda de 210nm, temperatura 25°C, injeção hidrodinâmica por gravidade de 20cm durante 50s, detecção catódica.....64

Figura 21 - Eletroferograma da separação dos 5 analitos por MEKC: cafeína, sinefrina, hidroclorotiazida, ioimbina e femproporex. Condições: eletrólito de trabalho tampão fosfato 50 mmol L⁻¹ (pH 9,6) contendo acetonitrila 20% (v/v) e SDS 50 mM, potencial de separação de -15 kV, capilar de sílica fundida 75 µm x 360 µm x 68 cm; detecção simultânea por ultravioleta (210 nm) e condutividade (C⁴D), temperatura 25°C, injeção hidrodinâmica por gravidade de 20 cm durante 50 s, detecção catódica.....67

Figura 22 - Eletroferograma da amostra 14 após extração em metanol, seguida da adição dos padrões de cafeína e hidroclorotiazida. Condições: eletrólito de trabalho tampão fosfato 50 mmol L⁻¹ (pH 9,6) contendo acetonitrila 20% (v/v) e SDS 50 mM, potencial de separação de -15Kv, capilar de sílica fundida 75µm x 360 µm x 68 cm; detecção ultravioleta com comprimento de onda de 210nm, temperatura 25°C, injeção hidrodinâmica por gravidade de 20cm durante 50s, detecção catódica73

Figura 23 - Eletroferograma da amostra 4 após extração em metanol, seguida da adição dos padrões de sinefrina e hidroclorotiazida. Condições: eletrólito de trabalho tampão fosfato 50 mmol L⁻¹ (pH 9,6) contendo acetonitrila 20% (v/v) e SDS 50 mM, potencial de separação de -15Kv, capilar de sílica fundida 75µm x 360 µm x 68 cm; detecção ultravioleta com comprimento de onda de 210nm, temperatura 25°C, injeção hidrodinâmica por gravidade de 20cm durante 50s, detecção catódica74

Figura 24 - Eletroferograma da amostra 10 à base de cafeína após extração em metanol. Condições: eletrólito de trabalho tampão fosfato 50 mmol L⁻¹ (pH 9,6) contendo acetonitrila 20% (v/v) e SDS 50 mM, potencial de separação de -15Kv, capilar de sílica fundida 75µm x 360 µm x 68 cm; detecção ultravioleta com comprimento de onda de 210nm, temperatura 25°C, injeção hidrodinâmica por gravidade de 20cm durante 50s, detecção catódica75

Figura 25 - Eletroferograma da amostra 5 após extração em metanol, seguida da adição dos padrões de cafeína e sinefrina. Condições: eletrólito de trabalho tampão fosfato 50 mmol L⁻¹ (pH 9,6) contendo acetonitrila 20% (v/v) e SDS 50 mM, potencial de separação de -15Kv, capilar de sílica fundida 75µm x 360 µm x 68 cm; detecção ultravioleta com comprimento de onda de 210nm, temperatura 25°C, injeção hidrodinâmica por gravidade de 20cm durante 50s, detecção catódica76

Figura 26 - Eletroferograma da amostra 1 após extração em metanol, seguida da adição dos padrões de cafeína e loimbina. Condições: eletrólito de trabalho tampão fosfato 50 mmol L⁻¹ (pH 9,6) contendo acetonitrila 20% (v/v) e SDS 50 mM, potencial de separação de -15Kv, capilar de sílica fundida 75µm x 360 µm x 68 cm; detecção ultravioleta com comprimento de onda de 210nm, temperatura 25°C, injeção hidrodinâmica por gravidade de 20cm durante 50s, detecção catódica.....77

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Pesquisa dos últimos 3 anos no Brasil relacionada ao uso de suplementos alimentares por frequentadores de academia.	20
Tabela 2 - Fármacos em estudo neste trabalho e suas respectivas características.	48
Tabela 3 - Parâmetros de linearidade do método desenvolvido.....	69
Tabela 4 - Parâmetros referente ao restante das figuras de mérito para os compostos analisados pelo método eletroforético com detecção UV em amostras de suplementos alimentares.....	70
Tabela 5 – Resultado da análise das formulações de suplementos alimentares por Eletroforese Capilar pela técnica de separação por Cromatografia Eletrocínética Micelar (MEKC), com os fármacos encontrados e suas quantidades segundo a ingestão diária recomendada pelo fabricante e as quantidades encontradas por cápsula.....	71

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOAC	<i>Association of Official Analytical Chemists</i>
C ⁴ D	Detecção condutométrica sem contato capacitivamente acoplada
CE	Eletroforese Capilar, do inglês <i>Capillary Electrophoresis</i>
CGE	Eletroforese capilar em gel
CZE	Eletroforese Capilar de Zona
DPR	Desvio Padrão Relativo
DSHES	A lei de Saúde e Educação de Suplementos Dietéticos, do inglês <i>The Dietary Supplement Health and Education Act</i>
EOF	Fluxo Eletroosmótico
EU	European Union
EUA	Estados Unidos da América
FDA	<i>Food and Drugs Administration</i>
GC	Cromatografia Gasosa
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
LC	Cromatografia Líquida
LOD	Limite de Detecção
LOQ	Limite de Quantificação
MEKC	Cromatografia Eletrocínética Micelar
MS	Espectrometria de Massas
pKa	Constante de Dissociação Ácida (função logarítmica)
PVA	Álcool Polivinílico
RASSAF	Sistema de Alerta Rápido para Alimentos e Rações, do inglês <i>Food and Feed Safety Alerts</i>
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
SQR	Substância Química de Referência
UFSC	Universidade Federal de Santa Maria
UV	Ultravioleta
v/v	Volume/Volume
WADA	Agência Mundial Antidoping, do inglês <i>World Antidoping Agency</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.2 OBJETIVOS	15
1.2.1 <i>Objetivo geral</i>	15
1.2.2 <i>Objetivos específicos</i>	15
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
2.1 SUPLEMENTOS ALIMENTARES	17
2.2 LEGISLAÇÃO BRASILEIRA DE SUPLEMENTOS ALIMENTARES.....	21
2.3 ADULTERAÇÃO DE SUPLEMENTOS ALIMENTARES POR ESTIMULANTES, ANOREXÍGENOS E DIURÉTICOS.	26
2.3.1 <i>Riscos em decorrência da adulteração de suplementos alimentares</i>	28
2.3.2 <i>Estimulantes</i>	29
2.3.3 <i>Diuréticos</i>	33
2.3.4 <i>Anorexígenos</i>	36
2.4 METODOLOGIAS ANALÍTICAS EMPREGADAS NA AVALIAÇÃO DE SUPLEMENTOS ALIMENTARES	40
2.4.1 <i>Eletroforese Capilar</i>	42
2.4.2 <i>Cromatografia Eletrocinética Micelar</i>	44
3 MATERIAL E MÉTODOS	46
3.1 INSTRUMENTAÇÃO E REAGENTES.....	46
3.2 PROCEDIMENTOS ANALÍTICOS.....	48
3.2.1 <i>Amostras de Suplementos Alimentares</i>	48
3.2.2 <i>Preparo das amostras</i>	51
3.2.3 <i>Método de separação por Eletroforese Capilar com Detecção por Condutividade sem contato e UV (CE-C⁴D/UV)</i>	52
3.2.4 <i>Paramentos de validação</i>	54
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
4.1 DETERMINAÇÃO DE ADULTERANTES EM SUPLEMENTOS ALIMENTARES POR ELETROFORESE CAPILAR	57
4.1.1 <i>Separação de fármacos por CZE e MEKC em capilar de sílica normal</i>	57
4.1.2 <i>Separação de fármacos por CZE e MEKC em capilar de sílica modificado</i>	61
4.2.3 <i>Validação do método eletroforético escolhido</i>	65
4.2.4 <i>Aplicação da metodologia em amostras de suplementos alimentares</i>	70
5 CONCLUSÕES	78
6 REFERÊNCIAS.....	79

1 INTRODUÇÃO

Suplementos alimentares são substâncias utilizadas por via oral com o intuito de complementar uma determinada deficiência dietética. Mas, na maioria das vezes, o seu consumo ocorre sem uma necessidade específica, sendo motivado apenas pela ideia vendida no rótulo de que o efeito prometido, muitas vezes emagrecedor, será possível ser alcançado em um menor espaço de tempo, mesmo que existam controvérsias em relação aos seus efeitos e benefícios à saúde (ALVES, 2009).

Em suas formulações é proibida a presença de estimulantes, hormônios, componentes com ação ou finalidade terapêutica e medicamentosa e outras substâncias consideradas como *dopping* contidas na lista de substâncias proibidas pela Agência Mundial Antidopping (WADA) (BRASIL,2010a). No entanto vem se tornando bastante frequente a adulteração de suplementos alimentares, que ocorre quando produtos não descritos nos rótulos são adicionados propositalmente nas formulações com intuito de intensificar o efeito farmacológico desejado, e impulsionar o seu consumo (CHAMPAGNE et al.,2011). Alguns fabricantes adicionam ilegalmente drogas sintéticas como, por exemplo, a sibutramina, em suas formulações com a intenção do efeito terapêutico ser alcançado em menor tempo, porém, esses produtos podem causar danos irreversíveis à saúde (DUNN et al., 2012).

Medicamentos da classe dos anorexígenos, diuréticos, laxantes e estimulantes, adicionados em suplementos vitamínicos com o objetivo de proporcionar a diminuição acelerada do peso corporal, têm sido os principais alvos de pesquisa com adulterantes (MOREIRA et al., 2013). Neste contexto, diferentes metodologias empregadas para a pesquisa de adulterantes sintéticos em amostras de suplementos alimentares são descritas na literatura. Métodos de separação como a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) e a Cromatografia Gasosa (GC) são mais empregados para determinação destes agentes (MOREIRA et al., 2014).

No entanto, a Eletroforese Capilar (CE) é considerada uma técnica analítica recente e vem ganhando cada vez mais atenção na comunidade científica no controle de qualidade de produtos farmacêuticos, devido à sua variedade de mecanismos de separação disponíveis (SPUDEIT et al.,2012). Destacando-se a Cromatografia eletrocínética micelar (MEKC) que consiste na separação de compostos neutros e

carregados em um mesmo intervalo de tempo, devido a adição de tensoativos iônicos ao eletrólito de trabalho, que tem por objetivo a formação de micelas as quais conferem o caráter seletivo da técnica (TAVARES, 1997).

Dentro do contexto apresentado, este estudo tem por objetivo identificar e quantificar diferentes amins diuréticas, estimulantes e anorexígenas (cafeína, sinefrina, ioimbina, amilorida, furosemida, hidroclorotiazida, sibutramina, topiramato, anfepramona e femproporex) em produtos comercializados como suplementos alimentares no Brasil. Para tanto, um método baseado na separação eletroforética de amins foi desenvolvido empregando detecção por condutividade e absorção no UV.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo geral

Avaliar a presença de amins estimulantes, diuréticas e anorexígenas adicionadas como adulterantes em suplementos alimentares empregando a eletroforese capilar.

1.2.2 Objetivos específicos

- 1 Realizar a amostragem de suplementos alimentares comercializados no mercado virtual brasileiro com finalidade estimulante e emagrecedora.
- 1 Estudar os métodos de extração para as amostras e posterior diluição e injeção no sistema de eletroforese capilar.
- 2 Desenvolver um método eletroforético com detecção simultânea por condutividade e absorção no UV empregando tampão fosfato como eletrólito de trabalho, baseado na migração eletroforética de cátions (amins protonadas).
- 3 Validação do método eletroforético para a determinação das amins envolvendo os principais parâmetros de validação analítica.

- 4 Aplicar o método desenvolvido na análise de suplementos alimentares em relação à presença das aminos estudadas enquanto fármacos adulterantes, envolvendo uma etapa de pré-tratamento das amostras em solventes orgânicos e extração.
- 5 Análise estatística da presença das aminos nos suplementos alimentares comercializados com o apelo comercial enquanto estimulantes para atividade física e perda de peso.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 SUPLEMENTOS ALIMENTARES

A correlação entre padrões estéticos relacionados ao corpo e alimentação nos acompanham desde a antiguidade, quando atletas gregos e romanos consumiam basicamente proteínas, vegetais e frutas e se preparavam para grandes competições olímpicas, afim de demonstrar bravura, força e habilidade atribuindo as vitórias ao preparo físico e a prática dietética (GOSTON, 2009). Desde então o homem procura aperfeiçoar o seu desempenho físico e foi aproximadamente no início do século XX com o aprimoramento de pesquisas e conhecimento do trabalho muscular que a suplementação foi compreendida e vem ganhando evidência (APPLEGATE; GRIVETTI, 1997).

A definição de suplemento alimentar é bastante ampla, segundo a DSHES (The Dietary Supplement Health and Education Act) de 1995, é um produto ingerido por via oral que contém um ou mais ingredientes nutricionais sendo esses, vitaminas, minerais, ervas e aminoácidos, utilizados para complementar uma dieta com deficiências nutricionais (FDA,1995). A União Europeia (UE) ressalta que a sua comercialização pode ser em forma de cápsulas, comprimidos, pó e ampolas líquidas, sendo seu constituinte de gênero alimentício, objeto da complementação de uma dieta regular (EU,2003).

Da mesma forma que DSHES e UE o Brasil também conta com uma definição de suplemento alimentar, de acordo com ANVISA (Agencia Nacional de Vigilância Sanitária) sendo produtos de ingestão via oral constituído de vitaminas, minerais, proteínas, carboidratos, entre outros, que possuem a finalidade de apenas complementar a dieta de indivíduos saudáveis sem nenhum fim terapêutico (BRASIL, 2018a). Podemos observar que as especificações podem vir a causar confusões pois não contribuem para um esclarecimento e definição de uma função.

Nos últimos anos a sociedade vem aprimorando seus padrões de vida saudável e os cuidados com a alimentação vem ganhando um papel de destaque, aproveitando este panorama o marketing publicitário torna-se muito atrativo, chamando a atenção com a frases em seus rótulos como: redutor de gordura, ganho de massa muscular, diminuidor de apetite, atingindo um público alvo, que busca benefícios mais

rapidamente tornando assim seu consumo rotineiro, visto que são produtos de livre comercialização e fácil acesso (DICKINSON; MACHAY, 2014).

Hoje em dia a categoria dita suplemento alimentar possui uma vasta diversidade de produtos disponibilizada aos consumidores, que podem ser adquiridas em farmácias, academias, supermercados e internet. A sua composição varia conforme o propósito desejado, suplementos à base de carboidratos são fontes rápida de energia, os proteicos à base de aminoácidos auxiliam no ganho de massa muscular, suplementos lipídicos e hipercalóricos complementam o alto gasto energético, os suplementos vitamínicos possuem a maior popularidade e melhoram a deficiência nutricional, por fim os termogênicos são responsáveis pela queima de gordura, sendo eles os mais atrativos por praticantes de exercício físico (SCHENEIDER et al., 2008).

A comercialização de suplementos alimentares vem tendo um rápido crescimento nos últimos anos, o mercado global de suplementos alimentares foi avaliado em 132,8 bilhões de dólares em 2016 e conforme estimativas deve atingir 220,3 bilhões de dólares em 2022. A Ásia apresentou a maior participação no mercado mundial em 2016, já na América-Latina o Brasil é visto com alto potencial lucrativo neste segmento (JOHN, 2017). Segundo uma pesquisa realizada nas principais capitais Brasileiras entre 2014 e 2015, quando questionados sobre o hábito de consumir suplemento alimentar cerca de 54% dos domicílios entrevistados relataram já terem feito o consumo de pelo menos algum tipo de suplemento. A maior prevalência do consumo foi no Pará, norte do país, com incidência de 59%, o Distrito Federal relatou a menor ingestão, por volta de 47%. Além disso foi possível observar que o consumo entre os sexos não demonstrou uma predominância significativa sendo 53% mulheres e 47% homens (ABIAD, 2015).

De um modo geral os praticantes de exercício físico são os principais usuários de suplementos alimentares, como mostra o estudo realizados por Moreira (2014) e Navarro (2017) , este grupo busca melhorar seu desempenho, ganhar massa magra e perder peso, muitas vezes devido a participação em competições de alta performance. No entanto a população em geral vem igualmente colaborando para aumentar e estimativa de usuários, onde as mulheres já ocupam um lugar ascendente, fazendo uso de suplementos vitamínicos, a base de plantas e aminoácidos (GOSTON, 2009).

Acredita-se que a crise global instaurada no ano de 2020 devido a pandemia causada pelo coronavírus (COVID-19), mudou drasticamente os hábitos de vida de grande parte da população mundial, originando assim uma maior probabilidade de automedicação e conseqüentemente aumento no consumo de suplementos alimentares conforme relata Karbownil e colaboradores (2020), em estudo on-line realizado na Polônia com 1560 participantes. Curiosamente os resultados demonstraram que o consumo de suplementos não mudou significativamente durante a pandemia, enquanto análises de mercado sugerem um crescente número de compras e logo um aumento do consumo neste período, essa discrepância pode estar relacionada aos diferentes tipos de população estudada.

Visto que nos EUA em uma entrevista realizada pelo Conselho Nutrição Responsável (CRN) relata que mais de três quartos da população afirma fazer uso de suplemento alimentar e 83% acredita que os mesmos são de grande importância durante a pandemia (RCN, 2020).

No Brasil diversas pesquisas vêm sendo realizadas para a avaliação do consumo de suplementos alimentares por praticantes de exercícios físicos. A tabela 1 mostra algumas das pesquisas realizadas nos últimos 3 anos em regiões distintas do país, bem como a composição dos suplementos mais consumidos e o percentual de adeptos as substâncias

Tabela 1 - Pesquisa dos últimos 3 anos no Brasil relacionada ao uso de suplementos alimentares por frequentadores de academia.

Cidade	Suplemento	Percentual (n° entrevistados)	Referência
Vale do Ipojuca –PE	Proteína	56,7% (180)	SILVA; SILVA, 2018
Recife – PE	Vitaminas e Anabolizante	76,9% (346)	GOMES et al., 2019
Potitendaba - SP	Suplementos energéticos	19% (63)	SANTOS et al., 2019
Juazeiro do Norte - CE	Proteínas	25,2 (127)	PEREIRA et al., 2017
Pelotas – RS	Vitaminas e proteína	10,5% (497)	CAVA et al., 2017
Curitiba – PR	Vitaminas e Anabolizante	27% (719)	PEREIRA et al., 2019
Manaus – AM	Proteínas	79%(250)	VIEIRA et al., 2018
Palhoça –SC	Proteínas	40% (150)	AMARAL,2017
Braço Norte -SC	Hiperprotéicos	38,5% (278)	CARVALHO; SOUZA, 2018
Goiânia – GO	Proteína e aminoácidos	59% (131)	VIANA et al., 2018
Anápolis- GO	Proteínas	46,7%(150)	SANTOS et al., 2018
Caxias do Sul- RS	Proteínas e Termogênicos	28,62% (83)	SOUZA; ALVEZ, 2019
Montes Claros-ES	Proteínas	65%(100)	CARDOSO; VARGAS; LOPES,2017
Cananéia- SP	Proteínas	53%(60)	GOMES et al., 2017

2.2 LEGISLAÇÃO BRASILEIRA DE SUPLEMENTOS ALIMENTARES

Apesar do termo “suplemento alimentar” ser popularmente conhecido há muitos anos, a categoria foi regulamentada apenas no ano de 2018 no Brasil, até então sua definição causava confusões para o consumidor, fiscalizadores e até mesmo para os fabricantes.

Em 2010 afim de atualizar o cenário que abrange os suplementos alimentares, foi instaurada pela ANVISA a RDC n° 18/2010, a qual os denomina “alimentos para atletas” enquadrando-os assim em diferentes categorias como: (I) Suplemento hidroeletrólítico para atletas, (II) Suplemento energético para atletas, (III) Suplemento proteico para atletas, (IV) Suplemento para substituição parcial de refeições de atletas, (V) Suplemento de creatina para atletas, (VI) Suplemento de cafeína para atletas (BRASIL. 2010). As categorias anteriormente utilizadas pelos fabricantes para regulamentação dos produtos eram: Suplementos Vitamínicos e/ou Minerais (Portaria MS n° 32/1998); Novos Alimentos (Resolução Anvisa n° 16/1999); Alimentos com Alegações de Propriedades Funcionais e/ou de Saúde (Resolução n° 19/1999); Substâncias Bioativas e Probióticos Isolados com Alegações de Propriedade Funcional (RDC n° 02/2002) e Produtos com Obrigatoriedade ou isenção de registro (RDC n° 27/2010).

