

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

Thaís Ramos Dal Molin

**SUPLEMENTOS ALIMENTARES COMERCIALIZADOS NO BRASIL:
UMA ABORDAGEM ROTULAR, ANALÍTICA E TOXICOLÓGICA**

Santa Maria, RS
2019

Thaís Ramos Dal Molin

**SUPLEMENTOS ALIMENTARES COMERCIALIZADOS NO BRASIL: UMA
ABORDAGEM ROTULAR, ANALÍTICA E TOXICOLÓGICA**

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração em Controle e Avaliação de Insumos e Produtos Farmacêuticos, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS).

Orientador (a): Prof^ª. Dr.^ª Carine Viana Silva

Santa Maria, RS
2019

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

Dal Molin, Thaís Ramos
Suplementos Alimentares Comercializados no Brasil:
uma abordagem rotular, analítica e toxicológica / Thaís
Ramos Dal Molin.- 2019.
182 p.; 30 cm

Orientadora: Carine Viana Silva
Coorientador: Leandro Machado de Carvalho
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós
Graduação em Ciências Farmacêuticas, RS, 2019

1. Suplementos alimentares 2. Adulterantes 3.
Toxicidade 4. Regulamentação I. Silva, Carine Viana II.
de Carvalho, Leandro Machado III. 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, THAÍ S RAMOS DAL MOLIN, para os devidos fins e sob as penas da lei, que a pesquisa constante neste trabalho de conclusão de curso (Tese) 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.

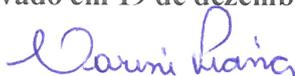
de

Thaís Ramos Dal Molin

**SUPLEMENTOS ALIMENTARES COMERCIALIZADOS NO BRASIL: UMA
ABORDAGEM ROTULAR, ANALÍTICA E TOXICOLÓGICA**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de concentração em Desenvolvimento e Avaliação de Produtos Farmacêuticos, da Universidade Federal de Santa Maria, como requisito parcial para obtenção do título de **Doutora em Ciências Farmacêuticas**

Aprovado em 19 de dezembro de 2019



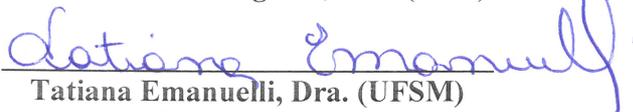
Carine Viana Silva, Dra. (UFSM)
(Presidente/orientador)



Michel Mansur Machado, Dr. (UNIPAMPA) – Parecer



Michele Rorato Sagrillo, Dra. (UFN)



Tatiana Emanuelli, Dra. (UFSM)



Liziane Maahs Flores, Dra. (UFSM)

Santa Maria, RS
2019

a
e
o
a
as

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho àqueles que me ensinaram sobre ser resistência em tempos sombrios, estar resiliente em situações desfavoráveis e a ter fé naquilo que acreditamos, minha família Maribel Ramos Dal Molin, João Carlos Dal Molin e Diego Ramos Dal Molin (in memoriam)

AGRADECIMENTOS

Este trabalho é o encerramento de um ciclo muito abençoado em minha vida, foram dez anos dedicados ao amor à pesquisa em uma instituição federal de qualidade reconhecida nacionalmente. Esse capítulo da minha vida não poderia ser elaborado se não fosse com a ajuda de todos aqueles que acompanharam e me incentivaram ao longo dessa trajetória.

Inicialmente agradeço a minha orientadora Prof^a Carine Viana, que mesmo antes de ser minha professora foi minha amiga, aquela que sempre me aconselhou, me deu carinhos e abraços e que acima de tudo me ajudou na minha evolução profissional. Agradeço também ao Prof. Leandro Machado de Carvalho que me acolheu nos primeiros semestres da faculdade, e aos grandes mestres o Prof. Paulo Cícero do Nascimento e a Prof^a. Denise Bohrer, que sempre estiveram ali para dar conselhos e sanar as nossas dúvidas. À banca, minha eterna gratidão por se dispor à avaliar e contribuir com o meu trabalho.

Sou grata também aos professores que desde quando eu nem imaginava ser pesquisadora, já me instigavam o lado de querer contribuir com a sociedade. Às professoras Aline Fogaça e Michele Sagrillo meu muito obrigado. Agradeço também às contribuições e ajuda do professor Alencar Kolinski, que teve um papel fundamental para a elaboração deste projeto. Assim como a minha querida colega, e que se tornou grande amiga, Lauren, as tuas dicas e o auxílio foram imprescindíveis para a realização dos ensaios.

Fazer pesquisa é muitas vezes exaustivo e desestimulante. No entanto, o aconchego de bons amigos, as boas energias emanadas ou um simples abraço sem nenhuma palavra é o que nos renova e nos dá forças para seguir adiante. Palavras não são o suficiente para descrever o quanto vocês são importantes para mim Alex, Ananda e Bruna. Acredito que nessa vida eu não seja capaz de retribuir tudo o que vocês representaram ao longo dessa trajetória. Vocês me inspiram e me ajudam a continuar, mesmo quando desistir parecia ser a saída mais fácil. Obrigada por serem o tijolinho, cimento, tinta e tudo da minha construção.

Respirar para não pirar também é essencial, e buscar isso através de uma atividade que me faz tão bem e que ao mesmo tempo me proporcionou grandes amizades é muito gratificante. Aos meus amigos de escalada e de vida, Alessandra, Greice, Iván, Jeferson, Neyha, Ronaldo, Tiago, Vanessa (e Antônia), Vinicius e Viviane, obrigada por me ajudarem a desfrutar da vida com leveza e alegrias.

Às vezes a vida nos mostra que devemos evoluir e deixar alguns julgamentos de lado, para nos tornamos pessoas melhores. Géssica, minha parceira científica e de ideias, muito obrigada por me estimular a crescer e por tornar nossa amizade mais leve, divertida e cheia de

conquistas. Também agradeço aos colegas desses 10 anos de Lachem que passaram na minha vida, e deixaram um pouquinho de alegria nos cafés e lanches do dia-a-dia. Luís F., Sandra, Larissa, Monique, Marcella, Lucas, Diana, Carol, Gabriela Leal, Carol G. (minha eterna IC), Gobo, e entre tantos outros nomes que não mencionei aqui mas que levo com muito carinho no coração.

A vida, sempre muito generosa comigo, colocou ao meu lado pessoas iluminadas com as quais eu aprendi muito e me ajudaram muito. Geane, Julierme, Felipe, Camila, Conan, Janaína, Camillo, Alcides, Luiz, Bibiana, João, Tati, entre tantos outros que não estão aqui nomeados, mas que enchem minha vida de alegria, obrigada por tudo!

Agradeço à minha outra família, Vera (tio Pinto para os íntimos), Murilo, Marina e Valter por sempre torcerem comigo, me cuidarem e me receberem de braços abertos quando precisei. Contem sempre conosco.

Esse cantinho é especial para aquele que me ensinou tanto nesses últimos sete anos, aquele que me mostrou que quando a gente tem um sonho a gente deve lutar até o fim, aquele que me mostrou que nada é impossível nessa vida. Meu noivo, futuro esposo, aquele que eu quero ter sempre ao meu lado, Diego Aguiar de Arruda, obrigada por me incentivar, me apoiar e ser meu maior fã (junto com o Choppinho) ao longo do desenvolvimento desse trabalho. Cada linha escrita, cada parágrafo discutido, tem o apoio e suporte de alguém que nunca me deixou desistir. Eu te amo muito. Agradeço também pela linda família que tu me deste. Com apoio dos teus pais, tias e avó e do nosso filhote peludo, tudo fica mais leve.

Aos meus pais, meus confidentes, meus ídolos, meu tudo. A vida muitas vezes nos traz obstáculos que parecem que nunca vamos superar. Contudo tenho certeza que ela também nos mostra que podemos aprender com cada erro, cada situação inesperada e até mesmo com cada acerto. Vocês são tudo na minha vida, obrigada por vocês terem me escolhido para vir como filha de vocês nessa missão, vocês me ensinaram muito nesses últimos quatro anos, me incentivaram, me apoiaram, comemoraram as minhas conquistas e me abraçaram nas derrotas. Eu amo vocês do infinito ao além.

Ao Lachem por todos esses anos de aprendizado e crescimento profissional e pessoal. Obrigada aos colegas, professores, amigos pelo suporte emocional e científico.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas obrigada pelo apoio e suporte. À secretária Rosalira e à coordenação, obrigada por todas as dúvidas sanadas e auxílios durante o doutorado. À CAPES pelo apoio e suporte financeiro.

À Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) pelo ensino público disponível a todos, gratuito e de qualidade.

RESUMO

SUPLEMENTOS ALIMENTARES COMERCIALIZADOS NO BRASIL: UMA ABORDAGEM ROTULAR, ANALÍTICO E TOXICOLÓGICA

AUTORA: Thaís Ramos Dal Molin
ORIENTADORA: Carine Viana Silva

O consumo de suplementos alimentares vem crescendo mundialmente, levando a faturamentos bilionários a cada ano. Devido à grande demanda, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) publicou o marco regulatório dos suplementos alimentares a fim de regularizar, padronizar e diminuir os entraves legais destes produtos. Dessa forma, o presente trabalho teve por objetivo elencar e adquirir produtos comercializados como suplementos alimentares, para a realização de uma análise regulatória, avaliação das suas composições nutricionais e não nutricionais, investigação da presença de adulterantes e realização de um estudo toxicológico. Com isso, foram adquiridas 44 amostras de suplementos alimentares em lojas virtuais brasileiras. Dessas, 97,7% estavam irregulares quanto as alegações atribuídas e 34,2% não poderiam ser comercializadas como suplementos alimentares devido aos ingredientes declarados. Quanto a composição centesimal 20 amostras (45,54%) continham as informações nutricionais obrigatórias nos rótulos e dessas, 70% (n = 14) apresentavam valores de nutrientes acima da tolerância permitida pela legislação. Para a investigação da presença de adulterantes em suplementos alimentares, foi proposto um método por HPLC-DAD para a determinação de 10 substâncias não permitidas, com tempo de análise inferior a cinco minutos. O método proposto foi validado de acordo com as diretrizes da AOAC e Anvisa e representou uma economia de 40% quando comparado a outros métodos convencionais, sendo que o gasto estimado para análise foi de US\$ 7,00 para cada amostra. Das 44 amostras analisadas, sete (15,90%) continham pelo menos um adulterante, como diuréticos, estimulantes sexuais e anabolizantes. Os suplementos adulterados possuíam características comuns entre si, como comercialização em mercado negro, matéria-prima ou produto de origem importada, ausência de informações nos rótulos e alegações que induziam a presença de substâncias farmacológicas. Posteriormente, foi realizado um estudo de predição *in silico* dos adulterantes a fim de comparar com os resultados da citotoxicidade *in vitro* e, dessa forma, poder inferir se a presença das substâncias encontradas é fator determinante para aumento da toxicidade dos suplementos alimentares. Apesar da necessidade de maiores estudos com relação a matriz das amostras, os resultados indicam que há uma relação entre os multiingredientes declarados nas amostras e os adulterantes encontrados, quanto à citotoxicidade. Todas as sete amostras estudadas apresentaram efeitos citotóxicos por diferentes mecanismos e proporcionais à concentração. Foram observadas diminuição de viabilidade celular, hemólise célula aumento significativo na liberação de espécies reativas de oxigênio. A partir da publicação do marco regulatório as indústrias têm cinco anos para se adaptarem as novas regras. Contudo, espera-se que os resultados aqui demonstrados sirvam de alerta, tanto para as agências regulatórias quanto para os consumidores, principalmente em relação aos produtos vendidos de forma irregular, ou que apresentam alguma não conformidade em seu rótulo, ou até mesmo na sua composição. A presença de adulterantes em suplementos alimentares é um grave problema de saúde pública, que pode acarretar em danos irreversíveis à saúde da população.

Palavras-chave: Suplementos alimentares. Adulterantes. Toxicidade. Regulamentação.

ABSTRACT

DIETARY SUPPLEMENTS COMMERCIALIZED IN BRAZIL: A ROTULAR, ANALYTICAL AND TOXICOLOGY APPROACH

AUTHOR: Thaís Ramos Dal Molin

ADVISOR: Carine Viana Silva

Consumption of dietary supplements has been increase worldwide, leading billionaires billing for Brazilian industries. Due to this situation, the National Health Surveillance Agency (Anvisa) has developed a new regulatory framework for dietary supplement, in order to regularize, to standardize and reduce the legal barriers of these products. This way, the present work aimed to acquired a certain number of samples marketed as food supplements, for a regulatory analysis, composition evaluation, investigation of the presence of adulterants and for a toxicological study. 44 samples of dietary supplements were purchased via the internet. From these, 97.7% showed irregular claims and 34.2% could not be commercialized as dietary supplements due their ingredients declared on the label. Still, regarding the centesimal composition, only 20 samples described the mandatory nutritional information on the label and, from these, 70% presented nutritional values above the tolerance allowed by the legislation. To investigate of the presence of adulterants in dietary supplements, a HPLC-DAD method was proposed for the determination of 10 non-permitted substances, with time of analysis less than five minutes. The proposed method was validated according to AOAC and Anvisa guidelines, and represented an economy of 40% when compared to LC-MS/MS, and the estimated cost for analysis was US\$ 7.00 per sample. From 44 analyzed samples, seven contained at least one adulterant in their composition, such as diuretics, sexual stimulants and anabolic, for example. The adulterated supplements presented common characteristics, such as the acquisition in not specialized market, were imported from other countries, lack of information on the label and use of the claims that induced the presence of drugs in the composition. After this, an *in silico* prediction study was performed in order to compare with the *in vitro* cytotoxicity results, and thus, it was able to evaluate if the presence of the found substances is a determining factor for the increase of the toxicity in health cells. Despite the need for further studies regarding the sample matrix, the results indicate that there is a relationship between the multi-ingredients declared in the samples and the adulterants found, considering the cytotoxicity of the products. All seven samples presented cytotoxic effects, proportional to the concentration, by different mechanisms, either reducing cell viability, hemolysis or a significant increase of reactive oxygen species. Since the publication of the regulatory framework, the industries have five years to adapt to the new guidelines, however, is expected that the results shown here serving as a warning to both regulatory agencies and consumers for those irregularly sold products, or which ones that have some nonconformity in their label or even in their composition. The presence of adulterants in food supplements is a serious public health problem that can lead to irreversible health damage to those who consume them.

Keywords: Dietary supplements. Adulterants. Toxicity. Regulation

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Distribuição regulatória dos suplementos alimentares comercializados no Brasil até 2017.	27
Figura 2 - Principais motivos para a retirada ou suspensão de comercialização dos suplementos alimentares no Brasil nos últimos 5 anos.....	30
Figura 3 - Principais motivos declarados pelo FDA para a retirada dos suplementos alimentares do mercado norte americano entre os anos 2010 à 2019.....	32
Figura 4 - Principais características que podem afetar o controle de qualidade dos suplementos alimentares.	36
Figura 5 - Esquema de identificação de dano hepático proveniente de suplementos alimentares.	46
Figura 6 - Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência com detecção por Arranjo de Diodos utilizado para o desenvolvimento do presente trabalho.....	51
Figura 7 – Esquema de preparo das amostras de suplemento alimentar.....	54
Figura 8 - Representação gráfica dos registros das amostras avaliadas: (A) declarações pelo fabricante; (B) declarações ideais, conforme as diretrizes regulatórias vigentes.	77
Figura 9 - Teor de umidade das amostras de suplementos alimentares e o desvio padrão considerando os resultados totais da população.	95
Figura 10 - Distribuição dos teores de cinzas das 44 amostras de suplementos alimentares analisadas.	96
Figura 11 - Distribuição dos teores de proteínas das amostras de suplementos alimentares adquiridas em lojas virtuais.	97
Figura 12 - Comparativo entre a quantidade de proteínas em gramas encontrada por porção do produto (∇) e a quantidade de proteínas em gramas por porção declaradas no rótulo pelo fabricante (\blacktriangle).....	98
Figura 13 - Distribuição dos teores de carboidratos das amostras de suplementos alimentares adquiridas em lojas virtuais.	105
Figura 14 - Estrutura molecular dos analitos de interesse para o desenvolvimento do método.	109
Figura 15 - Espectros absorção ultravioleta dos analitos de interesse para o presente estudo.	111

Figura 16 - Demonstração dos tempos de retenção para cada analito obtido através do estudo de Fase Móvel A. Condições do método: 0-100% Fase móvel B (acetonitrila) por 25 minutos, à 24 °C, fluxo 1,0 mL/min.	112
Figura 17 - Demonstração dos tempos de retenção para cada analito obtido através do estudo da concentração de Ácido Fórmico como Fase Móvel A. Condições do método: 0-100% Fase móvel B (acetonitrila) por 25 minutos, à 24 °C, fluxo de 1,0 mL/min. .	113
Figura 18 - Cromatograma desmostrativo do estudo de temperatura de análise dos compostos, monitorados em 263 nm.	114
Figura 19 - Cromatograma de separação dos adulterantes a 10 µg/mL. Condições cromatográficas: fase móvel A 0,1% de ácido fórmico, fase móvel B acetonitrila, coluna C18 Poroshel 120, temperatura 45°C.....	116
Figura 20 - Cromatograma demonstrativo da interferência da cafeína na hidroclorotiazida. Condições cromatográficas: fase móvel A 0,1% de ácido fórmico, fase móvel B acetonitrila, coluna C18 Poroshel 120, temperatura 45°C.....	117
Figura 21 - Espectros de absorção da cafeína e hidroclorotiazida. Condições cromatográficas: fase móvel A 0,1% de ácido fórmico, fase móvel B acetonitrila, coluna C18 Poroshel 120, temperatura 20°C.	118
Figura 22 - Cromatograma de separação da cafeína e hidroclorotiazida. Condições cromatográficas: fase móvel A 0,1% de ácido fórmico, fase móvel B acetonitrila, coluna C18 Poroshel 120, temperatura 20°C.....	119
Figura 23 - Gráfico demonstrativo da determinação da faixa linear dinâmica para o propionato de testosterona, onde no eixo y encontram-se a razão sinal:ruído e no eixo x o Log da concentração analisada.	120
Figura 24 - Curvas analíticas para cada substância em estudo, suas respectivas equações da reta e coeficiente de correlação.	121
Figura 25 - Comparação entre diferentes solventes para a extração dos analitos de interesse da amostra de suplemento alimentar. Os resultados estão expressos em percentual de recuperação.....	128
Figura 26 - Comparativo entre os espectros do pico sugestivo do propionato de testosterona na amostra (linha sólida) e do padrão de propianoto de testosterona (linha pontilhada).	131
Figura 27 - Cromatograma dos picos sugestivos de adulteração por sildenafil na amostra S6 (a) e tadalafil na amostra S7 (b), com sobreposição dos espectros.	134

Figura 28 - Portas de entrada dos suplementos alimentares no Brasil. I) Através da fronteiras e portos, II) Adicionados de medicamentos falsificados e distribuídos, III) Adulteração proposital para então comercialização.	135
Figura 29 - Diluição das amostras para estudo de citotoxicidade. Inicialmente a amostra era diluída em Metanol:DMSO 1:1 (v/v) até a concentração de 200 mg/mL. Posteriormente, a amostra foi diluída sete vezes em meio RPMI.	140
Figura 30 - Ensaio de viabilidade celular (MTT) após 24 horas de incubação. Os resultados são expressos em percentual do controle negativo (100%). Os dados são apresentados como % do grupo controle não tratado (CN), expressos como média ± desvio padrão. As análises foram realizadas por Anova de uma via seguido do teste de post hoc de Dunnett. Valores com $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes. Sendo * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$	142
Figura 31 – Quantificação do dsDNA livre em solução após os tratamentos. Os resultados são expressos em percentual do controle negativo (100%). Os dados são apresentados como % do grupo controle não tratado (CN), expressos como média ± desvio padrão. As análises foram realizadas por Anova de uma via seguido do teste de post hoc de Dunnett. Valores com $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes. Sendo * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$	144
Figura 32 – Quantificação de espécies reativas de oxigênio em PBMCs após o tratamento. Os resultados são expressos em percentual do controle negativo (100%). Os dados são apresentados como % do grupo controle não tratado (CN), expressos como média ± desvio padrão. As análises foram realizadas por Anova de uma via seguido do teste de post hoc de Dunnett. Valores com $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes. Sendo * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$	146
Figura 33 – Quantificação da liberação de óxido nítrico após o tratamento. Os resultados são expressos em percentual do controle negativo (100%). Os dados são apresentados como % do grupo controle não tratado (CN), expressos como média ± desvio padrão. As análises foram realizadas por Anova de uma via seguido do teste de post hoc de Dunnett. Valores com $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes. Sendo * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$	148
Figura 34 - Resultados da quantificação da hemólise dos eritrócitos após os tratamentos. Os resultados são expressos em percentual do controle negativo (100%). Os dados são apresentados como % do grupo controle não tratado (CN), expressos como média ± desvio padrão. As análises foram realizadas por Anova de uma via seguido do teste	

de post hoc de Dunnett. Valores com $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes. Sendo $*p < 0,05$, $**p < 0,01$ e $***p < 0,001$ 150

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Resumo das definições de alimentos para atletas segundo a RDC da Anvisa nº 18 de 2010.....	26
Tabela 2- Trabalhos descritos na literatura de métodos validados para a investigação de adulterantes em suplementos alimentares	42
Tabela 3 - Padrões dos fármacos estudados como adulterantes e interferentes para a otimização e validação do método.	52
Tabela 4 - Amostras de suplementos alimentares adquiridas estudadas no presente trabalho.	63
Tabela 5 - A frequência entre as categorias dos produtos, efeitos atribuídos aos produtos observados no rótulo e os ingredientes majoritários dos suplementos alimentares estudados.....	75
Tabela 6 - Composição nutricional declarada no rótulo das amostras de suplementos alimentares adquiridas no presente estudo.....	88
Tabela 7 - Comparativo entre os teores de proteínas declarado pelo fabricante e os teores determinados após a análise de nitrogênio pelo método Kjeldahl. Foram consideradas conformes, as amostras apresentando diferença de máximo $\pm 20\%$, entre o teor encontrado e o rotulado.....	99
Tabela 8 - Comparativo dos teores de lipídeos declarados no rótulo que os teores obtidos pela extração com éter conforme preconizado pelo Instituto Adolfo Lutz (2008).....	101
Tabela 9 - Comparativo entre os teores de lipídeos declarados pelo fabricante e os teores determinados após a análise de extração em Soxhlet com éter. Foram consideradas conforme aquelas que apresentaram a diferença entre o teor encontrado e o rotulado $\pm 20\%$	103
Tabela 10 - Comparativo entre os teores de carboidratos declarados pelo fabricante e os teores determinados após o cálculo da diferença entre 100 g de amostra e o somatório das porcentagens de umidade, cinzas, lipídeos totais e proteínas.....	106
Tabela 11 - Condições cromatográficas do método proposto para a determinação de fármacos adulterantes por HPLC-DAD.....	115
Tabela 12 - Parâmetros de regressão, resultados da análise de variância e apresentação dos limites de quantificação e de detecção para a determinação de hidroclorotiazida, ioimbina, vardenafil, sildenafil, clenbuterol, tadalafil, bisacodil, testosterona, espironolactona e propionato de testosterona.	124
Tabela 13 - Precisão e exatidão instrumentais do método UHPLC-DAD desenvolvido.....	127

Tabela 14 - Resultados obtidos para os estudo de robustez do método, mediante da variação de temperatura, concentração da fase móvel A e fluxo de análise.	129
Tabela 15 - Suplementos alimentares suspeitos de adulteração e a relação de similaridade entre as substâncias investigadas e os padrões.	132
Tabela 16 - Comparativo de custos entre o método por HPLC-DAD proposto e o método por UHPLC-ESI-MS/MS ¹ descrito na literatura.....	136
Tabela 17 - Predição da toxicidade dos adulterantes encontrados em suplementos alimentares e da cafeína, presente como composto majoritário das amostras, obtido via simulação computacional.....	139
Tabela 18 - Resumo comparativo da toxicidade in silico e citotoxicidade in vitro das amostras de suplemento alimentares estudadas.	152

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOAC	<i>Association of Official Analytical Chemists</i>
BCAA	do inglês Branched Chain AminoAcids
BRASNUTRI	Associação Brasileira dos Fabricantes de Suplementos Nutricionais e Alimentos para Fins Especiais
CZE-C ⁴ D	Eletroforese Capilar de Zona com Detecção por Condutividade
DAD	Detecção por Arranjo de Diodos
DMAA	1,3-Dimetilamilamina
DHEA	Dehidroepiandrosterona
DSHEA	<i>Dietary Supplement Health and Education Act</i>
DPR	Desvio Padrão Relativo
EAA _s	Esteroides Androgênicos Anabólicos
ESI	Ionização por Eletrospray
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
FI	Injeção em fluxo, do inglês <i>Flow injection</i>
FDA	<i>Food and Drugs Administration</i>
FTIR	Infravermelho com Transformada de Fourier, do inglês <i>Fourier Ion Transform Infrared</i>
HNMR	Ressonância Magnética Nuclear, do inglês <i>Nuclear Magnetic Resonance</i>
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, do inglês <i>High Performance Liquid Chromatography</i>
HPTLC	Cromatografia Líquida de Camada Fina de Alta Eficiência, do inglês <i>High Performance Thin Layer Chromatography</i>
GC	Cromatografia Gasosa, do inglês <i>Gas Chromatography</i>
GMPC	Guanosina monosfosfato cíclica
IN	Instrução Normativa
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
iPDE-5	Inibidor da fosfodiesterase-5
IR	Infravermelho, do inglês <i>Infrared</i>
LACHEM	Laboratório de Análises Químicas
LC	Cromatografia líquida, do inglês <i>Liquid chromatography</i>
LOD	Limite de Detecção
LOQ	Limite de Quantificação
MS/MS	Espectrometria de Massas Sequencial
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina
NMR	Ressonância Magnética Nuclear do inglês <i>Nuclear Magnetic Resonance</i>
ON	Óxido Nítrico
PAD	Detecção Amperométrica Pulsada, do inglês <i>Pulsed Amperometric Detection</i>
PBS	Tampão fosfato salino
PBMC	Células Mononucleadas do Sangue Periférico, do inglês <i>Peripheral Blood Mononuclear Cells</i>
PDE-5	Fosfodiesterase-5
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada

RPMI	meio de cultura de células do tipo RPMI (do inglês <i>Roswell Park Memorial Institute</i>)
DPR	Desvio Padrão Relativo
SQR	Substâncias Químicas de Referência
TLC – SERS	Cromatografia de Camada Fina com espalhamento de superfície melhorada de Raman (do inglês <i>Thin-layer Chromatography and Surface-enhanced Raman scattering</i>)
TOF	Analisador de Massas do tipo tempo-de-voo, do inglês <i>Time-of-flight</i>
UFN	Universidade Franciscana
UFSM	Universidade Federal de Santa Maria
UHPLC	Cromatografia Líquida de Ultra-alta Eficiência, do inglês <i>Ultra High Performance Liquid Chromatography</i>
UPLC	Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência, do inglês <i>Ultra Performance Liquid Chromatography</i>
UV	Deteção Ultravioleta
WADA	Agência Mundial Antidoping, do inglês <i>World Antidoping Agency</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
1.2.1 Objetivo geral	21
1.2.2 Objetivos específicos	21
2.1 UM BREVE HISTÓRICO DOS SUPLEMENTOS ALIMENTARES	23
2.1.1 Suplementos alimentares no Brasil e o marco regulatório	25
2.2 CONTROLE DE QUALIDADE EM SUPLEMENTOS ALIMENTARES	30
2.2.1 Fármacos adulterantes em suplementos alimentares	32
<i>2.2.1.1 Adulterações com esteroides anabolizantes</i>	36
<i>2.2.1.2 Adulterações com estimulantes sexuais</i>	38
<i>2.2.1.3 Adulterações com diuréticos</i>	40
2.3 MÉTODOS PARA INVESTIGAÇÃO DE ADULTERANTES	41
2.3.1 Cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por arranjo de diodos (HPLC-DAD) na investigação de adulterantes em suplementos alimentares	44
2.4 TOXICIDADE DOS SUPLEMENTOS ALIMENTARES	45
2.5 MÉTODOS ALTERNATIVOS PARA O USO DE ANIMAIS	47
3 MATERIAL E MÉTODOS	49
3.1 ANÁLISE DOS ASPECTOS REGULATÓRIOS DOS SUPLEMENTOS ALIMENTARES	49
3.1.1 Aquisição das amostras	49
3.1.2 Classificação das amostras	50
3.2 AVALIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DOS SUPLEMENTOS ALIMENTARES	50
3.3 DESENVOLVIMENTO DE UM MÉTODO ANALÍTICO PARA A DETERMINAÇÃO DE ADULTERANTES	51
3.3.1 Instrumentação e Reagentes	51
<i>3.3.1.1 Substâncias químicas de referência</i>	52
3.3.2 Preparo das amostras	54
3.3.3 Parâmetros de validação do método analítico	55
<i>3.3.3.1 Seletividade do método</i>	55
<i>3.3.3.2 Linearidade</i>	55
<i>3.3.3.3 Faixa de trabalho</i>	55

3.3.3.4	<i>Precisão</i>	56
3.3.3.5	<i>Exatidão</i>	56
3.3.3.6	<i>Limite de detecção (LOD) e quantificação (LOQ)</i>	56
3.3.3.7	<i>Robustez</i>	56
3.3.4	Análise estatística dos dados	57
3.4	ESTUDO DA TOXICIDADE <i>in silico</i> e CITOTOXICIDADE <i>in vitro</i> DOS SUPLEMENTOS ALIMENTARES ADULTERADOS.....	57
3.4.1	Estudo da toxicidade <i>in silico</i> dos adulterantes	57
3.4.2	Estudo da citotoxicidade <i>in vitro</i> para os suplementos adulterados	58
3.4.2.1	<i>Coleta de sangue para estudos de citotoxicidade in vitro</i>	58
3.4.2.2	<i>Cultura celular e tratamento</i>	58
3.4.2.3	<i>Ensaio de hemólise</i>	59
3.4.2.4	<i>Avaliação da viabilidade celular pelo ensaio de MTT</i>	59
3.4.2.5	<i>Ensaio de Óxido Nítrico</i>	60
3.4.2.6	<i>Liberção de espécies reativas de oxigênio (EROs)</i>	60
3.4.2.7	<i>Ensaio de dano de fita dupla do DNA (dsDNA)</i>	61
3.4.2.8	<i>Análise estatística</i>	61
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	62
4.1	ANÁLISE DOS ASPECTOS REGULATÓRIOS DOS SUPLEMENTOS ALIMENTARES.....	74
4.1.1	Inconformidades regulatórias das amostras analisadas	74
4.1.2	Principais compostos adicionados nos suplementos alimentares	78
4.1.2.1	<i>Substâncias emagrecedoras ou termogênicas</i>	79
4.1.2.2	<i>Vitaminas e minerais</i>	81
4.1.2.3	<i>Construtores musculares</i>	83
4.1.2.4	<i>Espécies vegetais</i>	84
4.1.3	Marco regulatório dos suplementos alimentares	85
4.2	AVALIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DAS AMOSTRAS DE SUPLEMENTOS ALIMENTARES.....	87
4.2.1	Determinação dos teores de umidade das amostras	94
4.2.2	Determinação dos teores de cinzas das amostras	95
4.2.3	Determinação dos teores de proteínas das amostras	96
4.2.4	Determinação dos teores de lipídeos das amostras	100
4.2.5	Determinação dos teores de carboidratos das amostras	104

4.3 DESENVOLVIMENTO DE UM MÉTODO POR HPLC-DAD PARA A DETERMINAÇÃO DE ADULTERANTES NAS AMOSTRAS DE SUPLEMENTOS ALIMENTARES	107
4.3.1 Estudo das condições cromatográficas e desenvolvimento do método	108
4.3.2 Validação do método por HPLC-DAD proposto	116
4.3.3 <i>Screening</i> e quantificação de adulterantes em amostras de suplementos alimentares	130
4.4 ESTUDO DA TOXICIDADE <i>IN SILICO</i> E CITOTOXICIDADE <i>IN VITRO</i> DOS SUPLEMENTOS ALIMENTARES ADULTERADOS	137
4.4.1 Predição da toxicidade <i>in silico</i> dos adulterantes encontrados nas amostras	137
4.4.2 Estudo da citotoxicidade <i>in vitro</i> das amostras de suplementos alimentares adulteradas	140
5 CONCLUSÃO	154
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	156
APÊNDICE A	176
APÊNDICE B	177
APÊNDICE C	178
APÊNDICE D	179
APÊNDICE E	180
APÊNDICE F	181
APÊNDICE G	182

1 INTRODUÇÃO

Os padrões de beleza estão sempre em transformação. Até os anos 60, pessoas com silhuetas maiores, cheias de curvas e saliências como a Marilyn Monroe, eram consideradas os exemplos de mulheres bonitas. Nos anos 90, os padrões determinavam mulheres magras; quanto menos gordura melhor, o que causou grandes preocupações com a saúde daquelas que faziam tudo para atingir o corpo perfeito. Atualmente, a palavra de ordem no meio estético é “definição”, ou seja, menos massa gorda e mais massa magra, valendo tanto para homens quanto para mulheres. A busca incessante por músculos e silhuetas definidas, transformaram o Brasil no segundo país com maior número de academias, ficando atrás apenas dos Estados Unidos (BRASNUTRI, 2018). Concomitante a isso, observam-se as mudanças na alimentação, na qual busca-se comer de forma mais rápida mas com maior ingestão de nutrientes possíveis. Os suplementos alimentares começaram a fazer parte do cardápio daqueles que almejam uma forma física adequada aos padrões atuais, aliado à atividade física e outros procedimentos estéticos. Entretanto, o consumo desses produtos como fonte de nutrientes muitas vezes ocorre sem a orientação de um profissional capacitado, seja ele médico e/ou nutricionista (DOMINGUES; MARINS, 2007).

Basicamente, suplementos alimentares são produtos que podem ser constituídos de vitaminas, minerais, fibras, ácidos graxos, carboidratos, proteínas ou aminoácidos, que objetivam complementar a alimentação habitual de indivíduos saudáveis através da incorporação destes nutrientes (SBME, 2003). Fica expressamente proibido a presença de substâncias consideradas como *doping* pela Agência Mundial Antidoping (WADA), como hormônios, estimulantes, ou de substâncias de finalidade terapêutica e/ou cura (BRASIL, 2018d). Todavia, o grande número de produtos disponíveis no mercado, associado a facilidade de aquisição, dificulta a fiscalização por parte dos órgãos regulatórios, o que facilita a ocorrência de fraudes e adulterações (CORREIA, 2008).

Até 2018, a denominação “suplementos alimentares” não era prevista por lei por parte da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa). O enquadramento legal dos produtos dependia basicamente da composição declarada no rótulo, e nem sempre era evidente a categoria a qual determinado produto pertencia, uma vez que os mesmos são conhecidos por se constituírem de multiingredientes. Dessa forma, após diversas reuniões junto com a comunidade científica, industrial e até mesmo os consumidores, a Anvisa elaborou o marco regulatório dos suplementos alimentares, a fim de tornar mais evidente quais são as

substâncias permitidas, o que caracteriza um suplemento alimentar e quais as alegações comprovadas para determinados ingredientes (BRASIL 2017a; 2018d). De acordo com a Anvisa, os suplementos alimentares são produtos de baixo risco à população, sendo considerados isentos da obrigatoriedade de registro (BRASIL, 2018e). Em decorrência disso, uma quantidade grande de produtos estão disponíveis no mercado, promovendo um consumo desenfreado.

As mudanças regulatórias possuem lacunas regulatórias que ainda necessitam de definições como, por exemplo, em relação à nutrivigilância desses produtos e o desenvolvimento de métodos oficiais para o controle de qualidade dos mesmos. Devido a extensa área de fronteiras do país, muitas vezes são comercializados no Brasil suplementos alimentares contendo substâncias não permitidas declaradas no próprio rótulo. Estes produtos entram por vias terrestres, portos e aeroportos, sendo distribuídos no mercado informal ou pelo comércio virtual. Somente nos Estados Unidos, nos anos de 2012 a 2014, o órgão fiscalizador responsável recebeu 114 relatos de eventos adversos referente ao consumo de um suplemento em específico que apresentava um derivado da anfetamina altamente tóxico declarado na sua composição (KLONTZ et al., 2015).

Além disso, com o intuito de intensificar a ação dos suplementos alimentares, e transmitir a imagem de que o produto realmente funciona, os fabricantes adicionam de forma proposital substâncias farmacológicas, sem que estas estejam descritas no rótulo (CHAMPAGNE; EMMEL, 2011). São inúmeros os relatos na literatura de suplementos adulterados provenientes da China, Taiwan, Brasil e Estados Unidos, contendo substâncias como diuréticos, hormônios e inibidores da fosfodietesrase-5 (PDE-5) (CARVALHO et al., 2012; FEIJOS et al., 2014; MATHON et al., 2013; MOREIRA et al., 2016; PAÍGA et al., 2017; PETRÓCZI; TAYLOR; NAUGHTON, 2011). Casos de toxicidade hepática têm sido relacionados ao consumo abusivo desses produtos e a presença de metabólitos vegetais altamente tóxicos (BROWN, 2017b).

Considerando a crescente procura por suplementos alimentares, aliado às incidências significativas nos casos de adulterações, tornam-se relevantes pesquisas que investiguem a qualidade dos produtos em toda cadeia logística desde a fabricação até o seu consumo. Com base nisso, o presente trabalho objetivou investigar do ponto de vista regulatório, publicitário e rotular os suplementos alimentares disponíveis no mercado brasileiro, e quais as principais mudanças a serem enfrentadas pelos fabricantes para o enquadramento dos produtos no novo marco regulatório. Desta forma, buscou-se desenvolver um método analítico de fácil acesso, baixo custo e que demande pouco tempo, principalmente considerando que o Brasil carece de

metodologias oficiais para investigação de adulterantes em suplementos alimentares. Os riscos do elevado consumo de suplementos adulterados é um problema de saúde pública que preocupa as autoridades, por isso, através de ensaios de citotoxicidade *in vitro* e toxicidade *in silico*, foram avaliados o grau de lesão celular e possíveis efeitos tóxicos no organismo, como metodologia alternativa ao uso de animais.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo geral

O presente trabalho teve por objetivo avaliar suplementos alimentares comercializados no Brasil do ponto de vista regulatório, rotular, analítico e toxicológico.

1.2.2 Objetivos específicos

- I. Avaliar aspectos regulatórios das amostras de suplementos alimentares desde o momento da aquisição, em que foram analisados apelos comerciais e indicações de consumo, até o recebimento do produto, no qual foi realizada uma avaliação de acordo com as legislação vigentes durante a aquisição, análise das informações presentes nos rótulos e as mudanças necessárias para a correta regularização o novo marco regulatório.
- II. Realizar um estudo da composição centesimal das amostras, incluindo a análise de carboidratos, proteínas e lipídios, bem como um comparativo entre as informações declaradas na tabela nutricional dos rótulos e os resultados obtidos.
- III. Desenvolver, otimizar e validar um método através de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC-DAD do inglês *High Performance Liquid Chromatography*) para a detecção simultânea de dez substâncias não permitidas em suplementos alimentares, nas classes de diuréticos (hidroclortiazida, furosemida e espironolactona), estimulantes sexuais (sildenafil, vardenafil, tadalafil e ioimbina) e fármacos utilizados como anabolizantes (clembuterol, testosterona e propionato de testosterona). Aplicar o método desenvolvido nas amostras de suplementos alimentares adquiridas;
- IV. Avaliar a toxicidade *in silico* das substâncias encontradas como adulterantes em suplementos alimentares. Realizar um estudo de viabilidade celular, citotoxicidade *in vitro*, hemólise, produção de de óxido nítrico, dano de fita dupla do DNA, produção de

espécies reativas de oxigênio em células mononucleadas das amostras adulteradas, detectadas pelo método de HPLC-DAD.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 UM BREVE HISTÓRICO DOS SUPLEMENTOS ALIMENTARES

Tanto os cuidados com alimentação, quanto o consumo de suplementos alimentares fazem parte do dia a dia do ser humano muito antes do que imaginávamos, principalmente quando se trata de produtos naturais. As plantas, por exemplo, são utilizadas de forma medicinal desde a pré-história e com o passar dos anos, descobriu-se que partes específicas delas poderiam auxiliar na melhora das condições físicas (BROWN, 2017a). Com o decorrer dos anos, surgiu então a Medicina Tradicional Chinesa, aliando o consumo de determinadas plantas ao bem estar e à saúde (BROWN, 2017a). Por volta de 400 à 500 a.C., algumas práticas dietéticas já eram conhecidas por parte dos atletas e soldados. A fim de demonstrar bravura, habilidade, velocidade e força, os mesmos faziam a ingestão de fígado de veado e coração de leão como fontes proteicas (APPLEGATE; GRIVETTI, 1997; GOSTON, 2009). A importância da alimentação ficou mais evidente com os Jogos Olímpicos da Antiguidade. A dieta dos atletas gregos e romanos era basicamente composta por vegetais, legumes, frutas e vinho. Nesta época, Milo de Cróton destacou-se como um vitorioso lutador grego, sendo um dos primeiros atletas a dedicar cuidados maiores com a alimentação, a sua dieta se constituía basicamente de 9 kg de carne, 9 kg de pão e 8,5 L de vinho por dia, durante as competições (GOSTON, 2009).

Nos Estados Unidos, os suplementos alimentares estão no mercado desde meados de 1920 (DICKINSON, 2011). De acordo com Wallace e colaboradores (2013), o primeiro suplemento dietético disponível no mercado norte americano foi o óleo de fígado de bacalhau em 1920, o mesmo era utilizado para aumentar a ingestão de vitamina A e D. Em seguida, a Nutrilite Company® comercializou o primeiro comprimido multivitamínico-multimineral. Somente em 1938, com o surgimento da Lei de Alimentos, Medicamentos e Cosméticos (do inglês *Food Drug and Cosmetic Act, FD&C Act*) eles começaram a ser comercializados de forma regular como alimentos (DICKINSON, 2011).

A primeira definição de suplementos alimentares surgiu em 1994, com a criação da Lei de Saúde e Educação de Suplementos Alimentares (do inglês *Dietary Supplements Health and Education Act, DSHEA*). A DSHEA surgiu com dois objetivos principais: a) assegurar o acesso contínuo dos consumidores a uma grande variedade de suplementos; b) fornecer aos consumidores mais informações sobre o consumo de suplementos alimentares (DICKINSON, 2011). Após a DSHEA, a *Food and Drug Administration* (FDA) foi delineada como

autoridade legal para regulamentar os suplementos alimentares (GLISSON; WALKER, 2010; USA, 1994).

No Brasil, as normas básicas para os alimentos foram reconhecidas pelo Decreto de Lei nº 986 de 1969. O mesmo determina que esses produtos não poderiam ser adicionados de substâncias medicamentosas ou terapêuticas (BRASIL, 1969). Em 1998, a Secretária de Vigilância Sanitária aprovou o primeiro regulamento técnico para suplementos vitamínicos e/ou minerais (BRASIL, 1998). Até 2018, os suplementos alimentares não eram previstos por lei, contudo, qualquer produto popularmente conhecido dessa maneira, era distribuído como um alimento, mas nem sempre essa classificação era a mais adequada (NEVES; CALDAS, 2015).

De acordo com a Anvisa, os suplementos alimentares produtos de ingestão via oral, constituídos de vitaminas, minerais, aminoácidos, proteínas, carboidratos, entre outros, com a função de suprir as necessidades da dieta de indivíduos saudáveis (BRASIL, 2018g). Não sendo permitida a adição de medicamentos, nem alegação de ação terapêutica ou de cura.

Outrossim, a busca pelo corpo perfeito de forma rápida e eficaz alavancou as vendas dos suplementos alimentares no Brasil. De acordo com a Associação Brasileira dos Fabricantes de Suplementos Nutricionais e Alimentos para Fins Especiais (Brasnutri), até 2017, o Brasil contava com 8 mil pontos de vendas desses produtos, entre lojas especializadas, farmácias, lojas virtuais e lojas de produtos naturais. Não obstante, o mercado teve um aumento de 233% dos anos de 2010 a 2016, chegando a um faturamento anual de 1,49 bilhões de reais (BRASNUTRI, 2017). De acordo com uma pesquisa encomendada realizada em 1007 lares das principais capitais brasileiras, 54% dos domicílios entrevistados afirmaram ter consumido pelo menos um suplemento alimentar em 2015, com destaque para os suplementos multivitamínicos e minerais. Ainda, com a mesma pesquisa, o consumo entre os sexos não mostrou ter uma diferença significativa, 53% eram mulheres e 47% homens (ABIAD, 2015). Outro fator que popularizou o consumo de suplementos alimentares foi a sua difusão dentre os praticantes de atividades físicas. O Brasil é o segundo país no número de academias de prática esportiva do mundo. Em 2015 haviam cerca de 31 mil academias, onde 7,95 milhões de brasileiros realizavam suas atividades físicas (IHRSA, 2016). Dentre os serviços encontrados em uma academia está a comercialização de produtos ergogênicos e suplementos alimentares. Entretanto, o consumo destes produtos nem sempre é indicado por um nutricionista ou médico, sendo o principal incentivo para aquisição a indicação de amigos ou por vontade própria (DOMINGUES; MARINS, 2007). Além do mais, a mídia social tornou-se o principal veículo de estímulo ao uso de suplementos alimentares. Só em 2001, a indústria de publicidade investiu

globalmente cerca U\$ 46 bilhões em propagandas, gerando, dessa forma, um maior consumo desses produtos (ALVES; LIMA, 2009; MAUGHAN; KING; LEA, 2004; SCOFIELD; UNRUH, 2006).

2.1.1 Suplementos alimentares no Brasil e o marco regulatório

Apesar do termo ser conhecido por parte da população, a categoria de produtos denominada “Suplementos Alimentares” é recente do ponto de vista regulatório no Brasil. Até 2018, essa classificação não era prevista por lei pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), podendo um produto com a finalidade de suplemento alimentar ser enquadrado em até sete legislações distintas, a depender da sua composição, permeando de alimentos a medicamentos.

Os produtos contendo creatina, proteínas ou cafeína, eram descritos como alimentos para atletas de acordo com a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) da Anvisa nº 18 de 27 de abril de 2010 (BRASIL, 2010a). A Tabela 1 especifica os produtos definidos como alimentos para atletas e as suas designações de acordo com esta norma.

Tabela 1 – Resumo das definições de alimentos para atletas segundo a RDC da Anvisa nº 18 de 2010.

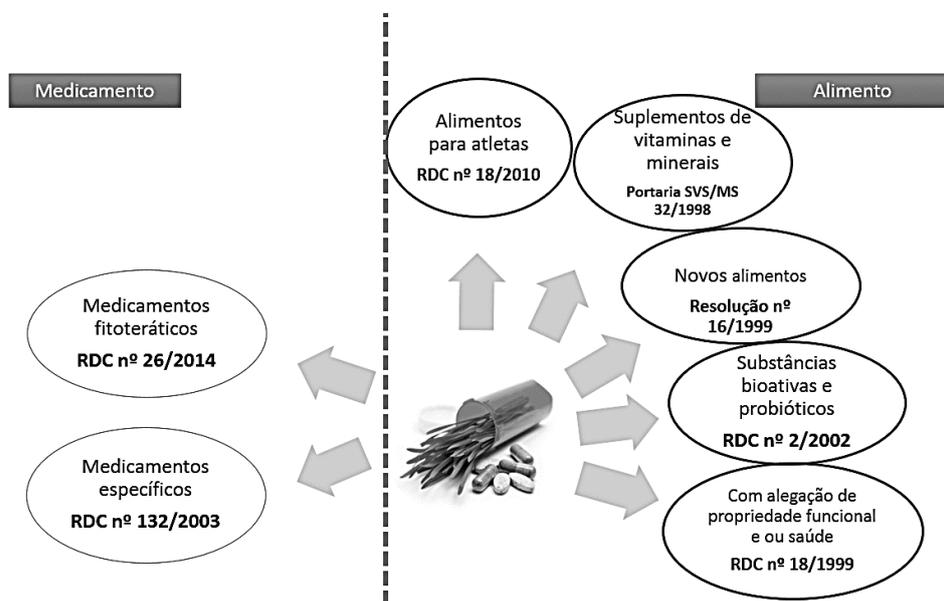
Categoria do alimento	Definição legal	Pode ser adicionado	Não pode conter
Suplemento hidroeletrolítico	Produto destinado a auxiliar a hidratação	Vitamina e minerais	Outros nutrientes e não nutrientes; fibras alimentares
Suplemento energético	Produto destinado a complementar as necessidades energéticas	Vitaminas e minerais; lipídios, proteínas intactas e/ou parcialmente hidrolisadas	Fibras alimentares e não nutrientes
Suplemento proteico	Produto destinado a complementar as necessidades proteicas/	Vitaminas e mineiras	Fibras alimentares e não nutrientes
Suplemento para substituição parcial de refeições	Produto destinado a complementar as refeições de atletas em situações nas quais o acesso a alimentos que compõe a alimentação habitual seja restrito	Vitaminas e minerais; fibras alimentares	n.i.
Suplemento de creatina	Produto destinado a complementar os estoques endógenos de creatina	Carboidratos	Fibras alimentares
Suplemento de cafeína	Produto destinado a aumentar a resistência aeróbia em exercícios físicos de longa duração	n.i.	Nutrientes e não nutrientes

n.i. – não informado

Fonte: Adaptado de Neves e Caldas (2015) e Brasil (2010a).

Os demais suplementos eram enquadrados conforme os ingredientes presentes nas suas composições como: (I) suplementos vitamínicos e/ou minerais (BRASIL, 1998), (II) alimentos com propriedade funcional e/ou saúde (BRASIL, 1999b), (III) novos alimentos e novos ingredientes (BRASIL, 1999a), (IV) substâncias bioativas ou probióticos (BRASIL, 2002a), (V) fitoterápicos (BRASIL, 2018b) ou (VI) medicamentos específicos (BRASIL, 2003). A Figura 1 representa a distribuição regulatória destes produtos no Brasil, até 2017.

Figura 1- Distribuição regulatória dos suplementos alimentares comercializados no Brasil até 2017.



Fonte: Adaptado de Brasil (2017a)

Desde 2010, a Anvisa considera os alimentos para atletas, suplementos vitamínicos e minerais como produtos “baixo risco à população”, dispensando o registro. Entretanto, o registro era obrigatório para os alimentos com alegações de propriedade funcional ou de saúde, novos alimentos e novos ingredientes, substâncias bioativas e probióticos isolados com alegação de propriedade funcional ou de saúde (BRASIL, 2010b).

A Anvisa, através da sua Gerência Geral de Alimentos (GGAl), promoveu nos últimos anos debates junto à comunidade científica, ao setor regulado e aos órgãos representantes dos consumidores tentando sanar problemas gerados pela alta complexidade e a fragmentação da legislação brasileira da época. Buscando atender as demandas, dispôs de um documento base para a regulamentação dos suplementos alimentares (BRASIL, 2017a). O texto passou por um período de consulta pública, e após as devidas alterações foi publicado o “Marco regulatório dos Suplementos Alimentares”. Os principais objetivos eram diminuir os

entraves regulatórios, melhorar o acesso do consumidor à informação, manter a segurança e qualidade dos produtos no mercado e reduzir a veiculação de alegações sem comprovação científica, eliminando dessa forma as fraudes contra o consumidor (BRASIL, 2018a).

Através de seis novas normas, o marco regulatório revogou 11 atos normativos, criou uma lista de constituintes positivos que contemplam 383 ingredientes, 249 aditivos alimentares e 70 coadjuvantes, além da autorização de 189 alegações permitidas nos rótulos dos produtos (BRASIL, 2018a). Quadro 1 resume de forma comparativa de como era a situação de legal dos suplementos alimentares antes do marco regulatório, e as mudanças a serem implementadas com a nova proposta regulatória.

Quadro 1 – Comparação entre a situação legal dos suplementos alimentares antes do marco regulatório, e as novas diretrizes da nova proposta regulatória.

Situações	Antes do marco regulatório	Mudanças a serem implementadas
Legislações	Dependendo dos ingredientes, os suplementos podem ser enquadrados em até 7 legislações: I) Alimentos para atletas; II) Suplementos vitamínicos e minerais; III) Alimentos com alegação de propriedade funcional e/ou saúde; IV) Novos alimentos e novos ingredientes; V) Substâncias Bioativas e probióticos VI) Fitoterápicos; VII) Medicamentos específicos.	Passam a vigorar as seguintes resoluções: I) Lista de aditivos e coadjuvantes permitidos; II) Categoria dos alimentos isentos e com obrigatoriedade de registro sanitário; III) Uso de probióticos em alimentos; IV) Regulamento de vitaminas, minerais e aminoácidos utilizados como medicamentos específicos; V) Requisitos sanitários do suplementos alimentares. Ainda, há um Instrução Normativa em constante atualização que apresenta os ingredientes autorizados.
Categoria contemplada	Na sua maioria são classificados como alimentos, mas haviam casos específicos de comercialização de medicamentos na forma de suplemento. Ex.: Fitoterápicos como <i>Tribullus terrestris</i> ; <i>Corynanthe yohimbe</i> .	Todos os produtos denominados suplementos alimentares serão comercializados como alimentos.
Registro	Apenas os produtos classificados como “Alimentos para atletas” e “Vitaminas e Minerais” encontravam-se isentos de registro.	Os suplementos alimentares são isentos de registro, exceto aqueles que contenham enzimas ou probióticos em sua formulação.
Alegações permitidas	Não apresentavam uma legislação específica quanto a rotulagem. Somente os produtos classificados como “Alimentos para atletas” (BRASIL, 2010a) apresentavam informações regulatórias quanto ao conteúdo do rótulo.	Na Instrução Normativa (IN) nº 28 de 2018, há uma lista de alegações autorizadas em suplementos alimentares ou de frases que contenham pequenas variações das mesmas.
Substâncias autorizadas	Ficava proibida a presença de substâncias proscritas, de finalidade terapêutica ou medicamentosa e/ou presentes na lista de substâncias consideradas “doping” pela WADA (BRASIL, 2010a).	A IN nº 28 de 2018, contém a lista de substâncias permitidas nos suplementos alimentares, bem como os limites mínimos e máximos para constituintes específicos.
Presença de medicamentos	Apesar de não ser permitido, em alguns casos havia a presença de medicamentos em alguns produtos contendo multiingredientes.	Fica expressamente proibida a presença de medicamentos e a comercialização dos mesmos como suplementos alimentares.

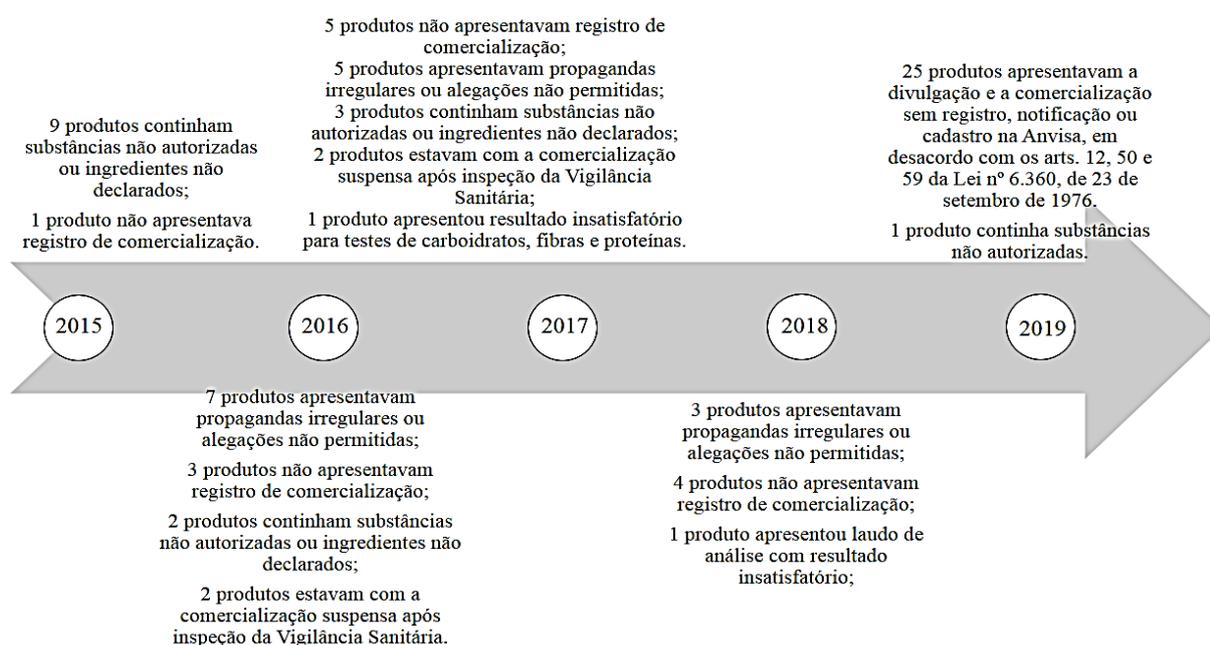
Fonte: (BRASIL 1998, 1999a, 1999b, 2002, 2003, 2010a, 2014, 2018c; d; e; f; g).

A consulta pública encerrou-se no dia 09 de abril de 2018, e no dia 27 de julho foram publicadas as novas regras (BRASIL, 2017c). As empresas tem cinco anos a contar da data de publicação no Diário Oficial da União, para se adaptarem as novas regras e regularizarem os produtos que já estão no mercado.

2.2 CONTROLE DE QUALIDADE EM SUPLEMENTOS ALIMENTARES

É praticamente impossível estimar o número de suplementos alimentares disponíveis atualmente no mercado, o que acaba dificultando ações por parte das agências regulatórias que visam avaliar a qualidade dos mesmos. A Anvisa emitiu diversos alertas sobre a segurança desses produtos em seus meios de comunicação (BRASIL, 2012, 2016). Eles ainda reiteram que os suplementos alimentares são muitas vezes comercializados de forma ilegal no país, podendo conter substâncias não autorizadas o que pode acarretar em inúmeros malefícios à saúde humana (BRASIL, 2012). Diversos produtos já tiveram sua comercialização suspensa ou proibida devido às fraudes contra o consumidor, presenças de substâncias não permitidas ou até mesmo o uso de ferramentas comerciais não autorizadas. A Figura 2 reflete as principais retiradas dos suplementos alimentares realizadas por parte da Anvisa, de 2015 a 2019.

Figura 2 - Principais motivos para a retirada ou suspensão de comercialização dos suplementos alimentares no Brasil nos últimos 5 anos.

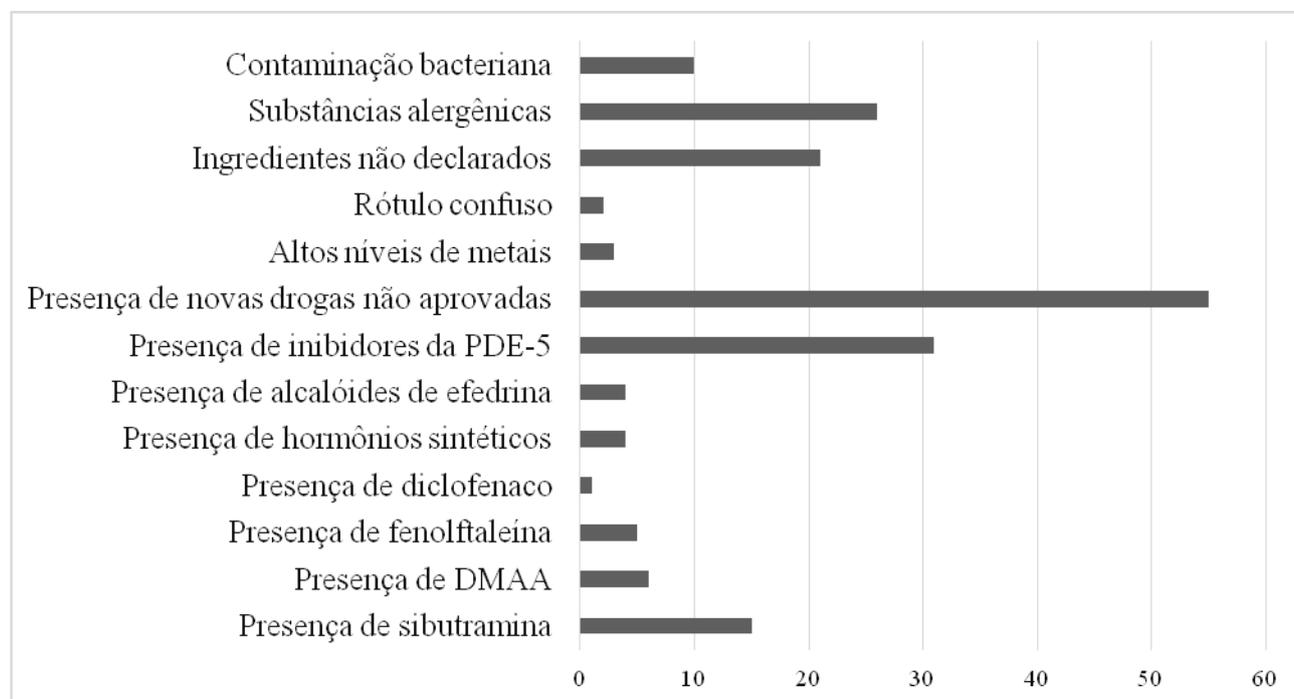


Fonte: BRASIL, 2018b.