Vale ressaltar que é de responsabilidade do fabricante o enquadramento na categoria adequada, sendo que muitas vezes leva o mesmo a omitir informações referentes a composição, devido ao produto não se enquadrar nos requisitos definidos por lei.

Quadro 1 - Especificações das categorias anteriormente utilizadas para registro dos suplementos alimentares comercializados no Brasil.

Documento	Especificação	Categoria
Portaria n° 32/1998	Não podem conter indicações terapêuticas. Constituídos de associação de vitaminas, minerais, fontes naturais de vitaminas e minerais. Devendo conter um mínimo de 25% e no máximo até 100% da ingestão diária recomendada.	Suplementos Vitamínicos e/ou Minerais
Resolução n° 16/1999	Os alimentos ou substâncias sem consumo no país, ou já consumidas, e que venham a ser adicionadas ou utilizadas em altos níveis comparados aos utilizados na dieta regular	Novos Alimentos
Resolução n° 19/1999	Alimento referente a ação metabólica ou fisiológica no crescimento, manutenção e funções normais do organismo. Alimento que se associa condição relacionada à saúde.	Alimentos com Alegações de Propriedades Funcionais e/ou de Saúde
RDC n° 02/2002	Nutrientes e não nutrientes que possuem ação metabólica ou fisiológica específica. Microrganismos vivos capazes de melhorar o equilíbrio microbiano intestinal. Não pode ter finalidade medicamentosa ou terapêutica.	Substâncias Bioativas e Probióticos Isolados com Alegações de Propriedade Funcional
RDC n° 18/2010	Alimentos destinados a atletas afim de atender suas necessidades nutricionais e desempenho físico.	Alimentos para atletas

Fonte:autor

Devido ao grande número de normas e o conflito gerado no momento de definir a categoria que abrange o suplemento alimentar em questão, a ANVISA após realização de pesquisas públicas, debates com órgãos representantes dos consumidores e comunidade científica, publicou a RDC n° 243/2018, com o objetivo

de melhorar a qualidade do produto oferecido ao público, aumentar a segurança definindo regras à sua composição, limites de uso e rotulagem específica (ANVISA,2019).

A nova resolução RDC nº 243/2018 estabelece quesitos importantes como a definição clara de suplemento alimentar sendo “um produto para ingestão oral, apresentado em formas farmacêuticas, destinado a suplementar a alimentação de indivíduos saudáveis com nutrientes, substâncias bioativas, enzimas ou probióticos, isolados ou combinados”, listas de substâncias permitidas na composição do produto, limites mínimos e máximos e alegações de que os produtos podem causar a saúde dos consumidores (BRASIL,2018a). Colaborando assim para o que antes eram seis categorias distintas, agora são enquadradas em uma única denominação, contribuindo para uma simplificação, uniformização dos requisitos sanitários e redução das brechas regulatórias existentes (ANVISA, 2019).

Foram também publicados outros cinco atos normativos além da RDC 243/2018 para legalização de suplementos alimentares conforme quadro a seguir:

Quadro 2- Legislação Brasileira vigente para suplementos alimentares.

Normas	Emendas	Referência
RDC 243/2018	Dispõe sobre os requisitos sanitários dos suplementos alimentares.	BRASIL, 2018a
RDC 242/2018	Regulamenta o registro de vitaminas, minerais, aminoácidos e proteínas de uso oral, classificados como medicamentos específicos. Esta norma altera a RDC 24/2011, a RDC 107/2016, a IN 11/2016 e a RDC 71/2009.	BRASIL, 2018f
RDC 241/2018	Dispõe sobre os requisitos para comprovação da segurança e dos benefícios a saúde dos probióticos para uso em alimentos	BRASIL, 2018e
RDC 240/2018	Dispõe sobre as categorias de alimentos e embalagens isentos e com obrigatoriedade de registro sanitário. Esta norma altera a RDC nº 27/2010.	BRASIL, 2018d
RDC 239/2018	Estabelece os aditivos alimentares e coadjuvantes de tecnologia autorizados para uso em suplementos alimentares.	BRASIL, 2018c

IN 28/2018	Estabelece as listas de constituintes, de limites de uso, de alegações e de rotulagem complementar do suplemento alimentares.	BRASIL, 2018b
------------	---	---------------

Fonte: ANVISA, 2019.

A regulamentação dos suplementos alimentares agora deve seguir novos parâmetros de aceitação, foram criadas listas de constituintes autorizados para uso, determinada pela ANVISA, que levou como base análise de risco para indivíduos saudáveis, evidências científicas, legislação sanitária de alimentos e referências regulatórias internacionais. Para a inclusão de novos ingredientes na lista positiva ou alteração de limites de uso, deverá ser aberto um protocolo de petição específica de comprovação e eficácia do produto que serão previamente avaliados e aprovados (ANVISA,2019; BRASIL 2018a).

Especificações como pureza, identidade e referências oficiais da composição presente, são requisitos para as substâncias que fazem parte da lista autorizada. São pertencentes desta lista: proteínas, carboidratos, fibras, lipídios, minerais, vitaminas, aminoácidos, adenosina, creatina, taurina, alicina, cafeína, compostos fenólicos, enzimas, entre outros (BRASIL, 2018b).

Bem como a ANVISA definiu uma lista de substâncias permitidas, a fim de oferecer ainda mais segurança e proteger o consumidor, foram estabelecidos limites mínimos e máximos de nutrientes que podem estar contidos nas formulações, além disso definições específicas de rotulagens, devendo constar recomendação de uso, grupo populacional, faixa etária indicada, quantidade e frequência de consumo, tabela nutricional, lista de ingredientes, instruções de conservação e advertências. Agora o termo “suplemento alimentar” que antes era considerado infração sanitária se encontrado em rotulagens, passa a ser obrigatoriedade (BRASIL, 2018a).

Uma vez que os suplementos alimentares estão em constante aprimoramento de formulação e ascensão no mercado, a intenção de evitar a adulteração com substâncias sintéticas e proibidas é de grande importância, sendo assim como apoio a intervenção contamos com uma lista de substâncias que não permitem a composição de : (I) substâncias consideradas como doping pela Agência Mundial Antidopagem, (II) substâncias sujeitas a controle especial, conforme Portaria nº 344, de 12 de maio de 1998, que aprova o regulamento técnico sobre substâncias e

medicamentos sujeitos a controle especial, e suas atualizações; (III) substâncias obtidas das espécies que não podem ser utilizadas na composição de produtos tradicionais fitoterápicos, conforme Anexo I da Resolução - RDC nº 26, de 13 de maio de 2014, que dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos e o registro e a notificação de produtos tradicionais fitoterápicos; e (IV) óleos e gorduras parcialmente hidrogenados (BRASIL,2018a).

Mediante as novas diretrizes adotadas, um estudo foi realizado por Dal Molin e colaboradores em 2018 referente a um panorama geral de como se encontram os produtos atualmente comercializados. Foram adquiridos 44 suplementos alimentares onde analisaram os ingredientes declarados, rotulagem e alegações comerciais. Dentre as amostras estudadas, 34,2 % não poderiam ser enquadradas na atual legislação que define suplementos alimentares, 16% dos produtos deveriam ser comercializados como medicamentos, devido a presença de substâncias não permitidas. Em relação a apelos comerciais em torno de 97,7% apresentaram expressões não permitidas pois não possuíam comprovação científica. Vale relatar que o setor regulado tem o prazo de cinco anos para se adequar às novas resoluções (DAL MOLIN et al, 2019).

Como visto a ANVISA vem se aprimorando para fechar as lacunas entre legislação, fabricação e assim reduzir a comercialização de possíveis formulações fraudulentas, mas o mercado não se faz somente de produtos nacionais, sendo assim devemos dar destaque aos maiores exportadores como UE e EUA.

A legislação brasileira assim como a europeia diferencia suplementos de medicamentos, logo substâncias farmacológicas são expressamente proibidas em produtos classificados como suplemento alimentar, entretanto na UE essas substâncias são permitidas nas formulações classificadas como “borderline products” ou produtos limitados, onde fármacos são encontrados a baixo de concentrações terapêuticas, sob condição da sua composição e concentração estar descrita no rótulo (EC,2003).

A legislação americana difere da brasileira no aspecto referente a rotulagem dos produtos. É permitido várias alegações estampadas nos produtos, como benefícios relacionados ao uso do suplemento, o bem-estar proporcionado se consumido, o resultado prometido do nutriente da formulação (FDA,1995). Foi

aprovado em 1994 o DSHEA (Dietary Supplement Health and Education Act), determinando que todos os suplementos seriam definidos como alimento, mesmo que as substâncias em suas formulações fossem vitaminas, minerais, ervas e até mesmo fármacos (DSHEA, 1994). Diante deste panorama é notório a divergência de legislações e mediante a facilidade de adquirir suplementos alimentares em diferentes linhas de mercado, subentende-se a possibilidade de termos substâncias proibidas sendo consumidas pelos brasileiros.

2.3 ADULTERAÇÃO DE SUPLEMENTOS ALIMENTARES POR ESTIMULANTES, ANOREXÍGENOS E DIURÉTICOS.

Atualmente o excesso de peso e a insatisfação com o próprio corpo afetam milhões de pessoas, em alternativa a mudança de estilo de vida os suplementos ditos inofensivos que prometem efeitos rápidos de emagrecimento são bastante visados. Nesse contexto o próprio fabricante para satisfazer a expectativa do consumidor e garantir a eficácia prometida, visando apenas o aumento do lucro e das vendas, de forma intencional, incorpora em suas formulações, substâncias farmacêuticas não declaradas, aproveitando-se da inexistência de um regulamento prévio da avaliação de segurança antes de sua comercialização (PAIGA et al., 2018).

De acordo com a pesquisa realizada pelo Food Drug Administration (FDA) nos EUA, entre 2007 e 2014, em 572 suplementos alimentares foram identificadas drogas não declaradas e os principais grupos de produtos identificados foram, para desempenho sexual (238), perda de peso (228) e aumento da musculatura (90) (NEVES, CALDAS, 2015). Vale ressaltar o grande risco que a adulteração causa para atletas de competição de alto nível, colocando em risco anos de carreiras, uma vez que a Agência Mundial Antidopagem (WADA) não diferencia doping deliberado de inadvertido, sendo responsabilizado estritamente o atleta que faz uso do suplemento (WADA. 2015).

Desta forma, existem relatos recentes na literatura envolvendo a prática de adulteração de suplementos dentro e fora do Brasil (CZEPIELEWSKA, et al., 2018; MULLER et al., 2018; CARVALHO et al., 2012; HACHEM et al., 2016). De acordo com a base de dados da UE, Sistema de Alerta Rápido para Alimentos e Rações (RASFF)

entre os anos de 2003 a 2016 observou-se um significativo aumento no número de notificações relacionada a composições não autorizadas em suplementos dietéticos, sendo que em 2003 as notificações eram inexistentes e no ano de 2014 obtiveram um número superior 100, entre as substâncias mais notificadas encontram-se, sibutramina, fármaco emagrecedor e sildenafil, medicamento para disfunção erétil (CZEPIELEWSKA, et al., 2018).

No Brasil passou a ser considerado crime quem falsificar, adulterar ou alterar produto destinado a fins terapêuticos conforme o Art. 273 do código penal, onde quem importa, expõe à venda, ter em estoques, distribuir ou entregar para consumo o produto falsificado, está sujeito a reclusão de 10 a 15 anos (BRASIL, 1940).

Em 2018 Muller e colaboradores realizaram uma análise de 113 suplementos alimentares, onde cerca de 12% encontravam-se adulterados por diuréticos, este estudo foi realizado no Brasil ficando clara a probabilidade de livre consumo em território nacional. Em outro estudo foram avaliadas 106 amostras de diferentes estados brasileiros, denominadas como produtos fitoterápicos para perda de peso, no entanto, quatro delas estavam adulteradas com femproporex ou sibutramina (CARVALHO et al., 2012).

Entre as 160 amostras de suplementos alimentares comercializadas para emagrecimento analisadas por Hachem e colaboradores (2016), quarenta e três continham sibutramina como adulterante, nove fenolftaleínas e o sildenafil foi encontrado em doze amostras, no entanto todas eram declaradas como naturais, os produtos haviam sido adquiridos principalmente em sites da internet e em algumas lojas físicas especializadas.

Os suplementos alimentares são comercializados como benéficos a saúde prometendo melhorar o desempenho físico e mental, no entanto a adulteração vem apresentando sérias consequências para aqueles que os consomem, como na sua rotulagem é oculta a substância de adulteração, interações medicamentosas podem ocorrer com medicamentos prescritos por um médico e não serem devidamente identificadas, pois ambos não estão cientes da possível adulteração (BIESTERBOS et al., 2019).

2.3.1 Riscos em decorrência da adulteração de suplementos alimentares

De um ponto de vista farmacológico e toxicológico suplementos alimentares adulterados representam uma grande ameaça ao público que os consome, visto que a farmacodinâmica e seus aspectos relacionados à segurança são desconhecidos na forma de administração por parte dos consumidores, podendo vir a originar efeitos adversos que podem pôr a vida dos usuários em perigo (ZUNTAR et al., 2018). Também se torna de grande relevância levar em conta a individualidade do consumidor, visto que possuem idades variadas, modelos fisiológicos e necessidades nutricionais diferentes, sem contar no padrão de vida individual. Assim sendo a veracidade de produtos livres de contaminantes podem garantir um alto nível de segurança a diferentes grupos de consumidores (VERKERK et al., 2010).

Neste contexto é observado na literatura a existência de relatos referente aos efeitos colaterais e tóxicos relacionados ao uso de suplementos para perda de peso (KARTH et al., 2010; NYKAMP et al., 2004; KARTH et al., 2010; CDC, 2013; NAVARRO et al., 2017). KARTH, em 2010 relatou a ocorrência de distúrbios cardíacos, relacionado a suplemento a base de epigalocatecina, um componente farmacologicamente ativo do extrato de chá verde, usado para perda de peso. A paciente fez uso por duas semanas do suplemento até vir a apresentar os primeiros sintomas, dor torácica e palpitações. Acredita-se que a epigalocatecina prolongue o potencial de ação arterial do coração o que explica o surgimento dos sintomas, além disso estudos demonstram que a substância não apresenta potencial emagrecedor significativo, como é relatado em seu rótulo (KARTH et al., 2010).

O uso de um suplemento a base de múltiplos componentes contendo também *Citrus aurantium* (laranja amarga) na formulação, possivelmente ocasionou o infarto do miocárdio de uma paciente de 55 anos, sendo que a mesma não apresentava históricos de doença vascular ou hipertensão anteriormente. A laranja amarga é rica em sinefrina tendo potencial de suprimir o apetite da mesma forma que a efedrina, seu efeito simpaticomimético pode causar vasoconstrição, bem como aumentos na frequência cardíaca e alteração na pressão arterial especialmente (NYKAMP et al., 2004).

Estima-se que nos EUA as lesões hepáticas tenham aumentado em níveis proporcionais ao aumento do consumo de suplementos alimentares, sendo responsável por 20% dos casos de hepatotoxicidade. Entre os principais responsáveis pelo fato, incluem-se esteroides anabolizantes, extrato de chá verde e suplementos nutricionais com vários ingredientes. É o caso do OxyELITE Pro®, suplemento para perda de peso e agente de construção muscular. Onde sete pessoas desenvolveram hepatite aguda grave no Havaí no ano de 2013, todos tendo em comum o relato de fazer uso do mesmo suplemento alimentar. Foi identificado a presença de aegeline, um alcaloide encontrado no fruto da árvore *Aegle marmelos*, normalmente utilizado para tratar problemas digestivos. Os pesquisadores não obtiveram relatos afirmando que a argelina causasse problemas hepáticos, contudo há a possibilidade de que a adulteração tenha ocorrido de forma sintética (CDC,2013; NAVARRO et al., 2017).

Os medicamentos geralmente mais associados a adulteração de suplementos alimentares que visam a perda de peso incluem uma série de classes farmacológicas. Nesse contexto os anorexígenos como femproporex, sibutramina, são normalmente utilizados para induzir à saciedade, causando uma rápida perda de apetite. Outras classes como diuréticos, laxativos, estimulantes e antidepressivos são descritos na literatura como os mais utilizados na prática de adulteração sintética (CARVALHO et al., 2011).

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

2.3.2 Estimulantes

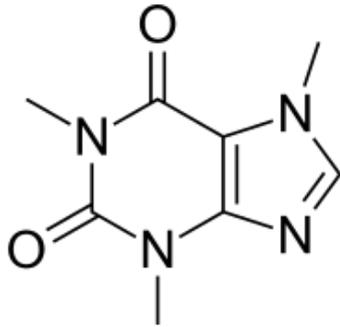
Os suplementos conhecidos como termogênicos tem como principal mecanismo o aumento da taxa metabólica em repouso, que gera a perda de gordura. É habitual ser observado que a maioria dos termogênicos contém a combinação de alguma substância associada a cafeína, essa por si só promove a ativação dos receptores β 2 e β 3 adrenérgicos e AMP cíclico promovendo queima de gordura (CAMPBELL et al., 2018).

2.3.2.1 Cafeína

A cafeína é um alcaloide natural pertencente ao grupo das metilxantinas, encontrada naturalmente no café, chá, cacau e guaraná. É classificada como um estimulante do sistema nervoso central proporcionando um aumento na concentração mental, estado de alerta e energia. Além disso é uma das principais substâncias das indústrias de suplementos alimentares, por apresentar baixo custo, grande quantidade de matéria prima e auxiliar de forma significativa na termogênese e melhora no desempenho de exercícios de média e alta intensidade (RIBEIRO et al., 2019). A quantidade considerada segura de cafeína é de 210 a 420 mg, já em doses excessivas que equivalem a 2000mg, podem afetar o sistema cardiovascular, causando taquicardia, hipertensão e arritmias (GURLEY et al., 2015). Na UE, as bebidas contendo mais de 150 mg/mL de cafeína, devem ser rotuladas como “alto teor de cafeína”. Nos EUA, a cafeína deve ser listada como ingrediente, mas não há exigência de quantidade de cafeína no rótulo (DO et al., 2019)

Apesar da cafeína não ser uma substância estritamente proibida e estar presente em vários suplementos, nem sempre a dosagem referenciada no rótulo é a mesma contida na embalagem. Além disso, muitas indústrias utilizam fontes naturais de cafeína, como o guaraná, sem ciência exata da dose total contida no produto final (GEYER et al., 2008). No entanto, para acelerar a perda de peso, muitas destas formulações apresentam a adição indiscriminada e ilegal destes compostos em produtos comerciais (SANTOS et al., 2016). Sua fórmula estrutural pode ser encontrada na figura 1.

Figura 1 - Estrutura química da cafeína.



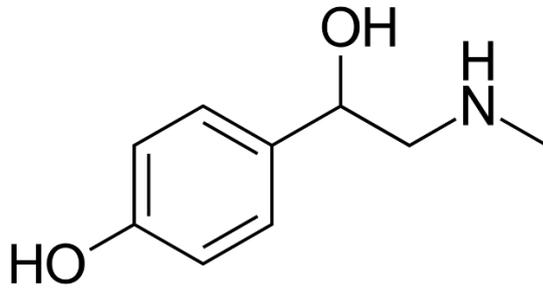
Fonte: autor

2.3.2.2 Sinefrina

A sinefrina é naturalmente encontrada no *Citrus aurantium* uma árvore da família *Rutaceae* conhecida popularmente por Laranja Amarga e empregada a mais de 20 anos na composição de suplementos termogênicos. Possui capacidade de ligação a receptores β_3 -adrenérgicos acarretando em aumento da lipólise, resistência esportiva e supressão do apetite (KUBO et al., 2005; ROSSATO et al., 2011). No entanto, foi observado que essa amina age também em adrenoreceptores β_1 e β_2 , o que leva ao desenvolvimento de efeitos adversos graves se o seu consumo for de forma indiscriminada (KAEFER et al., 2015). Como são apontados relatos de alterações cardíacas, convulsões, hipertensão, tontura, insônia entres outros sintomas devido ao uso da *p*-sinefrina e *Citrus aurantium* (FUGH; MYERS., 2004).

Em 2019 um estudo realizado por Alves e Capela identificou a presença de sinefrina em 16 de 37 amostras de suplementos alimentares, onde vários deles ultrapassavam a dose preconizada segura pelas autoridades de saúde, que vem a ser no 12 mg/dia ao contrário do fabricante que recomendava o equivalente a 200 mg/dia. Foi relatado também a presença da sinefrina na formulação concomitantes a outros termogênicos, por exemplo a cafeína, o que pode originar efeitos adversos graves que não seriam observados se a sinefrina fosse administrada isoladamente. Sua fórmula estrutural pode ser encontrada na figura 2.

Figura 2 - Estrutura química da sinefrina.



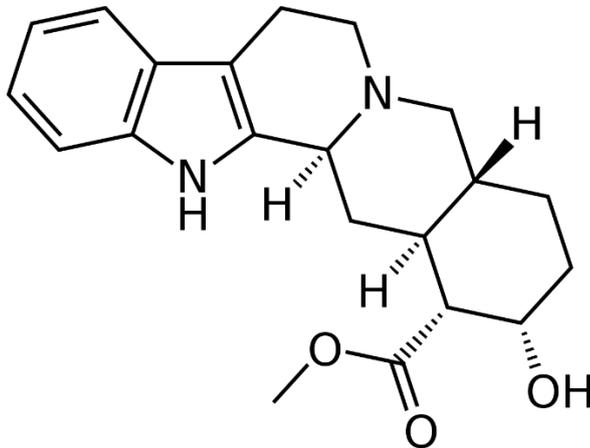
Fonte: autor

2.3.2.3 Ioimbina

A ioimbina é alcaloide naturalmente encontrado nas árvores de *Pausinystalia yohimbe* e *Rauvolfia serpentina* nativas da África. Atua como um antagonista de α_2 receptores promovendo um aumento da atividade do sistema nervoso simpático e consequentemente acarreta o aumento da lipólise induzida por catecolaminas. Doses em torno de 1 a 5 mg já causam efeitos fisiológico em humanos, mas normalmente em formulações encontram-se doses em torno de 5 a 30 mg. É usada tradicionalmente como estimulante sexual e possui efeitos colaterais como aumento da pressão arterial, irritabilidade, transpiração excessiva entre outros. Entretanto seu uso vem sendo implantado em suplementos alimentares, como bebidas energéticas e formulações que visam a perda de peso, onde nem sempre a ioimbina é listada como ingrediente (CIMOLAI, 2017).

Em um estudo realizado por Sommer e colaboradores (2011) acompanhou 20 atletas do sexo masculino que consumiam diariamente 20 mg de ioimbina, foi observado uma diminuição da gordura corporal sem perda de massa muscular. A fórmula estrutural pode ser observada a baixo na Figura 3.

Figura 3 – Estrutura química da loimbina.



Fonte: autor

2.3.3 Diuréticos

São fármacos que promovem uma diurese forçada, cujo mecanismo básico é inibir a reabsorção tubular de sódio e água ou seja, elevam a excreção de água do corpo, o que justifica o motivo pelo qual são adicionados ilegalmente em suplementos alimentares. Seu uso clínico está diretamente ligado ao tratamento de hipertensão e edemas. A classes de diuréticos representada neste trabalho, será a hidroclotiazida, um tiazidico, que como efeito colateral apresenta perda de apetite, visão turva, fraqueza e tontura respiratórios (WOO et al., 2013; MARTELLI; LONGO; SERIANI, 2008).

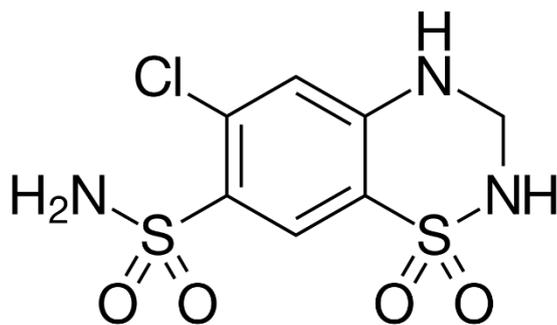
No meio esportivo os diuréticos são utilizados indevidamente com dois propósitos, para promover a eliminação de substâncias anteriormente ingeridas por meio de uma diurese foçada ou para facilitar a perda de peso (DEVENTER et al., 2009). Sendo eles substâncias proibidas desde 1988 pela WADA, dentro e fora de competições, ao mesmo tempo considerados como a classe mais provável de adulteração consumida por atletas, para melhoria no desempenho em competições (HELMMLIN et al., 2016).

2.3.3.1 Hidroclorotiazida

A hidroclorotiazida é um diurético tiazídico um dos primeiros anti-hipertensivos disponibilizados para uso da população, atua basicamente sobre o túbulo distal, bloqueando o cotransportador de sódio e cloro na membrana lúmen das células tubulares, fazendo com que 5 a 10% do filtrado glomerular passe para a urina. A diurese ocasionada proporciona ação vasodilatadora, diminuindo o volume sanguíneo assim levando a redução da pressão arterial (RANG, 2016).

Segundo Muller e coautores é simples a obtenção de suplementos alimentares em sites on-line que declaram ter efeito emagrecedor, redutor de apetite e queimado de gordura, porém em sua formulação foram identificados diuréticos como hidroclorotiazida e furosemida em concentrações acima das suas doses terapêuticas (MULLER et al., 2018b). A fórmula estrutural da hidroclorotiazida pode ser observada a seguir na Figura 4.

Figura 4- Estrutura química da hidroclorotiazida.



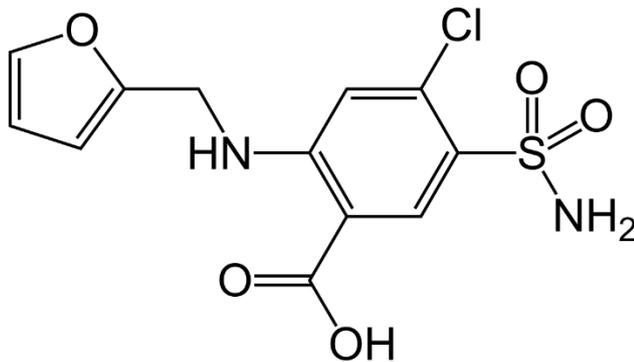
Fonte: autor

2.3.3.2 Furosemida

A furosemida é classificada como diurético de alça, agindo na membrana luminal das células da alça de Henle, favorecendo a redução da reabsorção de sódio e água, tendo como resultado a diurese. Por possuir efeito vasodilatador devido a

diminuição da retenção de sódio, tem sido bastante empregada no tratamento de cirrose hepática, doença renal crônica, hipertensão, insuficiência cardíaca, entre outros (DIAS et al., 2004). Suplementos alimentares com este tipo de substância não declarada podem ser consumidos durante muito tempo sem devido conhecimento e causar alterações nos níveis de eletrólitos no sangue. Por aumentarem a excreção de água do corpo são uma alternativa efetiva para promover a perda de peso (WOO et al., 2013). Representação da Furosemida apresentada na Figura 5.

Figura 5 - Estrutura química da furosemida.

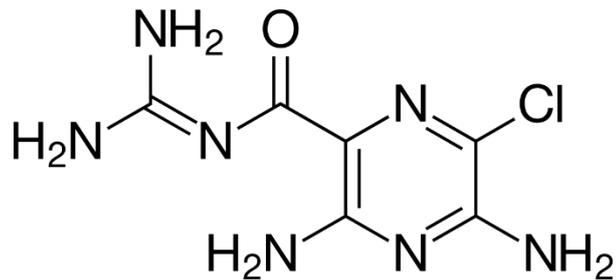


Fonte: autor

2.3.3.3 Amilorida

Fármaco classificado como diurético poupador de potássio a amilorida tem como principal local de ação o néfron, atuando sobre os túbulos coletores e ductos coletores, interfere na reabsorção de sódio por bloqueio dos canais de sódio luminiais, favorecendo a retenção de potássio e eliminação de água e eletrólitos (JACKSON, 2003; THAKRAL, 2008; MYUNG et al., 2008; GUIMARÃES, 2016). Os diuréticos tiazídicos e de alça são largamente utilizados no tratamento da hipertensão arterial, no entanto seu constante uso pode diminuir os níveis plasmáticos de potássio, podendo ocasionar diminuição na captação da glicose, câimbras e fraqueza, como alternativa a essa problemática a amilorida, sendo um retentor de potássio, é bastante empregada. Sua fórmula estrutural pode ser encontrada na Figura 6

Figura 6– Estrutura química da amilorida.



Fonte: autor

3.2.4. Anorexígenos

Em 2017 foi autorizada a produção, comercialização e consumo das substâncias ditas anorexígenas, utilizadas para tratamento da obesidade, sendo elas sibutramina, anfepramona e femproporex conforme a Lei nº 13.454. No entanto seu uso só é permitido mediante receituário médico tipo B2 não ultrapassando consumo superior a 30 dias.

Os anorexígenos são conhecidos como supressores de apetite que promovem a perda de peso através do aumento da sensação de saciedade e redução do apetite. Seu mecanismo de ação envolve os neurotransmissores no sistema nervoso central (SNC), promovendo a liberação e não recepção da dopamina e noradrenalina das terminações nervosas as quais estão relacionadas ao estado emocional e saciedade (NAPPO et al., 1993).

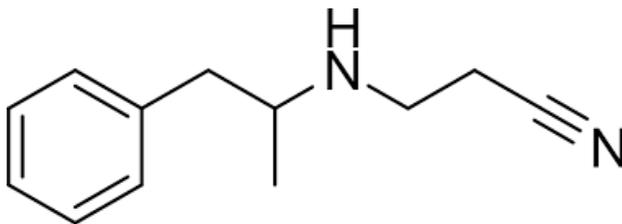
3.2.4.1 Femproporex

O femproporex é sintetizado a partir de modificações na estrutura química da anfetamina (α -metil- β -fenetilamina), produzindo derivados β -fenetilamínicos com influência na neurotransmissão noradrenérgica e dopaminérgica (HALPERN; MANCINI, 2003). A síntese visa aumentar o efeito anoréxico e reduzir o efeito estimulante central. Assim acreditou-se que o femproporex estaria livre dos efeitos estimulantes das anfetaminas. Por esse motivo, ele foi recomendado como

medicamento anorexígeno para tratamento de pacientes obesos com doenças cardiovasculares. No entanto reações como inquietude, nervosismo, irritabilidade, insônia, agressividade, psicose, transtorno obsessivo-compulsivo, ansiedade generalizada e pânico são comumente associadas ao seu uso (BELL, et al. 2001).

Em 2011, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) determinou o cancelamento dos registros dos medicamentos anfepramona, femproporex e mazindol e implantou regras mais rígidas de controle sobre a venda de sibutramina no Brasil. Apresentação da fórmula estrutura do femproporex pode ser observado na Figura 7.

Figura 7- Estrutura química do femproporex

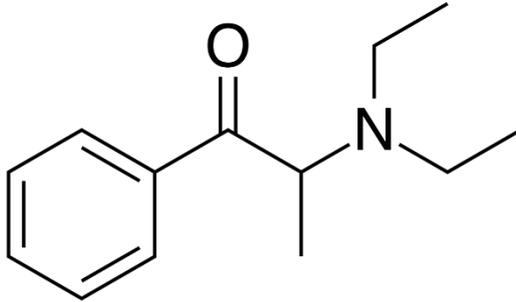


Fonte autor.

3.2.4.2 Anfepramona

Anfepramona, também conhecida como dietilpropiona apresenta efeitos mediados pela ação nos neurônios dopaminérgicos, promovendo, como outros medicamentos do tipo anfetamínicos, aumento da liberação de dopamina nos terminais pré-sinápticos. Pode apresentar alterações na pressão arterial e a frequência cardíaca sendo, portanto, contraindicados para pacientes com doenças cardiovasculares (CHEUNG, 2011). Desde a sua incorporação no mercado mundial em 1980 foi classificada como substância de alto risco e seu controle sendo exigido a nível internacional. É possível observar sintomas de irritabilidade, delírio e euforia mesmo se o consumo for feito em doses terapêuticas (SARDELA et al., 2018). Sua forma estrutural pode ser encontrada na Figura 8.

Figura 8 - Estrutura química da anfepramona.

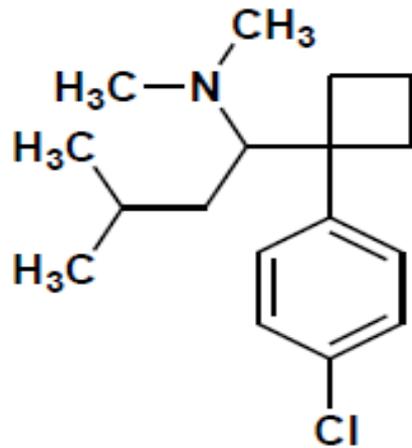


Fonte: autor

3.2.4.3 Sibutramina

A estrutura da sibutramina é semelhante as anfetaminas, seu mecanismo de ação é capaz de inibir a recaptação de neurotransmissores, resultando em maiores concentrações de serotonina e noradrenalina nas fendas sinápticas, procriando a diminuição do apetite e sensação de saciedade, sendo estes um dos principais motivos para ser um dos metabólitos mais encontrado como adulterante em suplementos alimentares (DECONINCK et al., 2014). Mesmo com a proibição da comercialização da sibutramina pela Agencia Europeia de Medicamentos (EMA) devido ao aumento de casos como ataque cardíaco, são recorrentes os casos encontrando formulações com a substância como mostra a literatura (BIESTERBOS et al., 2019, JUNG et al.,2006, VIDAL et al.,2006, ARIBURNU et al.,2012). Sua apresentação pode ser observada a baixo na Figura 9.

Figura 9 - Estrutura química da sibutramina



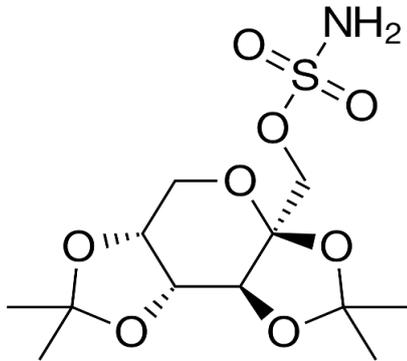
Fonte: autor

3.2.4.4 Topiramato

Devido seus variados mecanismos de ações como bloqueio de canais de sódio dependentes, inibição de receptores de glutamato, aumento da abertura de canais de cloreto mediados por GABA, inibição da anidrase carbônica e aumentando a condutância do potássio, o topiramato que habitualmente era utilizado no tratamento da epilepsia, e no tratamento da enxaqueca desempenha agora um papel no tratamento da obesidade, devido seus efeitos adversos serem a perda de peso e anorexia (MANZINI et al.,2019).

O mecanismo pelo qual o topiramato induz a perda de peso parece não envolver mecanismos noradrenérgico e serotoninérgicos e sim alteração da eficiência de utilização de energia, aumentando a termogênese (KIM et al.,2020). Sua fórmula estrutural pode ser observada na Figura 10.

Figura 10- Estrutura química do topiramato.



Fonte: autor

2.4 METODOLOGIAS ANALÍTICAS EMPREGADAS NA AVALIAÇÃO DE SUPLEMENTOS ALIMENTARES

Com o crescente consumo de suplementos alimentares pela população e a motivação econômica envolvida, a sua adulteração deixou de ser algo que vem a ocorrer esporadicamente, tornando assim complexa a detecção e identificação de formulações fraudulentas (HONG et al., 2017). A identificação exata da composição química dos suplementos alimentares, visto que são misturas de uma variedade complexa de componentes, vem a ser o primeiro passo para determinação de quais substâncias podem vir a ser responsáveis por causar um possível dano a saúde do consumidor (NAVARRO et al., 2017).

Sendo assim, métodos analíticos aplicáveis que proporcionem uma análise rápida e confiável de drogas sintéticas faz-se necessários, a fim de manter a qualidade e segurança dos produtos. Na literatura o método mais frequentemente aplicado costuma ser a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) por possuir uma alta capacidade de separação. A detecção por espectrometria de massa acoplada (LC-MS) também é vantajosa por possibilitar a confirmação estrutural do adulterante. Tempo curto de análise e baixo consumo de reagentes, estão entre as vantagens da eletroforese capilar (CE) (CARVALHO; et al., 2011).

O Quadro 3 resume os principais métodos descritos na literatura nos últimos anos para análise de suplementos alimentares, especificando o adulterante e a técnica analítica empregada. Em seguida, são descritas as principais características das metodologias utilizadas neste trabalho.

Quadro 3 – Métodos analíticos descritos na literatura para a determinação de adulterantes em suplementos alimentares recentemente.

SUBSTÂNCIAS	MÉTODO DE IDENTIFICAÇÃO	REFERÊNCIA
Diuréticos e estimulantes.	HPLC-PAD	MÜLLER et al., 2018a
Diuréticos, antidepressivos, laxantes e anorexígenos	CZE-UV-C4D	MÜLLER et al., 2018b
Estimulantes, anorexígenos, ansiolíticos, antidepressivos, diuréticos e laxantes	HPLC-PAD	MURATT et al., 2018
Cafeína	HPLC-DAD	RIBEIRO et al., 2019
Cafeína	HPLC-DAD e UHPLC-MS/MS	VIANA et al., 2018
Cafeína e sibutramina	LC-MS/MS	PASCALI et al., 2018
Hipoglicemiantes	LC-MS/MS	KIM et al., 2019
Sibutramina, fenolftaleína, sildenafil	HPLC	AHMED et al., 2019
29 drogas para perda de peso	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
Estimulantes e anorexígenos	LC-MS	STRANO-ROSSI et al., 2015
Anfetaminas e derivados	CE-MS/MS	DOS SANTOS et al., 2016

CE- Eletroforese Capilar

DAD- Detecção por arranjo de diodos

HPLC- Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

LC- Cromatografia Líquida

MS- Massas

MS-MS Massas tandem

UV- Ultravioleta

Fonte:autor

2.4.1 Eletroforese Capilar

Há anos a eletroforese capilar (CE) vem ganhando notoriedade como método de separação de compostos, sendo uma evolução instrumental das tradicionais técnicas de eletroforese em gel. Desde a sua introdução, a CE vem demonstrando um grande potencial tanto na análise de biopolímeros onde já vinha sendo empregada habitualmente, como em áreas onde a eletroforética nunca havia sido testada anteriormente (TAGLIARO et al., 1998).

A CE tem sido muito empregada na determinação de uma variedade de amostras complexas pelo fato de apresentar algumas vantagens sobre os demais métodos de separação analíticos. Suas características mais relevantes são a alta eficiência de separação, baixo consumo de reagentes e amostras, tempo de análise reduzido, simplicidade do equipamento utilizado e alto grau de automação (MOREIRA et al, 2014).

A técnica se baseia na migração de compostos neutros, iônicos ou ionizáveis, mediante aplicação de um campo elétrico de alta voltagem (10-30kV), conduzida através de tubos capilares preenchidos internamente com um eletrólito condutor (TAVARES ,1997). A detecção e a separação ocorrem internamente no capilar de pequeno diâmetro (20 a 100cm de comprimento e 25 a 100 μ m de diâmetro interno) normalmente constituídos de sílica fundida, sua superfície interna pode ser não revestida, deixando as paredes diretamente em contato com tampões e solutos, ou revestida por polímeros, protegendo a sílica de interações com o soluto (TAGLIARO et al., 1998).

A injeção das amostras ocorre por técnica eletrocinética ou por via hidrodinâmica. A execução da técnica com a utilização de capilares de sílica fundida gera o chamado fluxo eletroosmótico (EOF), que consiste na interação da solução utilizada com eletrólito e a superfície interna do capilar. A sílica fundida possui a presença de grupamentos silanóis (-SiOH) internamente, que em contato com o meio aquoso alguns desses grupos serão ionizados e com isso a superfície do capilar torna-se carregada negativamente, com a aplicação do campo elétrico forças elétricas promovem a movimentação dos íons para o eletrodo de carga oposta (SPUDEIT et al., 2012).

O sistema de detecção está localizado no final do capilar para quantificação ou identificação dos compostos podendo ser condutométrica sem contato capacitivamente acoplada (C⁴D) e a universalmente adotada absorção de UV (UV) (BOONE et al., 1999).

Dentro da CE existem inúmeros modos de operação, com diferentes mecanismos de separação, todos podendo ser executados usando o mesmo equipamento o que a torna ainda mais versátil e flexível. Os que possuem maior aplicabilidade são respectivamente: eletroforese capilar de zona (CZE), cromatografia eletrocinética micelar (MEKC) e eletroforese capilar em gel (CGE) (BOONE et al., 1999).