Devido as diferenças legais, a importação desses produtos também desperta a atenção das autoridades responsáveis. A legislação americana, por exemplo, alega que, embora os fabricantes de suplementos alimentares devam ter um registro de suas instalações, eles não são obrigados a terem uma aprovação da FDA antes de produzirem ou venderem seus produtos. Os próprios fabricantes e distribuidores certificam-se de que todas as afirmações e informações no rótulo do produto e em outras inscrições são verdadeiras e não enganosas (USA, 2014). Em 2012, o OxiElite Pro® e o Jack3D®, ambos produzidos nos Estados Unidos, tiveram as importações suspensas para o Brasil, mesmo que para consumo pessoal, uma vez que a FDA relatou a presença de uma 1,3-dimetilamilaamina (DMMA), estimulante altamente deletério ao organismo (BRASIL, 2012). De acordo com Correia (2008), a isenção de registro, bem como a livre comercialização e a falta de fiscalização corroboram para a ocorrência de fraudes, adulterações e contaminações dos produtos em questão.

Inúmeros suplementos são retirados anualmente do mercado norte americano e entre os principais motivos está a presença de substâncias farmacológicas e/ou de novos fármacos não aprovados. Em 2017, dezoito suplementos tiveram sua comercialização suspensa, enquanto que em 2018 foram 21 casos de produtos considerados irregulares pelo FDA. Somente nesse ano, cinco suplementos alimentares já foram apreendidos nos Estados Unidos por conterem inibidores da PDE-5 em sua composição. A Figura 3 estima as principais justificativas para a retirada dos suplementos alimentares do comércio dos anos de 2010 à 2019 (USA, 2019).

Figura 3 - Principais motivos declarados pelo FDA para a retirada dos suplementos alimentares do mercado norte americano entre os anos 2010 à 2019.



Fonte: Adaptado de USA (2018).

A entrada de produtos irregulares através das fronteiras é uma situação crítica no país. De acordo com Viana e colaboradores (2016), a comercialização desses suplementos no sul do país é facilitada pela proximidade com países vizinhos, como o Uruguai, em que o consumidor adquire suplementos proibidos pela Anvisa mas que lá a venda ainda é permitida. De acordo com o Departamento de Polícia Federal, a maior apreensão de suplementos alimentares clandestinos no país ocorreram nos estados do Paraná e de São Paulo, seguido do Mato Grosso do Sul. Os estados do Paraná e Mato Grosso do Sul fazem divisa com o Paraguai, fronteiras popularmente conhecidas pelo comércio irregular. Já no estado de São Paulo, é onde se encontra o maior aeroporto internacional do país (NEVES; CALDAS, 2015).

2.2.1 Fármacos adulterantes em suplementos alimentares

Concomitante ao aumento do interesse por parte do consumidor pelos suplementos alimentares, cresce também, por parte dos fabricantes, a vontade de se destacar no mercado e, assim, atingir um maior número de clientes. Tal cenário, afeta diretamente na segurança e

qualidade desses produtos uma vez que os mesmos fazem o uso de artimanhas, dentre elas a adulteração, a fim de “fidelizar” o consumidor (BROWN, 2017a; MURATT et al., 2018).

A adulteração deliberada consiste na adição proposital de ingredientes não declarados e/ou não permitidos, a fim de intensificar o efeito farmacológico e promover a falsa imagem de que o produto realmente funciona (CARVALHO et al., 2012; CHAMPAGNE; EMMEL, 2011; MÜLLER et al., 2018). Como são considerados alimentos, fica vetada a adição de qualquer substância com ação farmacológica em suplementos alimentares (BRASIL, 1969; USA, 1994). Tal prática é um risco em potencial à saúde, considerando principalmente que a presença da substância não declarada é desconhecida por parte do consumidor, bem como os efeitos provenientes da mesma (DAL MOLIN, 2016). Situações inesperadas podem ser ocasionadas com uma adulteração como, por exemplo, reações adversas provenientes dos fármacos adicionados, interações medicamentosas ou até mesmo superdosagens, que podem levar a efeitos nocivos ao consumidor (DUNN et al., 2011; GRYNIEWICZ et al., 2009).

Inúmeros casos de adulterações em suplementos alimentares têm sido descritos na literatura. Zhu e colaboradores (2005) identificaram em uma amostra 2,25 mg/mL de vardenafil dos oito suplementos analisados. Zhang e colaboradores (2010) detectaram quatro fármacos não declarados (ioimbina, tadalafil, sildenafil e vardenafil) em 21 amostras das 26 analisadas, ou seja, 80% das amostras estudadas estavam adulteradas. Outro estudo, analisou 150 suplementos alimentares comercializados com o apelo de melhorar o desempenho sexual, das quais 61% estavam adulteradas com algum inibidor da fosfodiesterase-5 (PDE-5), sendo que destes, 31% continham mistura de duas ou mais substâncias (GILARD et al., 2015).

Não somente a presença destes fármacos em suplementos alimentares preocupa as autoridades, mas também os análogos destas substâncias, que são pequenas mudanças na estrutura da molécula que eles sofrem a fim de dificultar sua detecção por métodos convencionais. De acordo com Patel e colaboradores (2014), são diversos fatores que estimulam a síntese de novos análogos, como a crescente busca por suplementos alimentares, a diversidade estrutural, bem como a disponibilidade de materiais, que permite o desenvolvimento ilimitado, a falta de uniformidade na nomenclatura destas novas moléculas, ausência de um método de *screening* ideal, falta de instrumentos analíticos avançados em laboratórios governamentais e a falta de conscientização por parte da população. Estima-se que há cerca de 80 inibidores da PDE-5 encontrados como adulterantes em suplementos alimentares (KEE et al., 2018). Reepmeyer, Woodruff e D'Avignon (2007) elucidaram um novo análogo do sildenafil encontrado em um suplemento alimentar dito natural, a substância foi nomeada como metiosildenafil. No mesmo ano, o mesmo grupo identificou outra estrutura

também análoga do sildenafil, o nor-acetildenafil (REEPMEYER; WOODRUFF, 2007). Kern e colaboradores (2015) identificaram um análogo do tadalafil, bem como Lee e colaboradores (2015). Ambos estudos encontraram a substância primeiramente através da análise por HPLC-DAD e elucidaram a estrutura com o auxílio do espectrômetro de massas. Durante análises de rotina para a investigação de inibidores de PDE-5 em suplementos alimentares, Zhang e colaboradores (2014) identificaram um adulterante com perfil de massas diferente dos analitos previamente estudados, após a investigação por Ressonância Magnética Nuclear (do inglês *Nuclear Magnetic Resonance, NMR*), descobriram se tratar de um precursor na síntese do tadalafil. Por serem substâncias pouco conhecidas, os análogos encontrados em suplementos alimentares são preocupantes devido à falta de conhecimento dos seus perfis farmacológicos, de segurança e de toxicidade, o que coloca a saúde do consumidor em risco (PATEL et al., 2014).

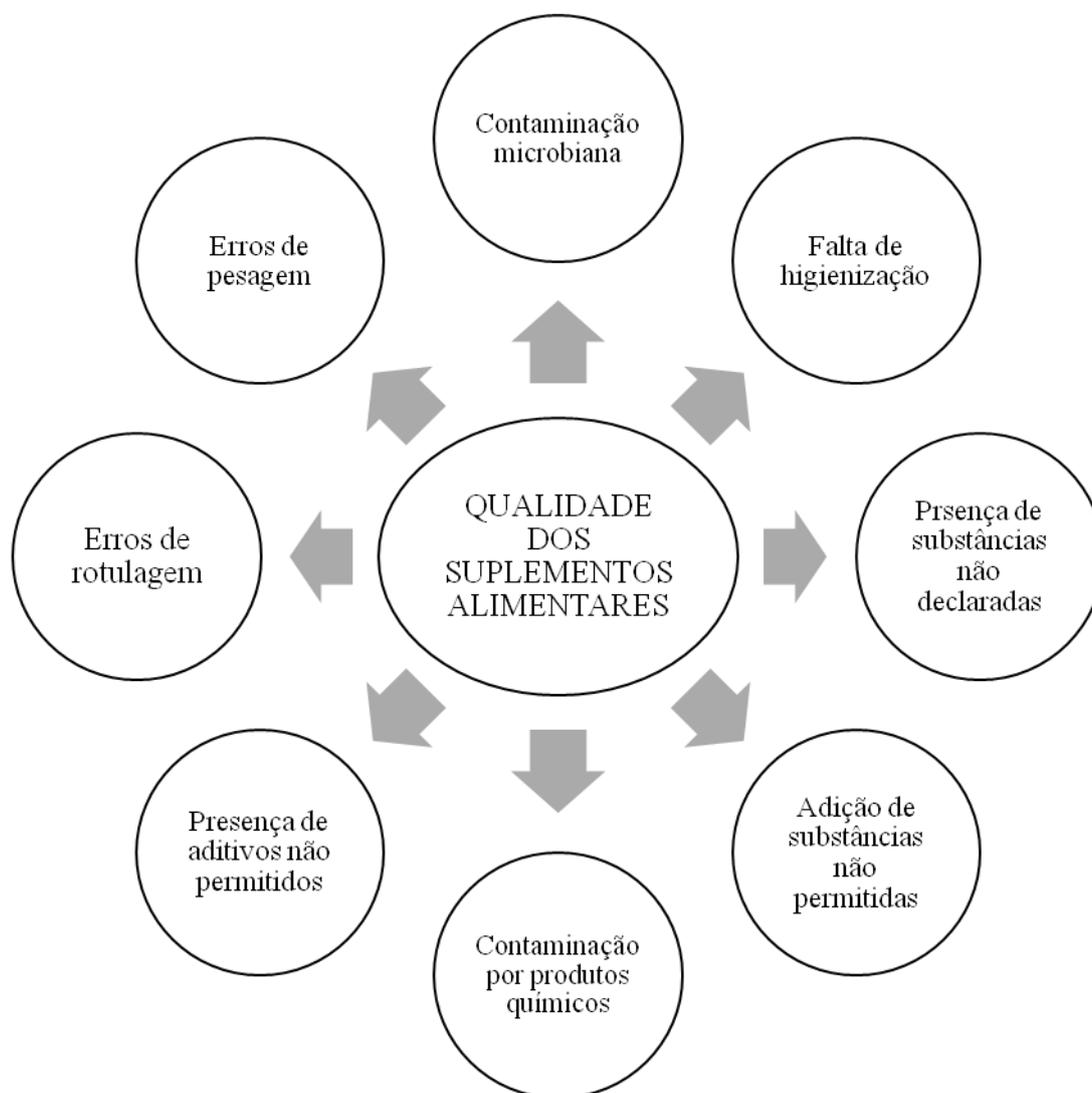
A adição proposital de substâncias farmacológicas ocorre conforme o efeito que se deseja ressaltar no produtos, i.e. suplementos que promovam perda de peso, são comumente adulterados com anorexígenos, diuréticos ou laxantes. Enquanto que aqueles produtos que possuem o apelo de aumentar desempenho sexual ou potencializar hormônios masculinos, são adicionados de inibidores da PDE-5 ou esteroides androgênicos anabolizantes (EAAs) (MOREIRA; MARTINI; CARVALHO, 2014; PETRÓCZI; TAYLOR; NAUGHTON, 2011). Ademais, a adição de fármacos ocorre sem concentrações definidas, tornando a prática de adulteração ainda mais perigosa (DAL MOLIN et al., 2019b). A sibutramina por exemplo, apresenta uma dose terapêutica máxima de 15 mg por dia (BRASIL, 2014b), contudo Dunn e colaboradores (2012), detectaram a presença desse fármaco em níveis que variaram de 0,1 até 40 mg por cápsula de suplemento. A fenolfaleína é uma substância química também utilizada como laxante, porém foi retirada do mercado brasileiro em 2002, devido à sua carcinogenicidade e cardiotoxicidade (BRASIL, 2002b; KATZUNG, 2004). Ela foi detectada em suplementos alimentares para perda de peso em doses que variaram de 18,2 a 69,8 mg por unidade (SONG et al., 2014).

Outrossim, os suplementos alimentares são caracterizados por serem produtos multi-ingredientes, e a sua composição nem sempre se encontra disponível no rótulo, ou está descrita de forma clara. Somente em 2018, o FDA apreendeu dois suplementos alimentares por apresentarem rótulos confusos ou escassez de informações no mesmo (USA, 2019). Esse tipo de descumprimento por parte dos fabricantes pode levar a reações não conhecidas entre os próprios componentes do produto ou com outros suplementos alimentares (DELDICQUE; FRANCAUX, 2016). Viana e colaboradores (2016) encontraram efedrina em uma amostra de

suplemento alimentar contendo multiingredientes. Este alcaloide de origem natural era comumente encontrado nos suplementos alimentares para perda de peso, juntamente com a cafeína. Entretanto, seu uso foi banido nos EUA em 2005 devido aos graves efeitos adversos relacionados ao seu consumo (GURLEU; STEELMAN; THOMAS, 2015).

Muitas vezes a presença de substâncias não declaradas no rótulo é considerado um problema de controle de qualidade, uma vez que pode ocorrer contaminação dentro de alguma fase do processo de produção do suplemento alimentar (LEDOUX et al., 2015). A Figura 4 demonstra as principais evidências que afetam o controle de qualidade dos suplementos alimentares.

Figura 4 - Principais características que podem afetar o controle de qualidade dos suplementos alimentares.



Fonte: Adaptado de Petróczy, Taylor e Naughton (2011).

2.2.1.1 Adultrações com esteroides anabolizantes

Os esteroides androgênicos anabolizantes (EAAs) são substâncias quimicamente semelhantes à testosterona, e são adicionados aos suplementos com a alegação de aumentar a força e a massa muscular. Apesar de estarem associados a uma série de efeitos nocivos, principalmente sobre os sistemas cardiovascular, hepático e neuroendócrino, verifica-se que o abuso de EAAs tem aumentado consideravelmente nos últimos anos (FRIZON; MACEDO; YONAMINE, 2005). Os primeiros relatos de uso de esteroides anabólicos estrogênicos entre

os atletas foi reportado em 1950 (KANAYAMA, 2008; NOGUEIRA et al., 2015). De acordo com um estudo realizado por Nogueira e colaboradores (2015), de 510 sujeitos analisados, 20,6% afirmaram fazer o uso de esteroides anabólicos androgênicos na cidade de João Pessoa. Ainda, de acordo com Domingues e Marins (2007), em Belo Horizonte, os esteroides estão entre os produtos mais utilizados por frequentadores de academias, sendo o sexo masculino com a faixa etária entre 21 e 25 anos como os maiores usuários. Já em Passo Fundo, de 418 praticantes de atividade física, 6,5% relataram fazer o uso de algum esteroide, sendo o decanoato de nandrolona o mais reportado (FRIZON; MACEDO; YONAMINE, 2005). Contudo, o consumo destes produtos muitas vezes é incentivado por aqueles que deveriam alertar sobre os seus malefícios; entre 305 professores de educação física do Rio de Janeiro questionados, 38,69% faziam o uso de aceleradores metabólicos e 25,57% de esteroides anabólicos androgênicos (PALMA; ASSIS, 2005).

Os EAAs são divididos em classes de acordo com as suas características. Os esteroides endógenos por exemplo, são produzidos naturalmente no corpo humano, como no caso da dehidroepiandrosterona (DHEA) e da epitestosterona. Os esteroides exógenos não são produzidos pelo corpo humano, mas são sintetizados com o propósito de que a sua estrutura molecular permita fugir das leis antidoping existentes, sendo que os seus efeitos são semelhantes aos medicamentos controlados. Entre eles encontram-se o propionato de testosterona e o desoximetiltestosterona. Os corticoesteróides afetam o sistema nervoso de tal forma que melhoram as habilidades de concentração e performance do atleta, além do alívio nas dores, sendo a dexametasona, prednisolona e prednisona exemplos desta classe. Por fim, tem a classe dos outros agentes anabólicos, pertencentes a outras classes farmacêuticas, mas que ainda assim são substâncias consideradas proibidas pela Agência Mundial Anti-doping (do inglês *World Anti-Doping Agency, WADA*), como a espirolactona, clenbuterol e a tibolona (GOSETTI et al., 2013; WADA, 2018).

Quando administrada via oral, a testosterona é rapidamente metabolizada pelo fígado, apresentando uma meia-vida de 10-20 min e eliminada como metabólito. Já os andrógenos sintéticos são metabolizados mais lentamente, e alguns são eliminados na sua forma original pela urina (RANG et al., 2012). O clenbuterol é um halogenado das feniletilaminas, sendo mundialmente reconhecido como anabolizante, devido ao seu efeito de aumentar massa muscular e redução de gordura corporal. É uma substância ativa oralmente de ação prolongada, e por se tratar de um agonista β -2, apresenta como efeitos adversos taquicardia, arritmias e vasodilatação periférica (RANG et al., 2012). Nos Estados Unidos, o FDA aprovou o clenbuterol somente como uso em animais, para a obstrução de vias aéreas em

cavalos contudo, seu uso é proibido em animais utilizados na preparação de alimentos (USA, 2002; PAWAR; GRUNDEL, 2017).

Os efeitos adversos dos EAAs incluem na diminuição da liberação de gonadotrofina durante o uso continuado, infertilidade, edema, masculinização em meninas e adenocarcinoma no fígado. Bond, Llewellyn e Mol (2016) levantaram quatro hipóteses para o mecanismo de hepatotoxicidade por parte dos EAAs: I) Estresse oxidativo das células hepáticas; II) Ativação de espécies reativas de oxigênio por parte do receptor de androgênio; III) O receptor de androgênio aumenta a β -oxidação mitocondrial; IV) A resistência metabólica e a potência androgênica estão positivamente correlacionadas com o grau de hepatotoxicidade. Além disso, a administração abusiva de testosterona demonstrou afetar disfunções hematopoiéticas graves, como diminuição nos níveis de hemoglobina e redução na fração de eritrócitos (MULLEN et al., 2014).

A presença de EAA em suplementos alimentares e o seu consumo é cada vez mais preocupante. Nos Estados Unidos, dois pacientes apresentaram hepatotoxicidade após consumirem Superdrol (metatestosterona) e Halodrol (clorodehimetilandrostenediol) adquiridos em lojas especializadas em suplementos alimentares (KAFROUNI; ANDERS; VERMA, 2007). Outrossim, estudos relataram a presença de EAAs em medicamentos falsificados, e em suplementos alimentares com concentrações variando de 0,01 $\mu\text{g/g}$ até 190 $\mu\text{g/g}$ (CHO et al., 2015; GEYER et al., 2004; THOMPSON; CARLSON, 2000). Além do mais, algumas substâncias permitidas em outros países acabam entrando de forma ilegal no Brasil. O DHEA, por exemplo, é permitido nos suplementos alimentares norte-americanos, e é amplamente distribuído em lojas especializadas em produtos para saúde (THOMPSON; CARLSON, 2000). No Brasil, essa substância é caracterizada como medicamento de controle especial, devendo sua distribuição ser realizada mediante retenção de prescrição médica (BRASL, 2019b)

2.2.1.2 Adulterações com estimulantes sexuais

Os inibidores seletivos da fosfodiesterase tipo 5 (PDE-5) são considerados agentes de primeira escolha para o tratamento da disfunção erétil. A primeira droga aprovada para o tratamento, citrato de sildenafil, foi introduzida no mercado em 1998 e atualmente há outras substâncias também usadas na disfunção erétil: vardenafil e tadalafil (SABUCEDO et al., 2004; FLESHNER et al., 2006; GRATZ; FLURER; WOLNIK, 2004).

Os inibidores da PDE-5 melhoram a função erétil penetrando nas células da musculatura lisa e inibindo a enzima PDE-5 que degrada a GMPc. O aumento resultante de GMPc citoplasmático medeia a vasodilatação via ativação da proteína quinase G. Conseqüentemente a inibição das PDE-5 potencializa o efeito do óxido nítrico derivado do endotélio dos nervos nitrérgicos, que são ativados pelo estímulo sexual, sobre o músculo liso vascular peniano. Outros leitos vasculares são também afetados, surgindo outros usos possíveis, como na hipertensão pulmonar. Porém, efeitos adversos também são relatados como hipotensão, rubor, cefaleia e alterações visuais (EARDLEY, 2010; ANDERSON, 2001). O uso de inibidores da PDE-5 é contraindicado em pacientes com problemas cardíacos ou que fazem uso de nitratos ou outros fármacos doadores de óxido nítrico, devido ao risco de desenvolvimento de hipotensão grave (ZOU, 2006; RANG, 2012).

Estudos apontam o emprego de inibidores da PDE-5 na adulteração de produtos de origem vegetal de uso lícito, como suplementos alimentares energizantes ou virilizantes (ZOU et al., 2006; REEPMEYER; WOODRUFF 2007; VENHUIS; DE KASTE, 2008). Devido o desconhecimento por parte do consumidor da presença destes fármacos, a adulteração de suplementos com esses fármacos promove sérios riscos à saúde. Outrossim, a popularidade desses produtos levou a recorrente produções de preparações farmacêuticas falsificadas escassa de Boas Práticas de Fabricação e que acabam sendo utilizadas na adulteração de suplementos alimentares (FEJOS et al., 2014; NEVES; CALDAS, 2015). Inúmeros casos de adulteração de suplementos alimentares com inibidores da PDE-5 têm sido descrito na literatura, e o problema se torna mais complexo quando há a adição de análogos não aprovados nesses produtos (BALAYSSAC et al., 2012; GE et al., 2008 SINGH et al., 2009; KERN et al., 2015).

A ioimbina é um alcaloide indolquilamínico, presente na casca da árvore africana *Corynanthe yohimbe* popularmente indicado para o tratamento de disfunção sexual. O efeito da ioimbina sobre o sistema nervoso autônomo periférico é o aumento da atividade parassimpática (colinérgica) e a diminuição da atividade simpática (adrenérgica). Os efeitos do bloqueio adrenérgico utilizado no tratamento da disfunção erétil são: atraso da detumescência da ereção peniana; prolongamento da duração da ereção iniciada por estimulação sexual; potencialização do efeito de estimulação do relaxamento do músculo liso removendo respostas inibitórias mediadas por catecolaminas pelo sistema nervoso simpático (GOLDSTEIN, 2000).

A ioimbina pode desencadear outros efeitos importantes no sistema nervoso parassimpático, mostrando atividade significativa no sistema central serotoninérgico

(MORALES, 2000). Por penetrar facilmente no sistema nervoso central, produz um complexo padrão de respostas com doses menores do que aquelas requeridas para produzir bloqueio alfa-adrenérgico. Estas incluem antidiurese e excitação central incluindo hipertensão e taquicardia, aumento da atividade motora, irritabilidade, vertigem e nervosismo. Em alguns casos, ioimbina pode causar até alucinações (ZHANG, 2010).

2.2.1.3 Adulterações com diuréticos

Os diuréticos aumentam a eliminação de sódio e água. Diminuem a reabsorção de sódio e do cloro do filtrado, e promovem aumento na perda de água como efeito secundário à eliminação de NaCl (RANG et al., 2012). São considerados como substâncias proibidas pela WADA, uma vez que são utilizada para a perda de peso e/ou para mascararem a presença de outros agentes na urina por diluição (RANG et al., 2012; WADA, 2018).

Recentemente, novos tipos de suplementos vêm sendo comercializados como ferramentas naturais para perda de peso. Contudo, a desidratação proveniente desses suplementos ditos naturais é baixa, apresentando uma baixa contribuição para perda de peso quando consumidos sozinhos (KREIDER et al., 2010). Porém, tal apelo para produtos naturais é um atrativo para a adição deliberada de fármacos sintéticos. Cianchino e colaboradores (2008) detectaram furosemida na concentração de 0,45 mg/g, juntamente com cafeína, efedrina e norepinefrina em um suplemento alimentar dito natural. Em outro estudo, foram avaliados 26 suplementos naturais destes, 8 continham diuréticos em suas formulações, sendo a hidroclorotiazida encontrada em concentrações de 2,4 mg/g a 45 mg/g e a furosemida nas concentrações de 31,6 mg/g e 57,4 mg/g. Müller e colaboradores (2018b) desenvolveram um método para investigação de furosemida, hidroclorotiazida, clortalidona e amilorida em 113 suplementos alimentares para perda de peso. A hidroclorotiazida esteve presente em 14 amostras, e foi detectada a presença de hidroclorotiazida e furosemida em outro produto.

Bell e colaboradores (2004) avaliaram o consumo de suplementos nutricionais entre 333 adolescentes do Canadá. Entre os produtos mais utilizados são os de ação diurética, uma vez que, devido à perda de água, eles atribuem a uma aparência de redução de peso imediata. Todavia, o consumo excessivo dessas substâncias levam a desregulações do balanço hídrico, que pode provocar até mesmo arritmias.

2.3 MÉTODOS PARA INVESTIGAÇÃO DE ADULTERANTES

A fim de manter a qualidade dos suplementos alimentares e a segurança dos usuários, faz-se necessário o desenvolvimento de métodos analíticos que possam auxiliar no controle dos suplementos alimentares, a fim de prevenir fraudes e contaminações (HONG et al., 2017). O método mais comumente descrito na literatura para a identificação de adulterantes é, sem dúvidas, a cromatografia de alta eficiência (do inglês *High Performance Liquid Chromatography*, *HPLC*) (HUANG et al., 2008; CHEN et al., 2009; LU et al., 2010). Outros métodos também são descritos na literatura, como a espectrometria de mobilidade de íons (DUNN et al., 2011; DUNN et al., 2012), espectroscopia de infravermelho (DECONINCK et al., 2014), eletroforese capilar (MOREIRA; MARTINI; CARVALHO, 2014), entre outras. A Tabela 2 representa os métodos analíticos validados para a identificação de adulterantes em suplementos alimentares.

Tabela 2- Trabalhos descritos na literatura de métodos validados para a investigação de adulterantes em suplementos alimentares

(continua)

Substâncias investigadas	Número de amostras investigadas	Amostras positivas	Método utilizado	Referência
Sibutramina	52 suplementos alimentares emagrecedores	26 amostras	HPTLC-UV	MATHON et al., 2014
Diuréticos, laxantes, antidepressivos e anorexígenos	26 suplementos ditos naturais	3 amostras	CZE-C ⁴ D	MOREIRA et al., 2013
Sibutramina e seus análogos, fenolftaleína	17 suplementos alimentares emagrecedores	11 amostras	FI-MS/MS	SONG et al., 2014
Inibidores da PDE-5 e análogos	26 suplementos ditos naturais	15 amostras	IMS	GRYNIEWICZ et al., 2009
Inibidores da PDE-5 e análogos	11 suplementos alimentares	3 amostras	UPLC-TOF/MS e GC-MS	DAMIANO et al., 2014
Inibidores da PDE-5, esteroides, melanina e anorexígenos	84 suplementos alimentares para homens	14 amostras	FTIR	CHAMPAGNE; EMMEL, 2011
Fentolamina, sildenafil e dois análogos dele	9 suplementos ditos naturais	8 amostras	NMR, MS, IR e UV	BALAYASSAC et al., 2012
Inibidores da PDE-5 e análogos	150 suplementos alimentares	92 amostras	¹ H NMR	GILARD et al., 2015

Tabela 2 – Trabalhos descritos na literatura de métodos validados para a investigação de adulterantes em suplementos alimentares

(conclusão)

Estimulantes, anorexígenos, ansiolíticos, antidepressivos, diuréticos e laxantes	10 amostras	4 amostras	HPLC-PAD	MURATT et al., 2017
Diuréticos	26 suplementos ditos naturais	8 amostras	HPLC-PAD	CARVALHO et al., 2013
Ioimbina, sildenafil, vardenafil e tadalafil	26 suplementos alimentares	21 amostras	LC-MS/MS	ZHANG et al., 2010
Sibutramina, efedrina, norpseudoefrina, fenfluramina e clopamida	12 suplementos alimentares	12 amostras	HPLC-ESI-MS/MS	SHI et al., 2011
Analgésicos, codeína e cafeína	5 suplementos alimentares	5 amostras	HPLC-DAD	DECONINCK et al., 2015
Estimulantes	46 suplementos alimentares	24 amostras	HPLC-DAD	VIANA et al., 2016
Hipoglicemiantes	30 suplementos alimentares e produtos ditos naturais	14 amostras	UHPLC-MS/MS	LI et al., 2010
Anti-hipertensivos, diuréticos	18 suplementos alimentares	9 amostras	LC/ESI-MS	LU et al., 2010
Anorexígenos, estimulantes, ansiolíticos, antidepressivos e laxantes	16 suplementos alimentares	9 amostras	UHPLC-MS/MS	PAÍGA et al., 2017
Diuréticos e estimulantes	78 suplementos alimentares	32 amostras	HPLC-PAD	MÜLLER et al., 2018a
Diuréticos, antidepressivos, laxante e anorexígeno	113 suplementos alimentares	14 amostras	CZE-UV-C ⁴ D	MÜLLER et al., 2018b

O desenvolvimento de novas técnicas para a investigação de adulterantes é um grande desafio, visto que nenhuma técnica individual é capaz de detectar todos os possíveis analitos (USP, 2015). Além do mais, no Brasil não há técnicas padronizadas que auxiliem as autoridades na investigação forense dos suplementos alimentares (NEVES; CALDAS, 2015).

2.3.1 Cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por arranjo de diodos (HPLC-DAD) na investigação de adulterantes em suplementos alimentares

O princípio da HPLC baseia-se em um método de separação realizado através de uma coluna analítica com aplicação de altas pressões (HARRIS, 2012). Esta técnica tornou-se popular em meados dos anos de 1960 e, desde então, vêm sendo aprimorada com o auxílio de novas tecnologias (COLLINS, 2006). A classificação dos métodos cromatográficos pode ser feita através da análise de massa molecular do analito de interesse, do tipo de fase móvel e estacionária a ser utilizada ou através da interação entre a fase estacionária e a amostras (SKOOG; HOOLER; NIEMAN, 1992; HARRIS, 2012).

Do ponto de vista de investigação de adulterantes em suplementos alimentares, o método por HPLC tem sido amplamente descrito na literatura (FEIJOS et al., 2014; MÜLLER et al., 2018; MURATT et al., 2018; ZHANG et al., 2010). A própria Farmacopeia Americana elaborou um compendio para a investigação de substâncias não autorizadas, como anorexígenos e diuréticos em suplementos alimentares por HPLC-DAD, entretanto uma análise envolvendo multiclases de adulterantes ainda não foi disponibilizada (USP, 2015)

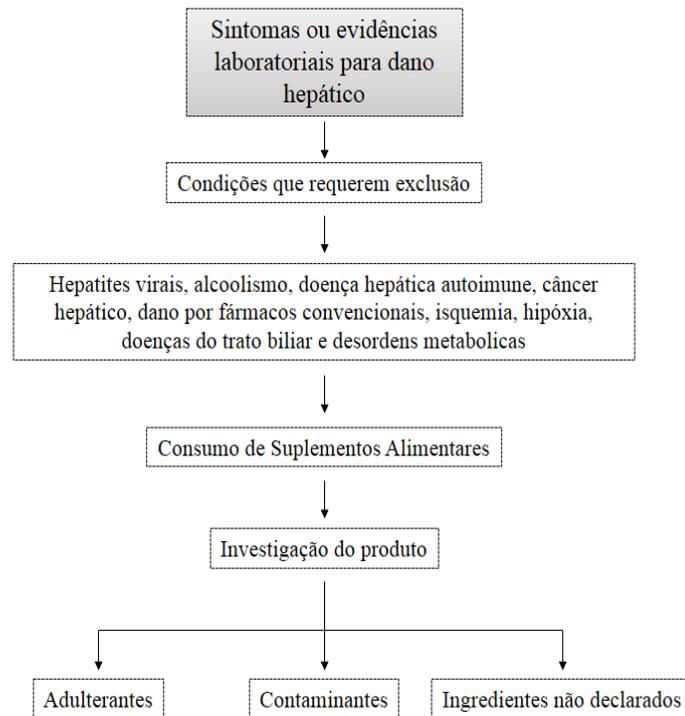
Além disso, os métodos de HPLC acoplados a um detector de arranjo de diodos (DAD) possuem diversas vantagens frente a outros detectores como a amperometria pulsada (PAD) ou ultravioleta/visível (UV/Vis). O DAD permite realizar a varredura de espectros dos analitos de interesse, detecção simultânea em mais de um comprimento de onda e o monitoramento da pureza do pico. Por outro lado, o PAD baseia-se apenas no potencial de oxidação/redução e tempo de retenção, enquanto que o detector UV/Vis realiza a análise dos picos cromatográficos apenas em um comprimento de onda fixado (HARRIS, 2012; MURATT et al., 2018). Ademais do disposto acima, os métodos de HPLC-DAD podem ser facilmente utilizados como alternativa a metodologias convencionais que demandam mais recursos financeiros e laboratoriais, como o LC-MS/MS.

2.4 TOXICIDADE DOS SUPLEMENTOS ALIMENTARES

O uso de preparações provenientes de espécies vegetais em suplementos alimentares são frequentes, e dentre os compostos encontrados incluem-se a quitosana, o psillium, a erva mate, guaraná, chá verde, ioimbina dentre outros (PITTLER; ERNST, 2004). A maioria destes ingredientes citados contém substâncias conhecidas, como por exemplo, a cafeína, que está presente no guaraná, na erva mate, nos chás verde e branco; o ácido hidroxicítrico, que é obtido da *Garcinia cambogia*, entre outros. Entretanto, a Anvisa reconhece a adição apenas de produtos específicos provenientes de plantas em suplementos alimentares, como o guaraná em pó e o chá verde, enquanto que outras substâncias são adicionadas indevidamente, como a ioimbina e o *Tribullus terrestris* (BRASIL, 2018g).

A presença de substâncias provenientes de espécies vegetais em suplementos pode apresentar efeitos tóxicos, uma vez que uma planta pode conter mais de uma substância, ou ainda, a preparação do produto pode promover a extração de metabólitos não desejados. Recentemente, três casos de hepatotoxicidade foram associados aos suplementos alimentares consumidos por praticantes de fisiculturismo na Espanha, sendo que em dois casos a substância consumida como suplemento alimentar, continha hepatoxinas conhecidas (CACHOT, 2016). O mecanismo pelo qual os suplementos a base de plantas causam danos no fígado é variável e específico à substância consumida; isto é, algumas substâncias aparentam serem seguras para o consumo na sua forma natural, mas quando sintetizadas tornam-se tóxicas devido às elevadas concentrações (BOER; SHERKER, 2017). Em um estudo realizado por Navarro e colaboradores (2014), durante os anos de 2004 a 2012, cerca de 130 pacientes foram hospitalizados em centros de referência norte-americanos por hepatotoxicidade referente ao consumo de suplementos alimentares de origem natural. Destes, 45 pacientes sofreram danos por suplementos comercializados como construtores musculares. Estima-se que entre os anos de 2013 a 2014, os suplementos alimentares compostos por espécies vegetais foram responsáveis por 20% dos casos de danos hepáticos nos Estados Unidos. Ainda, de acordo com os autores, a toxicidade hepática se dá por três fatores: I) Presença ilícita de substâncias sintéticas; II) Toxicidade aguda por espécies botânicas, devido à extração ou contaminação de metabólitos específicos; III) Toxicidade associada à presença de multiingredientes, desafiando a identificação do componentes responsável (NAVARRO et al., 2017). A Figura. 5 esquematiza como identificar danos hepáticos provenientes de suplementos alimentares ditos naturais.

Figura 5 - Esquema de identificação de dano hepático proveniente de suplementos alimentares.



Fonte: Adaptado de Navarro e colaboradores (2017).

Contudo, não somente os produtos à base de planta induzem injúrias ao fígado, algumas vezes o suplemento pode conter substâncias não autorizadas, como nos casos de adulterações e contaminações, ou então a hepatotoxicidade ocorre devido a um mecanismo específico de interação entre os próprios componentes da formulação (PITTLER; ENRST, 2004). Foi o caso do OxyElite Pro®, um suplemento alimentar que continha ilegalmente a dimetilamilamina (DMAA) em sua formulação, consumido com a finalidade de melhorar a performance e auxiliar na perda de peso (GARCIA-CORTÉS et al., 2016). O DMAA, é uma amina alifática, e os produtos que a contem são comercializados como “óleo de gerânio” ou “extrato de gerânio”. No momento, sua comercialização em suplementos alimentares é proibida no Brasil e nos Estados Unidos devido aos seus efeitos adversos, como hemorragias cerebrais e até mesmo a morte (DELDICQUE; FRANCAUX, 2016; PAWAR; GRUNDEL, 2017). De acordo com a Anvisa, a presença dessa substância pode acarretar em efeitos

adversos como hepatotoxicidade, danos cardiovasculares, alterações no sistema nervoso e até levar ao óbito (BRASIL, 2012). De fevereiro de 2012 a fevereiro de 2014, foram reportados 114 casos ao FDA de efeitos adversos relacionados ao consumo do OxyElite Pro® contendo DMAA (GARCIA-CORTÉS et al., 2016; KLONTZ et al., 2015).

A presença de ingredientes não permitidos são fatores determinantes para a toxicidade induzida pelos suplementos alimentares. Os esteroides anabolizantes, por exemplo, são substâncias comumente encontradas de forma ilegal nesses produtos (TUCKER et al., 2018). O consumo desses anabolizantes está diretamente relacionado ao hipogonadismo em homens em idade reprodutiva, além de hepatotoxicidade, problemas renais, ginecomastia e infertilidade como efeitos secundários (RAHNEMA; CROSNOE; KIM, 2014).

A presença de impurezas e metais tóxicos também são descritas na literatura, e são provenientes do solo, água, agrotóxicos utilizados em plantas ou até mesmo durante a produção pode ocorrer alguma contaminação. A maioria dos elementos encontrados em suplementos são chumbo, cádmio, mercúrio e arsênio, os quais provocam efeitos deletérios ao organismos como neurotoxicidade, toxicidade hepática, efeitos cardiovascular, toxicidade no desenvolvimento e na reprodução, entre outras (ABERNETHEY et al., 2010).

2.5 MÉTODOS ALTERNATIVOS PARA O USO DE ANIMAIS

Os métodos alternativos para o uso de animais tornaram-se ferramentas indispensáveis tanto no desenvolvimento de novos fármacos, como no estudo da toxicidade das substâncias já bem conhecidas (DEARDEN, 2003). Basicamente, os principais motivos para o uso dessas metodologias são a redução da experimentação animal, refinar a avaliação de efeitos, acelerar e simplificar os ensaios de segurança na área de toxicologia (PIERSMA, 2006).

Os estudos de toxicidade *in vitro* vêm sendo amplamente utilizados como ferramenta para substituir o uso de animais na avaliação da segurança de medicamentos, biocompostos e até mesmo alimentos (PAPPIS, 2019). As células mononucleadas do sangue periférico (PBMC) são utilizadas em modelos para avaliação de viabilidade celular, principalmente para estudo dos efeitos dos compostos bioativos alimentares no sistema imunológico. Essas células podem ser isoladas do sangue de doadores saudáveis, o que significa uma vantagem do ponto de vista financeiro e laboratorial. Apesar de possuir uma diferença fenotípica entre as PBMC e as células da mucosa intestinal, quando expostas as condições semelhante ao modelo *in vivo*, elas apresentam uma grande significância para a avaliação da reposta imune frente ao agente em estudo (KLEIVAND, 2015).

Os estudos de predição de toxicidade *in silico* tornaram-se imprescindíveis para a indústria farmacêutica, principalmente no que tange ao desenvolvimento de novos fármacos (DERDEN, 2003). Os métodos *in silico* permitem a identificação e avaliação do perfil toxicológico de componentes específicos, bem como os sítios de interação no organismo. Estratégias que combinem modelos *in vitro* e *in silico* tornam-se bem sucedidas, prevenindo falhas em relação ao uso de um único método alternativo poderia acarretar (KANDAROVA; LETASIOVA, 2011)

3 MATERIAL E MÉTODOS

O desenvolvimento e validação do método proposto, bem como sua aplicação em amostras de suplementos alimentares, foram realizados no Laboratório de Análises Químicas (LACHEM), localizados no Prédio 15 B, na Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). Os estudos de citotoxicidade foram realizados no Laboratório de Citologia, e a avaliação da composição centesimal foi realizada em parceria com o Laboratório de Bromatologia, ambos da Universidade Franciscana (UFN), localizada em Santa Maria (RS).

3.1 ANÁLISE DOS ASPECTOS REGULATÓRIOS DOS SUPLEMENTOS ALIMENTARES

3.1.1 Aquisição das amostras

Foi realizado um estudo retrospectivo, observacional e descritivo das informações coletadas desde o momento da realização da compra até o recebimento das amostras de suplementos alimentares. Os suplementos alimentares foram pesquisados com o auxílio da ferramenta de busca do Google®, com o uso de descritores “suplementos alimentares”, “suplementos alimentares para atletas”. As lojas virtuais (n = 7) eram todas brasileiras, com Cadastro Nacional de Pessoa Jurídica (CNPJ), declaravam o endereço físico nos seus sítios eletrônicos e possuíam serviço de atendimento ao consumidor (SAC). Foram considerados produtos relevantes para a pesquisa aqueles que apresentavam informações caracterizando o produto como importado (uso de língua estrangeira no rótulo), presença de substâncias farmacológicas ou então alegações comerciais de ação terapêutica. Os preços das amostras variaram de R\$ 19,50 a R\$ 244,45. De acordo com o orçamento disponível e as características necessárias para o enquadramento do produto como amostra de interesse, foi possível a aquisição de 44 amostras, as quais foram recebidas via postal. Os produtos foram adquiridos de janeiro a dezembro de 2017, antes do marco regulatório dos suplementos alimentares, e analisadas conforme as legislações vigentes à época para essa categoria de produtos. Também foram avaliadas as ocorrências de não conformidade e as mudanças requeridas para o enquadramento legal das amostras nas diretrizes atuais.

3.1.2 Classificação das amostras

Os suplementos alimentares foram distribuídos em categorias designadas de acordo com as classificações atribuídas pelos próprios sites de venda (suplementos para modulação hormonal, suplementos para perda de peso, suplementos para desempenho sexual e construtores musculares). As informações de rotulagem pertinentes, como ingredientes, lote, fabricante, presença de imagens ou expressões, informações sobre dispensação de registro sanitário conforme a RDC Anvisa nº 27/201020 e indicação para o consumo, entre outras, foram tabeladas com o auxílio da ferramenta Microsoft Excel®. Esses dados foram avaliados quanto à conformidade de acordo com a legislação vigente no período de aquisição. Em seguida, as amostras foram analisadas com base nos novos critérios de classificação dos suplementos alimentares, nos ingredientes permitidos e nas alegações dispostas na RDC Anvisa nº 242 e 243/2018, e anexos. As alegações atribuídas aos ingredientes majoritários das amostras foram comparadas com as recomendações de sociedades internacionais e organizações oficiais, como *International Society of Sports Nutrition*, *Academy of Nutrition and Dietetics*, *Dietitians of Canada* e *American College of Sports Medicine*, além de artigos científicos.

3.2 AVALIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DOS SUPLEMENTOS ALIMENTARES

Os ensaios ocorreram seguindo as diretrizes descritas por Instituto Adolfo Lutz (2008). Primeiramente, a umidade foi determinada por aquecimento direto em estufa a 105°C por 24 horas, conforme os Métodos físico-químicos para análise de alimentos do Instituto Adolfo Lutz (2008). A determinação do resíduo mineral fixo (teor de cinzas) foi realizada por meio da calcinação das amostras em mufla a temperatura de 550 °C até peso constante. Para a análise de proteína, o teor de nitrogênio total foi feito através do método de Kjeldahl sendo o teor de proteína bruta obtido pelo uso do fator 6,25 para conversão de nitrogênio em proteína. A determinação de lipídios foi realizada em extrator de Soxhlet, utilizando como solvente extrator o éter de petróleo. O teor de carboidratos totais dos suplementos proteicos foi obtido pelo cálculo da diferença entre 100 g de amostra e o somatório das porcentagens de umidade, cinzas, lipídeos totais e proteínas contidas em cada amostra. As determinações da composição centesimal ocorreram em triplicata, e os resultados foram expressos de acordo com as médias

dos teores encontrados e o desvio padrão relativo dos resultados obtidos, com auxílio do GraphPad Prism versão 5.01.

3.3 DESENVOLVIMENTO DE UM MÉTODO ANALÍTICO PARA A DETERMINAÇÃO DE ADULTERANTES

3.3.1 Instrumentação e Reagentes

Para o desenvolvimento do método, foram utilizados reagentes e solventes com alto grau de pureza, como acetonitrila grau HPLC (JTBacker, EUA), metanol grau LC-MS (Panreac, Castellar del Vallès, Espanha), ácido fórmico 85% de pureza grau PA e isopropanol grau HPLC (ambos Tedia, Fairfield, Estados Unidos). A água ultrapura foi obtida através de sistema Milli-Q Synergy UV (Merck Millipore, Darmstadt, Alemanha).

O método utilizado para a determinação de adulterantes foi desenvolvido em um sistema de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detecção por Arranjo de Diodos (HPLC-DAD) Agilent Technology® (Santa Clara, CA, Estados Unidos) L1260 Infinity capaz de operar em pressões de até 600 bar (Figura 6). O equipamento era provido de sistemas de separação por gradiente de bomba quaternária, injeção automatizada e forno termostático de coluna. A separação cromatográfica foi realizada em uma coluna de fase reversa Agilent® Poroshel 120 EC-C18 (4,6x50mm; 2,7 μm), acoplada à uma pré-coluna Agilent® Eclipse Plus C18, (4,6x5 mm; 1,8 μm). As determinações e os resultados foram monitorados através do software Agilent® OpenLab CDS EZChrom.

Figura 6 - Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência com detecção por Arranjo de Diodos utilizado para o desenvolvimento do presente trabalho.



Como instrumentação, também foi utilizado o sistema de banho ultrassônico Unique® (São Paulo, Brasil) para desaerar a fase móvel, padrões e amostras. Para a pesagem de padrões, amostras e reagentes, foi utilizada uma balança analítica Shimadzu® (Quioto, Japão) com quatro casas de precisão depois da vírgula. Também foram utilizados sistema de filtração à vácuo e pHmetro digital Metrohm® (Herisau, Suíça).

3.3.1.1 Substâncias químicas de referência

Como padrões analíticos para estudo do método cromatográfico foram utilizadas tanto matérias-primas de grau farmacêutico quanto substâncias químicas de referência (SQR) grau analítico. As matérias-primas foram obtidas em farmácias de manipulação acompanhadas do laudo de análise contendo seu grau de pureza. A Tabela 3 detalha a classe farmacêutica de todos os padrões utilizados, seu fornecedor e grau de pureza.

Tabela 3 - Padrões dos fármacos estudados como adulterantes e interferentes para a otimização e validação do método.

(continua)

	Substância	Fornecedor	Grau de Pureza (%)¹
ADULTERANTES ESTUDADOS	Diuréticos		
	Espironolactona	Pharma Nostra	100,56
	Furosemida	Pharma Nostra	99,85
	Hidroclorotiazida	Pharma Nostra	99,97
	Estimulantes sexuais		
	Cloridrato de Ioimbina	Sigma-Aldrich	98,00
	Sildenafil	Fagron do Brasil	99,00
	Tadalafil	Sigma-Aldrich	99,90
	Vardenafil	Euroepan Pharmacopeia Reference Standard	90,50
	Anabolizantes		
	Clembuterol	AvaChem Scientific	98,00
	Testosterona	Pharma Nostra	98,90
	Propionato de testosterona	Pharma Nostra	100,74

SUBSTÂNCIAS UTILIZADAS PARA O ESTUDO DE SELETIVIDADE

(conclusão)

Anorexígenos		
Anfepramona	Genix Ind. Farm. Ltda	98,00
Femproporex	Genix Ind. Farm Ltda	100,42
Sibutramina	Deg	99,30
Ansiolíticos		
Alprazolam	Deg	100,18
Bromazepam	Opção Fênix Dist. Ins. Ltda	99,80
Clonazepam	Opção Fenix Dist. Ins. Ltda	99,90
Clordiazepóxido	Opção Fênix Dist. Ins. Ltda	99,57
Diazepam	Deg	98,99
Fluxoetina	SulFarma	
Flurazepam	Deg	99,56
Medazepam	Pharma Nostra	98,79
Midazolam	Pharma Nostra	100,06
Antidepressivos		
Amitriptilina	Fragon do Brasil	99,99
Citalopram	Gemin	99,78
Imipramina	Pharma Nostra	98,97
Nortriptilina	Pharma Nostra	97,88
Paroxetina	Fragon do Brasil	99,99
Selegiline	Pharma Nostra	98,79
Sertralina	Pharma Nostra	99,87
Venlafaxina	Fragon do Brasil	99,99
Estimulantes do SNC		
Cafeína		
Efedrina	Sigma-Aldrich	98,00
Hordenina	Sigma-Aldrich	97,00
Octopamina	Sigma-Aldrich	95,00
Tiramina	Sigma-Aldrich	99,00
Tirosina	Sigma-Aldrich	99,00
DMAA	Sigma-Aldrich	98,00
Fenilpropanolamina	Sigma-Aldrich	97,00
Laxantes		
Bisacodil	Dermapelle	98,76
Fenolftaleína	Vetec	Grau P.A.

Fonte: Do autor.

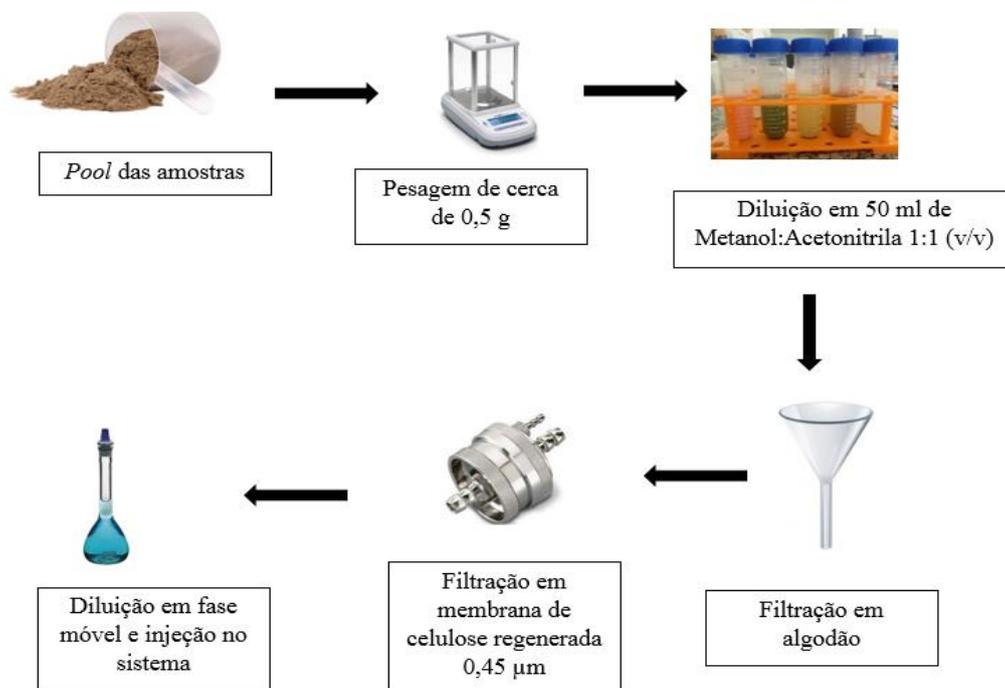
¹ Grau de pureza determinado conforme o laudo anexado pelo fornecedor.

Todas as SQR foram diluídas a 1 g/L em Metanol:Acetonitrila 1:1 (v/v) e mantidas sob refrigeração por até 30 dias.

3.3.2 Preparo das amostras

Para a análise por HPLC-DAD, as amostras foram separadas de acordo com sua forma farmacêutica, ou seja, pó à granel, cápsulas de gelatina mole, cápsulas de gelatina dura, sachês ou comprimidos. Para todas as formas sólidas com o conteúdo em pó, como cápsulas, comprimidos, sachê, entre outras, foram preparados *pools* do mesmo lote (n=10) com posterior extração conforme método anteriormente desenvolvido (DAL MOLIN, 2016). 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 comprimidos foram pesados individualmente dez unidades, reunidos e triturados para formar o *pool*. Os suplementos apresentados na forma de pó à granel foram amostrados retirando dez alíquotas de diferentes partes até formar um pool contendo 5 g de amostra. Soluções analíticas de cada amostra foram preparadas a partir de 0,5 g de peso médio diluída em 50 mL de metanol:acetonitrila 1:1 (v/v). As diluições foram levadas ao banho ultrassônico por 30 minutos, filtradas previamente em algodão para posterior filtração em membrana regenerada de 0,45 µm e então diluição na fase móvel (Figura 7).

Figura 7 – Esquema de preparo das amostras de suplemento alimentar.



Fonte: Adaptado de Dal Molin (2016).

3.3.3 Parâmetros de validação do método analítico

Os parâmetros de desempenho do método cromatográfico desenvolvido, foram validados conforme o protocolo disponível pela Anvisa na RDC nº 166, de 24 de julho de 2017 a qual dispõe sobre validação de métodos analíticos (BRASIL, 2017b). Parâmetros básicos de desempenho do método como linearidade, precisão, exatidão e sensibilidade do método foram avaliados para determinar a performance do método proposto.

3.3.3.1 Seletividade do método

A capacidade do método de identificar e quantificar o analito de interesse na presença de outros componentes que poderiam estar presentes nas amostras foi realizada com a adição de substâncias químicas de referência como interferentes (Tabela 3). Devido aos casos de adulterações descritos na literatura com diferentes substâncias, foram utilizadas cinco classes farmacológicas (anorexígenos, antidepressivos, ansiolíticos, antidepressivos, estimulantes e laxantes) para o estudo da seletividade. O resultado foi expresso avaliando a presença ou não de interferentes do método.

3.3.3.2 Linearidade

A capacidade do método de obter resposta analítica diretamente proporcional à concentração do analito de interesse foi avaliada a partir das áreas dos picos cromatográficos de diferentes concentrações em triplicata. Os resultados de linearidade de cada método foram analisados através da regressão linear (método dos mínimos quadrados) e pelo coeficiente de correlação linear. Além disso, foram avaliados os gráficos plotados entre as áreas relativas dos picos cromatográficos *versus* a concentração correspondente em escala logarítmica, sendo o nível de significância de $\pm 10\%$.

3.3.3.3 Faixa de trabalho

A faixa de trabalho foi estabelecida a partir dos estudos de linearidade, com a elaboração de uma curva analítica constituída de cinco pontos.

3.3.3.4 *Precisão*

A precisão foi utilizada para avaliar a proximidade entre os resultados obtidos a partir de ensaios realizados com amostras previamente preparadas. Neste trabalho, ela foi expressa de duas formas, a repetibilidade e a precisão intermediária. Para a repetibilidade, foram utilizadas três concentrações diferentes (baixa, média e alta) em triplicata, totalizando nove determinações, sob as mesmas condições de operação, mesmo analista e mesma instrumentação. Para o ensaio de precisão intermediária, foi avaliada a proximidade entre os resultados obtidos com análise de três concentrações distintas (baixa, média e alta) em triplicata, durante três dias. Os resultados foram expressos de acordo com os desvios padrões relativos (DPR) das concentrações obtidas.

3.3.3.5 *Exatidão*

Para avaliar a recuperação do método analítico, a exatidão foi avaliada a partir de nove determinações, ou seja, três concentrações (alta, média e baixa) em triplicata em uma matriz de suplemento alimentar. A análise constituiu da adição de uma concentração de SQR conhecida na etapa de preparação da amostra. No presente estudo, foi analisado tanto a recuperação para o melhor solvente de extração (metanol ou metanol:acetonitrila 1:1 (v/v)), e exatidão do método analítico. Os resultados foram expressos em percentual de recuperação.

3.3.3.6 *Limite de detecção (LOD) e quantificação (LOQ)*

A determinação da menor quantidade de analito presente em uma amostra foi realizada pela razão sinal-ruído de 3:1 na injeção de baixas concentrações de analitos. Ainda, a determinação da menor quantidade de analito em uma amostra que pode ser quantificada com precisão e exatidão aceitáveis, foi feita pela razão 10:1, sinal:ruído.

3.3.3.7 *Robustez*

Por fim, foi avaliada a capacidade do método de resistir a pequenas e deliberadas variações de condições analíticas. Os parâmetros estudados foram: I) Composição da fase

móvel (Ácido fórmico 0,01 e 1%), II) vazão da fase móvel e III) temperatura de separação. Os resultados foram obtidos conforme o desvio padrão dos tempos de retenção para cada analito.

3.3.4 Análise estatística dos dados

Os dados obtidos para os procedimentos acima descritos, foram interpretados através da Análise Variância (ANOVA). Os resultados encontrados na determinação da precisão do método serão avaliados estatisticamente através do teste F e expressos através do desvio padrão (DP) e desvio padrão relativo (DPR). A exatidão do método analítico foi determinada através de ensaio de recuperação de padrão adicionados as amostras, sendo expressa como percentual de recuperação e avaliada a partir do teste t de Student.

Todos os cálculos utilizados foram realizados através do software Microsoft® Excel® 2013.

3.4 ESTUDO DA TOXICIDADE *in silico* e CITOTOXICIDADE *in vitro* DOS SUPLEMENTOS ALIMENTARES ADULTERADOS

3.4.1 Estudo da toxicidade *in silico* dos adulterantes

O estudo de simulação computacional da toxicidade foi realizado nos fármacos sintético encontrados como adulterantes nas amostras de suplementos alimentares. A ioimbina não foi incluída no estudo, uma vez que a sua ocorrência é de origem natural. A cafeína, uma xantina comumente presente em suplementos alimentares foi estudada a fim de correlacionar os efeitos da matriz dos produtos com os fármacos adulterantes. Foram utilizados cinco programas computacionais gratuitos para o estudo da toxicidade *in silico*: I) pkCSM (<http://biosig.unimelb.edu.au/pkcsm/prediction>); II) ProTOX (http://tox.charite.de/prottox_II/); III) Lazar (<https://lazar.in-silico.ch/predict>); IV) preADMET (<https://preadmet.bmdrc.kr/>); V) OSIRIS property explorer (<http://www.organic-chemistry.org/prog/peo/>). Foram avaliados os riscos de mutagenicidade, carcinogenicidade, cardiotoxicidade, irritação, toxicidade do sistema reprodutor, hepatotoxicidade e citotoxicidade para cada substância. Os efeitos adversos foram interpretados e expressos em escala, conforme descrito por Salgueiro e colaboradores (2016), onde (+) significa baixo risco de toxicidade, (++) médio risco e (+++) risco elevado. Para a atribuição de escala de toxicidade, os resultados encontrados nos programas computacionais foram tabelados com o auxílio do software Microsoft Excel®.

Aquelas substâncias que apresentaram o maior escore de risco específico receberam a escala máxima de toxicidade (+++), enquanto que as outras substâncias tiveram a escala proporcional ao escore máximo.

3.4.2 Estudo da citotoxicidade *in vitro* para os suplementos adulterados

*3.4.2.1 Coleta de sangue para estudos de citotoxicidade *in vitro**

As células mononucleadas do sangue periférico (do inglês, *Peripheral Blood Mononuclear Cells, PBMC*) foram coletadas de voluntários jovens saudáveis, não-fumantes, que não haviam consumido álcool, nem tomado qualquer medicação que pudesse interferir com os resultados científicos, nas últimas 48 horas. As amostras de sangue periférico foram obtidas através de três coletas realizadas no Laboratório de Análises Clínicas da Universidade Franciscana, sob aprovação do Comitê de Ética em Pesquisas com Seres Humanos (CAAE: 31211214.4.0000.5306) com ausência de dados de identificação. As amostras foram obtidas através de punção venosa utilizando tubos do tipo Vacutainer® contendo heparina, os quais foram utilizados para a separação das PMBCs e tratamento subsequente para a cultura celular.

3.4.2.2 Cultura celular e tratamento

Para os ensaios dos efeitos citotóxicos dos suplementos adulterados sobre a viabilidade celular e dano do DNA, foi utilizado um protocolo experimental semelhante ao descrito por Wilms e colaboradores (2005). Utilizou-se o meio de cultura contendo as células em meio RPMI:MeOH 1:1 (v/v) como controle negativo e o meio de cultura adicionado de 100 mM de peróxido de hidrogênio como controle positivo.

A separação das PBMC ocorreu através do gradiente de densidade com reagente de Histopaque®-1077. Em tubos cônicos foram adicionados 4 mL desse reagente e cuidadosamente foram transferidos 4 mL de sangue. Os tubos foram centrifugados a 1000 rpm por 30 minutos. Em seguida, as células mononucleadas foram retiradas e transferidas para novos tubos, para então, ser adicionado meio de cultura RPMI 1640 (do inglês *Roswell Park Memorial Institute*) (Invitrogen®) contendo 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) (Invitrogen®) e 1% de antibióticos. Os tubos foram centrifugados novamente por 10 minutos a 1800 rpm, posteriormente as células foram suspensas com meio RPMI completo. A

concentração de 2×10^5 células/mL foi obtida através da contagem em câmara de Neubauer com 0,4% de azul de Tripán. Os meios consistiam de controles negativos (MeOH:RPMI 1:1 (v/v)), controles positivos (H_2O_2) e as amostras adulteradas encontradas a partir do método analítico solubilizadas em DMSO:MeOH 1:1 (v/v) a 200 mg/mL, diluídas em sete concentrações distintas em meio RPMI. Após os tratamentos, as placas foram incubadas em estufa de CO_2 à $37^\circ C$ durante 24 horas. Todos os experimentos foram realizados em triplicatas.