Em razão da sua facilidade de implementação a CZE é na prática um dos métodos mais utilizados, consiste em preencher o capilar com o eletrólito geralmente com características tamponantes e os analitos iônicos serão separados sob aplicação de um campo elétrico com base na sua mobilidade eletroforética (TAGLIARO et al., 1998). A MEKC é usualmente implementada na separação de compostos neutros, com base na partição diferencial dos solutos entre o interior hidrofóbico da micela e a

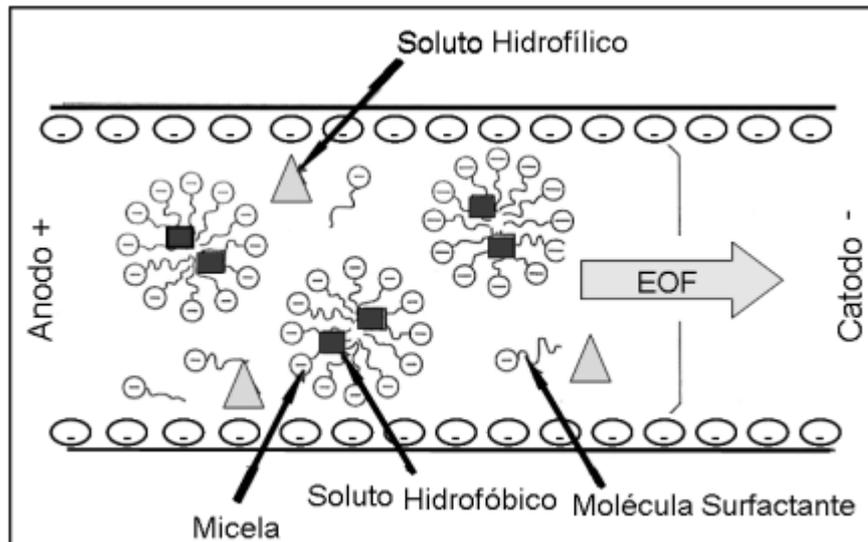
fase móvel (FENG et al., 2017). Já a CGE separa compostos com base em suas dimensões, normalmente possuem caráter iônico e a alta massa molecular, migram através do gel, estrutura porosa em que um componente fluido é imobilizado numa rede polimérica, sendo está seletiva a passagem de diferentes tamanhos estruturais, condição necessária para a separação ocorrer (TAVARES,1997).

2.4.2 Cromatografia Eletrocínética Micelar

A MEKC foi introduzida em 1984 por Tarebe e colaboradores, como uma versão modificada de eletroforese capilar, capaz de separar tanto compostos neutros quanto carregados, técnica que consiste na adição de agentes tensoativos iônicos em condições apropriadas para a formação de micelas, ao eletrólito de corrida. Sendo assim obtêm-se um sistema cromatográfico de duas fases, onde o eletrólito representa a fase primária transportada sob ação do campo elétrico, enquanto que as micelas são a fase secundária ou “pseudoestacionária” as quais interagem com os solutos conforme os mecanismos de particionamento, sendo assim responsável pela seletividade de separação.

Habitualmente o surfactante que mais têm se utilizado vem sendo o dodecil sulfato de sódio (SDS), formador de micelas aniônicas que são atraídas eletrostaticamente para o ânodo, mas devido a velocidade predominante do EOF elas migram mais lentamente que a maior parte do líquido, em direção ao cátodo, ou seja, direção do detector. Dependendo do equilíbrio individual de partição dos diferentes analitos, entre o núcleo hidrofóbico das micelas e o tampão aquoso, será observado um efeito retardador nos analitos neutros, originando assim a separação no interior do capilar (TAGLIARO et al., 1998). Como é possível observar na figura 11.

Figura 11 - Representação esquemática da separação por MEKC usando micelas aniônicas



Fonte: adaptado de (NURSTEN, 2000).

Por se uma técnica com extensa variedade de aplicação a MEKC oferece vantagens em relação a outros métodos de separação, como sua instrumentação ser básica idêntica a empregada em CZE, no entanto mais versátil, por poder explorar diferentes mobilidades eletroforéticas para separar solutos iônicos e ao mesmo tempo diferentes distribuições entre a fase micelar e eletrólito, para separação de solutos neutros (TAVARES, 1997).

A MEKC já demonstrou ser bastante eficiente na identificação de fármacos como mostra Nussbaumer e colaboradores, em que foi possível a determinação de quimioterapias à base de platina sendo elas, cis - platina, carboplatina e oxaliplatina, fazendo uso de eletrólito contendo SDS 80mM, sendo assim o método considerado de grande importância para o controle de qualidade de formulações farmacêuticas (NUSSBAUMER et al.,2011). Segundo Cheng em 2001 através da aplicação de MEKC foi possível a determinação de 16 drogas encontradas como adulterantes em formulações ditas naturais da medicina tradicional chinesa, sendo essas pertencentes as classes farmacológicas: anti-inflamatórias, analgésicas, antipirética e ansiolítica. Como podemos observar na literatura, são escassos os estudos envolvendo a técnica

em MEKC relacionadas a adulteração por substâncias sintéticas envolvendo suplementos alimentares.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 INSTRUMENTAÇÃO E REAGENTES

O método utilizado para determinação de adulterantes em suplementos alimentares foi desenvolvido em um equipamento de eletroforese capilar construído em laboratório no ano de 2009 por CARVALHO et al., conforme figura 12, acoplado a um detector por condutividade sem contato (CE-C⁴D) 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).

Ainda foram utilizados balança analítica Srtorius® (Alemanha) com quatro casa de precisão, pHmetro digital Metrohm® 827 pHlab (Suíça) com eletrodo de vidro combinado, banho ultrassônico Unique® (São Paulo, Brasil) para desaerar o eletrólito, padrões e amostras e bomba de vácuo Primatec® 131/132 (Brasil). Capilar de sílica fundida 75µm de diâmetro interno UV transparente (TSU) e capilar revestido de álcool polivinílico (PVA) 100µm de diâmetro interno e 60cm de comprimento Agilent Technologic®. Na figura abaixo é possível observar o equipamento utilizado nas medidas eletroforéticas.

Figura 12- Foto do equipamento de eletroforese capilar construído em laboratório.



Fonte: autor

Para o desenvolvimento do método, foram utilizados reagentes e solventes de alto grau de pureza, como metanol e acetonitrila grau HPLC Tedia®, fosfato de sódio Merck®, dodecil sulfato de sódio Merck®. A água ultrapura foi obtida através de sistema Milli-Q Synergy UV (Merck Millipore, Darmstadt, Alemanha).

Como padrões analíticos de referência foram utilizadas matérias-primas de grau farmacêutico, obtidos em distribuidoras de insumos farmacêuticos e farmácias de manipulação, acompanhados de certificados de análises de controle de qualidade. Os fármacos em estudo (Tabela 2) são respectivamente estimulantes (cafeína,

sinefrina, ioimbina), diurético (hidroclorotiazida) e anorexígeno (femproporex). As concentrações das soluções-padrão dos analitos estudados foram de 1 g L⁻¹, posteriormente mantidas refrigeradas e a partir das soluções estoque foram preparadas as soluções de trabalho, por meio de diluição em metanol.

Tabela 2 - Fármacos em estudo neste trabalho e suas respectivas características.

Estimulantes	pka	Fórmula molecular
Cafeína	14,0	C ₈ H ₁₀ N ₄ O ₂
Sinefrina	9,76	C ₉ H ₁₃ NO ₂
Ioimbina	14,64	C ₂₁ H ₂₆ N ₂ O ₃
Diurético		
Hidroclorotiazida	9,09	C ₇ H ₈ ClN ₃ O ₄ S ₂
Furosemida	4,25	C ₁₂ H ₁₁ ClN ₂ O ₅ S
Amilorida	8,7	C ₆ H ₈ ClN ₇ O
Anorexígeno		
Femproporex	7,88	C ₁₂ H ₁₆ N ₂
Sibutramina	9,77	C ₁₇ H ₂₆ ClN
Anfepramona	7,44	C ₁₃ H ₁₉ NO
Antidepressivo		
Topiramato	8,7	C ₁₂ H ₂₁ NO ₈ S

Fonte: drugbank,2021.

3.2 PROCEDIMENTOS ANALÍTICOS

3.2.1 Amostras de Suplementos Alimentares

A amostragem dos suplementos alimentares foi realizada pelo grupo de pesquisa do laboratório, onde foram adquiridos em torno de 130 produtos, através de sites brasileiros e lojas físicas. As amostras analisadas neste trabalho, foram selecionadas buscando o apelo para perda de peso, aumento da disposição e energia

e aumento de massa magra, somando um total de 20 amostras a serem avaliadas, as formas farmacêuticas encontradas foram: 6 como pó e 14 cápsulas contendo pó.

Segundo a rotulagem dos suplementos os principais componentes de suas formulações são cafeína, guaraná, chá verde, citrus aurantium, vitaminas, minerais, maltodextrina, proteína do soro do leite, erva mate, psillium e quitosana. O quadro 4 apresenta as 20 amostras que foram separadas de acordo com objetivo deste estudo, bem como seu código de identificação e sua composição.

Quadro 4 - Amostras de suplementos alimentares selecionados para esta pesquisa.

Número	Composição declarada	Forma farmacêutica	Posologia
1	Guaraná (Paullina cupana L., sementes), erva mate (Ilex paraguariensis St. Hill., folhas e talos), banana-prata (Musa paradisiaca L., frutos), chá verde (Camellia sinensis L., folhas), chá branco (Camellia sinensis L., folhas), chá preto (Camellia sinensis L., folhas), limão (Citrus limmonia Osbeck, casca do fruto e flores),	Pó	5 g uma vez ao dia
2	Citrus aurantium, chá verde colina, cromo, magnésio, vit. B3 e B6, vit. C e ácido fólico	Cápsula em gelatina dura contendo pó	4 cápsulas ao dia
3	Chá verde, laranja amarga, guaraná, vitaminas e minerais	Sachê em pó	1 sachê antes das refeições
4	Colina, cromo, magnésio e citrus aurantium	Cápsula em gelatina dura contendo pó	2 cápsulas ao dia
5	Guaraná em pó com alta concentração de cafeína, citrus, café verde, picolinato de cromo, suplemento vitamínico e mineral	Cápsula em gelatina dura contendo pó	4 cápsulas ao dia
6	Cafeína 420 mg	Cápsula em gelatina dura contendo pó	1 cápsula ao dia
7	Fibra de laranja amarga	Cápsula em gelatina dura contendo pó	2 cápsulas duas vezes ao dia

8	Cafeína anidra	Cápsula em gelatina dura contendo pó	2 cápsulas ao dia
9	Cafeína 220 mg	Cápsula em gelatina dura contendo pó	1 cápsula ao dia
10	Suplemento 100% cafeína para atletas	Cápsula em gelatina dura contendo pó	1 cápsula ao dia
11	Maltodextrina, Vitamina C, B3, B5, B2, B1, H, B12, CITRATO DE COLINA, ACIDO FOLICO, CROMO, cafeína, taurina, chá verde, citrus aurantium, gengibre e pimenta vermelha	Pó	2 doses de 6g ao dia
12	Laranja amarga, guaraná, chá verde, erva mate, canela do ceilão, gengibre, abacaxi, framboesa, maltodextrina	Pó	5g ao dia
13	Cafeína anidra, fibra de laranja, psillium, quitosana, vitaminas e minerais	Cápsula em gelatina dura contendo pó	2 cápsulas incolores duas vezes ao dia + 1 cápsula vermelha 1 vez ao dia
14	Cafeína, n-acetyl-L-tirosina, niacina, vit B6 e B12, camellia sinensis	Cápsula em gelatina dura contendo pó	1 cápsula duas vezes ao dia
15	Aminoácidos de cadeia ramificada	Pó	13,37g ao dia
16	L-valina, L-leucina, L-iso-leucina, vit. B6, arginina	Cápsula em gelatina dura contendo pó	4 cápsulas 1 vez ao dia
17	Dextrose, maltodextrina, creatina, guaraná, cálcio arginina quelato, cálcio ornitina quelato, taurina, VITAMINAS B1, B2, B3, B6, B12, C.	Pó	15g uma vez por dia
18	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, vit. C, vit. B3, vit. E, óxido de zinco, sulfato de	Tabletes	11 tabletes uma vez ao dia

	manganês, biotina, picolinato de cromo		
19	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 uma vez ao dia
20	Cafeína	Cápsula em gelatina dura contendo pó	2 cápsulas 1 vez ao dia

Fonte: autor.

3.2.2 Preparo das amostras

As amostras encontravam-se nas formas de cápsula de gelatina dura, pó à granel e sachê. Sendo estes todos sólidos, foram preparados *pools* do mesmo lote (n=10). Para determinar a massa do conteúdo das cápsulas e sachês, os invólucros foram pesados cheios (n=10), retirado o seu conteúdo, reunido em um pool, e então novamente pesados vazios. Os suplementos encontrados em pó à granel, foram amostrados retirando dez alíquotas de diferentes partes, até formar um *pool* correspondente a 5g de amostra. As soluções a serem analisadas foram preparadas a partir de 0,5 g de peso médio e dissolvidas em balão volumétrico de 25mL com metanol, sonicado por 30 minutos, filtradas previamente em algodão, para posterior filtração em membrana regenerada de 0,45µm, antes de ser diluído e injetado no sistema (Figura 13).

Figura 13- Esquema de preparo das amostras de suplementos alimentares em laboratório.



Fonte: autor

3.2.3 Método de separação por Eletroforese Capilar com Detecção por Condutividade sem contato e UV (CE-C⁴D/UV)

Todas as determinações eletroforéticas foram realizadas no equipamento de eletroforese capilar construído em laboratório (Figura 14). Os suplementos alimentares foram analisados pelo método de MEKC apenas por detecção UV, visto que pelo detector por condutividade não foi possível obter identificações. A fonte de alta tensão foi configurada para detecção indireta dos fármacos na forma catiônica, com injeção anódica e detecção catódica. O capilar utilizado no método foi de sílica fundida transparente (TSU) com 68cm de comprimento, (46 cm até o primeiro detector) 75µm de diâmetro interno e 360µm de diâmetro externo.

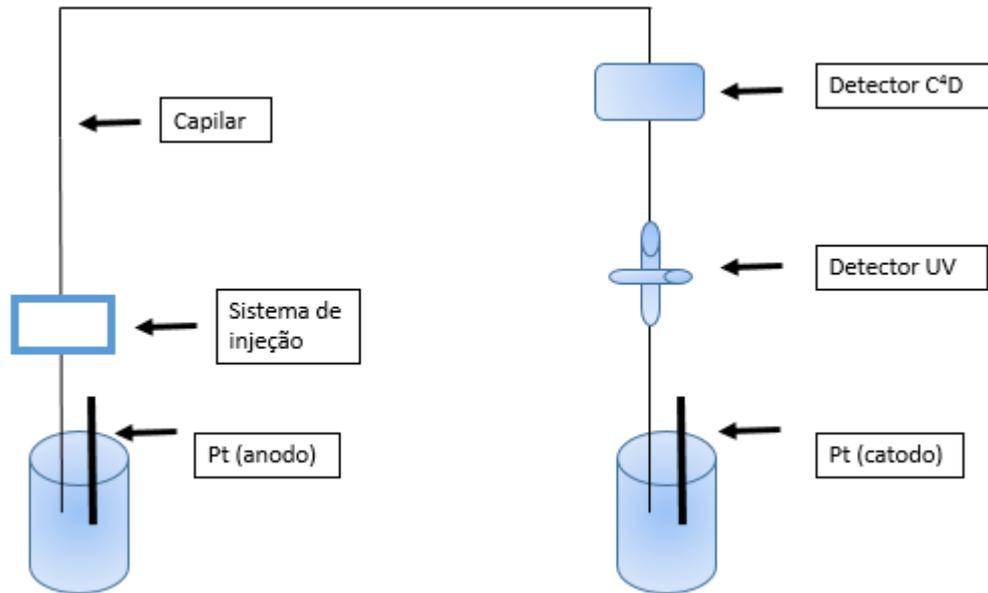
O capilar quando novo foi condicionado lavando-se com NaOH 1 mol L⁻¹ por 40 minutos, seguido de água ultrapura por 15 minutos e por fim eletrólito de trabalho por 30 minutos, utilizando vácuo a uma pressão constante de -600 mmHg. No início de

cada dia o capilar foi condicionado com NaOH 0,1 mol L⁻¹ durante 15 minutos e água ultrapura também por 15 minutos e por fim 30 minutos com eletrólito de trabalho. Entre as injeções de padrões e amostras o capilar foi lavado por 5 minutos com eletrólito de trabalho. Ao fim do dia o capilar era lavado com eletrólito por 15 minutos e água ultrapura por 15 minutos, afim de prolongar sua vida útil.

As amostras foram injetadas através da injeção hidrodinâmica, que consiste na elevação de uma das extremidades do capilar, até uma altura de 20 cm por 50 segundos, originando assim a entrada de determinado volume no interior do capilar. A temperatura de 25°C foi mantida no interior do sistema CE. Na fonte de alta tensão foi mantido o potencial de separação de 15 kV, a frequência de 400 kHz de acordo com Moreira e colaboradores (2013). O melhor comprimento de onda foi de 210nm para a detecção UV, escolhido mediante observação dos espectros de cada fármaco separadamente.

O eletrólito de trabalho após otimização foi fixado em tampão fosfato 50 mmol L⁻¹, SDS 50 mmol L⁻¹ e 20% de acetonitrila (v/v) com pH 9,6. Sendo este preparado diariamente com posterior filtração em membrana 0,45µm.

Figura 14 - Esquema do equipamento de CE construído em laboratório.



Fonte: autor

3.2.4 Parâmetros de validação

A validação analítica garante que o método forneça dados confiáveis, que atendam às exigências das aplicações analíticas, por meio de estudos experimentais que assegurem a confiabilidade dos resultados (ANVISA, 2003). A validação do método foi realizada de acordo com o Guia de Validação de Métodos Analíticos (AOAC, 2013), que trata sobre os parâmetros para validação em laboratório direcionados a suplementos alimentares. Conforme revisão feita em 2020 pelo INMETRO, as definições para os principais parâmetros de validação são descritos abaixo.

3.2.4.1 Seletividade

Capacidade do método em identificar e quantificar o analito de interesse na presença de interferentes presentes na matriz da amostra. Na literatura são descritos

experimentos para avaliação da seletividade, envolvendo ensaios com padrões ou materiais de referência e amostras com e sem analitos. Quando não for possível obter a segurança da seletividade, os restantes dos parâmetros de validação estarão seriamente comprometidos.

A seletividade foi realizada através da injeção de possíveis fármacos adulterantes que poderiam estar presentes nas amostras de suplementos alimentares. Os fármacos testados estão listados no Quadro 4.

3.2.4.2 Linearidade

A capacidade do método de obter resposta analítica diretamente proporcional à concentração do analito de interesse. A linearidade é obtida por padronização interna ou externa, e formulada como expressão matemática usada para o cálculo da concentração do analito a ser determinado na amostra real. A curva analítica foi obtida através da medida de cinco diferentes níveis de concentração, com um total de três replicadas para cada nível. O resultado foi analisado através da regressão linear (método dos mínimos quadrados) e pelo coeficiente de coeficiente de determinação linear (r^2).

3.2.4.3 Limite de detecção (LD) e quantificação (LQ)

O LD representa a menor concentração da substância em análise que pode ser detectada pelo método proposto, mas não necessariamente quantificada. Sua estimativa teve como base a relação de três vezes o ruído da linha base. Pode ser expresso como: $LD = 3 \times S / a$

onde S, é o desvio padrão absoluto do branco, e “a” é o coeficiente angular (inclinação da curva analítica).

O LQ representa a menos concentração da substância em exame que pode ser medida pelo método em questão. Sua estimativa foi estabelecida com base na relação de dez vezes o ruído da linha base. Através da equação: $LQ = 10 \times S / a$

onde S é o desvio padrão absoluto do branco, e “a” é o coeficiente angular (inclinação da curva analítica).

O LQ e LD foram calculados com suas respectivas formulas referente de 10 leituras do branco.

3.2.4.4 Precisão

A precisão pode ser avaliada através de diferentes formas podendo ser relacionado a repetitividade com mesmo procedimento de medidas, instrumento, mesmas condições e mesmo local, relacionada com a dispersão entre os resultados alcançados, para uma mesma amostra em condições definidas. Sendo o resultado expresso como desvio padrão e coeficiente de variação. O coeficiente de variação (CV, expresso em %) também conhecido como desvio padrão relativo (DPR), é calculado através da fórmula:

$$C. V. = DPR \frac{DP}{CMD} \times 100$$

onde, DP é o desvio padrão, CMD é a concentração media determinada e DPR é o desvio padrão relativo.

3.2.4.5 Exatidão

Sempre que possível, materiais de referência certificados (SRMs) devem ser utilizados para a validação do método. Na falta de SRM, é realizada a fortificação da amostra com concentrações conhecidas do analito, de preferência antes do processo de extração, para realização da determinação.

Na ausência de amostras certificadas de suplementos alimentares optou-se pela fortificação de concentração conhecida à uma amostra. Mediu-se três replicatas de cada composto separadamente na amostra, após o cálculo por extrapolação da curva analítica a média foi usada para calcular a recuperação do composto sendo

recuperação (%) = Valor calculado x 100 / Valor obtido, onde variações de até 15% foram aceitas.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste trabalho, métodos eletroforéticos foram desenvolvidos para a detecção e quantificação de possíveis adulterantes em suplementos alimentares. Os métodos foram baseados em dois mecanismos de separação distintos: eletroforese de zona (CZE) e cromatografia eletrocínética micelar (MEKC). Além dos mecanismos de separação, dois tipos de capilares foram estudados como coluna capilar de separação: capilar de sílica fundida e capilar revestido com álcool polivinílico (PVA). O método otimizado foi aplicado no estudo de fármacos como possíveis adulterantes em amostras comercializadas no Brasil, adquiridas em *websites* e lojas físicas. Os adulterantes estudados foram escolhidos de acordo com a maior frequência de relatos na literatura. Inicialmente, um total de 10 fármacos foi escolhido para estudo, pertencentes a quatro classes farmacológicas: estimulantes (cafeína, sinefrina e ioimbina), anorexígenos (anfepramona, femproporex e sibutramina), antidepressivos (topiramato) e diuréticos (furosemida, hidroclorotiazida e amilorida). Esses fármacos foram estudados e selecionados para otimização final do método de acordo com a seletividade atingida para cada um nos métodos eletroforéticos testados.

4.1 DETERMINAÇÃO DE ADULTERANTES EM SUPLEMENTOS ALIMENTARES POR ELETROFORESE CAPILAR

4.1.1 Separação de fármacos por CZE e MEKC em capilar de sílica normal

O método desenvolvido para a separação e detecção das diferentes classes de adulterantes, foi validado e otimizado utilizando o detector UV visto que o detector C⁴D não apresentou sinal das substâncias durante as corridas. Portanto, primeiramente foi

realizada uma varredura dos espectros dos analitos, com o objetivo de escolher um comprimento de onda adequado para a detecção UV. A partir dos resultados foi selecionado o comprimento de onda de 210 nm. Inicialmente, o número de fármacos estudados numa mistura hipotética eram 10, sendo eles: sinefrina, cafeína, ioimbina, anfepramona, fenproporex, sibutramina, topiramato, furosemida, hidroclorotiazida e amilorida. Como estratégia de investigação da seletividade do método, uma mistura de todos os padrões na mesma concentração (150 mg L^{-1}) foi utilizada. O primeiro teste foi feito empregando-se como eletrólito de trabalho o tampão fosfato 20 mM (pH 9,2) aditivado de metanol na concentração 30 % (v/v) como a técnica de separação CZE. A escolha deste eletrólito de trabalho deve-se a um trabalho prévio desenvolvido e publicado pelo grupo de pesquisa (MÜLLER et al., 2018). A separação foi realizada com a polaridade de detecção negativa (catódica), ou seja, com a corrida eletroforética no sentido positivo → negativo.

No entanto conforme a Figura 15 nota-se que não foi obtido um eletroferograma satisfatório nas condições já otimizadas anteriormente (MÜLLER et al., 2018), sendo que os picos iniciais não ficaram bem resolvidos apresentando coeluições. A fim de melhorar a separação dos picos, por se tratar de uma mistura mais complexa, a concentração de metanol como aditivo foi aumentada para 60% (v/v) no eletrólito e a concentração de fosfato para 50 mM. Aqui, pode-se observar uma leve melhora na separação dos picos iniciais, mas também o desaparecimento de prováveis picos da mistura, como mostra a Figura 16 a provável sequência e coeluições.

Figura 15 - Eletroferograma dos analitos primeiramente selecionados por CZE: (1)caféina, (2)sinefrina + (3)amilorida, (4) topiramato + (5) furosemida, (6) ioimbina + (7) hidroclorotiazida, (8) femproporex + (9) anfepramona, (10) sibutramina, (150mg L⁻¹). Condições: eletrólito de trabalho tampão fosfato 20 mmol L⁻¹ (pH 9,2) contendo metanol 30% (v/v), potencial de separação de -15Kv, capilar de sílica fundida 75µm x 360 µm x 68 cm; detecção ultravioleta com comprimento de onda de 210nm, temperatura 25°C, injeção hidrodinâmica por gravidade de 20cm durante 50s.

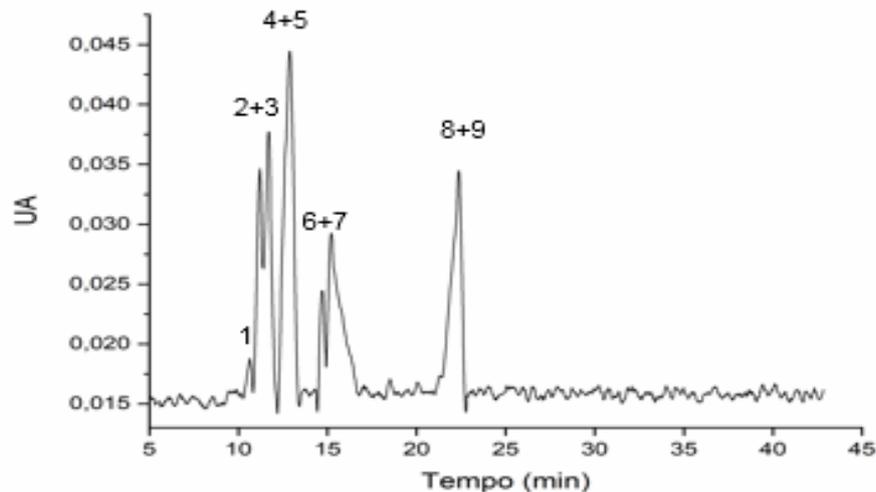
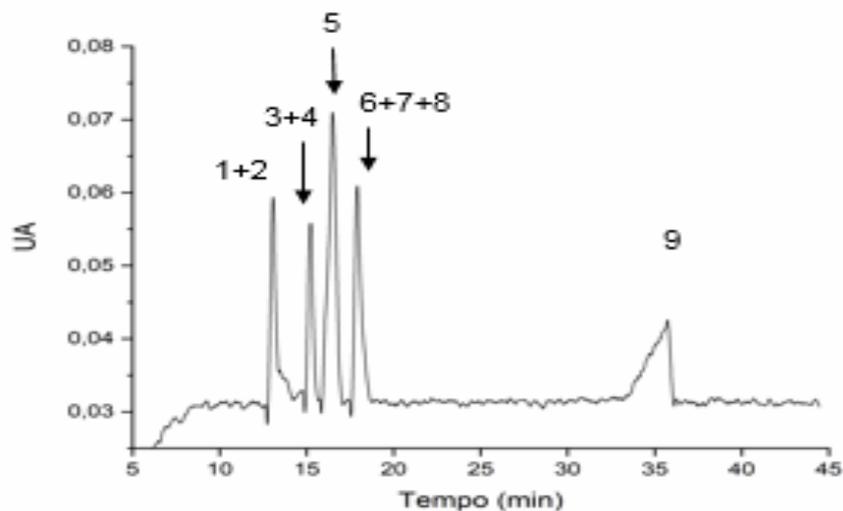


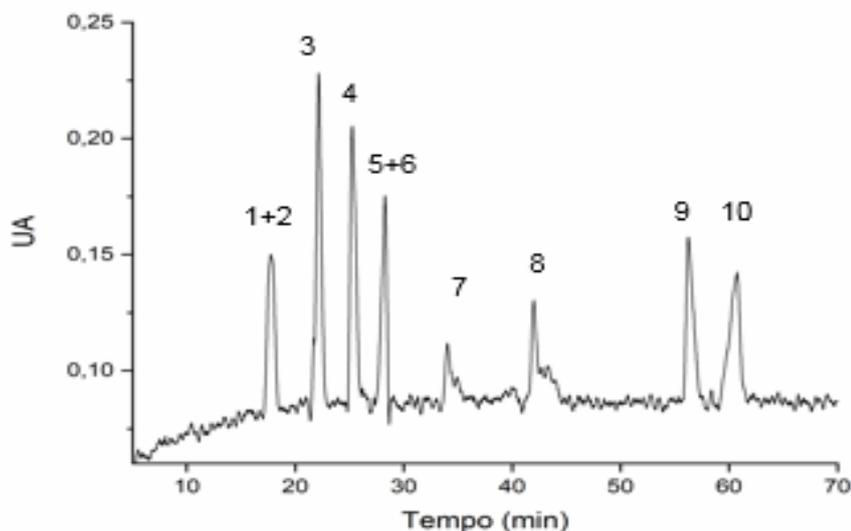
Figura 16 - Eletroferograma dos analitos primeiramente selecionados por CZE: (1)caféina + (2)sinefrina, (3)ioimbina + (4)topiramato +(5)furosemida, (6)amilorida + (7)femproporex + (8)anfepramona, (9)hidroclorotiazida, (10)sibutramina Condições: eletrólito de trabalho tampão fosfato 20 mmol L⁻¹ (pH 9,2) contendo metanol 60% (v/v), potencial de separação de -15Kv, capilar de sílica fundida 75µm x 360 µm x 68 cm; detecção ultravioleta com comprimento de onda de 210nm, temperatura 25°C, injeção hidrodinâmica por gravidade de 20cm durante 50s.



Como a separação dos 10 fármacos de interesse inicialmente injetados no sistema não foi satisfatória, um segundo mecanismo de separação foi testado. Para isso, o tensoativo dodecil sulfato de sódio (SDS) foi adicionado ao eletrólito para a formação de micelas carregadas negativamente, o que leva a um mecanismo de separação cromatográfico somado ao mecanismo eletroforético já existente. Esse mecanismo leva à formação de duas fases (eletrólito + micelas), sendo que a solução migra mediante ação do campo elétrico e a micela negativa migra no mesmo sentido sob arraste do fluxo eletrosmótico (EOF).

A Figura 17 mostra a separação obtida após a adição de SDS ao eletrólito, onde é possível presumir a provável sequência dos picos e coeluições, é também possível observar que o mecanismo cromatográfico devido à interação de cada fármaco com o interior apolar da micela leva a uma separação mais eficiente da mistura.

Figura 17 – Eletroferograma da provável sequência dos 10 analitos analisados por MEKC: (1) cafeína + (2) amilorida, (3) sinefrina, (4) topiramato, (5) furosemida + (6) ioimbina, (7) hidroclorotiazida, (8) fenproporex, (9) sibutramina, (10) anfepramona. Condições: eletrólito de trabalho tampão fosfato 50 mmol L⁻¹ (pH 9,2) contendo metanol 30% (v/v) e SDS 50 mM, potencial de separação de -15Kv, capilar de sílica fundida 75µm x 360 µm x 68 cm; detecção ultravioleta com comprimento de onda de 210nm, temperatura 25°C, injeção hidrodinâmica por gravidade de 20cm durante 50s, detecção catódica.



Fonte: autor

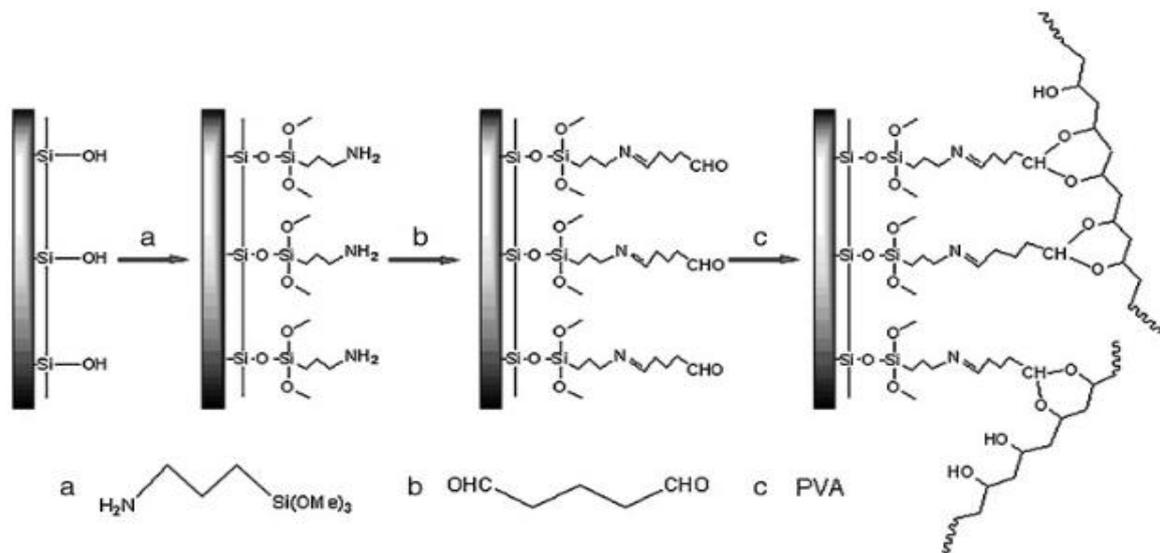
Mesmo com a maior seletividade na separação por MEKC com SDS 50 mM como aditivo micelar, o eletroferograma mostra ainda uma co-eluição na separação e a obtenção de 8 picos para um total de 10 fármacos. Mesmo a técnica micelar apresentando uma significativa melhora na separação dos compostos comparada a CZE, não foi possível realizar a identificação real da posição de cada composto. Isso deve-se ao fato de numa mistura extremamente complexa contendo 10 fármacos de diferentes classes farmacológicas, possíveis interações farmacológicas possam ocorrer no interior do capilar, ocasionando assim uma instabilidade a cada corrida iniciada como o deslocamento de picos. Sendo assim, o uso de separações eletroforéticas empregando capilar de sílica, onde nenhuma interação dos fármacos acontece com a coluna de separação, permite a observação de possíveis interações fármaco-fármaco em misturas de adulterantes. Entretanto, essas interações devem ser exploradas de maneira sistemática e mais aprofundada, o que não caracteriza o objetivo principal deste trabalho.

Com o objetivo de melhorar a separação dos fármacos e minimizar possíveis interferências das amostras de suplementos na condição da parede interna do capilar, um capilar modificado quimicamente foi testado na separação da mesma mistura.

4.1.2 Separação de fármacos por CZE e MEKC em capilar de sílica modificado

O capilar de sílica a base de álcool polivinílico (PVA) como revestimento interno foi estudado inicialmente no método por CZE utilizando o tampão fosfato 50 mM e acetonitrila como aditivo orgânico, devido à sua maior compatibilidade com a modificação interna do capilar (PVA). De acordo com a literatura (XU et al., 2010), a modificação interna do capilar leva à formação de um capilar mais resistente quimicamente, evitando aos processos de adsorção dos compostos em sua parede interna, sendo estável em uma ampla faixa de pH (2-10). Além de reduzir drasticamente a intensidade do fluxo eletrosmótico (EOF), as separações obtidas neste tipo de capilar levaram a uma maior reprodutibilidade dos tempos de migração dos fármacos. A Figura 18 representa o capilar internamente revestido com PVA.

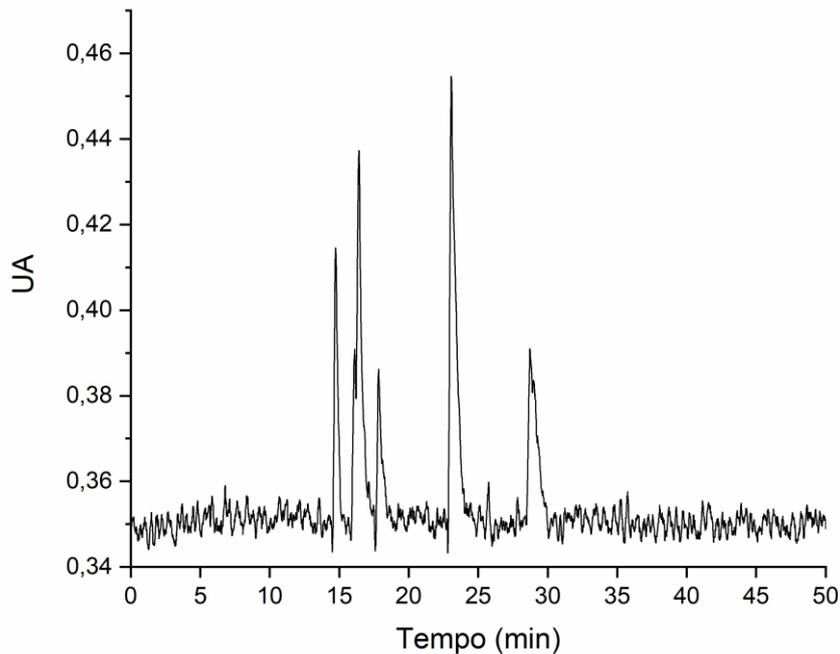
Figura 18 - Representação esquemática da estrutura química interna do capilar de sílica modificado à base de álcool polivinílico (PVA).



Fonte: Adaptado de (XU et al., 2010)

A separação dos compostos neste capilar pode ser vista no eletroferograma da Figura 19. Baseado no critério da seletividade, optou-se por retirar da mistura de interesse no estudo o fármaco topiramato, visto que sua identificação na mistura não foi possível devido à co-eluição e provável interação com os demais fármacos. Essa interação foi observada pelo deslocamento significativo dos tempos de migração dos outros fármacos na mistura.

Figura 19 - Eletroferograma dos 9 analitos por CZE: sinefrina, cafeína, ioimbina, anfepramona, fenproporex, sibutramina, furosemida, hidroclorotiazida e amilorida (150 mg L^{-1}). Condições: eletrólito de trabalho tampão fosfato 50 mmol L^{-1} (pH 9,2) contendo acetonitrila 30% (v/v), potencial de separação de -15Kv , capilar revestido com PVA $100\mu\text{m} \times 60 \text{ cm}$; detecção ultravioleta com comprimento de onda de 210nm , temperatura 25°C , injeção hidrodinâmica por gravidade de 20cm durante 50s , detecção catódica.