3.4.2.3 Ensaio de hemólise

A atividade hemolítica foi medida em espectrofotômetro usando um ensaio de liberação de hemoglobina. Resumidamente, os eritrócitos foram desfibrinados através da lavagem por três vezes com Tampão Fosfato Salino (PBS) e centrifugados a 9000 rpm por 15 minutos. Após a lavagem, os eritrócitos foram concentrados em tubos de 10 mL (tipo Falcon). Então, 400 μ L desse concentrado foi retirado e ressuspenso em 1 mL de PBS. As células foram então tratadas e estocadas por 1 hora a $37^\circ C$, para posterior centrifugação em 1000 rpm por 10 minutos. Alíquotas do sobrenadante foram transferidas para tubos de microcentrifugação, onde a liberação de hemoglobina foi monitorada utilizando um leitor de microplaca TP-Reader (Thermoplate®, China), na absorvância de 409 nm. A porcentagem da atividade de hemólise foi calculada conforme a equação (1) abaixo:

(1)

$$\frac{(TA - CN)}{(CP - CN)} \times 100$$

Onde TA é a absorvância das amostras tratadas, CN a absorvância do controle negativo tratado com PBS em Metanol:RPMI 1:1 (v/v) e CP a absorvância do controle positivo.

3.4.2.4 Avaliação da viabilidade celular pelo ensaio de MTT

O ensaio de MTT foi realizado conforme o protocolo descrito por Mossman (1983). No ensaio do MTT, o reagente brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-yl]-2,5-difeniltetrazólio, solúvel em água e de coloração amarela, foi incorporado em células viáveis (20 μ L na

concentração de 5mg/mL em PBS) após a incubação. As placas foram homogenizadas e mantidas em estufa a 37°C com 5% de CO₂, por 4 horas. A atividade mitocondrial das células viáveis reduz esse composto pela enzima succinato desidrogenase. Ao ser reduzido, o MTT é convertido em cristais azul de formazam, o qual é insolúvel em água e apresenta uma coloração azul-púrpura. O azul de formazam, estocado no citoplasma da célula, foi ressuspensionado com a adição de 200 µL de DMSO (dimetilsulfóxido) e quantificado colorimetricamente por espectrofotometria no comprimento de onda de 570 nm. O valor de absorvância obtido foi proporcional ao número de células viáveis em comparação ao controle negativo.

3.4.2.5 Ensaio de Óxido Nítrico

O teste de óxido nítrico detecta a presença de nitrito livre nas amostras. O nitrito é detectado e analisado através da formação da coloração rosada quando o reagente de Griess é adicionado nas amostras que contêm NO₂. A sulfanilamida do reagente de Griess é responsável pela formação de diazônio do nitrito da amostra. Quando o composto azo (N-1-naftilenediamino-bicloridrato) interage com os sais de diazônio, a coloração rosa aparece na amostra.

Após a incubação dos tratamentos, a placa de cultura foi centrifugada e o sobrenadante foi separado para a realização do ensaio. Então, foram transferidos 100 µL dos respectivos sobrenadantes dos testes para outra placa de 96 poços. Em seguida, 100 µL do reagente de Griess foi incorporado ao sobrenadante. Esse reagente é composto por uma solução I (Sulfanilamida 1%) + solução II (N-1-naftilenediamino-bicloridrato), na proporção 1:1 (v/v). A placa foi estocada a temperatura ambiente por 15 minutos para posterior leitura em espectrofotômetro na absorvância de 540 nm. Os resultados foram calculados em porcentagem em relação ao controle negativo.

3.4.2.6 Liberação de espécies reativas de oxigênio (EROs)

A quantificação das espécies reativas de oxigênio (EROs) foi determinada utilizando o ensaio de diacetato de 2,7-diclorofluoresceína (DCFH-DA) (Sigma-Aldrich®), como descrito por Bass e colaboradores (1983). O reagente DCFH-DA atravessa a membrana celular, e é desacetilado pelas enzimas mitocondriais originando a 2,7-diclorohidrofluoresceína a qual

reage com as EROs, principalmente com o peróxido de hidrogênio, emitindo fluorescência. PBMCs tratadas e não tratadas foram solubilizadas com o reagente DCFH-DA por 1 hora a temperatura ambiente. A fluorescência foi determinada em um espectrofluorímetro (Agilent®) em comprimentos de onda de 488 nm de excitação e 525 nm de emissão (ESPOSTI, 2002).

3.4.2.7 Ensaio de dano de fita dupla do DNA (dsDNA)

O ensaio de quantificação de dsDNA é um parâmetro de avaliação de morte celular por lise. O Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Reagent (Invitrogen®) emite fluorescência quando ligado ao DNA dupla fita em solução. Em cada poço, foi pipetado 80 µL de TE 1x e 10 µL do sobrenadante. A incubação foi feita por 5 minutos no escuro e com 10 µL do reagente de PicoGreen® diluído. As leituras foram feitas em triplicata e com excitação a 480 nm e emissão a 520 nm em espectrofluorímetro (Agilent®).

3.4.2.8 Análise estatística

Os resultados de citotoxicidade foram demonstrados em porcentagem em relação ao grupo não tratado, o controle negativo. Os dados foram expressos em média \pm desvio padrão, sendo que os resultados obtidos foram comparados estatisticamente com o grupo controle. As análises foram realizadas por ANOVA de 1 via seguido do teste de Dunnet *post hoc*. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. Os gráficos foram elaborados utilizando GraphPad Prism versão 5.01 (GraphPad Software, La Jolla, CA, EUA).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Uma análise minuciosa do ponto de vista regulatório, rotular e analítico para cada amostra foi realizada. Com a investigação dos suplementos alimentares pelo método analítico proposto, foi possível realizar uma predição toxicológica *in silico* dos adulterantes encontrados nas amostras e, concomitantemente, realizar estudos de citotoxicidade *in vitro* das amostras positivas para a presença destas substâncias.

Portanto, para um melhor entendimento do trabalho realizado e, conseqüentemente, a elaboração de uma discussão mais coesa, os resultados foram divididos em quatro capítulos: I) Análise dos aspectos regulatórios dos suplementos alimentares; II) Análise da composição centesimal das amostras de suplementos alimentares; III) Desenvolvimento de um método analítico por HPLC-DAD e determinação de adulterantes em suplementos alimentares; IV) Estudo da toxicidade *in silico* dos fármacos adulterantes e da citotoxicidade *in vitro* das amostras adulteradas. A composição das amostras adquiridas para o presente estudo, bem como o apelo comercial atribuído ao produto disponível nos *sites* de venda e outras informações consideradas relevantes presentes nos seus respectivos rótulos, estão descritas na Tabela 4.

Tabela 4 - Amostras de suplementos alimentares adquiridas estudadas no presente trabalho.

(continua)

Amostra	Apelo comercial ¹	Ingredientes	Faixa de preço ²	Legislação declarada pelo fabricante	Indicação de consumo	Forma de apresentação
01	Auxilia no ganho muscular e aumento de força	Proteína do soro do leite isolada e hidrolisada	R\$ 119,00 – R\$ 259,90	Dispensado de registro de acordo com a RDC Anvisa nº 27/2010	Ingerir 31g em 30 mL de água por dia	Pó à granel
02	Aumento da virilidade e potência sexual. Combate impotência e reforça os níveis de testosterona	Long Jack (<i>Eurycoma longifolia</i>)	R\$ 169,00	n.d.	Consumir 1 cápsula 2 vezes ao dia	Cápsula gelatinosa dura
03	Moderador de apetite, melhor do fluxo sanguíneo, diurético, redução da absorção de gorduras, cardioprotetor	Psyllium, abacaxi, acerola, açaí, amora, ameixa, banana, laranja, maçã, mamão, morango, maracujá, tamarindo, uva, berinjela, beterraba, brócolis, cenoura, espinafre, tomate, guaraná, cogumelo <i>Agaricus blazei</i> , gérmen de soja, aveia, trigo, linhaça, gergelim, cacau, alho	R\$ 20,90 – R\$ 29,99	Produto registrado na Anvisa/MS	Consumir 2 a 3 cápsulas 3 vezes ao dia	Cápsula gelatinosa dura
04	Aumento de força, auxílio no ganho de massa magra	Proteína de carne bovina hidrolisada e isolada, maltodextrina	R\$ 269,00 – R\$ 359,00	Produto regulamentado pelo FDA	Ingerir 31,3 g do pó em 200 a 300 mL de água	Pó à granel
05	Auxilia no emagrecimento e no desempenho durante os exercícios físicos	Carnitina	R\$ 163,31 – R\$ 191,00	Produto registrado na Anvisa/MS	Consumir 1 a 2 cápsulas por dia	Cápsula gelatinosa dura

Tabela 4 – Amostras de suplementos alimentares adquiridas estudadas no presente trabalho.

						(continuação)
06	Auxilia na perda de apetite, possui compostos diuréticos	Cafeína 420 mg	R\$ 155,54	n.d.	Consumir 2 cápsulas ao dia	Cápsula gelatinosa dura
07	Construção e definição muscular, transformador de açúcares e gorduras em energia, potencializador dos efeitos da insulina	Picolinato de cromo 200 mcg	R\$ 21,67 – R\$ 42,89	Produto registrado na Anvisa/Ministério da Saúde	Consumir 1 cápsula ao dia	Cápsula gelatinosa dura
08	Propriedades afrodisíacas, produção de hormônios sexuais, aumento da libido	Maca peruana, acerola, vitamina E, vitamina A, zinco, picolinato de cromo, selênio	R\$ 38,40 – R\$ 23,90	Dispensado de Registro de acordo com a RDC Anvisa nº 27/2010	Consumir 2 cápsulas ao dia	Cápsula gelatinosa dura
09	Aumento de massa muscular, suporte ao crescimento e manutenção muscular	Proteína do leite concentrada, proteína de soro do leite isolada, albumina, leite desnatado, triglicerídeos de cadeia média, cloreto de sódio, caseinato de sódio, óleo de girassol, óleo de canola, caseína, cacau em pó com álcalis	R\$ 111,26 – R\$ 233,10	Produto regulamento pelo FDA	Ingerir 1 colher média diluído em 1 copo de água	Pó à granel
10	Estimula a síntese proteica, maximizando o crescimento de massa muscular	Mistura de proteínas do soro do leite, glicina, creme de leite vegetal, cacau em pó	R\$ 111,41 – R\$ 244,85	Dispensado de Registro de acordo com a RDC Anvisa nº 27/2010	Ingerir 37,8 g diluído em 200 mL de água fria	Pó à granel

Tabela 4 – Amostras de suplementos alimentares adquiridas estudadas no presente trabalho.

(continuação)

11	Fórmula de minerais desenvolvida para aumentar a testosterona, força muscular e o desempenho do atleta	Complexo de magnésio, zinco e vitamina B16	R\$ 30,50 – R\$ 38,00	Produto regulamentado pelo FDA	Consumir 2 cápsulas ao dia	Cápsula gelatinosa dura
12	Ganho de massa muscular, força e performance	Proteína do soro do leite, fígado bovino, maltodextrina, carbonato de cálcio, óleo de linhaça, citrato de colina, óleo de palma, óxido de magnésio, ácido fólico, vitamina C, vitamina B3, vitamina E, óxido de zinco, sulfato de manganês, biotina, picolinato de cromo	R\$ 112,38 – R\$ 239,90	Dispensado de Registro de acordo com a RDC Anvisa nº 27/2010	11 tabletes (1 porção) ao dia junto as refeições	Tabletes
13	Termogênico 3 em 1: elimina gordura, te deixa “rasgado”, e melhora seus níveis de testosterona, estrogênio e cortisol	Cafeína, carbonato de cálcio, maltodextrina, estearato de magnésio, dióxido de silício	R\$ 198,90 – R\$ 209,00	Produto regulamentado pelo FDA	Homens: Como suplemento dietético tomar 3 cápsulas diariamente na primeira refeição. Programa de treinamento intensivo - Homens: como suplemento dietético servir 3 cápsulas duas vezes ao dia. De manhã: tomar 3 cápsulas com o café-da-manhã. A tarde: tomar 3 cápsulas com o lanche. Não deve ser tomado com menos de 6 horas antes de dormir	Cápsula gelatinosa dura

Tabela 4 – Amostras de suplementos alimentares adquiridas estudadas no presente trabalho.

(continuação)

14	Erva natural que estimula o aumento da produção do hormônio que é responsável pela produção de testosterona	<i>Tribullus terrestris</i>	R\$ 37,80 – R\$ 42,00	Dispensado de registro de acordo com a RDC Anvisa nº 27/2010	1 cápsula, 4 vez ao dia, uma hora antes das refeições e antes de dormir	Cápsula gelatinosa dura
15	Crescimento, performance e anabolismo muscular	Óxido de Magnésio, óxido de zinco, cromo quelato e vitamina B6	R\$ 41,52 – R\$ 52,00	Dispensado de registro de acordo com a RDC Anvisa nº 27/2010	1 cápsula uma vez ao dia, 30 minutos antes de dormir	Cápsula gelatinosa dura
16	Aumenta níveis anabólicos, gera força e massa muscular	Magnésio Aspartato, zinco Aspartato, zinco Monometionina, vitamina B6	R\$ 58,17 – R\$ 66,40	Dispensado de registro de acordo com a RDC Anvisa nº 27/2010	1 cápsula uma vez ao dia, 30 minutos antes de dormir	Cápsula gelatinosa dura
17	Ajuda a aumentar os hormônios anabólicos, níveis de testosterona e força do atleta	Bisglicinato de magnéio, maltodextrina, bisglicinato de zinco, vitamina B6	R\$ 19,50 – R\$ 29,00	Dispensado de registro de acordo com a RDC Anvisa nº 27/2010	2 cápsula, 30 a 60 minutos antes de dormir	Cápsula gelatinosa dura
18	Efeito anabólico e afrodisíaco. Aumenta níveis de hormônio luteinizante e testosterona	<i>Tribullus terrestris</i> (450 mg) e <i>Lepidium meyenii</i> (50 mg)	R\$ 29,90	Produto isento de registro de acordo com a Resolução Anvisa nº 23/2010 e RDC Anvisa nº 27/2010	1 a 2 cápsulas, 2 vezes ao dia, uma hora antes das refeições	Cápsula gelatinosa dura

Tabela 4 – Amostras de suplementos alimentares adquiridas estudadas no presente trabalho.

(continuação)						
19	Máximo de rendimento e ganho de massa	Maltodextrina, proteína concentrada do soro do leite, colágeno hidrolisado, albumina [clara de ovo desidratada], cacau em pó	R\$ 39,99 – R\$ 49,00	Dispensado de registro de acordo com a RDC Anvisa nº 27/2010	Bater no liquidificador 160 g (5 dosadores) em 250 mL (1 copo) de leite integral, desnatado ou água. Utilize antes ou depois do treino.	Pó à granel
20	Ajuda na recuperação de energia, reduz dor muscular, auxilia na construção muscular	Citrato trissódico, cloreto de potássio, cloreto de sódio, L-glutamina, L-citrulina, L-isoleucina, L-valina, antiumectante maldodextrina	R\$ 29,00 – R\$ 34,37	Dispensado de registro de acordo com a RDC Anvisa nº 27/2010	Depois de cada treino, misture 1 pacote em 200 mL de água fria e consumir dentro de 15 min ou menos pós-exercício.	Sachê com conteúdo em pó
21	Promove crescimento muscular, recuperação muscular, mais energia, mais força e mais potência	L-Leucina, L-Valina, L-Isoleucina, maltodextrina	R\$ 178,81 – R\$ 200,34	Dispensado de registro de acordo com a RDC Anvisa nº 27/2010	Consumir 3,5 g (1/3 colher medida) ao dia diluídos em 250 mL de água	Pó à granel
22	Recomendado para ganho de massa muscular	Maltodextrina, leite em pó desnatado, dextrose, proteína concentrada do soro de leite, albumina desidratada	R\$ 48, 83 – R\$ 64,99	Dispensado de registro de acordo com a RDC Anvisa nº 27/2010	Diluir 13 colheres de sopa (160 g) em 300 mL de água ou suco de frutas. Consumir até 2 porções por dia.	Pó á granel
23	Vai dar um impacto máximo na produção de testosterona, aumentar libido e desempenho sexual	Gelatina, celulose microcristalina, estearato de magnésio, mix de vitamina e minerais [B6 (piridoxina HCL), magnésio (aspartato) e zinco (monometionina/aspartato)]	R\$ 162,92 – R\$ 215,95	Dispensado de registro de acordo com a RDC Anvisa nº 27/2010	Tomar 2 cápsulas uma vez por dia 30 min antes de deitar. Sugerido usar 60 dias.	Cápsula gelatinosa dura

Tabela 4 – Amostras de suplementos alimentares adquiridas estudadas no presente trabalho.

(continuação)

24	Extremo “pump”, máxima dilatação muscular, altos níveis de energia, máxima vascularização e rápida resposta muscular	Guaraná (<i>Paullina cupana</i> L., sementes), erva mate (<i>Ilex paraguariensis</i> St. Hill., folhas e talos), banana-prata (<i>Musa paradisiaca</i> L., frutos), chá verde (<i>Camellia sinensis</i> L., folhas), chá branco (<i>Camellia sinensis</i> L., folhas), chá preto (<i>Camellia sinensis</i> L., folhas), limão (<i>Citrus limmonia</i> Osbeck, casca do fruto e flores)	R\$ 144,21 – R\$ 151,80	Dispensado de registro de acordo com a RDC Anvisa nº 27/2010	Misture uma colher média (5 g) dissolvida em 250 mL de água.	Pó à granel
25	Fórmula que promove estímulo energético para treinos de alta intensidade, além de contribuir para o aumento de diurese	Guaraná em pó, laranja amarga em pó, chá <i>Camellia sinensis</i> solúvel, gengibre em pó, raiz-forte em pó, pimenta vermelha em pó	R\$ 71,89 – R\$ 90,00	Dispensado de registro de acordo com a RDC Anvisa nº 27/2010	Diluir 1 scoop (5 g) em 200 mL de água, de preferência gelada. Consumir 1 min antes do treino.	Pó à granel
26	Maior resistência física, aumento do ganho de massa muscular, auxilia na queima de gordura	L-Leucina, L- Isoleucina, L-Valina	R\$ 60,12 – R\$ 70,61	Dispensado de registro de acordo com a RDC Anvisa nº 27/2010	Tome uma colher dosadora misturada a um copo de 200 mL de água.	Pó à granel
27	Queima mais gordura, ajuda o corpo a produzir testosterona, fornece energia extra aos músculos	Cafeína, aromatizantes naturais (extratos secos de <i>Citrus aurantium</i> , chá verde e gengibre)	R\$ 57,00 – R\$ 79,00	Dispensado de registro de acordo com a RDC Anvisa nº 27/2010	Ingestão diária de 2 comprimidos	Comprimidos

Tabela 4 – Amostras de suplementos alimentares adquiridas estudadas no presente trabalho.

(continuação)

28	Extremo “pump”, máxima dilatação muscular, altos níveis de energia, máxima vascularização e rápida resposta muscular	Guaraná (<i>Paullinea cupana</i> L., sementes), erva mate (<i>Ilex paraguariensis</i> St. Hill., folhas e talos), banana-prata (<i>Musa paradisiaca</i> L., frutos), chá verde (<i>Camellia sinensis</i> L., folhas), chá branco (<i>Camellia sinensis</i> L., folhas), chá preto (<i>Camellia sinensis</i> L., folhas), limão (<i>Citrus limmonia</i> Osbeck)	R\$ 144,21 – R\$ 151,80	Dispensado de registro de acordo com a RDC Anvisa nº 27/2010	Uma colher medida (3g) dissolvida em 20 mL de água.	Pó à granel
29	Vasodilatador precursor do óxido nítrico, dá mais força, energia e diminui a fadiga	Semente de uva em pó (alimento tratado por processo de irradiação), cálcio de ostra, amido modificado, carbonato de magnésio, ácido ascórbico (Vitamina C)	R\$ 47,91 – R\$ 48,90	Dispensado de registro de acordo com a RDC Anvisa nº 27/2010	Tomar 4 cápsulas ao dia	Cápsula gelatinosa dura
30	Resultado “extra pump” nunca visto antes, proporcionando mais densidade muscular e maior efeito da inibição da fadiga	Semente de uva em pó (alimento tratado por processo de irradiação), cálcio de ostra, amido modificado, carbonato de magnésio, ácido ascórbico (Vitamina C)	R\$ 39,51 – R\$ 46,67	Dispensado de registro de acordo com a RDC Anvisa nº 27/2010	Tomar 4 cápsulas ao dia	Cápsula gelatinosa dura
31	Nutricosmético ativador da circulação	Maltodextrina, bisglicinato de zinco, pantotenato de cálcio, piridoxina, tiamina, biotina	R\$ 119,30	Dispensado de registro de acordo com a RDC Anvisa nº 27/2010	Ingerir uma cápsula por dia	Cápsula gelatinosa dura

Tabela 4 – Amostras de suplementos alimentares adquiridas estudadas no presente trabalho.

(continuação)

32	Perda e manutenção de peso, mais força, mais energia e previne o envelhecimento	Fosfato monocálcio, carbonato de cálcio, pirofosfato férrico, cloreto de sódio, fosfato de magnésio, sulfato de zinco, sulfato de cobre, sulfato de manganês, selenito de sódio, iodeto de potássio, sulfato de potássio, acetato de retinol, coлекаlCIFerol, acetato de tocoferol, tiamina, riboflavina, ácido ascórbico, nicotinamida, piridoxina, ácido fólico, cianocobalamina, biotina, pantotenato de cálcio, extrato de soja, lecitina de soja	R\$ 94,45	Dispensado de registro de acordo com a RDC Anvisa nº 27/2010	Bater no liquidificador 3 colheres de sopa cheia (30 g) com 300 mL de água ou leite desnatado gelado	Pó à granel
33	Hormônio natural anti-envelhecimento, precursor de estrogênio e testosterona	DHEA e farinha de arroz	R\$ 89,37 – R\$ 99,30	Produto regulamentado pelo FDA	1 cápsula diariamente com uma refeição ou conforme indicado pelo profissional da saúde	Cápsula em pó
34	n.i.	DHEA, maltodextrina	R\$ 120,00	Produto regulamentado pelo FDA	1 comprimido diariamente com uma refeição ou conforme indicado pelo seu profissional da saúde	Comprimido
35	Capacidade de turbinar o desempenho sexual, máximo resultado na libido masculina	Arginina, zinco, selênio, <i>Trichilia catigua</i> juss, xarope de <i>Coffea arabica</i> , <i>Solanum sessiliflorum</i> , taurina	R\$ 42,42	Produto regulamentado pelo FDA	Ingerir 2 cápsulas ao dia	Comprimido

Tabela 4 – Amostras de suplementos alimentares adquiridas estudadas no presente trabalho.

(continuação)

36	Suplemento pró-hormonal que promove aumento significativo de força, resistência, performance e queima de gordura	Mix de vitaminas de minerais (óxido de magnésio, ácido bórico, óxido de zinco, vitamina B3, vitamina D3, vitamina B6, vitamina B12), ácido málico	R\$ 64,99 – R\$ 49,90	Dispensado de registro de acordo com a RDC Anvisa nº 27/2010	Ingerir 2 tabletes por dia	Comprimido
37	Promove mais tesão e aumento da libido masculina	Farinha de maca peruana, óxido de magnésio, niacina, vitamina E, sulfato de zinco, ácido pantotênico, vitamina B2, vitamina B6, vitamina B1, trib mx, ácido fólico, biotina, vitamina B12	R\$ 39,20 – R\$ 43,12	Dispensado de registro de acordo com a RDC Anvisa nº 27/2010	Ingerir 2 cápsulas por dia	Cápsula gelatinosa dura
38	Percursor hormonal que auxilia na produção de testosterona, no ganho de força e massa muscular além de aumentar o impulso sexual	Maca peruana em pó (<i>Lepidium meyenii</i>), mix de vitaminas e minerais: óxido de magnésio, niacina, biotina, acetato de tocoferol (vitamina E), sulfato de zinco, pantotenato de cálcio (vitamina B5), piridoxina (vitamina B6), riboflavina (vitamina B2), tiamina (vitamina B1), ácido fólico, cianocobalamina (vitamina B12)	R\$ 69,90	Dispensado de registro de acordo com a RDC Anvisa nº 27/2010	Ingerir 4 cápsulas por dia	Cápsula gelatinosa dura
39	Ganho de massa magra, redução de gordura e melhor porte físico	Bisglicinato de magnésio, gengibre em pó (gengibre em pó e maltodextrina), carbonato de cálcio, maltodextrina, bisglicinato de zinco, ácido bórico, niaciamida, polietilenoglicol, cianocobalamina, colecalciferol.	R\$ 91,60 – R\$ 109,99	Dispensado de registro de acordo com a RDC Anvisa nº 27/2010	Ingerir 2 comprimidos por dia	Comprimido

Tabela 4 – Amostras de suplementos alimentares adquiridas estudadas no presente trabalho.

(continuação)

40	Proteínas de alto valor biológico, excelente opção para complementar as necessidades de proteína do organismo	Proteína isolada de soja, proteína concentrada de soro de leite.	R\$ 88,31	Dispensado de registro de acordo com a RDC Anvisa nº 27/2010	Uma colher de sopa rasa (aproximadamente 6g), de uma a seis vezes por dia.	Pó à granel
41	Forma simples para controlar o total de calorias ingeridas e manter uma proporção ideal de carboidratos, proteínas e gorduras para controle de peso	Proteína isolada de soja, frutose, fibra de aveia, inulina, cacau em pó, óleo vegetal de canola, cloreto de potássio, café em pó, triglicerídeos de cadeia média, caseinato de cálcio, proteína concentrada do soro de leite, mix de vitaminas e minerais (maltodextrina, ortofosfato férrico, vitamina C, sulfato de zinco, vitamina E, niacinamida, gluconato de cobre, D-pantotenato de cálcio, sulfato de manganês, vitamina B6, tiamina, vitamina A, ácido fólico, iodeto de potássio, selenito de sódio, biotina, vitamina D e vitamina B12), fosfato de cálcio dibásico, óxido de magnésio, canela em pó, gengibre.	R\$ 28,00	Dispensado de registro de acordo com a RDC Anvisa nº 27/2010	Para perder peso: substituir 2 a 3 refeições diárias. Para manter o peso: substituir apenas 1 refeição principal diária. Para aumentar o peso: acrescentar até 2 shakes ao cardápio/dia.	Pó à granel
42	Relacionado com a síntese endógena de testosterona	Óxido de magnésio, niacina (vitamina B3), vitamina E, borato de sódio, bisglicinato de zinco, piridoxina (vitamina B6), ácido fólico, cianocobalamina (vitamina B12), vitamina D.	R\$ 25-99 – R\$ 47,88	Dispensado de registro de acordo com a RDC Anvisa nº 27/2010	Ingerir 2 cápsulas, "preferência à noite".	Cápsula gelatinosa dura

Tabela 4 – Amostras de suplementos alimentares adquiridas estudadas no presente trabalho.

(conclusão)

43	Usado no tratamento da impotência sexual, aumento da produção natural de testosterona	Extrato de <i>Tribulus terrestris</i>	R\$ 119,00 – R\$ 139,69	Produto regulamentado pelo FDA	1-2 cápsulas, diariamente com as refeições.	Cápsula gelatinosa dura
44	Fórmula poderosa e natural precursora de testosterona, maximizando a construção de massa muscular magra, gerando força e acelerando a redução de gordura	Maltodextrina, CalDrive-NO [L-Ascorbato de cálcio, Magnésio Aspartato (L-Aspartic Acid)], vitamina D3 (colecalfiferol), vitamina B6 (piridoxina), zinco (zinco aspartato), boro (borato de sódio).	R\$ 79,56 – R\$ 68,05	Dispensado de registro de acordo com a RDC Anvisa nº 27/2010	Dissolver 5 g em 250 mL de água gelada. Consumir uma porção após o treino ou antes de dormir. Nos dias sem treino, consumir uma porção pela manhã, com o estômago vazio.	Pó à granel

¹ Apelo comercial declarado pelo fabricante observado no momento da compra.

² Faixa de preço disponível de acordo com a ferramenta de busca Google® Shopping.

n.d. – Não declarado; n.i. – Não informado

Fonte: Do autor

4.1 ANÁLISE DOS ASPECTOS REGULATÓRIOS DOS SUPLEMENTOS ALIMENTARES

Parte dos resultados apresentados nesse capítulo da tese foram publicados na Revista de Saúde Pública, v. 53, 2019, conforme pode ser visualizado no Apêndice A. Nesse artigo, encontram-se o levantamento completo dos aspectos regulatórios das amostras e os resultados encontrados. Os dados aqui apresentados foram reproduzidos de forma parcial, mediante autorização dos editores.

4.1.1 Inconformidades regulatórias das amostras analisadas

Devido ao período de aquisição, durante os anos de 2016 a 2017, a análise regulatória realizada para amostras foi de acordo com as legislações vigentes até abril de 2017. Neste período, a denominação “Suplementos alimentares” não era amparada por lei no Brasil. Até então, por se tratar de uma classe que abrange diversos produtos popularmente denominados como suplementos alimentares, distintas categorias eram comercializados, como os suplementos proteicos, suplementos de cafeína, pré-treinos, pós-treinos, suplementos vitamínicos e/ou minerais e até mesmo suplementos ditos naturais. Tal situação tornou a análise e caracterização dos produtos confusa uma vez que, devido à presença de inúmeros ingredientes em apenas uma amostra, como pode ser visualizado na Tabela 4, era praticamente inviável enquadrá-la somente em uma legislação específica.

De acordo com os apelos comerciais, presentes nos sítios eletrônicos, os suplementos alimentares foram classificados em quatro categorias principais: (I) Modulador/Precursor hormonal; (II) Perda de peso/Controle de apetite/Diurese; (III) Aumento da libido/Potência sexual; e (IV) Construtor muscular/Melhorador de performance/Ganho de força. A frequência dessas categorias é apresentada na Tabela 5, bem como os efeitos atribuídos pelos fabricantes como forma de publicidade do produto. A presença de mais de um nutriente ou ingrediente ativo declarado no rótulo de alguns produtos é uma das questões que deve ser observada. Desta forma, a Tabela 5 apresenta somente os ingredientes principais da formulação, destacando-se entre eles a proteína do soro do leite, os ingredientes naturais (espécies vegetais) e as vitaminas e/ou minerais.

Tabela 5 - A frequência entre as categorias dos produtos, efeitos atribuídos aos produtos observados no rótulo e os ingredientes majoritários dos suplementos alimentares estudados.

Categoria % (n)			Efeitos atribuídos ao produtos		Ingredientes principais	
					Descrição	n
I	Modulador hormonal/percursor hormonal	29,6 (13)	Percursor/ síntese de/ potencializador/aumento	Testosterona	Zinco, magnésio e vitamina B6 ¹	7
					DHEA ²	2
					<i>Tribullus terrestris</i>	2
					Maca peruana	1
					Picolinato de cromo	1
II	Perda de peso/controle de apetite/diurese	18,2 (8)	Moderador	Apetite	Cafeína	3
			Melhora/aumenta	Diurese	Vitaminas e/ou minerais	3
			Auxilia/promove	Perda de peso	<i>Citrus aurantium</i>	1
					Psyllium (<i>Plantago ovato</i>)	1
III	Aumento da potência sexual/libido	13,6 (6)	Aumenta/reforça	Virilidade e libido	<i>Tribullus terrestris</i>	2
					Maca peruana	2
			Combate/Tratamento da	Impotência sexual	<i>Eurycoma longifolia</i>	1
IV	Construtor muscular/Melhora performance/Ganho de força	38,6 (17)	Auxilia/aumenta/ define	Massa muscular	Zinco, magnésio e vitamina B6	1
					Proteína do soro do leite	7
					BCAA ³	3
					<i>Paullinia cupana</i>	2
					Maltodextrina	2
		Promove/ proporciona	Efeitos anabólicos	Zinco, magnésio e vitamina B6	2	
				Proteína de carne bovina	1	
100 (44)					TOTAL	44

¹ Ingrediente declarado no rótulo de duas maneiras: I) como denominação de ZMA; II) como nutrientes adicionados em diferentes proporções

² Dehidroepiandrosterona

³ Aminoácidos de cadeia ramificada, do inglês *Branched Chain AminoAcids*.

Fonte: Dal Molin e colaboradores (2019a).

Na análise rotular, observou-se que não há um consenso para a adição de ingredientes, i.e. os fabricantes adicionam plantas, vitaminas e minerais, proteínas e carboidratos independente da função atribuída ao produto. Uma das hipóteses para a presença de um grande número de ingredientes provenientes de plantas, vitaminas e/ou minerais, é a finalidade de transmitirem uma imagem de “produto natural”. Consequentemente, por ser “natural”, o consumidor acredita que o produto é seguro e não ocasionará efeitos adversos ao organismo.

Estes apontamentos estão de acordo com os autores Rocha, Amaral e Oliveira (2016), que acreditam que a aceitação de produtos naturais se dá por três fatores: I) uma desconfiança crescente na medicina convencional, juntamente com uma maior demanda e interesse em terapias alternativas; II) a percepção de que são produtos “naturais”, “saudáveis” e por se tratarem de produtos vegetais, são seguros; III) uma tendência crescente pela automedicação com o objetivo de aumentar o controle sobre a própria saúde e tomada de decisões que possam afetá-la.

Neste trabalho, das 44 amostras analisadas, seis amostras continham espécies vegetais não permitidas em alimentos para atletas, como o *Tribullus terrestris*, *Citrus aurantium* e *Paullina cupana*, devido as propriedades fitoterápicas alegadas por parte do fabricante para adição das mesmas (BRASIL, 2011; 2014a). As amostras 02, 14, 18, 24, 27 e 43 que continham fitoterápicos deveriam apresentar registro sanitário de medicamento junto a Anvisa (BRASIL, 2010b). Atualmente, de acordo com a IN nº 28, de 26 de julho de 2018, a *Paullina cupana* está dentre os constituintes autorizados em suplementos alimentares como fonte de cafeína (BRASIL, 2018g).

Outras não conformidades foram observadas em relação a presença de ingredientes não permitidos nos produtos. Os suplementos de proteína por exemplo, não poderiam conter nutrientes ou não-nutrientes, ou seja, um suplemento como o *Whey protein* deveria, até então, possuir somente proteína do soro do leite. O mesmo era válido também para suplementos de cafeína que não poderiam conter espécies vegetais (BRASIL, 2010a).

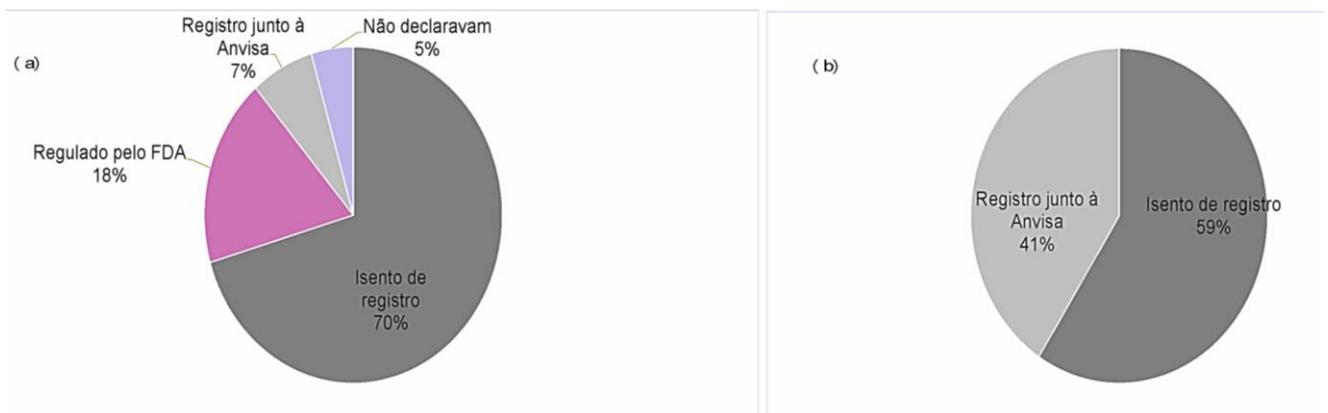
A partir de 2023, este tipo de não conformidade não deve mais ser encontrada uma vez que a IN da Anvisa nº 28/2018 estabeleceu as listas de constituintes permitidos em suplementos alimentares. Os produtos deverão sofrer adequação e apresentar na sua composição somente ingredientes presentes nesta lista respeitando os limites mínimos ou máximos, quando houver (BRASIL, 2018g).

Considerando a obrigatoriedade ou isenção de registro dos produtos junto à Anvisa, foi realizada uma análise comparativa entre o que os fabricantes declaravam nos rótulos e o

imposto pela legislação vigente no momento da fabricação, a RDC da Anvisa nº 27/2010 (Figura 8). Das 31 amostras que apresentavam dizeres como “Produto isento de registro” nos seus rótulos, cinco deveriam obrigatoriamente apresentar registro junto a Anvisa e/ou Ministério da Saúde. Dentre as amostras que se declaravam erroneamente isentas de registro, estavam novos alimentos, alimentos com propriedade funcional e até mesmo medicamentos.

De acordo com a Anvisa, quando produtos apresentam em sua composição tanto substâncias com obrigatoriedade de registro como isentas, o registro deve ser considerado. A exemplo, da amostra 27 que declarava no seu rótulo a presença de “*Cafeína, aromatizantes naturais (extratos secos de Citrus aurantium, chá verde e gengibre)*”. Neste caso, a adição de extrato seco de *Citrus aurantium*, que é uma espécie vegetal regulamentada como fitoterápico, o produto deveria ser registrado e cumprir as exigências para um medicamento fitoterápico (BRASIL, 2014a).

Figura 8 - Representação gráfica dos registros das amostras avaliadas: (A) declarações pelo



fabricante; (B) declarações ideais, conforme as diretrizes regulatórias vigentes.

Fonte: Dal Molin e colaboradores, 2019a.

Com a alteração da RDC da Anvisa nº 27/2010 pela RDC da Anvisa nº 240/2018, todos os produtos reconhecidos como suplementos alimentares, com exceção daqueles que contenham enzimas e/ou probióticos na sua composição, estarão isentos de registro (BRASIL, 2018e).

Desde que implementada, a resolução da Anvisa RDC nº 259/2002 determina que os alimentos, independentemente da categoria, não podem possuir indicações de propriedades medicinais ou terapêuticas (BRASIL, 2002c). Essa não conformidade é passível de penalidade, como suspensão da comercialização do produto, multa e até mesmo exclusão dos sítios eletrônicos. No presente estudo, observou-se um número significativo de amostras que

apresentavam apelos comerciais e uso de expressões indevidas (97,7%). Sugerem-se as seguintes hipóteses: (I) Elevada quantidade de sítios eletrônicos; (II) Dificuldade de fiscalização de lojas virtuais; (III) A exclusão de um sítio inapropriado não impossibilita a abertura de outro; (IV) Nem sempre são os fabricantes que fazem os apelos comerciais dos produtos, mas, sim, os distribuidores, com a finalidade de aumentar as vendas. O uso de frases que induzam o consumidor à compra pode ser considerado fraude contra o consumidor, já que nem sempre é possível garantir que determinado ingrediente irá proporcionar o resultado esperado.

No geral, as não conformidades encontradas nas amostras estudadas foram: (I) ausência de registro de produtos nas categorias “Novos alimentos” (n = 8) e “Alimentos com propriedade funcional” (n = 1); (II) presença de ingredientes que caracterizavam o produto como medicamento (n = 7); (III) uso de expressões e alegações indevidas (n = 43).

4.1.2 Principais compostos adicionados nos suplementos alimentares

Inúmeras são as substâncias presentes em suplementos alimentares, mas nem sempre sua presença é justificada em evidências científicas consolidadas. Conforme os dados disponíveis na Tabela 4, observa-se uma não homogeneidade entre os ingredientes adicionados em suplementos alimentares, ainda que a intenção de consumo seja semelhante a todos.

Os efeitos atribuídos aos ingredientes desses produtos muitas vezes não apresentam comprovações fundamentadas ou, até mesmo, não condizem com aqueles já descritos. As lacunas na fiscalização colaboram para o elevado número de produtos que ludibriam o consumidor por seus efeitos milagrosos, levando-o à compra. O marco regulatório surgiu para tentar reduzir essas falhas, através de uma lista de alegações permitidas relacionadas aos constituintes dos suplementos alimentares, disponível no anexo A da IN da Anvisa nº 28/2018 (BRASIL, 2018g).

Entre os ingredientes presentes nos suplementos, ressalta a presença da dehidroepiandrosterona (DHEA) em duas amostras. De acordo com os fabricantes, essas amostras possuíam ingredientes precursores da testosterona promovendo um aumento dos níveis desse hormônio no organismo. O DHEA é um derivado do colesterol, precursor de hormônios esteroidais (THOMPSON; CARLSON, 2000). Essa substância é encontrada em suplementos alimentares comercializados nos Estados Unidos devido a legalização pela DSHEA, sendo amplamente distribuída em lojas especializadas. Contudo, encontra-se na lista

de substâncias proibidas pela Agência Mundial Anti-Doping (THOMPSON; CARLSON, 2000; WADA, 2018). No Brasil, o DHEA não é permitido em suplementos alimentares por se tratar de um medicamento anabolizante sujeito a controle especial. Em 2016, a Anvisa suspendeu qualquer divulgação de um suplemento em específico e a comercialização dos produtos da mesma fabricante que, além de apresentarem alegações terapêuticas, declarava no rótulo a presença de DHEA (BRASIL, 2016).

4.1.2.1 Substâncias emagrecedoras ou termogênicas

Substâncias ditas termogênicas são aquelas que possuem a finalidade de aumentar a temperatura corporal e, conseqüentemente, estimular o metabolismo. Oficialmente, essa terminologia não existe nas legislações brasileiras, contudo ela está diretamente associada aos suplementos que contém cafeína. Assim como as substâncias emagrecedoras, a presença de substâncias termogênicas em suplementos alimentares é relacionada com a perda de peso, aumento da resistência e melhora na performance.

A cafeína (1,3,7-trimetilxantina) é uma substância natural encontrada em algumas espécies vegetais e consumida em larga escala no mundo inteiro como um estimulante (GURLEY; STEELMANS; THOMAS, 2015). Essa metilxantina é adicionada em suplementos alimentares na sua forma sintética anidra ou mesmo plantas fornecedoras de cafeína como a *Camellia sinensis*, *Paullina cupana*, *Ilex paraguariensis*. As principais justificativas de uso são acelerar o metabolismo, estimular a diurese e, conseqüentemente, promover a perda de peso.

Nas amostras estudadas, 16% (n = 7) continham cafeína sintética ou uma espécie vegetal fornecedora de cafeína, com alegações de “*Efeitos máximo*” ou “*Queima de gordura*”. Estudos na literatura relacionam o consumo de cafeína a um desempenho mais rápido em testes de tempo do ciclismo quanto comparado com o placebo (PITCHFORD et al., 2014). Embora seja menos potente que a cafeína em cápsulas, um estudo recente demonstrou que, a combinação de uma xícara de café após uma série de exercícios de alta intensidade intervalados resultou no aumento da taxa de oxidação de gordura quando comparado ao grupo que consumiu água quente (KUROBE et al., 2017). Por outro lado, um posicionamento da sociedade de nutrição esportiva não atribui à cafeína um aumento na taxa de oxidação de gordura, mas sim ao aumento no desempenho do atleta, uma vez que ela é um potente estimulante cerebral (GOLDSTEIN et al., 2010).

Até a criação da nova legislação dos suplementos alimentares, produtos que continham cafeína deveriam ser comercializados em doses de 210 a 420 mg por porção (BRASIL, 2010a). Atualmente, os limites foram alterados para no mínimo 75 mg e no máximo 200 mg em dose diária, com ressalva para os atletas que o limite máximo pode chegar até a 400 mg por dia (BRASIL, 2018g). Assim como essas concentrações, doses usuais de cafeína, com uma xícara de café, não são associadas a doenças cardiovasculares. Contudo, desde que o seu consumo se popularizou como alimento para atletas, efeitos de superdosagem vêm sendo frequentemente reportados (ZULLI et al., 2016). Reações tóxicas foram observadas em concentrações sanguíneas de cafeína de 15 mg/L, e casos de intoxicações letais foram descritas nas concentrações de 31,2 µg/mL até 197,5 µg/mL em diferentes órgãos do corpo humano (ACHESON et al., 1980; ISHIKAWA; YUASA; ENDONH, 2015).

De acordo com Wikoff e colaboradores (2010), doses de 275-360 mg ou maiores que 360 mg de cafeína por dia são suficientes para a aumentar os riscos de doenças coronárias. Em um estudo recente realizado pelo nosso grupo de pesquisa, a análise de suplementos alimentares contendo cafeína encontrou concentrações equivalente a 1476,6 mg/dia (VIANA et al., 2016). Neves e Caldas (2017) descreveram concentrações de cafeína 120% maiores do que aquelas especificadas nos rótulos dos suplementos alimentares e, das 213 amostras analisadas, 101 excediam a dosagem de 400 mg por dia.

O extrato de *Citrus aurantium* ou laranja amarga tem sido comumente adicionado em suplementos alimentares para perda de peso. No Brasil, as indicações aprovadas são de propriedades ansiolíticas e sedativo intermediário, sem relação com perda de peso (BRASIL, 2011; 2016b). Contudo, essa espécie vegetal é considerada um medicamento fitoterápico sujeito a registro com comercialização exclusiva em farmácias (BRASIL, 2014b). A sinefrina é um dos compostos ativos do *Citrus aurantium* frequentemente presente em produtos comercializados para perda de peso. Alguns estudos associaram os efeitos cardiovasculares do consumo de laranja amarga, uma vez que a sinefrina é um agonista α -adrenérgico estruturalmente semelhante à efedrina (HAAZ et al., 2006; HANSEN et al., 2012; MENASHE, 1974; STOHS 2010). De acordo com o Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira, devido às suas propriedades simpatomiméticas do *Citrus aurantium*, a dose diária recomendada, de 1 a 2g de flores que equivale a 1600 mg de extrato seco, deve ser respeitada a fim de evitar efeitos adversos (BRASIL, 2011a).

Desde que o FDA proibiu a presença de alcaloides de efedra em suplementos (USA, 2004), o consumo de *Citrus aurantium* como alternativa para perda de peso aumentou, todavia seus efeitos ainda não foram bem definidos pela literatura (HAAZ et al., 2006;

ROSSATO et al., 2011; STOHS et al., 2011; HANSEN et al., 2012; PAWAR; GRUWEL, 2017). Ademais, a fim de promover a eficácia do produto, adulterações deliberadas dos extratos são cada vez mais evidentes e, conseqüentemente, os efeitos toxicológicos acabam por serem associados aos extratos de laranja amarga (CALAPAI, 1999; CIANCHINO et al., 2008; DILORENZO et al., 2004GRAY; WOLF, 2005). A associação proposital de laranja amarga a cafeína, como na amostra 27 da Tabela 4, pode acarretar em efeitos adversos graves para o consumidor. Estudo demonstra que a combinação de cafeína com extratos de laranja amarga foram responsáveis pelo aumento da pressão arterial sistólica e diastólica e da frequência cardíaca em ratos quando comparados com aqueles tratados apenas com o extrato (HANSEN et al., 2012). No Canadá, por exemplo, não é permitida a adição de cafeína ou fontes de cafeína em produtos contendo sinefrina devido ao sinergismo de ação que pode promover efeitos cardiotoxicos (PAWAR; GRUDEL, 2017).

4.1.2.2 Vitaminas e minerais

Vitaminas e minerais são nutrientes com finalidade de complementar as necessidades da dieta de uma pessoa saudável, mas sem a intenção de substituir algum alimento ou ser considerado uma dieta exclusiva (BRASIL, 1998). Atletas costumam consumir estas substâncias com o propósito de melhorar a performance e o sistema antioxidante do organismo (ASAIKKUTTI, 2016). Nos produtos adquiridos, a presença de pelo menos uma vitamina ou mineral foi observada em 40,9% das amostras (n = 18)

O cromo trivalente, presente em três amostras, é um mineral essencial à nutrição humana, encontrado naturalmente em alimentos e também consumido como suplemento alimentar em diferentes formas: cloridrato de cromo, polinicotinato de cromo, nicotinato de cromo e picolinato de cromo, sendo este último o que apresenta melhor absorção aguda (ASHOU et al., 2016; DISILVESTRO; DY, 2007).

De acordo com os fabricantes e os apelos comerciais descritos nas lojas virtuais, o picolinato de cromo auxilia na perda de peso, promove a lipólise e aumenta os efeitos anabólicos. Inúmeros estudos reportaram a atuação do cromo no metabolismo da glicose e insulina (LIU et al., 2016; LUKASI, 1999; SHINDE et al., 2004). Uma suplementação diária de 600 µg de picolinato de cromo reduziu significativamente a concentração de glicose sanguínea e da hemoglobina A1c em pacientes com Diabetes Mellitus tipo 2; entretanto não foram observados diferenças significativas no perfil lipídico dos pacientes quando comparado ao grupo controle (PAIVA et al., 2015).

Por outro lado, um efeito pronunciado na diminuição do colesterol total e nos níveis de triglicérides foi observado em ratos diabéticos com a administração de nicotinato de cromo do que aqueles tratados com picolinato de cromo (JAIN; RAINS; CROAD, 2007). Sugere-se a hipótese de que o efeito do cromo nos lipídeos possa estar diretamente relacionado com a sua ação no metabolismo da insulina, uma vez que a insulina age no músculo esquelético periférico e no tecido adiposo, e o cromo atua potencializando a estimulação de insulina logo, ele controlaria a adipogênese e a absorção da glicose também (SHINDE et al., 2004). Contudo, evidências de que a suplementação com picolinato de cromo possa promover qualquer outro benefício ou mudanças na composição corporal requerem maiores investigações (LUKASKI et al., 1996; LUKASKI, 1999).

Vitamina C, vitamina E, biotina, ácido fólico, zinco e magnésio são nutrientes muito frequentes nas amostras adquiridas para este trabalho. Suplementos contendo vitamina C estão entre os mais consumidos por atletas, principalmente devido à sua capacidade de diminuir o estresse oxidativo e pelo conhecimento popular de que eles auxiliam o sistema imunológico (BELL et al., 2004; KRUMBACH; ELLIS; DRISKELL, 1999). A suplementação com vitamina C e vitamina E em atletas do sexo feminino foi eficaz na redução do dano muscular pós exercícios aeróbicos (TAGHIYAR et al., 2013). Entretanto, outros estudos relatam que a administração oral de doses elevadas de vitamina C reduz os benefícios do exercício físico uma vez que impedem algumas adaptações celulares ao exercício (ADAMS; EGHO; DEMMING-ADAMS, 2013; GOMEZ-CABRERA et al., 2008).

O consumo de zinco e magnésio aspartato cresceu entre os usuários de suplementos alimentares do sexo masculino. Acredita-se, popularmente, de que essa combinação de minerais é capaz de aumentar a testosterona e, conseqüentemente, promover efeitos anabólicos melhorando o desempenho nos treinos de resistência (WILBORN et al., 2004). Estudos sugerem que o zinco e o magnésio, em pessoas com deficiências destes elementos, sejam capazes de aumentar as concentrações do Fator de Crescimento Semelhante à Insulina (IGF-1, do inglês *Insulin-like Growth Factor*), mas não há evidências em pessoas saudáveis (DEUSTER et al., 2013; HAMZA; HAMED; SOLLAM, 2012). O ZMA® (zinco, magnésio e piridoxina) é uma fórmula patenteada por uma empresa norte-americana, comumente utilizada com a intenção de elevação da testosterona. Contudo, não há comprovação de que a suplementação de ZMA® promova efeitos anabólicos ou que promova efeitos significativos no metabolismo e nos níveis de testosterona (KOEHLER et al., 2009; WILBORN et al., 2004).

Assim como qualquer outra substância, os nutrientes como as vitaminas e minerais também podem ocasionar efeitos adversos ou interações medicamentosas. O excesso de zinco, por exemplo, pode induzir efeitos adversos com anemia sideroblástica e deficiência de cobre; a niacina e o ferro devem ser consumidos com cautela por portadores de doenças hepáticas, hipervitaminose A está relacionada com anorexia, aumento da pressão intracranial e distúrbios menstruais; excesso de vitamina E pode resultar em tromboflebite, embolia pulmonar, hipertensão e ginecomastia (DRISCOL et al., 2010).

4.1.2.3 Construtores musculares

Sem dúvidas, suplementos da proteína do soro do leite, também conhecidos como *whey proteins*, são os mais populares dentro das academias, principalmente devido à sua associação com ganhos de massa magra. O *whey protein* nada mais é do que a proteína do soro do leite, ou seja um sobrenadante obtido da coagulação da caseína, constituindo cerca de 15 a 20% do leite total (PATEL, 2015).

A proteína no corpo humano exerce desde funções arquitetônicas até atuação como combustível para sobrevivência em condições extremas (POORTMANS et al., 2012). Após os exercícios intensos, aminoácidos como proteínas hidrolisadas, devem estar disponíveis para o músculo para otimizar o anabolismo muscular (LATTAVO; KOPPERUD; ROGERS, 2007). De acordo com a Sociedade Internacional de Nutrição Esportiva, é recomendada a ingestão de 0,8 – 1,0 grama/kg/dia de proteína para indivíduos que realizam qualquer atividade física, e a ingestão de 1,0 – 1,2 gramas/kg/dia para aqueles que apresentam um elevado gasto energético a fim de prevenir sarcopenia (KREDIER et al., 2010).

A suplementação de proteínas aliada a exercícios físicos tem sido associada como preventivo de sarcopenia em idosos. Contudo, é necessário uma investigação da dose diária recomendada, uma vez que a função renal diminui com a idade, somado ao fato que elevadas ingestões de proteínas podem afetar a função renal em pessoas saudáveis (NASSEB; VOLPE, 2017; PADOON-JONES et al., 2008; PADOON-JONES; RASMUSSEN, 2009).

As amostras de suplementos de proteína talvez seja um dos poucos que vão de acordo com as evidências científicas quanto ao ganho de massa magra (TIPTON et al., 2004). Contudo, não há relação quanto aos níveis de testosterona ou outros efeitos ergogênicos, como afirmado nas amostras 12 e 19. De acordo com as novas diretrizes, é permitido nos rótulos alegações como “*As proteínas auxiliam na formação dos músculos e ossos*”, ou então atribuições de que o produto é fonte de proteína e/ou contém proteínas de alto valor biológico.

Apenas a amostra 40 estava de acordo com as normativas presentes no Anexo V da IN nº28/2018 (BRASIL, 2018g).

Os aminoácidos de cadeia ramificada (BCAAs, do inglês *Branched Chain AminoAcids*), são outros suplementos que adquiriram seu espaço entre os praticantes de atividades físicas. Os BCAAs são consumidos com o intuito de reduzir tanto a fadiga física quanto mental, melhorar a performance e promover efeitos ergogênicos, como o anabolismo. Os BCAAs são responsáveis pela captação de triptofano e sua conversão em serotonina, o qual é responsável pela fadiga muscular (CHOI et al., 2013; FERNSTROM, 2013), contudo os efeitos benéficos desse tipo de suplemento ainda são divergentes. Em um estudo realizado com jogadores de futebol, o consumo de 7g de BCAA uma hora antes dos testes de corrida, diminuíram as suas respostas a determinadas reações em 10% quando comparado ao placebo (WISNIK et al., 2011). Além disto, um estudo posterior demonstrou que a suplementação com 9g de BCAA antes e após treinos de resistência não demonstrou efeitos na composição corporal e na performance muscular (SPILANEE; EMERSON; WILLOUGHBY, 2012).

Até 2017, os produtos brasileiros contendo BCAA não poderiam possuir indicações para atletas ou como um alimento para atleta, mesmo estando dispensados de registro (BRASIL, 2010a). Neste trabalho, amostras contendo BCAA foram adquiridos com a especificação de alimento para atleta. Por este mesmo motivo, a Anvisa proibiu a comercialização e distribuição do Isofast® no território brasileiro, em 2014 (NEVES; CALDAS, 2015; BRASIL, 2014a). De acordo com as normas atuais, esses aminoácidos podem ser adicionados em suplementos alimentares, desde que seus limites mínimos e máximos sejam respeitados.

4.1.2.4 *Espécies vegetais*

Espécies vegetais estavam presentes como ingredientes majoritários em pelo menos 12 das amostras analisadas (Tabela 5), o que representa 27% dos produtos adquiridos. Após análise, pode-se inferir que adição de plantas nestes suplementos alimentares estava diretamente relacionada a alegações de propriedades para perda de peso, efeitos diuréticos, diminuição do apetite e redução de gordura corporal.

As espécies vegetais mais frequentes na composição das amostras foram fontes naturais de cafeína (n = 16) como o chá mate, guaraná, chá verde, chá branco entre outros, conforme já exposto anteriormente (item 4.1.2.1). No momento da aquisição, a Anvisa não reconhecia a adição de espécies vegetais em alimentos para atletas (BRASIL, 2014b). De

acordo com as novas diretrizes, é possível a adição de algumas espécies vegetais desde que estejam presentes na lista de ingredientes permitidos para suplementos alimentares (BRASIL, 2018g).

O extrato de *Tribulus terrestris* tem sido relacionado à estimulação do hormônio luteinizante (LH) e consequente aumento de testosterona (KREIDER et al., 2010). Estudos também sugerem que, devido à presença da protodioscina, esta espécie vegetal apresente atividade semelhante a um esteroide. Explica-se esta ação porque durante a extração, sob condições apropriadas, a protodioscina pode ser transformada em dehidroepiandrosterona (DHEA), o que auxiliaria na função erétil (MOYAD, 2004). Porém não há evidências de que o *Tribulus terrestris* ou algum composto isolado desta espécie promoveriam mudanças significativas na composição corporal, como ganho de massa magra ou anabolismo (MOYAD et al., 2004; KREIDER et al., 2010), conforme declarado nas amostras contendo este extrato.

A presença de mais de um ingrediente nas amostras é frequente, mesmo sem evidências científicas de eficácia e sem conhecer as interações entre os diferentes componentes (DELDICQUE; FRANCAUX, 2016). Com propósito de aumentar os efeitos, os fabricantes adicionam compostos com características semelhantes a fim de promover o sinergismo, como a adição de quitosana e psyllium em uma mesma formulação. Ambos são laxativos naturais que, quando consumidos juntos, podem provocar desde desconforto abdominal até diarreia grave (DAL MOLIN, 2016).

A adição de substâncias em suplementos alimentares nem sempre é baseada em evidências científicas, mas sim no conhecimento popular. Atribuir um efeito inverídico a um suplemento alimentar caracteriza-se como fraude ao consumidor, considerando que o mesmo espera que o produto apresente a ação declarada. O usuário deveria ter noção que as ferramentas de publicidade possuem a finalidade de induzir o consumidor a compra, muitas vezes sem compromisso com a eficácia, segurança e qualidade do produto.

4.1.3 Marco regulatório dos suplementos alimentares

Grande parte dos produtos analisados (65,9%, n = 29) está em conformidade com a lista de ingredientes permitidos em suplementos alimentares pela IN da Anvisa nº 28/2018 (BRASIL, 2018g). Alguns ingredientes, que não possuíam amparo legal para serem adicionados (por exemplo, a *Paullina cupana*), agora estão autorizados a fazer parte dos constituintes dos suplementos alimentares. A partir da vigência das novas regras, quinze amostras (34,1%) não poderão mais serem comercializadas como suplementos alimentares

por apresentarem ingredientes como *Camellia sinensis*, *Lepidium meyenii*, gengibre, canela em pó, *Trichilia catigua*.

Quanto à rotulagem, 97,7% das amostras não estavam em conformidade em razão do uso de expressões não autorizadas em suplementos alimentares por atribuírem propriedades medicamentosas ou terapêuticas ao produto, como exemplo aumento da libido e ação diurética. Além disso, o uso de imagens fazendo alusão a efeitos farmacológicos, como perda de peso ou melhora no desempenho sexual, também foram observados.

As novas normas regulatórias para os suplementos alimentares brasileiros buscam garantir produtos de qualidade ao consumidor, com menos entraves regulatórios para os fabricantes. Os produtos avaliados no presente estudo precisam passar por diversas mudanças para se adequar às novas diretrizes. Essas modificações incluem desde alterações na composição, até a regularização da rotulagem e das alegações utilizadas para promover o produto.

Observou-se elevada frequência no uso de propagandas com alegações inverídicas sobre determinados ingredientes, com objetivo claro de induzir o consumidor à compra ou promover a falsa imagem de que o produto funciona. Quanto às alegações, de acordo com a nova legislação, das 44 amostras analisadas apenas duas estariam conforme as normas previstas no Anexo V, da Instrução Normativa nº 28, de 26 de julho de 2018 (BRASIL, 2018g).

As normas de propagandas são menos obedecidas por fabricantes e distribuidores em decorrência da dificuldade de fiscalização pela agência reguladora. Muitas vezes, é mais vantajoso aos fabricantes pagar as multas decorrentes ao uso de alegações apelativas, uma vez que estas impulsionam as vendas e a popularização do produto.

O novo sistema regulatório imposto para os suplementos alimentares objetiva reduzir as não conformidades por meio da relação de constituintes autorizados, seus limites mínimos e máximos e alegações permitidas. No entanto, as novas diretrizes ainda não são ferramentas facilitadoras tanto para as indústrias quanto para o consumidor, uma vez que há alguns balizadores. Por exemplo, caberá ao fabricante definir as quantidades adequadas a serem ingeridas nas recomendações diárias de consumo do produto e por grupo populacional em casos em que os limites mínimos e máximos não estiverem estabelecidos (BRASIL, 2018d).

O crescimento no número de suplementos alimentares disponíveis no mercado, bem como o elevado número de pontos de vendas, colabora para a ineficiência na fiscalização desses produtos. Cabe salientar que a facilidade de aquisição via comércio virtual pode fazer o consumidor ter acesso a produtos ilegais ou que contenham substâncias não autorizadas em

suplementos alimentares. O usuário nem sempre está ciente dos danos que essas substâncias podem causar, configurando-se um desafio à saúde pública.