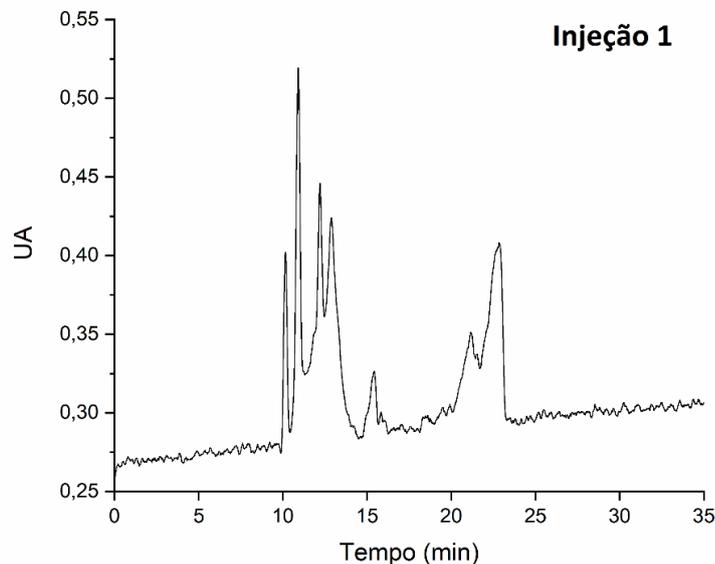


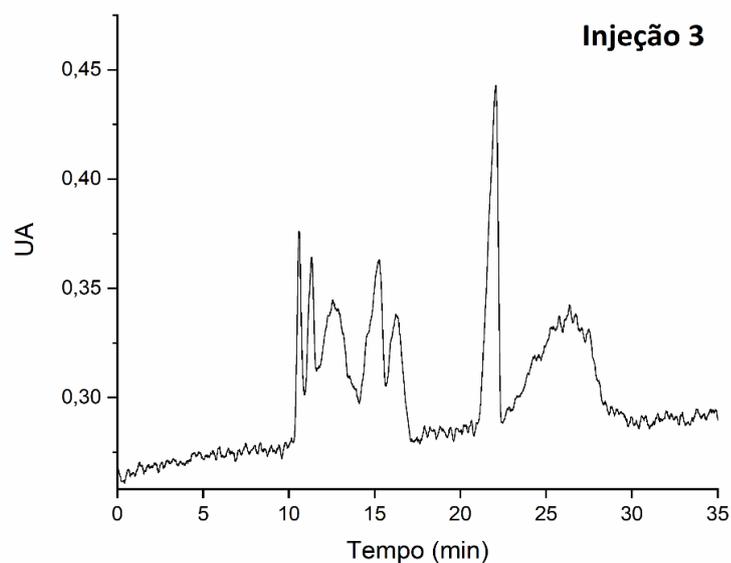
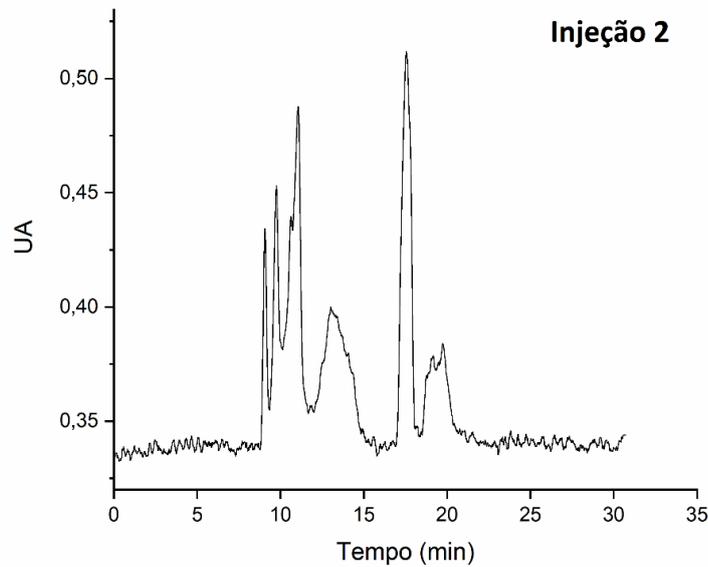
Fonte: autor.

Apesar da obtenção de picos mais estreitos na separação, menor tempo de análise e conseqüentemente uma eficiência maior, o eletroferograma apresentou 5 picos de um total de 9 compostos na detecção catódica (polo negativo) por absorção no UV. Desta forma, foi adicionado ao eletrólito o tensoativo SDS, para a modificação do mecanismo de separação eletroforético. Como pode-se observar nos eletroferogramas abaixo, a adição de SDS leva a separação de alguns sinais e confirma o fato da separação baseada exclusivamente na eletroforese dos fármacos na forma de íons (cátions ou ânions) por CZE não ser suficiente em termos de seletividade para essa mistura estudada.

Os eletroferogramas da Figura 20 mostram injeções sucessivas da mesma mistura no capilar modificado, o que demonstra uma baixa reprodutibilidade dos tempos de migração em termos de intensidade e forma dos picos neste capilar. Além disso, o capilar se mostrou pouco resistente ao eletrólito contendo SDS, sendo que foi observado o entupimento do capilar após sucessivas corridas eletroforéticas. Esse entupimento frequente do capilar deve estar relacionado à solubilização da parede polimérica do capilar na presença do tensoativo SDS, levando a uma espécie de sangria da coluna cromatográfica, o que explica a baixa reprodutibilidade na identificação dos fármacos.

Figura 20 - Eletroferogramas das sucessivas injeções dos 9 analitos por MEKC: sinefrina, cafeína, ioimbina, anfepramona, fenproporex, sibutramina, furosemida, hidroclorotiazida e amilorida (150 mg L^{-1}). Condições: eletrólito de trabalho tampão fosfato 50 mmol L^{-1} (pH 9,2) contendo acetonitrila 30% (v/v) e SDS 50mM, potencial de separação de -15Kv, capilar revestido com PVA $100 \mu\text{m} \times 60 \text{ cm}$; detecção ultravioleta com comprimento de onda de 210nm, temperatura 25°C , injeção hidrodinâmica por gravidade de 20cm durante 50s, detecção catódica.





Fonte: autor.

4.2.3 Validação do método eletroforético escolhido

Após o estudo sistemático dos parâmetros composição do tampão, aditivo orgânico (solvente), aditivo surfactante (SDS) e tipo de capilar, concluiu-se que a técnica de separação por cromatografia eletrocinética micelar (MEKC) em capilar de sílica normal (sílica fundida) foi mais eficiente e mais promissora para a investigação dos adulterantes escolhidos inicialmente como mistura hipotética.

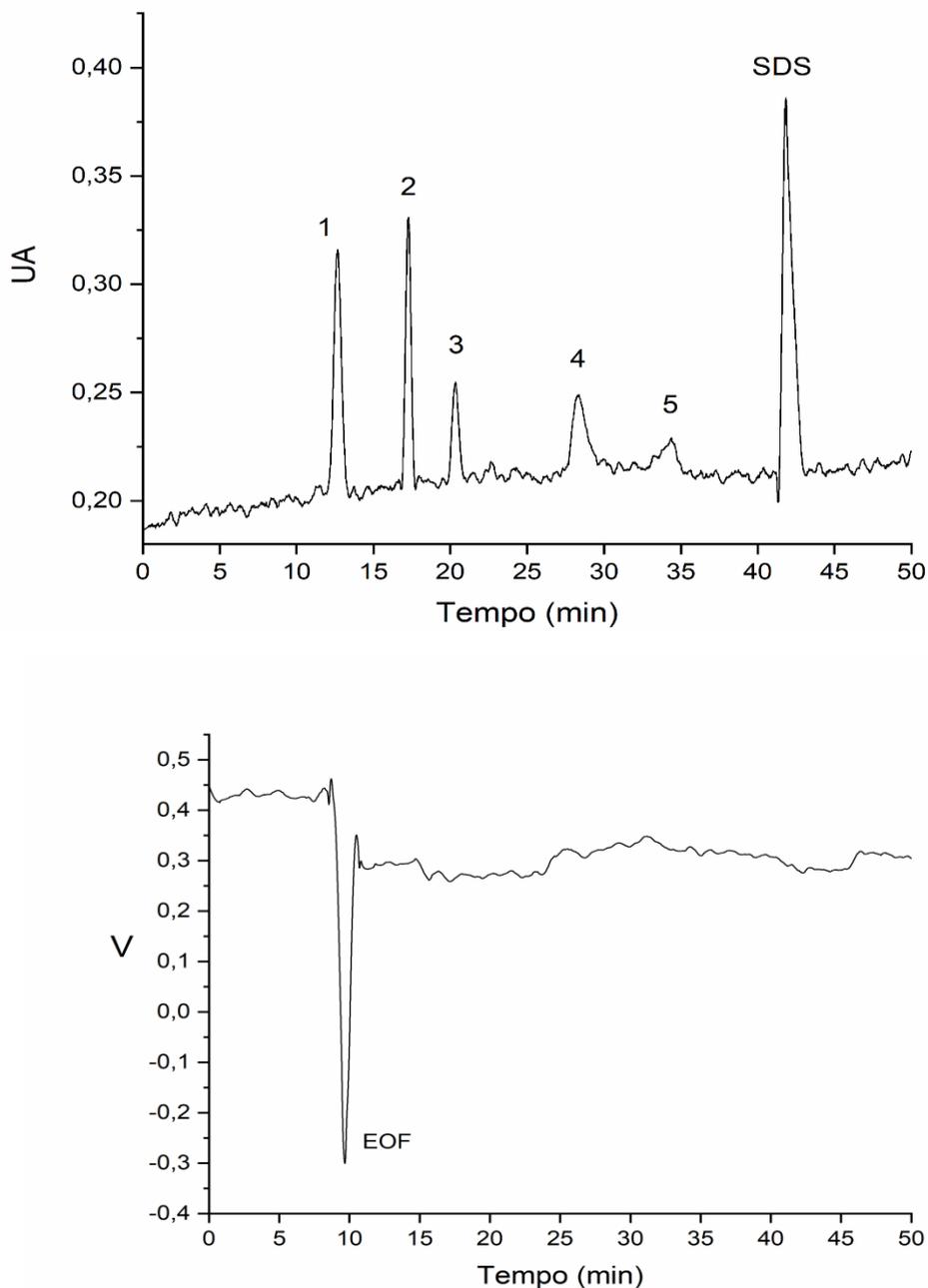
A partir deste estudo, verificou-se também que na separação por MEKC ocorreram algumas co-eluições elucidadas pela adição individual de cada fármaco na mistura. Além disso, o fármaco sibutramina foi retirado da mistura de interesse no método final devido à baixa absorvidade molar e pico eletroforético não detectável no eletroferograma, sendo que foram testados diferentes comprimentos de onda onde haveria a possibilidade da sua absorção de luz mesmo que pouco sensível, sugerindo-se uma dificuldade de migração eletroforética. Além deste fármaco, os diuréticos furosemida e amilorida mostraram uma provável interação química na mistura por provocarem o deslocamento de picos eletroforéticos quando comparados às suas injeções individuais, o mesmo tendo acontecido para o fármaco anfepramona.

Portanto, a mistura complexa testada inicialmente contendo como grupos funcionais aminas e sítios nitrogenados protonáveis na estrutura molecular não foi possível de ser estudada enquanto mistura hipotética (mesmo que irreal em termos de adulterações em suplementos comerciais). Portanto, o estudo simultâneo dos fármacos pertence às classes dos anorexígenos, estimulantes, diuréticos e antidepressivos leva a prováveis interações farmacológicas no tampão e o deslocamento de sinais da mistura quando comparado às migrações individuais dos mesmos no capilar de sílica. Mas, esse tipo de estudo requer uma pesquisa bem mais aprofundada e sistemática, sendo que neste trabalho as prováveis interações na mistura levaram à baixa reprodutibilidade nas separações dos 10 fármacos iniciais e conduziu a escolha do método otimizado em termos de seletividade como principal critério de validação final.

Porém, a hidroclorotiazida apresentou uma boa reprodutibilidade na mistura e, portanto, foi mantida na composição da mistura. Além disso, é frequente sua aparição como adulterante em estudos descritos na literatura, ocorrência que supostamente estaria ligada ao fato de ser a terapia de primeira escolha no tratamento da hipertensão, além da fácil aquisição. Soma-se a isso o fato de seus efeitos colaterais serem dependentes de altas doses e sua meia vida de 6-12 horas ser considerada baixa em relação aos demais diuréticos tiazídicos (BENENSON, 2020). O femproporex também não apresentou co-eluição com os demais compostos, sendo um fármaco anorexígeno também já relatado na literatura e encontrado ilegalmente em formulações de suplementos alimentares devido à sua atividade farmacológica de induzir a perda de apetite. Sendo assim, o estudo optou por restringir a identificação aos fármacos com maior reprodutibilidade na separação final por MEKC, além da

seletividade obtida na separação e ausência de interação fármaco-fármaco na mistura complexa, visto que a ocorrência de todos os fármacos como adulterantes e um mesmo suplemento vem a ser improvável. Por fim, os 5 fármacos separados com boa eficiência e reprodutibilidade na MEKC são mostrados na Figura 21.

Figura 21 - Eletroferograma da separação dos 5 analitos por MEKC: cafeína, sinefrina, hidroclorotiazida, ioimbina e femproporex. Condições: eletrólito de trabalho tampão fosfato 50 mmol L⁻¹ (pH 9,6) contendo acetonitrila 20% (v/v) e SDS 50 mM, potencial de separação de -15 kV, capilar de sílica fundida 75 µm x 360 µm x 68 cm; detecção simultânea por ultravioleta (210 nm) e condutividade (C⁴D), temperatura 25°C, injeção hidrodinâmica por gravidade de 20 cm durante 50 s, detecção catódica.



No eletroferograma da figura 21 é possível observar ainda um sinal intenso após o tempo de 40 min de corrida, sendo este atribuído à absorção UV do tensoativo da fase micelar (SDS) quando deixa o capilar de sílica. Além disso, o segundo eletroferograma mostra a detecção observada no primeiro detector do instrumento (C⁴D). Neste caso, apenas uma linha base e um intenso sinal devido ao fluxo eletroosmótico são observados, provocado pelas moléculas neutras na mistura de solventes no eletrólito (Metanol/Água) após a injeção dos padrões (dissolvidos previamente em metanol). Como pode se observar, as moléculas neutras injetadas no sistema levam a um decréscimo do sinal basal devido à forte diminuição da condutividade do eletrólito neste ponto, fato observado unicamente no primeiro detector. Já no segundo detector (UV), este sinal não é observado devido à fraca absorção de luz dos solventes neutros. Por fim, a ausência de sinais para os fármacos no eletroferograma com detecção por condutividade (C⁴D) deve-se à baixa condutividade elétrica dos fármacos decorrente do seu baixo grau de ionização, o que é esperado para ácidos fracos e bases fracas. Além disso, a separação por MEKC de compostos na presença de um tensoativo (SDS) e de compostos majoritariamente neutros leva geralmente à ausência de sinais de condutividade na detecção por C⁴D, fato este já observado e descrito na literatura (FRACASSI DA SILVA, 2001).

A validação por detecção UV foi realizada conforme os parâmetros da AOAC para suplementos alimentares (AOAC, 2013). A faixa linear de trabalho foi obtida através da injeção em triplicata de cinco concentrações correspondentes a cada composto separadamente. Após identificação e cálculo das áreas, a média dos valores de cada concentração foi utilizada para a obtenção da regressão linear, onde os coeficientes de determinação linear foram todos acima de 0,99 como descrito na Tabela 3.

Tabela 3 - Parâmetros de linearidade do método desenvolvido

Composto	Faixa Linear (mg L⁻¹)	R²	Equação da reta
Cafeína	9,48–320,00	0,999	y=0,0005x+0,0045
Sinefrina	10,06–320,00	0,990	y=0,0003x+0,0012
Femproporex	28,10–320,00	0,990	y=0,0002x+0,0004
loimbina	11,43–320,00	0,993	y=0,0011x -0,0073
Hidroclorotiazida	9,57–320,00	0,992	y=0,0007x -0,0043

Fonte: autor

A sensibilidade do método foi avaliada mediante determinação dos limites de detecção e quantificação para cada analito, obtidos através da razão sinal ruído da linha base de dez replicatas, calculados de acordo com as equações da reta já descritas. A precisão foi realizada através da injeção de três níveis de concentração, cada concentração variou conforme a substância (baixo, médio e alto) da curva analítica em triplicata no mesmo dia (intra-dia) e seis replicatas do ponto médio da concentração em dias diferentes foi considerada (intre-dia). O resultado foi expresso através do coeficiente de variação percentual (CV%), onde valores de até 20% podem ser aceitos considerando a complexidade da amostra segundo Lanças (2004).

A exatidão foi avaliada através do método de recuperação de padrão, onde uma amostra que não apresentava sinal no eletroferograma foi escolhida. A amostra contaminada com cada fármaco foi submetida ao processo de extração, sendo a recuperação calculada através da curva analítica obtida após três determinações para cada composto analisado. Os valores de exatidão obtidos estão na faixa de 80 a 120%, estando dentro do esperado considerando à complexidade das matrizes analíticas estudadas. Os dados de validação obtidos por MEKC com detecção UV são apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 - Parâmetros de validação referente ao às figuras de mérito LD, LQ, precisão e exatidão para os compostos analisados por MEKC com detecção UV em amostras de suplementos alimentares.

Composto	LOD (mg L⁻¹)	LOQ (mg L⁻¹)	Precisão CV (%) Intra dia	Precisão CV (%) Inter dia	Exatidão
Cafeína	3,12	9,48	3,37 – 11,52	3,04	103,82
Sinefrina	3,32	10,06	1,05 – 13,4	3,27	83,80
Femproporex	9,27	28,10	8,4 – 17,9	7,28	120,00
loimbina	3,77	11,43	4,2 – 8,3	4,97	112,98
Hidroclorotiazida	3,15	9,57	2,44 – 13,45	2,87	111,36

Fonte: autor

4.2.4 Aplicação da metodologia em amostras de suplementos alimentares

Após a otimização e validação do método analítico de separação por eletroforese capilar através da técnica MEKC, partiu-se para a aplicação das amostras de suplementos alimentares. Um total de 20 amostras foi estudado conforme descrição da Tabela 5. Primeiramente, realizou-se um *screening* após o processo de extração, a fim de identificar algum analito de interesse e identificado no método otimizado e validado. As amostras que apresentaram sinais eletroforéticos em tempos semelhantes aos padrões analisados foram selecionadas e através do método de adição de padrão foi feita a confirmação da presença ou algum possível adulterante na formulação. É importante destacar que na análise de todas as amostras foram necessárias diluições com água, visto que a dissolução da amostra puramente em metanol 100% (v/v) não fornecia corrente elétrica para o funcionamento da eletroforese capilar.

Tabela 5 – Resultado da análise das formulações de suplementos alimentares pela técnica de separação MEKC, com os fármacos encontrados e suas quantidades segundo a ingestão diária recomendada pelo fabricante e as quantidades encontradas por cápsula.

Amostra	Fármaco declarado (mg/dose)	Dose diária	Fármaco encontrado	Concentração encontrada (mg/cápsula)	Concentração encontrada (mg/dose)
1	ND	5g	Cafeína	0,71	12,74
			loimbina	1,94	19,45
2	ND	4	-		-
		cápsulas			
3	ND	4g	Cafeína	11,89	88,42
			Sinefrina	2,58	19,23
4	ND	2	Hidroclorotiazida	2,54	18,03
		cápsulas	Sinefrina	61,82	195,60
5	Cafeína 280 mg	4	Cafeína	50,93	272,88
		cápsulas	Sinefrina	2,50	3,35
6	Cafeína 420 mg	1 cápsula	Cafeína	306,45	380,65
7	ND	4	-		-
		cápsulas			
8	Cafeína 420 mg	2	Cafeína	84,18	301,9
		cápsulas			
9	Cafeína 220 mg	1 cápsula	Cafeína	24,22	69,73
10	Cafeína 420 mg	1 cápsula	Cafeína	92,88	290,00
11	ND	6g	Cafeína	6,86	82,39
12	ND	5g	Cafeína	23,94	239,48
13	ND	5	Cafeína	76,64	258,32
		cápsulas	Hidroclorotiazida	1,63	6,00

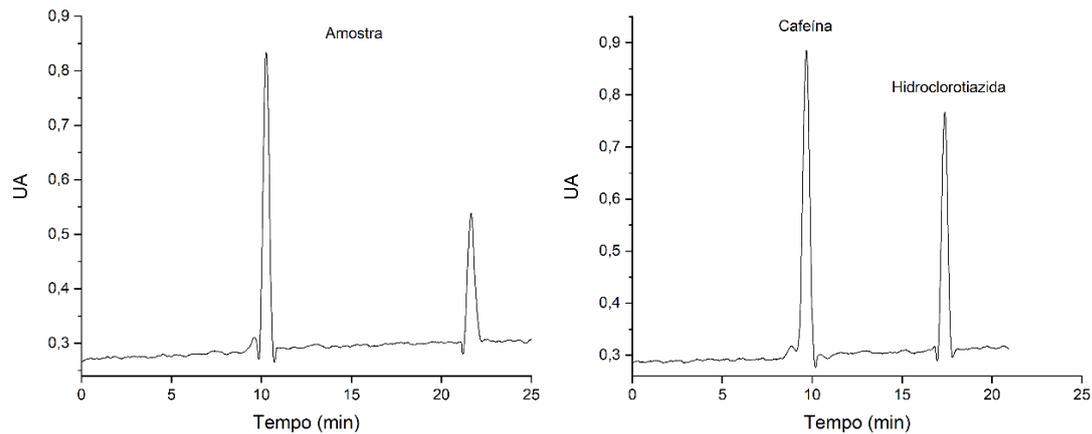
14	Cafeína 160 mg	2 cápsulas	Cafeína	68,82	111,70
			Hidroclorotiazida	36,45	59,15
15	ND	13,37g	-		-
16	ND	4 cápsulas	Hidroclorotiazida	2,54	13,43
17	Cafeína 440 mg	15g	Cafeína	17,88	536,58
18	ND	11 cápsulas	Hidroclorotiazida	1,37	52,46
19	Cafeína 225 mg	4 cápsulas	Cafeína	46,54	236,81
20	Cafeína 420 mg	2 cápsulas	Cafeína	123,70	397,02

ND: Não Declarado pelo fabricante

Fonte: autor

Das amostras analisadas (n=20) neste trabalho, cerca de 20% (n=4) foram adulteradas com o diurético hidroclorotiazida como mostra a confirmação mediante o eletroferograma da Figura 22. A figura mostra os sinais da amostra pura (nº 14) e, ao lado, a adição 100 mg L⁻¹ do padrão hidroclorotiazida na mesma matriz, sendo que no rótulo apenas a presença da cafeína foi declarada. A hidroclorotiazida é o fármaco de primeira escolha para o tratamento da hipertensão, de fácil aquisição e promove o aumento da excreção de água no corpo, acabando por ser adicionada ilegalmente nos suplementos alimentares para auxiliar a promover uma rápida perda de peso, mesmo não sendo considerada substancial. Usualmente os comprimidos de hidroclorotiazida encontram-se em dosagens de 25 ou 50 mg e a dosagem considerada segura não pode exceder 200 mg por dia. Sendo assim, as concentrações encontradas nas formulações de suplementos não ultrapassam a dose máxima recomendada. No entanto, os efeitos colaterais dos diuréticos podem incluir fraqueza, tontura, insônia, perda de apetite, distúrbios sexuais (BENENSON,2020), além de possíveis interações farmacológicas com outras substâncias e componentes orgânicos majoritários na formulação serem imprevisíveis.

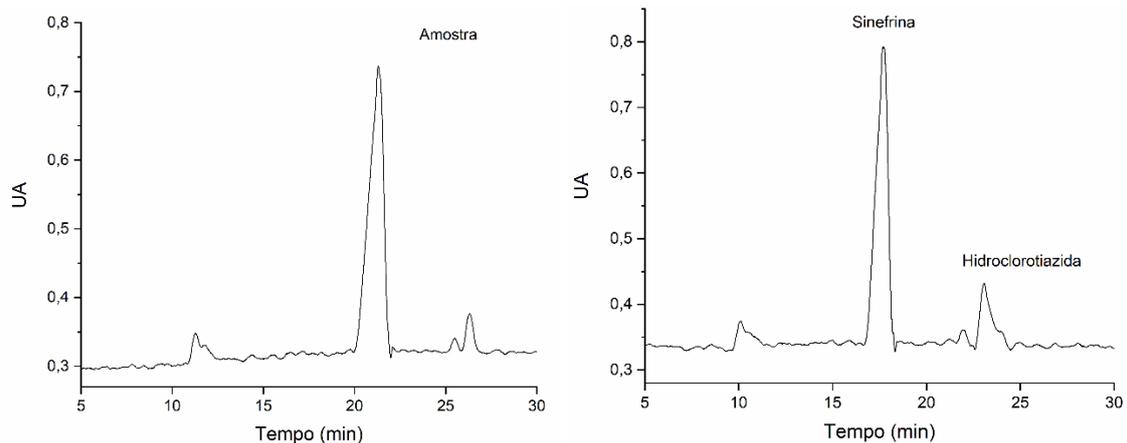
Figura 22 - Eletroferograma da amostra 14 após extração em metanol, seguida da adição dos padrões de cafeína e hidroclorotiazida. Condições: eletrólito de trabalho tampão fosfato 50 mmol L⁻¹ (pH 9,6) contendo acetonitrila 20% (v/v) e SDS 50 mM, potencial de separação de -15Kv, capilar de sílica fundida 75µm x 360 µm x 68 cm; detecção ultravioleta com comprimento de onda de 210nm, temperatura 25°C, injeção hidrodinâmica por gravidade de 20cm durante 50s, detecção catódica



Fonte: autor

Em duas das amostras estudadas foi detectada a presença de sinefrina em pequenas quantidades, sendo estas declaradas como *Citrus* ou fibra de laranja amarga e consideradas naturais. Além disso, esta pode ser adicionada sinteticamente em grandes concentrações. Na figura 23 pode-se observar também a presença da hidroclorotiazida como adulterante identificado sem previa declaração. Neste caso, a potência dos fármacos pode ser alterada resultando em efeitos colaterais desconhecidos (COHEN, 2014). Na amostra 4 (Figura 23), os níveis de sinefrina foram encontrados em uma concentração acima do limite recomendado para consumo diário (180 mg). Embora permitida a presença da sinefrina em suplementos alimentares, seu uso tem sido associado a casos de alterações cardíacas, convulsões, hipertensão, tontura e insônia (FUGH; MYERS., 2004).

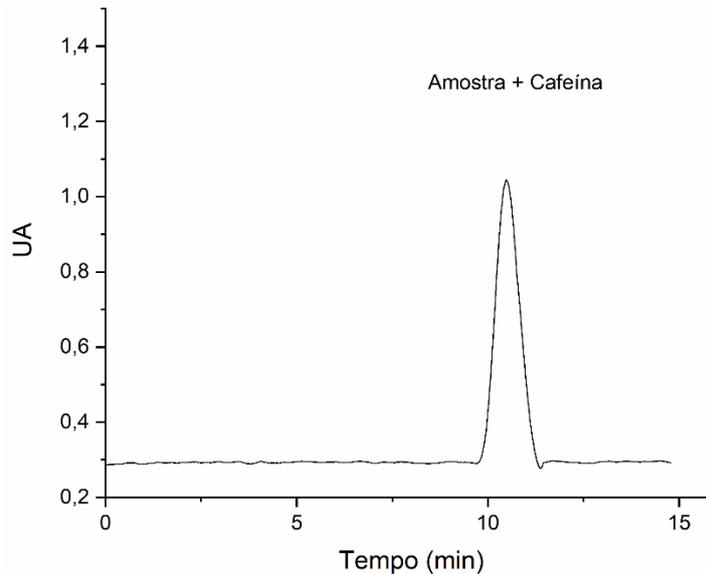
Figura 23 - Eletroferograma da amostra 4 após extração em metanol, seguida da adição dos padrões de sinefrina e hidrocortiazida. Condições: eletrólito de trabalho tampão fosfato 50 mmol L⁻¹ (pH 9,6) contendo acetonitrila 20% (v/v) e SDS 50 mM, potencial de separação de -15Kv, capilar de sílica fundida 75µm x 360 µm x 68 cm; detecção ultravioleta com comprimento de onda de 210nm, temperatura 25°C, injeção hidrodinâmica por gravidade de 20cm durante 50s, detecção catódica



Fonte: autor

O método se mostrou bastante eficiente na identificação do estimulante cafeína mesmo se tratando de formulações de composição tão variável e heterogêneas como são os suplementos alimentares, como pode ser visto na Figura 24. Assim, foi possível identificar o composto em cerca de 25% (n=5) das amostras, mesmo estas não apresentando sua declaração na embalagem, mas apenas matérias primas naturais como chá verde, guaraná, erva mate e chá branco. Mesmo sendo esperada a presença de cafeína nestes produtos, suas quantidades não são declaradas, impossibilitando assim uma conclusão autêntica da presença ou não destes compostos naturais na formulação.

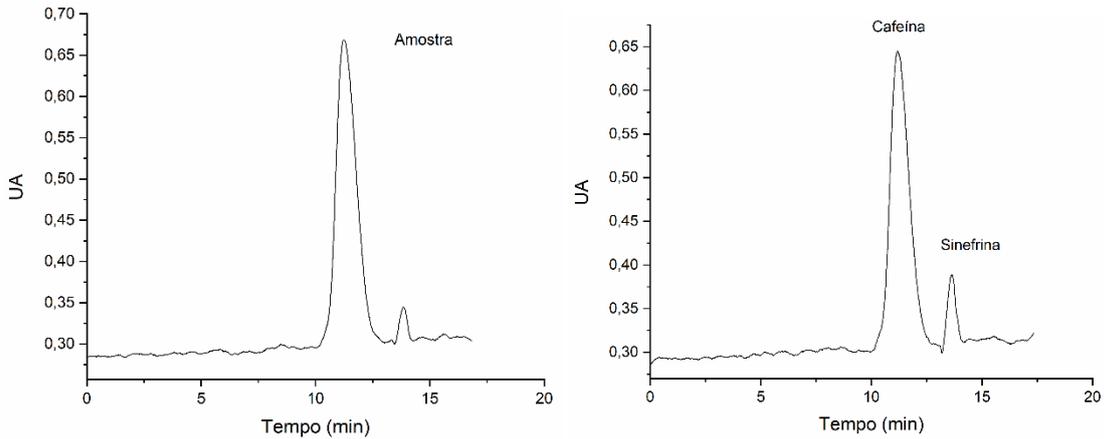
Figura 24 - Eletroferograma da amostra 10 à base de cafeína após extração em metanol. Condições: eletrólito de trabalho tampão fosfato 50 mmol L⁻¹ (pH 9,6) contendo acetonitrila 20% (v/v) e SDS 50 mM, potencial de separação de -15Kv, capilar de sílica fundida 75µm x 360 µm x 68 cm; detecção ultravioleta com comprimento de onda de 210nm, temperatura 25°C, injeção hidrodinâmica por gravidade de 20cm durante 50s, detecção catódica



Fonte: autor

Neste estudo apenas uma amostra de cafeína (amostra 17) apresentou concentração acima da declarada no rótulo e ao mesmo tempo acima da considerada segura, onde sua concentração deve estar entre 210 e 420mg por porção. No Brasil, é permitida a comercialização da cafeína, apesar de não existir especificação na resolução referente a dose máxima recomendada (BRASIL, 2010). Vale ressaltar que em algumas amostras, além da quantidade declarada de cafeína, as formulações contêm fontes naturais da substância aumentando assim a sua concentração final. O consumo de altas doses de cafeína antes do exercício físico leva a um aumento da frequência cardíaca e pressão arterial, fatores estes que podem estar associados ao desenvolvimento de futuras arritmias (ZULLI et al., 2016). A associação de dois estimulantes potentes como cafeína e sinefrina (naturais ou sintéticas) podem levar a efeitos adversos graves como problemas cardiovasculares, tremores e aumento da neurotoxicidade, em comparação as duas substâncias consumidas separadamente (ARBO et al., 2011). Esta ocorrência pode ser evidenciada na amostra 5 (Figura 25).

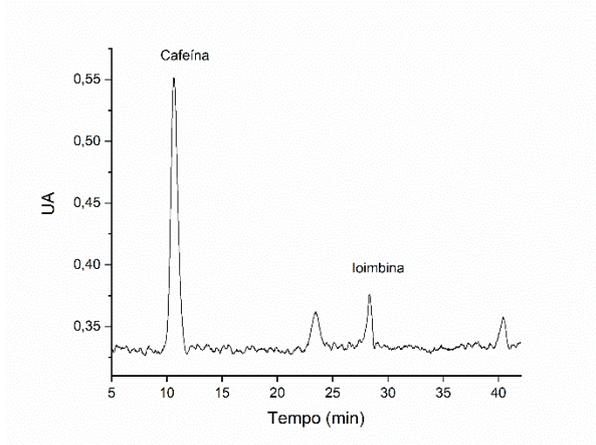
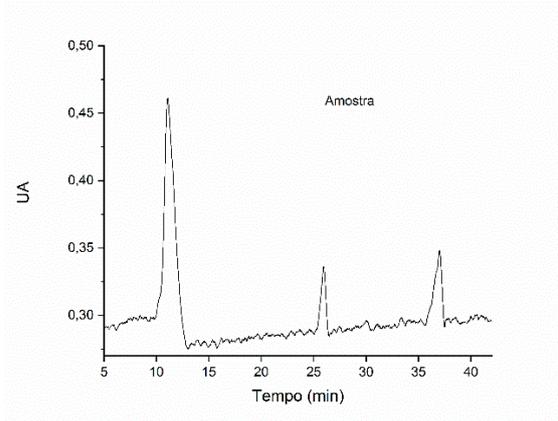
Figura 25 - Eletroferograma da amostra 5 após extração em metanol, seguida da adição dos padrões de cafeína e sinefrina. Condições: eletrólito de trabalho tampão fosfato 50 mmol L⁻¹ (pH 9,6) contendo acetonitrila 20% (v/v) e SDS 50 mM, potencial de separação de -15Kv, capilar de sílica fundida 75µm x 360 µm x 68 cm; detecção ultravioleta com comprimento de onda de 210nm, temperatura 25°C, injeção hidrodinâmica por gravidade de 20cm durante 50s, detecção catódica



Fonte: autor

Por fim, 7 amostras apresentaram níveis de cafeína abaixo dos declarados e em uma amostra foi considerada a possível adulteração pelo fármaco ioimbina (Figura 26). Este composto é normalmente empregado para aumento da satisfação sexual e disfunção erétil, tendo sido utilizado também em formulações que visam o aumento da energia e proporcionam facilidade na perda de peso. Os efeitos colaterais relatados estão envolvidos na elevação da pressão arterial e frequência cardíaca, ansiedade, dor de cabeça e aumento do fluxo urinário (SUN et al.,2012).

Figura 26 - Eletroferograma da amostra 1 após extração em metanol, seguida da adição dos padrões de cafeína e loimbina. Condições: eletrólito de trabalho tampão fosfato 50 mmol L⁻¹ (pH 9,6) contendo acetonitrila 20% (v/v) e SDS 50 mM, potencial de separação de -15Kv, capilar de sílica fundida 75µm x 360 µm x 68 cm; detecção ultravioleta com comprimento de onda de 210nm, temperatura 25°C, injeção hidrodinâmica por gravidade de 20cm durante 50s, detecção catódica.



Fonte: autor.

5 CONCLUSÕES

Neste trabalho foi realizado o estudo de 20 amostras de suplementos alimentares comercializados no Brasil através do método validado por cromatografia eletrocínética micelar (MEKC) para 5 substâncias pertencentes as classes farmacológicas mais empregadas na adulteração: estimulantes, diuréticos e anorexígenos. Além da validação do método foi possível estudar o comportamento eletroforético dos compostos em diferentes técnicas da eletroforese capilar (CZE e MEKC), também em diferentes capilares.

O método eletroforético demonstrou boa seletividade para os compostos pesquisados, fato importante tendo em vista o caráter das amostras de alta complexidade. Como perspectivas futuras, seria importante avaliar a fundo as interações farmacológicas e químicas que impossibilitaram a confirmação das 10 substâncias no mesmo método, visto que todas podem aparecer em prováveis adulterações de suplementos alimentares.

Com relação às amostras estudadas, foi evidenciado a não-conformidade em relação a legislação vigente, seja pela presença de ingredientes não autorizados como também os apelos sobre vantagens de consumo e sem comprovação científica. Cerca de 20% das amostras apresentaram como adulterante não declarado na formulação a hidroclorotiazida e em 50% das amostras foi possível a identificação de componentes permitidos ou não nas formulações, mas todos sem quaisquer prévias informações declaradas em seus rótulos o que é considerado ilegal.

Para o enquadramento legal das amostras são necessárias mudanças específicas, mesmo as novas diretrizes já estando em vigor. Os resultados demonstram claramente a necessidade de cada vez mais a intensificação nas limitações, registros e regras para o controle dos suplementos alimentares. Por fim, novos casos de adulteração são relatados a cada ano em todo o mundo, sendo importante um trabalho de conscientização da população sobre as alegações quanto à sua total segurança e promoção de resultado rápido prometido. Esse fato pode ser agravado tendo em vista as possíveis interações farmacológicas que podem ocorrer nos suplementos, principalmente devido ao desconhecimento das substâncias presentes no produto consumido.

6 REFERÊNCIAS

- ABIAD. Pesquisa : Hábitos de consumo de suplementos alimentares no Brasil. **Associação Brasileira de Indústrias de Alimentos para Fins Especiais e Congêneros**, São Paulo, 2015. Disponível em < <http://abiad.org.br/pb/pesquisa-inedita-aponta-que-mais-da-metade-dos-lares-brasileiros-consome-suplementos-alimentares/>>. Acesso 30 de abril de 2020.
- AHMED, N. et al. Over-the-Counter Herbal Weight Loss Supplements in Egypt: Label Claim, Microbiological and Pharmaceutical Quality, and Safety Assessments. **Medical Principles and Practice**, v.28, p.167-177, 2019.
- ALVES, C; LIMA, R. V. Dietary supplement use by adolescents. **Jornal de Pediatria, Rio de Janeiro**, v. 85, n. 4, p 287-294, 2009.
- ALVES, M. C. R.; CAPELA, J. P. Dietary supplements for weight loss with synephrine: risks and toxicity. **Acta Portuguesa de Nutrição** n.16, 2019.
- AMARAL, L. **Consumo de suplementos alimentares por frequentadores de uma academia de Palhoça-SC**. 2017. 19p. Trabalho de conclusão de curso. Universidade do Sul de Santa Catarina, Santa Catarina 2017.
- ANVISA. Macrotema de Alimentos – Perguntas e Respostas- suplementos alimentares- Gerencia Geral de alimentos- **Agência Nacional de Vigilância Sanitária** Brasília, DF 4 de Fevereiro de 2019- 4 ed Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/33916/2810640/Suplementos+Alimentares/a6fd2839-6d80-496a-becb-8b2122eff409> (a)
- AOAC. Guidelines for dietary supplements and botanicals. AOAC Official methods: Appedix K,. p 32,2013 Disponível em: https://members.aoac.org/AOAC_Docs/StandardsDevelopment/SLV_Guidelines_Dietary_Supplements.pdf .Acesso em 5 jan.2021
- APPLEGATE, E. A.; GRIVETTI, L. E. Search for the Cometitive Edge: A History of dietary fads and Supplements, **The Journal of Nutrition**, v.127, n.5, p.857-859, 1997.
- ARBO, M. D. et al. Enhancement of toxicity followed by association of p-synephrine with ephedrine, salicin and caffeine. **Toxicology Letters**, n°205, p.212–213,2011.
- ARIBURNU, E. et al. Comparative determination of sibutramine as an adulterant in natural slimming products by HPLC and HPTLC densitometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.65, p.77-81, 2012.
- BENENSON, I. Chlorthalidone or Hydrochlorothiazide for Treatment of Hypertension.**The Journal for Nurse Practitioners**. 2020.
- BIESTERBOS,W.H.J. et al. A health risk for consumers: the presence of adulterated food supplements in the Netherlands. **Food Additives & Contaminants**, v 36, n. 9, p. 1273- 1288, 2019.

BOONE, C. M. et al. 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, ANVISA. IN nº 28, de 26 de julho de 2018. Estabelece as listas de constituintes, de limites de uso, de alegações e de rotulagem complementar dos suplementos alimentares. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 27 jul. 2018(a). Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/3898888/IN_28_2018_.pdf/84235aa6-978d-4240-bc02-1080a0d2cbfd>. Acesso em : 20 de abril de 2020.

BRASIL. Lei nº 2.848, de 7 de dezembro de 1940. Código Penal. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/decreto-lei/del2848.htm

BRASIL, ANVISA. IN nº 28, de 26 de julho de 2018. Estabelece as listas de constituintes, de limites de uso, de alegações e de rotulagem complementar dos suplementos alimentares. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 27 jul. 2018(b). Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/3898888/IN_28_2018_.pdf/84235aa6-978d-4240-bc02-1080a0d2cbfd> . Acesso em 04 de junh. 2020

BRASIL, ANVISA. RDC nº 2, de 07 de janeiro de 2002. Aprova, de o regulamento técnico de substâncias bioativas e probióticos isolados com alegação de propriedade funcional ou saúde. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 07 jan 2002. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2718376/RDC_02_2002_COMP.pdf/68a25113-35e2-4327-a75f-ae22e714ca7c Acesso em 06 de junho de 2020.

BRASIL, ANVISA. RDC nº 239, de 26 de junho de 2018. Estabelece os aditivos alimentares e coadjuvantes de tecnologia autorizados para uso em suplementos alimentares. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 26 jul. 2018(c). Disponível em: <https://www.in.gov.br/materia/-/asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/34380515/do1-2018-07-27-resolucao-da-diretoria-colegiada-rdc-n-239-de-26-de-julho-de-2018-34380387> Acesso em 04 de jun. 2020.

BRASIL, ANVISA. RDC nº 240, de 26 de julho de 2018. Regulamenta o registro de vitaminas, minerais, aminoácidos e proteínas de uso oral, classificados como medicamentos específicos **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 27 jul. 2018(d). Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/3898888/IN_28_2018_.pdf/84235aa6-978d-4240-bc02-1080a0d2cbfd> . Acesso em 04 de jun. 2020.