Políticas de educação que mostrem os riscos associados ao consumo desnecessário, alertas que auxiliem a reconhecer a qualidade dos suplementos alimentares e o incentivo à busca de profissional capacitado antes de adquirir um produto dessa natureza são boas estratégias para conscientizar a população e, conseqüentemente, reduzir o comércio ilegal ou em desacordo com a legislação sanitária.

4.2 AVALIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DAS AMOSTRAS DE SUPLEMENTOS ALIMENTARES

O estudo da composição centesimal dos alimentos nos permite avaliar o valor nutricional desses, bem como a proporção dos componentes, como carboidratos, proteínas, lipídeos e fibras por porção. No Brasil, a Anvisa determina que algumas informações como lista de ingredientes, prazo de validade, origem, lote, conteúdo líquido e informação nutricional são itens obrigatórios nos rótulos dos alimentos (BRASIL, 2003b). Atualmente, o tema de rotulagem encontra-se em debate junto com a comunidade, buscando-se uma nova regulamentação que visa garantir a identificação com mais clareza se o produto apresenta ou não uma alta concentração de nutrientes (BRASIL, 2019).

A rotulagem nutricional desses produtos deve seguir as diretrizes dispostas na RDC Anvisa nº 360, de 23 de dezembro de 2003, que aprova o regulamento técnico sobre rotulagem de alimentos embalados (BRASIL, 2018d). Além disso, esses produtos devem apresentar especificações como: (I) a porção declarada na informação nutricional de acordo com as especificações do fabricante para cada faixa populacional indicada; (II) a informação nutricional deve apresentar as quantidades de todos os nutrientes fornecidos pelo produto e (III) o percentual de valor diário (%VD) deve ser declarado para cada um dos grupos populacionais em que o produto é indicado (BRASIL, 2003b; 2018d).

A Tabela 6 apresenta os dados fornecidos no rótulo referentes aos valores nutricionais das amostras de suplementos alimentares. Como pode ser visualizado, 11,36% (n = 5) das amostras não declaravam qualquer informação referente ao valor nutricional do suplemento alimentar. Em alguns casos, o produto até apresentava uma tabela nutricional, mas não continha os teores dos nutrientes exigidos pela legislação, o que representou 29,54% (n = 13) das amostras.

Tabela 6 - Composição nutricional declarada no rótulo das amostras de suplementos alimentares adquiridas no presente estudo.

(continua)

Amostra	Porção	Carboidratos	Proteínas	Fibras	Gorduras totais	Valor energético (kcal)	Vitaminas	Minerais
01	31 g	2 g	25 g	n.i.	0,5 g	110 kcal	n.i.	Sódio 100 mg
02	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
03	4,5g	0 g	0,3 g	3 g	0 g	0	n.i.	Sódio 0 mg
04	31,3 g	5g	23 g	0g	0g	112 kcal	n.i.	Sódio 170 mg
05	1,9 g	< 1g	< 1g	n.i.	n.i.	6 kcal	n.i.	n.i.
06	n.i	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
07	n.i	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	Cromo 200 mcg
08	1 g	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	2 kcal	Vitamina A 150 mg/ Vitamina C 40 mg/ Vitamina E 2,5 mg	Zinco 1,75 mg/ Selênio 8,5 mcg/ Cromo 8,75 mcg
09	36 g	7 g	21 g	0g	4g	150 kcal	n.i.	n.i.
10	38,8 g	5g	25g	0g	3g	145 kcal	n.i.	Sódio 95 mg/ Cálcio 152 mg/ Ferro 0,6 mg/ Magnésio 20 mg/ Fósforo 105 mg

Tabela 6 – Composição nutricional declarada no rótulo das amostras de suplementos alimentares adquiridas no presente estudo

(continuação)

28	3 g	0 g	0 g	0 g	0 g	0 kcal	n.i.	n.i.
29	2,5 g	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	0 kcal	Vitamina C 12 mg	Magnésio 13 mg/ Cálcio 250 mg
30	2,5 g	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	0 kcal	Vitamina C 12 mg	Magnésio 13 mg/ Cálcio 250 mg
31	0,35g	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	Tiamina 1,2 mg/ Biotina 30 mcg/ Vitamina B6 1,3 mg/ Ácido pantotênico 5,0 mg	Zinco 7,0 mg
32	30 g	18 g	8 g	1 g	1,3 g	110 kcal	Vitamina A 264 mcg/ Vitmaina D 0,83 mcg/ Vitamina B1 0,26 mg/ Vitamina B2 0,40 mg/ Pantotena de Cálcio 0,99 mg/ Vitamina B6 0,66 mg/ Bitamina B12 0,50 mcg/ Vitamina C 20 mg/ Vitamina E 5 mg/ Nicotinamida 3,63 mg/ Ácido Fólico 100 mcg	Sódio 200 mg/ Cálcio 330 mg/ Ferro 5,3 mg/ Zinco 2 mg/ Cobre 0,5 mg/ Iodo 49 mcg/ Selênio 18 mcg/ Manganês 0,33 mg/ Fósforo 165 mg/ Potássio 530 mg

Tabela 6 – Composição nutricional declarada no rótulo das amostras de suplementos alimentares adquiridas no presente estudo

(continuação)

33	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
34	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
35	n.i	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	Zinco 3,5 mg/ Selênio 17 mcg
36	n.i	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	Vitamina D3 5 mcg/ Vitamina B3 16 mg/ Vitamina B6 1,3 mg/ Vitamina B12 2,4 mg	Cálcio 272 mg/ Magnésio 260 mg/ Zinco 7 mg/ Boro 9 mg
37	n.i	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	Vitamina B1 1,2 mg/ Vitamina B2 1,3 mg/ Niacina 16 mg/ Vitamina B12 2,4 mcg/ Ácido pantotênico 5 mg/ Vitamina B6 1,3 mg/ Biotina 30 mcg/ Ácido fólico 240 mcg/ Vitamina E 10 mg	Magnésio 130 mg/ Zinco 7 mg
38	2 g	1 g	n.i.	n.i.	n.i.	5 kcal	Vitamina B6 1,3 mg/ Vitamina B5 5 mg/ Vitamina B1 1,2 mg/ Vitamina B2 1,3 mg/ Vitamina E 10 mg/ Vitamina B12 2,4 mcg/ Ácido fólico 240 mcg/ Niacina 16 mg/ Biotina 10 mg	Magnésio 130 mg/ Zinco 7 mg

Tabela 6 – Composição nutricional declarada no rótulo das amostras de suplementos alimentares adquiridas no presente estudo

(conclusão)

39	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	Vitamina D 5 mcg/ Niacina 16 mg/ Vitamina B6 1,3 mg/ Vitamina B12 2,4 mcg	Cálcio 172 mg/ Magnésio 260 mg/ Zinco 7 mg/ Boro 4,6 mg
40	6 g	n.i.	5 g	n.i.	n.i.	22 kcal	n.i.	n.i.
41	26 g	9,2 g	11 g	3,7 g	1,3 g	91 kcal	Vitamina A 198 mcg/ Vitamina C 14 mg/ Vitamina D 0,83 mcg/ Vitamina E 4,3 mg/ Tiamina 0,27 mg/ Riboflavina 0,04 mg/ Niacina 3,7 mg/ Vitamina B6 0,66 mg/ Vitamina B12 0,39 mcg/ Ácido fólico 92 mcg/ Biotina 8,2 mcg/ Ácido pantotênico 1,4 mg	Sódio 90 mg/ Potássio 275 mg/ Ferro 8 mg/ Cálcio 86 mg/ Fósforo 141 mg/ Iodo 47 mcg/ Magnésio 123 mg/ Zinco 2,1 mg/ Selênio 19 mcg/ Cobre 495 mcg/ Manganês 0,33 mg
42	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	Ácido fólico 240 mcg/ Niacina 16 mg/ Piridoxina 1,3 mg/ Cianocobalamina 2,4 mcg/ Vitamina D 5 mcg/ Vitamina E 10 mg	Boro 10 mg/ Magnésio 260 mg/ Zinco 7 mg
43	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
44	5 g	n.i.	3 g	n.i.	n.i.	12 kcal	Vitamina B6 1,3 mg/ Vitamina D3 5 mcg	Magnésio 260 mg/ Zinco 7 mg/ Cálcio 1000 mg/ Boro 10 mg

n.i. – Não informado.

n.d. – Não declarado

Fonte: Do autor.

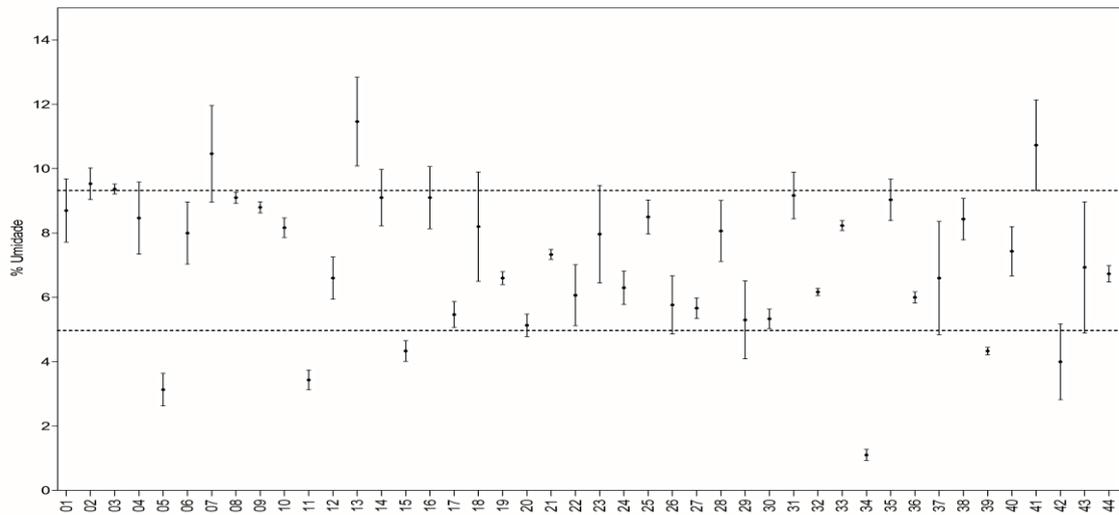
Por serem adquiridos antes do marco regulatório, a escassez de uma legislação específica que determinasse como esses produtos deveriam ser rotulados, ficou evidente na ausência de informações disponibilizadas pelo fabricante. Mesmo assim, os teores de umidade, cinzas, proteínas, lipídeos, carboidratos de cada amostra foram avaliados. Entretanto em alguns casos não é possível realizar uma comparação eficaz entre o que continha declarado no rótulo do produto e os reais teores encontrados, devido à ausência de dados fornecidos pelo fabricante.

4.2.1 Determinação dos teores de umidade das amostras

Apesar de não ser um item obrigatório na rotulagem dos alimentos, o teor de umidade nos suplementos alimentares permite avaliar a estabilidade, segurança e qualidade do produto, juntamente com a avaliação da atividade de água do produto (SILVA; SOUZA, 2016). A quantidade água presente nos alimentos está diretamente relacionada com a velocidade de decomposição, ou seja, quanto mais água presente menor a estabilidade do alimento. Isto se deve à capacidade da água, junto com os macro e micronutrientes dos alimentos, em formar soluções que servirão de substrato para o desenvolvimento de microorganismos (EMBRAPA, 2010).

O teor de umidade das amostras de suplementos alimentares analisadas variou de 1,1% (34) a 11,5% (13), com uma média de 7,15%. Todas as amostras apresentaram diferença significativa entre si ($p < 0,05$). A Figura 9 representa a média das triplicatas de cada amostra e os desvios padrões para o teor de umidade das amostras analisadas.

Figura 9 - Teor de umidade das amostras de suplementos alimentares e o desvio padrão considerando os resultados totais da população.



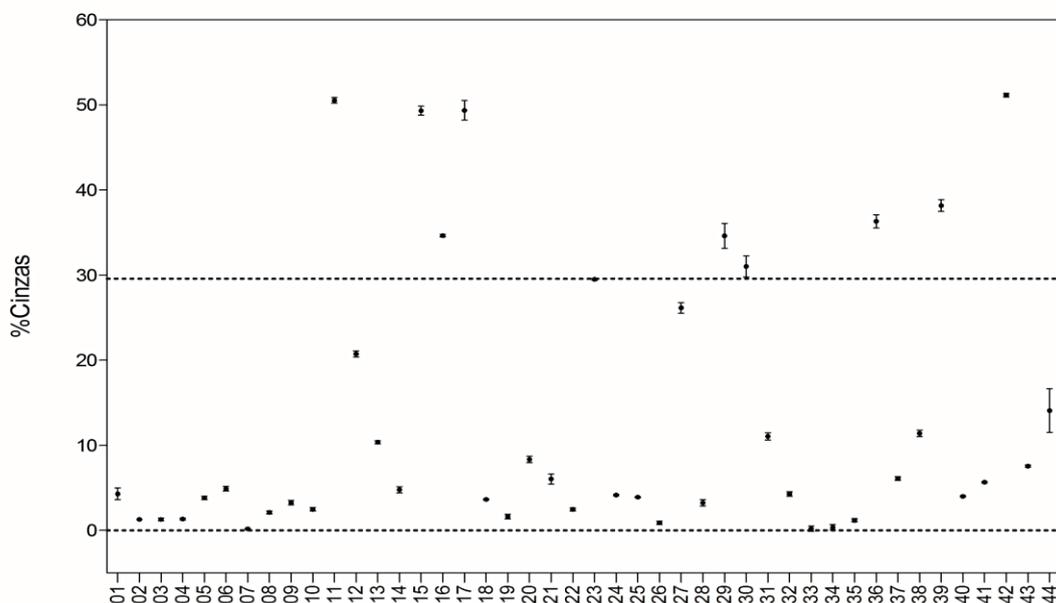
Fonte: Do autor.

4.2.2 Determinação dos teores de cinzas das amostras

Das amostras adquiridas, 23% (n = 10) eram produtos contendo vitaminas e/ou minerais. Nos ingredientes declarados, 65,9% (n = 29) continham pelo menos um mineral na sua composição. O teor de cinzas está relacionado à determinação do resíduo mineral fixo (SILVA; SOUZA, 2016), mas por ser obtido por ignição nem sempre essa metodologia representa toda a substância inorgânica na amostra, uma vez que alguns sais podem sofrer redução ou volatilização no aquecimento (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008).

Nas amostras de suplementos alimentares analisadas, a média do teor de cinzas foi de 13,45%. Amostras que não continham minerais na sua composição (por exemplo as amostras 33 e 34) os valores foram próximos a zero. Em trabalhos relatados na literatura a média global do teor de cinzas foi de 2,98 a 3,58% (OLIVEIRA et al., 2015; SILVA; SOUZA, 2016). Essa discrepância nos valores não se deve apenas ao número de amostras analisadas, mas também o tipo de suplementos estudados que eram apenas alimentos para atletas fonte de proteínas. Conforme a Tabela 7, a amostra 07 declarava a presença de 200 mcg de cromo e na análise do teor de cinzas, para a amostra 07 obteve-se um teor de $0,18 \pm 0,25\%$. Considerando o peso médio, e supondo que o teor de cinzas se referiria à concentração total de cromo neste caso, a amostra 07 possuiria 9 mcg de cromo, ou seja 22 vezes abaixo do declarado, enquanto que a amostra 13 conteria 51,88 mcg, o que vai de acordo com as informações do fabricante. A Figura 10 representa a distribuição dos teores de cinzas das amostras analisadas.

Figura 10 - Distribuição dos teores de cinzas das 44 amostras de suplementos alimentares analisadas.



Fonte: Do autor.

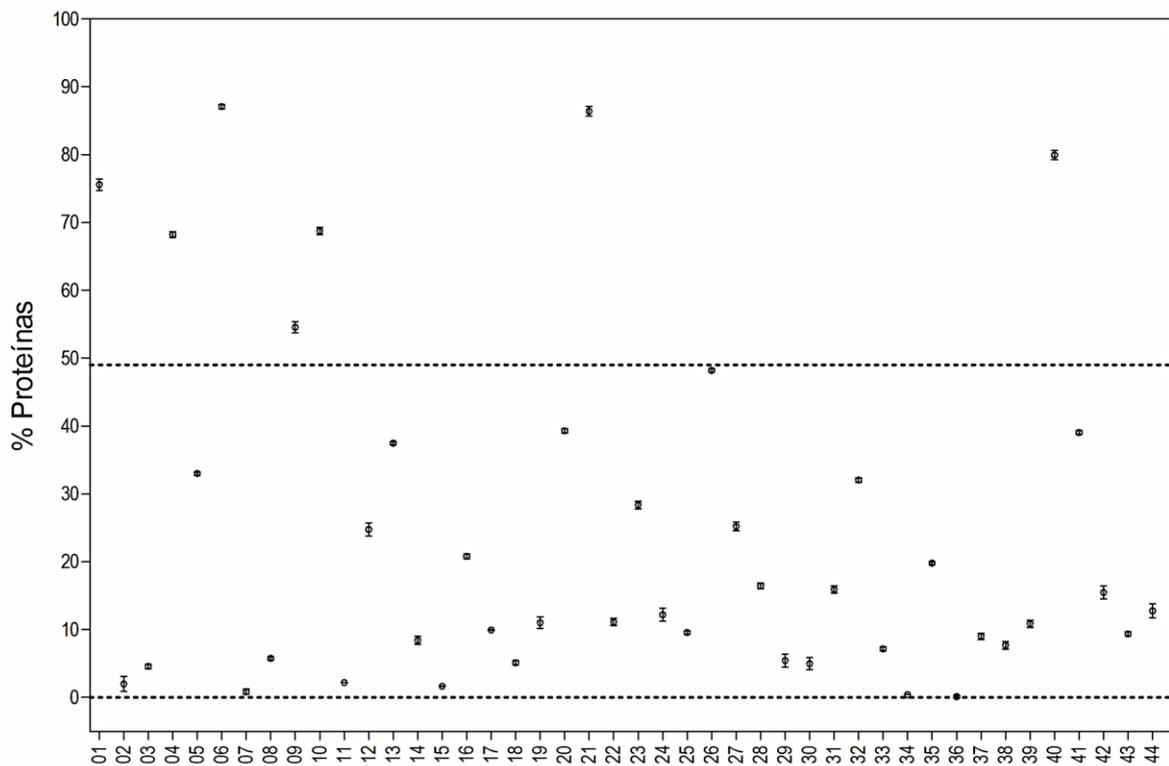
4.2.3 Determinação dos teores de proteínas das amostras

Muitos produtos comercializados como suplemento proteico para atletas apresentam alegações referente à concentração e a qualidade das proteínas presentes na composição. Os fabricantes também alegam que os produtos apresentam alto teor de aminoácidos essenciais e baixas concentrações de carboidratos e lipídeos, referindo síntese proteica com baixo valor calórico. Em 2014, ocorreram denúncias de que alguns alimentos proteicos para atletas estariam sendo comercializados com quantidades de proteínas muito abaixo do declarado. Nesta ocasião, o Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO) investigou 15 marcas nacionais e importadas de produtos disponíveis no mercado (INMETRO, 2014). Das marcas investigadas, duas apresentavam valores de proteínas 20% abaixo do declarado, em desacordo com a Resolução nº 360/2003 da Anvisa (BRASIL, 2003; INMETRO, 2014).

O teor de proteína foi calculado através do método de Kjeldahl, o qual determina o valor de nitrogênio total presente no produto, método este considerado referência pela AOAC. Entretanto, por se tratarem de produtos multiingredientes, é possível que ocorram interferências devido à presença de compostos nitrogenados da própria matriz, superestimando os valores encontrados. Referente as amostras estudadas, a média global do

teor de suplementos alimentares foi de 24,29% e a distribuição dos teores para cada amostra pode ser visualizado na Figura 11. Apenas 36,36% (n = 16) das amostras apresentaram o valor de proteína declarado por porção, tornando possível o estudo comparativo entre as informações presentes no rótulo e os valores encontrados.

Figura 11 - Distribuição dos teores de proteínas das amostras de suplementos alimentares adquiridas em lojas virtuais.

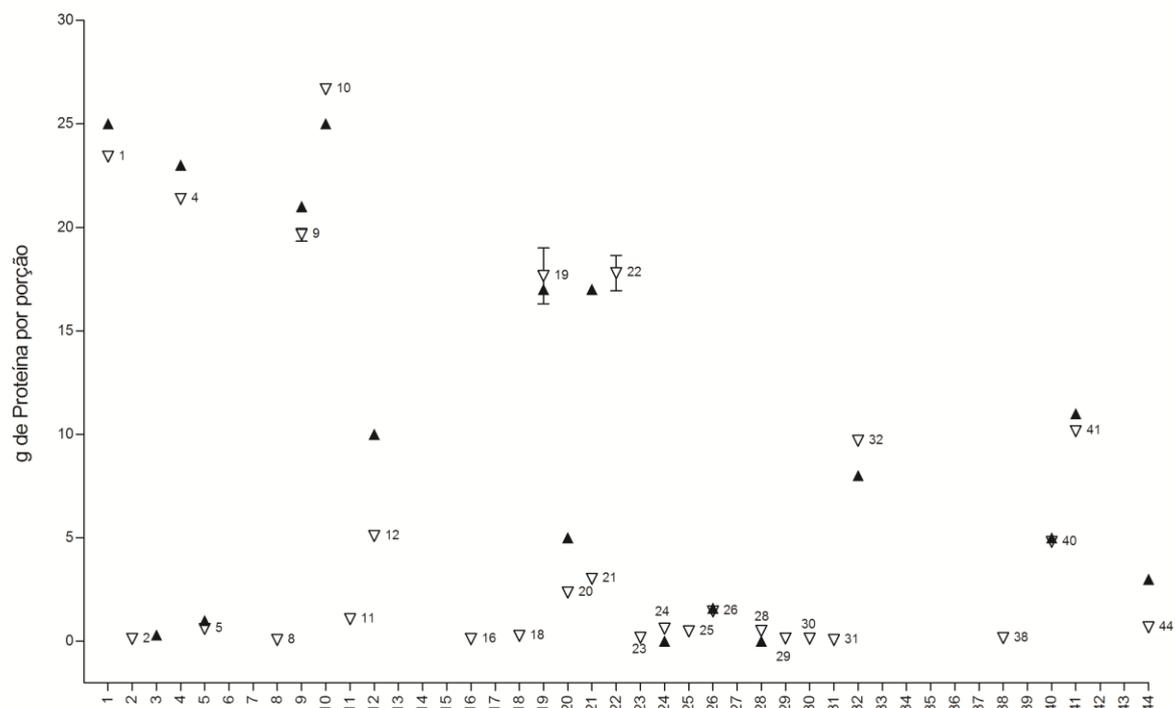


Fonte: Do autor.

O teor proteico variou de 0,85 % a 87,10 %. De acordo com o Inmetro (2014), um produto *whey protein* concentrado pode fornecer de 29% a 89% de proteína, enquanto que um produto *whey protein* isolado deve conter no mínimo 90% de proteínas em sua composição. Por sua vez, o *whey protein* hidrolisado exige que os componentes sejam colocados em maior quantidade, podendo conter até mesmo carboidratos como ingrediente majoritário. De acordo com as normas do Inmetro, o teor proteico determinado nas amostras analisadas indica que nenhum poderia ser considerado um produto *whey protein* isolado. A amostra 01 foi adquirida com alegação de ser um produto *whey protein* isolado, mas a quantidade de proteína encontrada foi de $75,59 \pm 0,84$ gramas por cento. Este valor representa 14,4% a menos do que deveria conter para ser considerado um suplemento de proteína do soro do leite isolada.

Os teores de proteínas determinados e os valores descritos nos rótulos das amostras de suplementos alimentares são comparados na Figura 12. Os produtos que não informaram nas tabelas nutricionais a quantidade de proteína no produto, não permitiram este comparativo.

Figura 12 - Comparativo entre a quantidade de proteínas em gramas encontrada por porção do produto (∇) e a quantidade de proteínas em gramas por porção declaradas no rótulo pelo fabricante (\blacktriangle).



Fonte: Do autor.

Na Figura 12, quanto mais próximo os símbolos estão, maior é a semelhança entre o valor encontrado e o valor declarado no rótulo. Em 16 amostras, foi realizado o comparativo entre os teores de proteínas determinados e os teores declarados na tabela nutricional, o qual é mostrado na Tabela 7. A Resolução da Anvisa nº 360/2003 permite uma tolerância de $\pm 20\%$ aos valores de nutrientes declarados o rótulo (BRASIL, 2003). Com base nesta norma, as amostras foram classificadas como “Conformes” e “Não-conformes”. De um total de 16 amostras comparadas, 25% encontravam-se não conformes, apresentando valores de proteínas até 78,68% abaixo do teor rotulado. Tal situação é caracterizada como infração sanitária que se constitui desde multas até a suspensão de venda e fabricação do produto (BRASIL, 1977).

Tabela 7 - Comparativo entre os teores de proteínas declarado pelo fabricante e os teores determinados após a análise de nitrogênio pelo método Kjeldahl. Foram consideradas conformes, as amostras apresentando diferença de máximo $\pm 20\%$, entre o teor encontrado e o rotulado.

Amostra	Teor de proteínas (%) ou g de proteínas por 100 g de amostra	Teor de proteínas expresso no rótulo		Diferença do teor de proteínas expresso no rótulo e o valor medido (%)	Resultados
		Em gramas de produto por (porção)	Teor de proteínas (%) ou g de proteínas por 100 g de produto		
1	75,59	25 (31)	80,64	- 6,26	Conforme
4	68,23	23 (31,3)	73,48	- 7,14	Conforme
5	33,00	<1 (1,9)	52,63	- 37,29	Não conforme
9	54,57	21 (36)	58,33	- 6,44	Conforme
10	68,74	25 (38,8)	64,43	+ 6,68	Conforme
12	24,77	10 (20)	50	- 50,46	Não conforme
19	11,03	17 (160)	10,62	+ 3,86	Conforme
20	39,31	5 (6)	83,33	- 52,83	Não conforme
22	11,12	17 (160)	10,62	+ 4,71	Conforme
24	12,19	0 (5)	0	n.a.	n.a.
26	48,21	1,6 (3)	53,33	- 9,6	Conforme
28	16,43	0 (3)	0	n.a.	n.a.
32	32,06	8 (30)	26,67	+ 20,20	Conforme*
40	79,93	5 (6)	83,33	- 4,08	Conforme
41	39,06	11 (26)	42,30	- 7,66	Conforme
44	12,79	3 (5)	60,00	- 78,68	Não conforme

* Considerando o desvio padrão entre as triplicatas da amostra, a mesma pode ser considerada como conforme.

n.a. – Não se aplica uma vez que o valor da diferença dos teores não é divisível por zero.

Fonte: Do autor.

4.2.4 Determinação dos teores de lipídeos das amostras

Os lipídeos são compostos orgânicos altamente energéticos, contêm ácidos graxos essenciais ao organismo e atuam como transportadores de vitaminas lipossolúveis. A determinação dos teores de lipídeos nas amostras foi realizada através da extração com éter pelo Soxhlet, seguida da evaporação do solvente. A massa de resíduo obtido equivale não somente aos teores de lipídeos, mas também de ésteres de ácidos graxos, carotenoides, vitaminas lipossolúveis, esteróis e outros ácidos graxos (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008). Devido as características da matriz analisada, esses são considerados componentes majoritários, o que pode influenciar no teor de lipídeos das amostras.

Devido às carências laboratoriais, a análise do teor de lipídeos foi realizada naquelas amostras que continham alguma substância declarada no rótulo que pudesse ser extraída pelo método, ou que apresentavam valores de gorduras totais nas informações nutricionais, o que correspondeu a 10 amostras (22,72%). Os resultados dos teores determinados, bem como aqueles que estavam presentes nos rótulos, estão disponíveis na Tabela 8.

Tabela 8 - Comparativo dos teores de lipídeos declarados no rótulo que os teores obtidos pela extração com éter conforme preconizado pelo Instituto Adolfo Lutz (2008).

Amostra	Ingredientes	Teor de lipídeos declarado no rótulo		(continua)
		Em gramas de produto por (porção)	Teor de lipídeos por 100 g de produto	Teor de lipídeos determinados por 100 g de produto
1	Proteína do soro do leite isolada e hidrolisada	0,5 (31 g)	1,61	3,07
3	Psyllium, abacaxi, acerola, açaí, amora, ameixa, banana, laranja, maçã, mamão, morango, maracujá, tamarindo, uva, berinjela, beterraba, brócolis, cenoura, espinafre, tomate, guaraná, cogumelo <i>Agaricus blazei</i> , gérmen de soja, aveia, trigo, linhaça, gergelim, cacau, alho	0 (4,5 g)	0	2,28
9	Proteína do leite concentrada, proteína de soro do leite isolada, albumina, leite desnatado, triglicerídeos de cadeia média, cloreto de sódio, caseinato de sódio, óleo de girassol, óleo de canola, caseína, cacau em pó com álcalis	4 (36 g)	11,11	3,62
10	Mistura de proteínas do soro do leite, glicina, creme de leite vegetal, cacau em pó	3 (38,8 g)	7,73	4,55
12	Proteína do soro do leite, fígado bovino, maltodextrina, carbonato de cálcio, óleo de linhaça, citrato de colina, óleo de palma, óxido de magnésio, ácido fólico, vitamina C, vitamina B3, vitamina E, óxido de zinco, sulfato de manganês, biotina, picolinato de cromo	0 (20 g)	0	5,20

Tabela 8 - Comparativo dos teores de lipídeos declarados no rótulo que os teores obtidos pela extração com éter conforme preconizado pelo Instituto Adolfo Lutz (2008).

		(conclusão)		
19	Maltodextrina, proteína concentrada do soro do leite, colágeno hidrolisado, albumina [clara de ovo desidratada], cacau em pó	0,9 (160 g)	0,56	3,84
22	Maltodextrina, leite em pó desnatado, dextrose, proteína concentrada do soro de leite, albumina desidratada	0,8 (160 g)	0,50	7,79
29	Semente de uva em pó (alimento tratado por processo de irradiação), cálcio de ostra, amido modificado, carbonato de magnésio, ácido ascórbico (Vitamina C)	n.i. (2,5 g)	-	12,82
32	Fosfato monocálcio, carbonato de cálcio, pirofosfato férrico, cloreto de sódio, fosfato de magnésio, sulfato de zinco, sulfato de cobre, sulfato de manganês, selenito de sódio, iodeto de potássio, sulfato de potássio, acetato de retinol, colecalciferol, acetato de tocoferol, tiamina, riboflavina, ácido ascórbico, nicotinamida, piridoxina, ácido fólico, cianocobalamina, biotina, pantotenato de cálcio, extrato de soja, lecitina de soja	1,3 (30 g)	4,33	24,40
41	Proteína isolada de soja, frutose, fibra de aveia, inulina, cacau em pó, óleo vegetal de canola, cloreto de potássio, café em pó, triglicérides de cadeia média, caseinato de cálcio, proteína concentrada do soro de leite, mix de vitaminas e minerais (maltodextrina, ortofosfato férrico, vitamina C, sulfato de zinco, vitamina E, niacinamida, gluconato de cobre, D-pantotenato de cálcio, sulfato de manganês, vitamina B6, tiamina, vitamina A, ácido fólico, iodeto de potássio, selenito de sódio, biotina, vitamina D e vitamina B12), fosfato de cálcio dibásico, óxido de magnésio, canela em pó, gengibre.	1,3 (26 g)	5	20,37

n.i. - Não informado no rótulo.