BRASIL, ANVISA. RDC nº 241, de 26 de julho de 2018. Dispõe sobre os requisitos para comprovação da segurança e dos benefícios à saúde dos probióticos para uso em alimentos **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 26 jul. 2018(e). Disponível em: <https://www.in.gov.br/materia/-/asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/34379910/do1-2018-07-27-resolucao-da>

[diretoria-colegiada-rdc-n-241-de-26-de-julho-de-2018-34379900](#)> Acesso em 04 de junh. 2020.

BRASIL, ANVISA. RDC nº 242, de 26 de julho de 2018. Altera a Resolução - RDC nº 24, de 14 de junho de 2011, a Resolução - RDC nº 107, de 5 de setembro de 2016, a Instrução Normativa - IN nº 11, de 29 de setembro de 2016 e a Resolução - RDC nº 71, de 22 de dezembro de 2009 e regulamenta o registro de vitaminas, minerais, aminoácidos e proteínas de uso oral, classificados como medicamentos específicos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 26jul. 2018(f). Disponível em: <http://www.in.gov.br/materia/-/asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/34379904/do1-2018-07-27-resolucao-da-diretoria-colegiada-rdc-n-240-de-26-de-julho-de-2018-34379893> Acesso em 04 de jun. de 2020.

BRASIL, ANVISA. RDC nº 243, de 26 de julho de 2018. Dispõe sobre os requisitos sanitários dos suplementos alimentares. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 27 jul. 2018(a). Disponível em: <http://www.in.gov.br/materia/-/asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/34379969/do1-2018-07-27-resolucao-da-diretoria-colegiada-rdc-n-243-de-26-de-julho-de-2018-34379917> . Acesso em 04 de junh. 2020.

BRASIL, ANVISA. Resolução nº 899, de 2003. Características a serem consideradas durante a validação de procedimentos analíticos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 29 de mai. 2003.

BRASIL, ANVISA. Resolução RDC nº 27 de 6 de agosto de 2010. Dispõe sobre as categorias de alimentos e embalagens isentos e com obrigatoriedade de registro sanitário. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 10 de agosto de 2010.

BRASIL. ANVISA Resolução nº 19, de 30 de abril de 1999. Aprova o Regulamento Técnico de procedimentos para registro de alimento com alegação de propriedades funcionais e ou de saúde em sua rotulagem. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 30 de abril, 1999(b).

BRASIL. ANVISA. Resolução nº16, de 30 de abril de 1999. Aprova o regulamento técnico de procedimentos para registro de alimentos de novos ingredientes. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF , 30 de abr. 1999 (a)

BRASIL. ANVISA. Resolução RDC nº18 de 27 de abril de 2010. Dispõe sobre alimentos para atletas. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, 30 de Abr.de 2010. Disponível em:<http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2718376/RDC_18_2010_COMP.pdf/1f6e1baf-fd83-4408-8e97-07578fe3db18>. Acesso em: 06 de jun. de 2020.

BRASIL. Decreto-Lei nº 13454 de 23 de junho de 2017. Lei dos Anorexígneos) e suas consequências sobre o regime de vigilância sanitária ao qual estão sujeitos os medicamentos abrangidos por ela. **Diário Oficial [da] República Federativa do**

Brasil, Brasília, DF, 22 de jun. 2017. Disponível em: <https://www2.camara.leg.br/legin/fed/lei/2017/lei-13454-23-junho-2017-785090publicacaooriginal-153183-pl.html> Acesso em 5 de dez 2020.

BRASIL. Ministério da saúde. Secretaria nacional de vigilância sanitária (SVS/MS) . Portaria 32, de 13 de janeiro de 1998. Aprova o Regulamento Técnico para Suplementos Vitamínicos e ou de Minerais. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 13 de jan 1998.

BRASIL. Resolução RDC nº 18 de 27 de abril de 2010. Dispõe sobre alimentos para atletas. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 30 de abril de 2010^a

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

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. 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. 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.

CAVA, T. A. et al, Consumo excessivo de suplementos nutricionais entre profissionais atuantes em academias de ginástica de Pelotas, Rio Grande do Sul, **Epidemiologia e serviços de saúde: Revista do Sistema Único de Saúde do Brasil** v.26, n.1, p. 99-108, 2017.

CDC. Notas de campo: hepatite aguda e insuficiência hepática após o uso de um suplemento dietético para perda de peso ou construção muscular. **Centros para Controle e Prevenção de Doenças (CDC)** v.62, p.817–819. 2013.

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

CHEN, P. S. J. Análise cromatográfica de impressões digitais de casca de yohimbe e suplementos dietéticos relacionados usando UHPLC / UV / MS. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 61, p.142-149, 2012.

CHENG, H. L. et al. Analysis os synthetic chemical drugs in adulterated Chinese medicines by capillary electrophoresis/ electrospray ionization mass spectrometry. **Rapid commun. Mass Spectrom**, V.15, p.1473-1480, 2001.

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 Addit Contam Part A**. p.1029-1039, 2015.

CIMOLAIL, N. An Overview of Yohimbine in Sports Medicine **Sustained Energy for Enhanced Human Functions and Activity**, p.251-260, 2017.

CNR. **Dietary supplement usage up dramatically during pandemic, new ipsos-CRN survey shows**. Concelho de Nutrição Responsável, Washington 2020. Disponível em: <https://web.archive.org/web/20200926081839/https://www.crnusa.org/newsroom/dietary-supplement-usage-dramatically-during-pandemic-new-ipsos-crn-survey-shows> . Acesso em 20 nov. 2020.

DAL MOLIN TR, LEAL GC, MÜLLER LS, MURATT DT, MARCON GZ, CARVALHO LM, et al. Marco regulatório dos suplementos alimentares e o desafio à saúde pública. **Rev Saúde Pública**. v.53. 2019.

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

DEVENTER, K. et al. Detection of urinary markers for thiazide diuretics after oral administration of hydrochlorothiazide and altizide-relevance to doping control analysis. **Journal of Chromatography A**, v.1216, p. 2466-2473, 2009.

DIAS, T. L. I. et al. Metodologias analíticas para a determinação da furosemida. **Lecta** v. 22, n. 2, p. 19-26, 2004.

DICKINSON, A.; MACKAY, D. Health habits and other characteristics of dietary supplement users: a review. **Nutrition Journal** V 13 n.14, 2014.

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.

EUROPEAN COUNCIL. 2003 **Directive 2002/46/EC** of the European Parliament and of the Council of 10 June 2002. On the approximation of the laws of member states relating to food supplements. Official J.E.C. 183:51-57. Disponível em: http://extwprlegs1.fao.org/cgi-bin/faolex.exe?rec_id=029723&database=faolex&search_type=link&lang=eng&format_name=esTree&table=result Acesso em 04 de jun de 2020.

EUROPEAN UNION. **Directive 2002/46/EC of the European Parliament and of the Council of 10 June 2002 on the approximation of the laws of the Member States relating to food supplements**. 2003. Disponível: <<https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/ALL/?uri=celex%3A32002L0046> . Acesso em: 29 de abril de 2020.

FENG, H. T. et al. Parallel analysis and orthogonal identification of N-glycans with different capillary electrophoresis mechanisms. **Analytica Chimica Acta** v.953, p.79-86, 2017.

FRACASSI DA SILVA, J. A. **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.

FUNGH, B. A.; MYERS, A. Citrus aurantium, an ingredient of dietary supplements marketed for weight loss: current status of clinical and basic research. **Exp Biol Med (Maywood)** , v.8, n. 229, p. 698-704, 2004.

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

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

GONÇALVES, G. et al. Excessive dietary supplement use and blood pressure among Brazilian male resistance training practitioners and bodybuilders. **Journal of Substance Use** v.24, p.619-625, 2019.

GOSTON, J. L. Suplementos nutricionais: histórico, classificação, legislação e uso em ambiente esportivo. **Nutrição e Esporte**, v. 9, 2009.

GUIMARÃES, F. L. **Avaliação biofarmacêutica do cloridrato de amilorida como candidato a bioisenoção**. 2016. Dissertação (Mestrado Desenvolvimento de Medicamentos)- Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, MG. 2016.

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

HALPERN, A.; MANCINI, A. C. Treatment of obesity: an update on anti-obesity medications, **Obesity reviews** v.4, p.25-42, 2003.

HELMMLIN, J. H. et al. Detection of the diuretic hydrochlorothiazide in a doping control urine sample as the result of a non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID) tablet contamination. **Forensic Science International**, v. 267, p.166-172, 2016.

INMETRO. Instituto nacional de metrologia Qualidade e tecnologia. **Orientação sobre validação de métodos**. Revisão 9. 2020 Disponível em: file:///C:/Users/User/Downloads/DOQ-Cgcre-8_09.pdf Acesso em 5 jan. 2021.

JACKSON, E. K. **Diuréticos. As Bases Farmacológicas da Terapêutica de Goodman & Gilman**, 10ª ed., Guanabara Koogan : Rio de Janeiro, 2003.

JOHN, J.; 2017 **Global Dietary Supplements Market will reach USD 220.3 Billion in 2022**: Zion Market Research Disponível em <<https://www.globenewswire.com/news-release/2017/01/11/905073/0/en/Global-Dietary-Supplements-Market-will-reach->

[USD-220-3-Billion-in-2022-Zion-Market-Research.html](#) >. Acesso em : 20 de abril de 2020

JUNG, J. et al. Anorexigenic sibutramine detected in a Chinese herbal medicine for weight loss. **Forensic Science International**.n° 161, p.221 – 222, 2006.

KAEFER, C. L. et al. Development and validation of a HPLC-PDA method and preliminary study of synephrine in *Citrus aurantium dry extract*. **Química Nova**, v.38, n.5, 2015.

KARBOWNII, M. S. et al. Health-, medication- and dietary supplement-related behaviors and beliefs relatively unchanged during the COVID-19 pandemic lockdown **Research in Social and Administrative Pharmacy** 2020.

KARTH, A. et al. A case report of atrial fibrillation potentially induced by hydroxycut: a multicomponent dietary weight loss supplement devoid of sympathomimetic amines. **JPharm Pract** . v.3, p 245-9. 2010.

KIM, H. J. et al. Monitoring of 29 weight loss compounds in foods and dietary supplements by LC-MS/MS. **Food Addit Contam Part A**, p.777-783, 2014.

KIM, J. et al. Simultaneous determination of barbiturates, phenytoin and topiramate in hair by LC-MS/MS and application to real samples. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v.106, 2020.

KIM, N. et al Development and validation of an LC-MS/MS method for the simultaneous analysis of 26 anti-diabetic drugs in adulterated dietary supplements and its application to a forensic sample. **Analytical Science and Technology**, v.32, p. 35-47, 2019.

KOHLMANN J. O. et al. Estudo dos efeitos diurético, natriurético e sobre a calemia e caliurese da combinação fixa de furosemida e amilorida em voluntários sadios. **Rev Bras Hipertens** v.13, p.177-185, 2006.

KUBO, K. et al. Suppressive Effect of Citrus aurantium against Body Fat Accumulation and Its Safety. **J Clin Biochem Nutr**, v.36 p.11–7, 2007

LANÇAS, M.F. **Validação de métodos cromatográficos de análise**. Universidade de São Paulo, 2004.

LI, M.F.; CHEUNG, B. M. Rise and fall of anti-obesity drugs. **World J Diabetes**. v.2, p.19-23, 2011.

MAKAREWICZ, E. C. M. et al. Drug adulteration of food supplements: A threat to public health in the European Union? **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v 97, p. 98-102, 2018.

MANZINI, S. et al. Topiramate protects apoE-deficient mice from kidney damage without affecting plasma lipids. **Pharmacological Research**,v.141, p. 189-200, 2019.

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. 72, p. 149-156, 2008.

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

MOREIRA, A. P. L. et al. Capillary electrophoretic methods for the screening and determination of pharmacologic adulterants in herbal-based pharmaceutical formulations. **Electrophoresis**, v. 35, 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 and Contaminants**, v. 30, p.1230-1237, 2013.

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

MÜLLER, L.S. et al. Analysis of pharmacologic adulteration in dietary supplements by capillary zone electrophoresis using simultaneous contactless conductivity and UV detection. **Chromatographia**, v. 81, n. 4, p. 689-698, 2018(b).

MÜLLER, L.S. et al. Determination of stimulants and diuretics in dietary supplements for weight loss and physical fitness by Ion-Pair Chromatography and Pulsed Amperometric Detection (PAD). **Current Analytical Chemistry**, v. 14, 2018.

MÜLLER, L.S. et al. Determination of stimulants and diuretics in dietary supplements for weight loss and physical fitness by Ion-Pair Chromatography and Pulsed Amperometric Detection (PAD). **Current Analytical Chemistry**, v. 14, 2018a.

MURATT, D. T. et al. Pulsed amperometric detection of pharmacologic adulterants in dietary supplements using gold electrode coupled to HPLC separation. **Analytical Methods**, v. 19, 2018.

MYUNG, C. et al. Analytical HPLC method validation of amiloride and its pharmacokinetic study in humans. **Journal of Liquid Chromatography & related Technologies**, v.31, p.2455- 2466, 2008.

NAPPO, S. A. - Revisão: Medicamentos Anorexígenos. **Revista Conselho Federal de Farmácia**, v. 2, n. 5 1993.

NAVARRO, V. J. et al. Liver injury from herbal and dietary supplements. **Hepatology**, v. 65, n. 1, p. 363-373, 2017.

NEVES, D. B. da 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, p. 93-105, 2015.

NURSTEN, R. M. A., Capillary Electrophoresis for Food Analysis – Method Development, **Royal Society of Chemistry**, 2000.

NUSSBAUMER, S. et al. Quality control of pharmaceutical formulations containing cisplatin, carboplatin, and oxaliplatin by micellar and microemulsion electrokinetic chromatography (MEKC, MEEKC). **J Pharm Biomed Anal**, p.253-258. 2011.

NYKAMP, D. L. et al. Possible Association of Acute Lateral-Wall Myocardial Infarction and Bitter Orange Supplement. **Annals of Pharmacotherapy**, v.5, p.812-816, 2004.

PAÍGA, P. et al. Analysis of pharmaceutical adulterants in plant food supplements by UHPLC-MS/MS. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 99, p. 219-227, 2018.

PASCALI, J.P. et al. Application of HRAM screening and LC-MS/MS confirmation of active pharmaceutical ingredient in “natural” herbal supplements. **Forensic Science International**, v. 288, p. 28-31, 2018.

PEREIRA et al., Anabolic steroids among resistance training practitioners. **Plos One** v.14, n.2, 2019.

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

RIBEIRO, S. M. et al. Development and Validation of an HPLC-DAD Method to Quantify Caffeine in Time-release Dosage Forms. **Indian Journal Of Pharmaceutical Sciences**. v. 81, p. 626-632, 2019.

Rodrigues, S. I.; Cargnin, C. A. Consumo de suplementos nutricionais nas academias da cidade de Braço do Norte-SC. **RBNE - Revista Brasileira De Nutrição Esportiva**, V.12. p.213-221, 2018.

ROSSATO, L.C. et al. Synephrine: From trace concentrations to massive consumption in weight loss. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, p. 8-16, 2011.

ROSSI, S. S. et al. Liquid chromatography–high resolution mass spectrometry (LC–HRMS) determination of stimulants, anorectic drugs and phosphodiesterase 5 inhibitors (PDE5i) in food supplements. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, p.144-152, 2015.

SANTOS, J. F. et al. Avaliação do consumo de suplementos alimentares entre praticantes de musculação em academias de Anápolis- GO. **Revista Científica Multidisciplinar Núcleo do Conhecimento**, v.6. p.114-125, 2018.

SANTOS, V. B. et al. Amphetamine and derivatives in natural weight loss pills and dietary supplements by capillary electrophoresis-tandem mass spectrometry. **J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci**, n.1038, p. 19-25, 2016.

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**, v. 1038, p. 19–25, 2016.

SARDELA, V. F.; CARVALHO, R. A.; NUNES, C. K. I. The black market for anorectic agents: A case study of amfepramone. **Toxicologie Analytique et Clinique**, v.30, p.149-153, 2018.

SCHENEIDER, C. et al. Consumo de suplementos nutricionais por praticantes de exercícios físicos em academias de musculação de Balneário Camburiú- SC. **Revista Brasileira de Nutrição Esportiva**, São Paulo V.2, n. 11, p.307-322, 2008.

Silva, C. C.; Silva, R. P. P. Consumo de suplementos alimentares por adultos praticantes de musculação em academias no interior de Pernambuco. **RBNE - Revista Brasileira De Nutrição Esportiva**, v.12, n.73, p.617-627, 2018.

SOMMER, M. et al. Psychological and neuroendocrine responses to social stress and to the administration of the alpha-2-receptor antagonist, yohimbine, in highly trained endurance athletes in comparison to untrained healthy controls. **Pharmacopsychiatry**, v.44, p.129-134, 2011.

SOUZA, M.; V. ALVES, M. K . Perfil Socioeconômico de usuários e utilização de suplementos em uma loja especializada em produtos nutricionais na serra gaúcha. **Revista Brasileira de Nutrição Esportiva**, São Paulo. v. 13. n. 78. p.206-211, 2019.

SPUDEIT, A. D.; DOLZAN, D. M.; MICKE, G. A. Conceitos básicos em Eletroforese Capilar. **Scientia Chromatographica**, p.287-297, 2012.

SPUDEIT, D.A. et al. Conceitos básicos em Eletroforese Capilar. **Scientia Chromatographica**, v.4, p. 287-297, 2012.

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

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

TERABE, S. et al. Cromatografia eletrocínética Micelar. **Adv. Electrophor**, v.7, p. 87-153, 1984.

THAKRAL, S.; MADAN, A.K. Adduction of Amiloride Hydrochloride in Urea Through a Modified Technique for the Dissolution Enhancement. **Journal of pharmaceutical sciences**, v.97, n°. 3, 2008.

USA. Dietary Supplement Health and Education Act, (DSHEA) **United States Food and Drugs Administration**. 1994. Disponível em: < https://ods.od.nih.gov/About/DSHEA_Wording.aspx >. Acesso em 05 de maio de 2020.

USA. FDA Tainted Products Marketed as Dietary Supplements_CDER. **United States Food and Drug Administration**. 2015 (a). Disponível em: <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/sda/sdNavigation.cfm?filter=&sortColumn=1d>

[&sd=tainted_supplements_cder&page=1&displayAll=true](#) Acesso em 20 de nov. 2020.

VEDOVELI, I. dos SANTOS, I. V.; BORGES, L. E. C. Hábitos alimentares e o uso de suplementos alimentares em indivíduos frequentadores de uma academia no município de Potirendaba-SP. **Revista Unilago** v.1 n.1 2019.

VERKERK, H. J.; HICKEY, S. A critique of prevailing approaches to nutrient risk analysis pertaining to food supplements with specific reference to the European Union. **Toxicology** V.278, p.17-26. 2010.

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

VIANA, R.B. et al. Profiling the Use of Dietary Supplements by Brazilian Physical Education Professionals. **Journal of Dietary Supplements**, v .15, n.6, p. 884-892, 2018.

VIDAL, C.; QUANDTE, S. Identification of a sibutramine-metabolite in patient urine after intake of a "pure herbal" Chinese slimming product". **Ther. Drug Monit**, nº28, p. 690 – 692, 2006.

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

WADA. **World Anti-Doping Agency. 2015.** World Anti-Doping Code. Disponível em: http://www.wada-ama.org/Documents/World_Anti-Doping_Program/WADP-The-Code/Code_Review/Code_Review_2015/Code_Final_Draft/WADA-2015-World-Anti-Doping-Code.pdf. Acesso em 20 de nov. 2020.

WOO, H. et al. Simultaneous analysis of 17 diuretics in dietary supplements by HPLC and LC-MS/MS. **Food Additives & Contaminants**, n. 1072954, p.209–217, 2013.

XU, L.; DONG, Y. X.; SUN, Y. Novel poly(vinyl alcohol)-based column coating for capillary electrophoresis of proteins. **Biochemical Engineering Journal**, v.53, p137-142, 2010.

ZULLI, A. Caffeine and cardiovascular diseases: critical review of current research. *Europe journal of nutrition*, v.55 p.1331-1343, 2016.

ZUNTAR, A. K. et al. Pharmacological and toxicological health risk of food (herbal) supplements adulterated with erectile dysfunction **Medications Current Opinion in Food Science** v. 24, p. 9-15, 2018.