Fonte: Do autor

A média dos teores de lipídeos nas amostras foi de 8,79%, sendo que o menor teor foi observado na amostra 3, que apresentou um teor de 2,28%. Por outro lado, os maiores teores foram observados nas amostras 40 e 41, provavelmente pelo fato de conterem maiores concentrações de vitaminas lipossolúveis. Em estudos anteriores, realizados com suplementos proteicos comercializados no Brasil, a média dos teores de gorduras foi significativamente menor do que aquela determinada aqui, com média dos teores de 5,42% (OLIVEIRA et al., 2015; SILVA; SOUZA, 2016). Essa diferença de valores provavelmente se deve a dois fatores: I) a matriz das amostras nos estudos anteriores era basicamente constituída de proteínas, o que representa um produto com baixo teor lipídico. II) as metodologias utilizadas para a análise de gorduras nas amostras diferem entre si. Devido as características dos lipídeos encontrados nas amostras, e ao elevado teor de compostos bioativos declarados, uma análise mais específica seria necessária para poder estabelecer o teor real encontrado em cada produto. A Tabela 9 representa a diferença do teor de lipídeos encontrado nas amostras analisadas e declarado no rótulo.

Tabela 9 - Comparativo entre os teores de lipídeos declarados pelo fabricante e os teores determinados após a análise de extração em Soxhlet com éter. Foram consideradas conforme aquelas que apresentaram a diferença entre o teor encontrado e o rotulado $\pm 20\%$.

Amostra	Teor de lipídeos declarado no rótulo	Teor de lipídeos determinados por 100 g de produto	Diferença do teor de lipídeos expresso no rótulo e o valor medido (%)	Resultados
1	1,61	3,07	+ 47,56	Não conforme
3	0	2,28	n.a.	-
9	11,11	3,62	-206,90	Não conforme
10	7,73	4,55	-69,89	Não conforme
12	0	5,20	n.a.	-
19	0,56	3,84	+ 85,41	Não conforme
22	0,50	7,79	+ 93,58	Não conforme
29	-	12,82	n.a.	-
32	4,33	24,40	+ 82,25	Não conforme
41	5	20,37	+ 75,45	Não conforme

n.a. – Não se aplica uma vez que o valor da diferença dos teores não é divisível por zero.
Fonte: Do autor.

Frequentemente, os suplementos alimentares apresentam alegações como “*produto baixo em calorias*”. Todavia, nas amostras analisadas, foram encontrados teores de lipídeos totais até 93,58% acima do declarado no rótulo. Cada grama de gordura fornece 9 kcal, assim elevados teores de lipídeos nas amostras estão diretamente relacionados com maior valor calórico do produto.

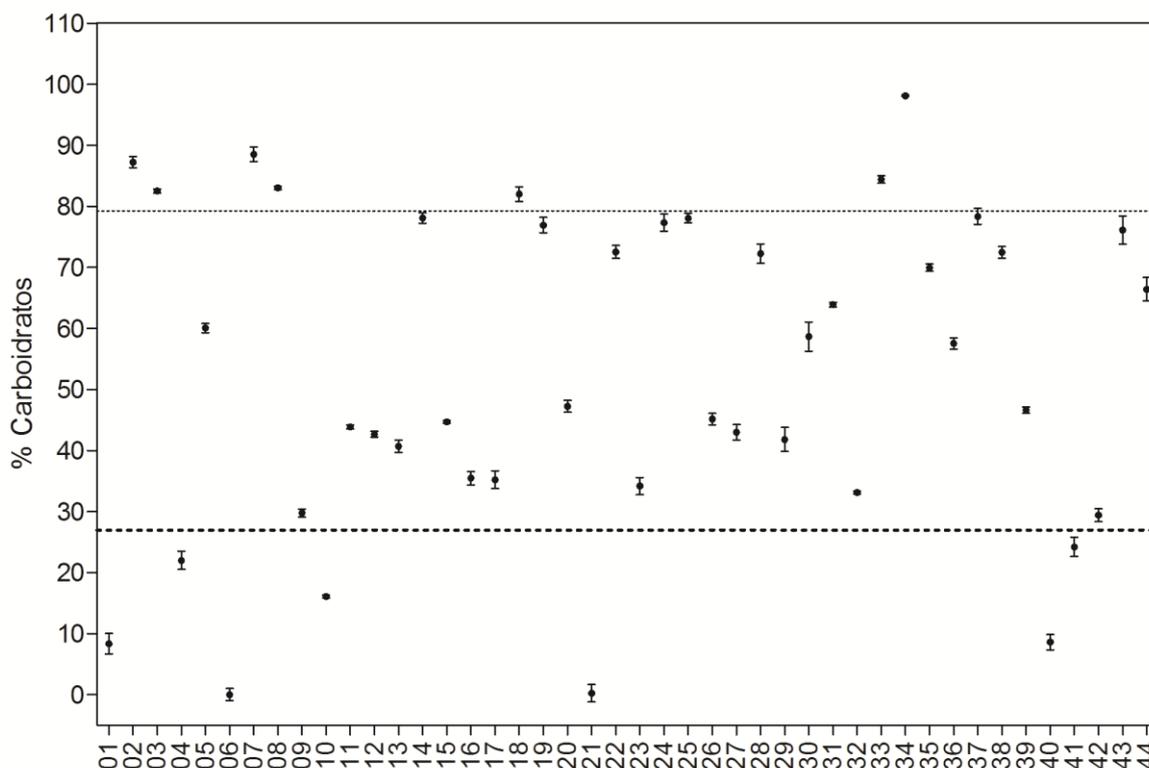
4.2.5 Determinação dos teores de carboidratos das amostras

Alguns suplementos alimentares possuem carboidratos como ingrediente principal da sua composição, como a maltodextrina, uma vez que eles são comercializados como produto fonte de energia. Por outro lado, altas concentrações desse nutriente são indesejadas naqueles produtos de alto teor proteico, consumidos com o intuito de construção muscular mas com baixo valor energético.

No estudo realizado pelo Inmetro em 2014, 11 das 15 marcas de suplementos alimentares analisadas (73,3%) estavam não conformes quanto ao teor de carboidrato. A diferença entre os teores determinados e os teores declarados nos rótulos variaram de 50,6% daquele declarado, até 300,5% acima daquele teor informado pelo fabricante (INMETRO, 2014).

Nas amostras analisadas, a média dos teores de carboidratos foi de 53,10%, sendo que a maior distribuição encontrava-se na faixa de 26,94% a 79,27%, como pode ser visualizado na Figura 13.

Figura 13 - Distribuição dos teores de carboidratos das amostras de suplementos alimentares adquiridas em lojas virtuais.



Fonte: Do autor.

No estudo realizado por Silva e Souza (2016), um terço das amostras analisadas ($n = 10$) extrapolaram os teores de carboidratos declarados no rótulo. Nas amostras de suplementos alimentares selecionadas para a comparação com o rótulo ($n = 16$), 62,5% estavam não conformes, com teores que extrapolaram até 326,70% daquele descrito nas informações nutricionais. O comparativo entre os teores de carboidratos rotulados e os valores encontrados é apresentado na Tabela 10.

Tabela 10 - Comparativo entre os teores de carboidratos declarados pelo fabricante e os teores determinados após o cálculo da diferença entre 100 g de amostra e o somatório das porcentagens de umidade, cinzas, lipídeos totais e proteínas.

Amostra	Teor de carboidratos (%) ou g de carboidratos por 100 g de amostra	Teor de carboidratos expresso no rótulo		Diferença do teor de carboidratos expresso no rótulo e o valor medido (%)	Resultados
		Em gramas de produto por (porção)	Teor de carboidratos (%) ou g de carboidratos por 100 g de produto		
1	8,35	2 (31)	6,45	+ 29,46	Não conforme
4	21,98	5 (31,3)	15,97	+ 37,63	Não conforme
5	60,06	<1 (1,9)	52,63	+ 14,19	Conforme
9	29,74	7 (36)	19,44	+ 252,98	Não conforme
10	16,09	5 (38,8)	12,89	+ 224,82	Não conforme
12	42,67	2 (20)	10,00	+ 326,70	Não conforme
19	76,91	132 (160)	82,50	- 6,77	Conforme
20	47,24	0,67 (6)	11,16	+ 323,29	Não conforme
22	72,51	132 (160)	82,50	- 12,10	Conforme
24	77,32	0 (5)	n.a.	n.a.	-
25	78,04	2,7 (5)	54,00	+ 44,52	Não conforme
26	45,14	0 (3)	n.a.	n.a.	-
28	72,24	0 (3)	n.a.	n.a.	-
32	33,10	18 (30)	60,00	- 44,83	Não conforme
38	72,47	1 (2)	50,00	+ 44,94	Não conforme
41	24,20	9,2 (26)	35,38	- 31,63	Não conforme

n.a. – Não se aplica uma vez que o valor da diferença dos teores não é divisível por zero.

Fonte: Do autor.

Oliveira e colaboradores (2015) realizaram a análise de carboidratos pelo mesmo método deste estudo, sendo que das cinco amostras avaliadas por eles apenas uma estava de acordo com os teores declarados no rótulo. De acordo com o Inmetro (2014), teores de

carboidratos muito elevados podem comprometer a programação nutricional do usuário, podendo acarretar resultados indesejados. Contudo, o método aplicado para a determinação de carboidratos não elimina os teores de fibras presentes nos produtos, sendo necessário uma análise mais específica para avaliação de açúcares redutores e não redutores.

Durante a amostragem, os suplementos alimentares adquiridos se enquadravam como “Alimento proteico para atletas” de acordo com a RDC da Anvisa nº 18/2010. Desta forma, deveriam conter no mínimo 10g de proteínas por porção e 50% do valor energético total deveria ser proveniente de proteínas (BRASIL, 2010a). As amostras 1, 4, 9 e 10 encontravam-se conforme e as amostras 12 e 40 continham valores de proteína abaixo do preconizado na norma. A nova legislação permite a alegação de que o produto é fonte de proteína se o mesmo apresentar no mínimo 7,8 g de proteína por porção (BRASIL, 2018d). Dessa forma, a amostra 40 continuaria não conforme devido as alegações atribuídas ao produto, conforme apresentado na Tabela 4.

Quanto aos valores de carboidratos, o Anexo III da IN da Anvisa nº 28/2018 estabelece o limite mínimo de 19,5 g de carboidratos por porção, em produtos fonte de energia (BRASIL, 2018g). As amostras 24, 25, 28, 32 e 41 não possuem a quantidade mínima de carboidratos determinada por porção, conforme mostrado na Tabela 4.

Por não apresentarem as informações nutricionais obrigatórias nos rótulos, não foi possível realizar um comparativo de todos os suplementos alimentares adquiridos. Das 20 amostras em que foi possível comparar os teores de pelo menos um dos nutrientes, 70% (n=14) apresentavam valores que extrapolaram a tolerância de $\pm 20\%$ preconizada pela RDC da Anvisa nº 360/2003, caracterizando infração sanitária (BRASIL, 2003).

Os resultados apresentados neste capítulo, estão disponíveis no manuscrito submetido à Revista Instituto Adolfo Lutz, intitulado “Composição centesimal de produtos comercializados como suplementos alimentares em lojas virtuais brasileiras”, conforme apresentado no Apêndice B.

4.3 DESENVOLVIMENTO DE UM MÉTODO POR HPLC-DAD PARA A DETERMINAÇÃO DE ADULTERANTES NAS AMOSTRAS DE SUPLEMENTOS ALIMENTARES

Os resultados aqui apresentados são uma reprodução parcial do manuscrito submetido à *Food Chemistry* em novembro de 2019, conforme disposto no Apêndice C. Parte dos resultados descritos a seguir foram apresentados na modalidade de apresentação oral no I

Congresso e Exposição de Nutrição e Farmácia, na cidade do Rio de Janeiro em 2018. A apresentação recebeu destaque como melhor trabalho científico do evento (Apêndice D). Os resultados obtidos através da validação do método e a relação custo-benefício do mesmo, foi apresentado no IV Encontro de Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da UFSM, recebendo distinção como melhor pôster na Área I (Certificado apresentado no Apêndice E).

4.3.1 Estudo das condições cromatográficas e desenvolvimento do método

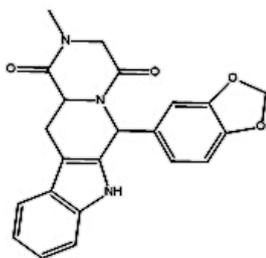
O desenvolvimento de um método analítico é uma etapa que exige um estudo prévio dos analitos de interesse, a fim de avaliar as condições experimentais necessárias. A detecção espectrofotométrica por arranjo de diodos (DAD) foi escolhida, principalmente devido a vantagem de baixo custo quando comparado a detectores como o espectrômetro de massas o qual, ainda que apresente vantagens indiscutíveis, apresenta um alto valor de manutenção e nem sempre está disponível em laboratórios de controle de qualidade. Além disso, a detecção por DAD possui como vantagem a determinação da pureza do pico, o que aumenta a especificidade da determinação.

Como pode ser visualizado na Figura 14, as moléculas dos compostos de interesse apresentam grupamentos cromóforos, o que possibilitou o uso da detecção por arranjo de diodos de forma direta, sem necessitar de etapas subjacentes, como o uso de agentes derivatizantes.

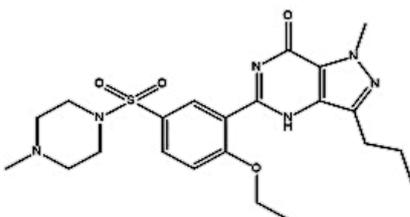
Figura 14 - Estrutura molecular dos analitos de interesse para o desenvolvimento do método.

Estimulantes Sexuais

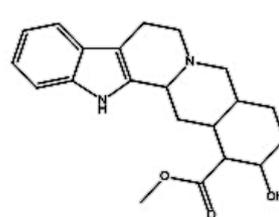
Tadalafil



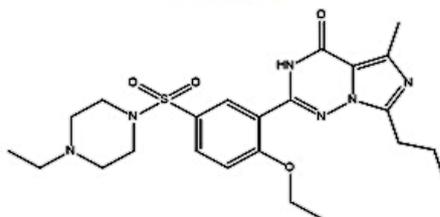
Sildenafil



Ioimbina

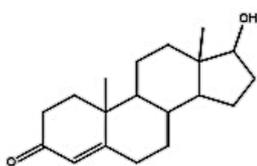


Vardenafil

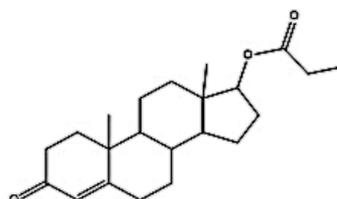


Anabolizantes

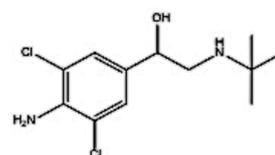
Testosterona



Propionato de Testosterona

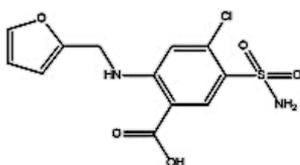


Clembeturool

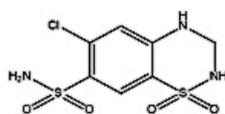


Diuréticos

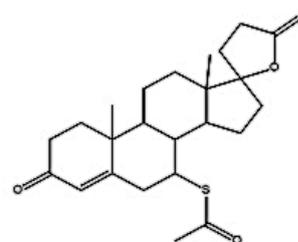
Furosemida



Hidroclorotiazida



Espirinolactona

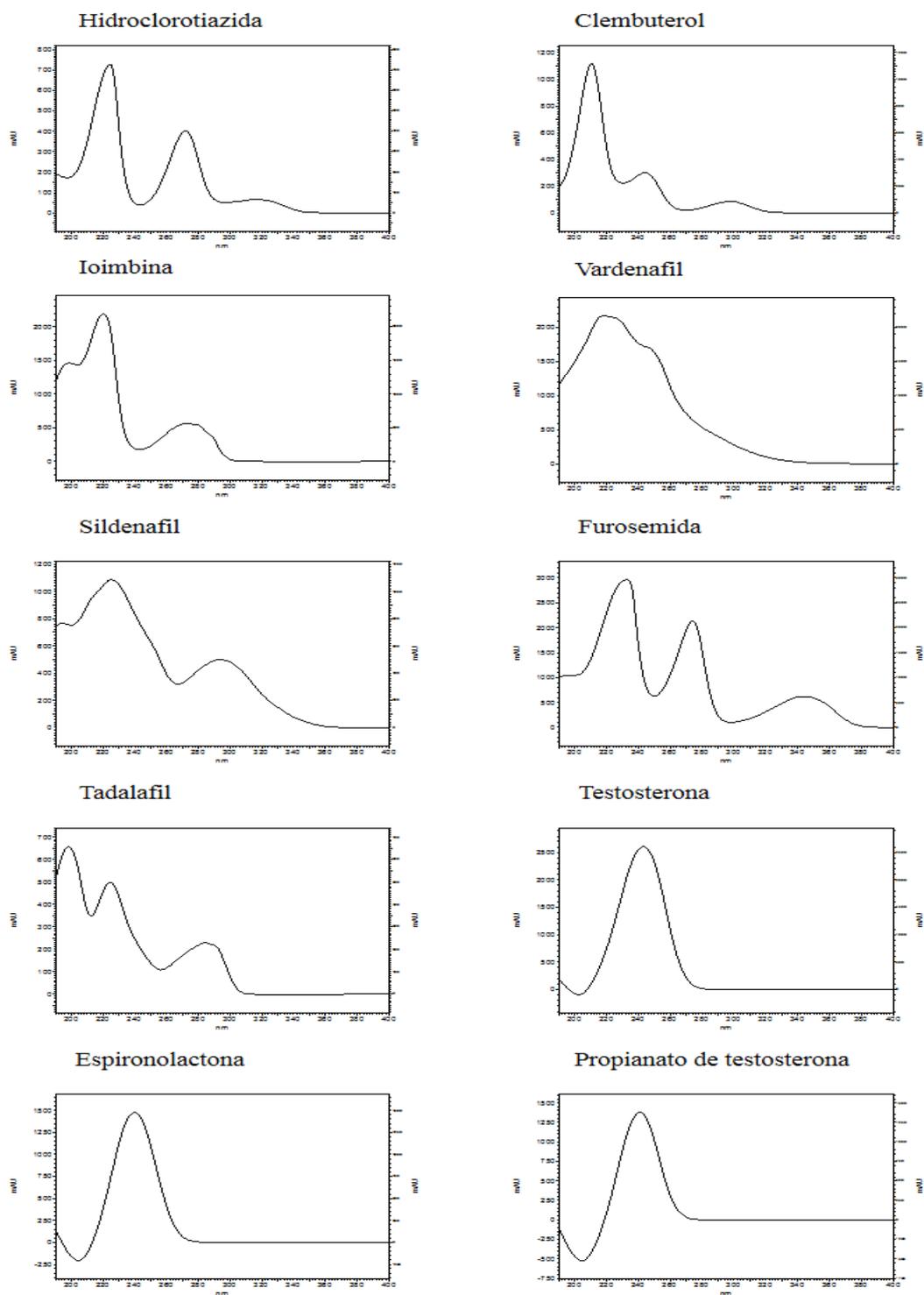


Fonte: Do autor.

Na determinação do comprimento de onda adequado para cada analito, foi realizada varredura do espectro de absorção entre 200 a 400 nm, resultando na seleção dos comprimentos 254 e 263 nm. O clenbuterol apresentou um máximo de absorção em 254 nm, enquanto os outros nove adulterantes apresentaram maior absorvância em 263 nm (Figura 15).

Inicialmente, o estudo foi proposto para a investigação de duas classes farmacológicas: I) estimulantes sexuais (ioimbina, vardenafil, sildenafil e tadalafil); II) anabolizantes (clenbuterol, testosterona e propionato de testosterona). Contudo, na fase de estudos dos interferentes do método, foi possível a inserção de uma terceira classe, os diuréticos (hidroclorotiazida, espironolactona e furosemida) sem afetar a distribuição na corrida cromatográfica dos analitos previamente estudados. O interesse por tais adulterantes se deu a partir dos apelos comerciais declarados pelos fabricantes, ou seja, frases ou publicidades que poderiam induzir a presença de tais fármacos nos suplementos alimentares. Além disso, a presença de diuréticos em suplementos alimentares vem sendo amplamente reportada na literatura (ROCHA; AMARAL; OLIVEIRA, 2016; BROWN, 2017a).

Figura 15 - Espectros absorção ultravioleta dos analitos de interesse para o presente estudo.

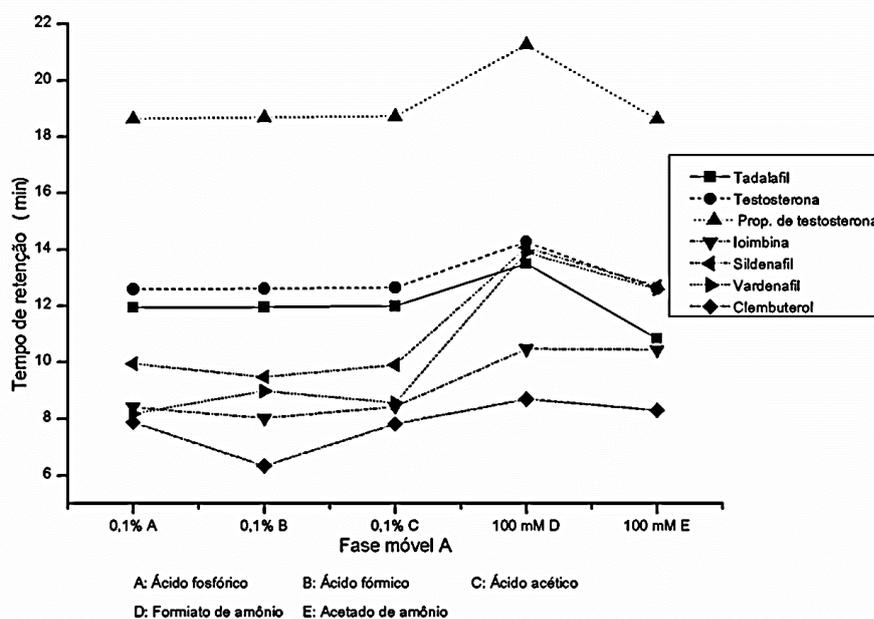


Fonte: Do autor.

A otimização do método é uma etapa que exige o conhecimento da polaridade dos analitos a serem estudados, considerando também a complexidade da matriz em que serão analisados. Devido a polaridade variável para cada composto, a fase reversa foi a ferramenta de escolha, mais especificamente constituída de octadecil ou C18, com diâmetro de partícula relativamente pequeno (2,7 μm). Além da interação dos analitos com os sítios de forma específica, fases estacionárias com diâmetros pequenos permitem corridas cromatográficas mais rápidas e baixa detectabilidade (ORTIZ; ANTUNES; LINDEN, 2010).

Para a otimização da fase móvel foi aplicado um sistema de gradiente constituído de duas fases, uma aquosa e outra orgânica. Para o estudo da fase aquosa, foram investigados a eluição dos anabolizantes e estimulantes sexuais em ácido fosfórico 0,1% (v/v), ácido acético 0,1% (v/v), ácido fórmico 0,1% (v/v), formiato de amônio 100 mM e acetato de amônio 100 mM, diluídos em água ultra pura. A acetonitrila foi utilizada como modificador orgânico e o gradiente de fases foi linear variando de 0 a 100% de acetonitrila em 25 minutos, a uma temperatura de 24 °C e fluxo isocrático de 1,0 mL/min. Conforme observado na Figura 16, o ácido fórmico foi o solvente que apresentou melhor desempenho para a eluição dos compostos, com tempos de retenção menores, alta resolução e menor capacidade de danificação da vida útil do equipamento.

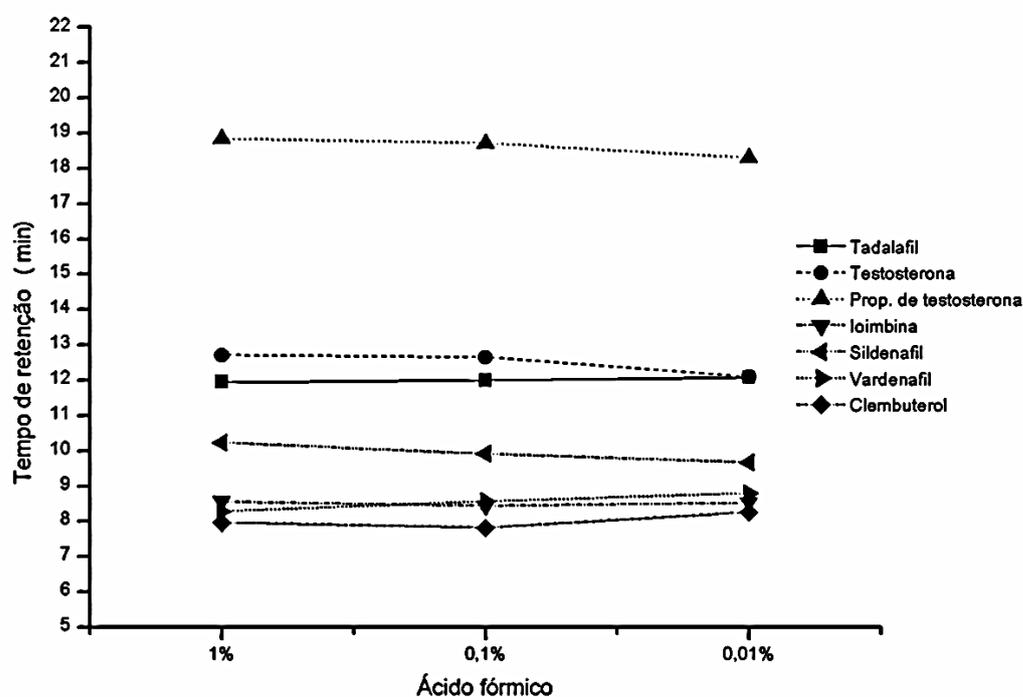
Figura 16 - Demonstração dos tempos de retenção para cada analito obtido através do estudo de Fase Móvel A. Condições do método: 0-100% Fase móvel B (acetonitrila) por 25 minutos, à 24 °C, fluxo 1,0 mL/min.



Fonte: Do autor.

Posto isto, a concentração do ácido fórmico (1%, 0,1% ou 0,01% v/v) na fase aquosa também foi investigada. A Figura 17 apresenta a sutil diferença nos tempos de retenção dos analitos conforme a concentração de ácido variava, sendo que 0,1% (v/v) de ácido fórmico apresentou um tempo de eluição dos compostos menor quando comparado às outras concentrações, bem como melhor eficiência na separação dos analitos.

Figura 17 - Demonstração dos tempos de retenção para cada analito obtido através do estudo da concentração de Ácido Fórmico como Fase Móvel A. Condições do método: 0-100% Fase móvel B (acetoneitrila) por 25 minutos, à 24 °C, fluxo de 1,0 mL/min.



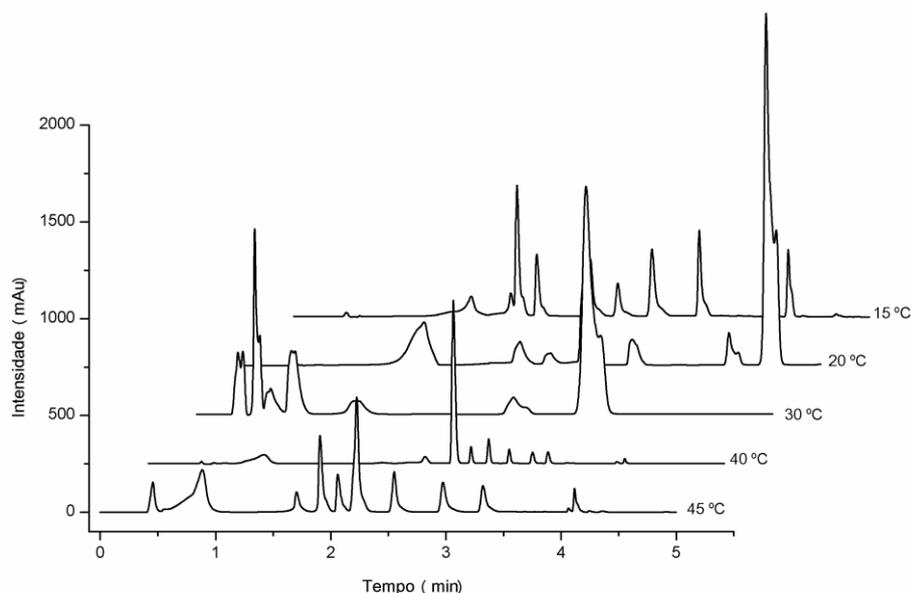
Fonte: Do autor.

Metanol, acetoneitrila e tetrahydrofurano (THF) foram avaliados como modificadores orgânicos da fase móvel. O metanol elevou a pressão do sistema cromatográfico, o que poderia afetar a vida útil da bomba e da coluna de separação, enquanto que o THF diminuiu a sensibilidade dos analitos uma vez que apresentava comprimento de absorção próximo aos compostos estudados. Dessa forma, a acetoneitrila demonstrou ser uma boa alternativa como constituinte da fase orgânica.

Outras condições específicas também foram avaliadas, como a temperatura de análise, volume de injeção e fluxo da fase móvel durante a análise. Entre as temperaturas estudadas (15, 20, 30, 40 e 45°C), aquela que apresentou um tempo de análise menor, com melhor

eficiência e sem prejudicar os sítios da fase estacionária, foi a temperatura de 45 °C, conforme pode ser visualizado na Figura 18.

Figura 18 - Cromatograma desmostrativo do estudo de temperatura de análise dos compostos, monitorados em 263 nm.



Fonte: Do autor.

Quanto aos volumes de injeção avaliados (5, 10 e 20 μL), o volume de 10 μL proporcionou picos de formato gaussiano com áreas maiores e reprodutíveis.

Por fim, foram estudados o fluxo da fase móvel e diferentes gradientes de composição entre as fases aquosa e orgânica, de forma que a separação cromatográfica apresentasse uma boa resolução entre os analitos de interesse, com o menor tempo de análise possível. As condições otimizadas para o gradiente de fluxo e de composição de fase móvel estão apresentadas na Tabela 11. Ao final de cada análise, foi atribuído um sistema de equilíbrio pós corrida para retornar as condições iniciais do método.

Tabela 11 - Condições cromatográficas do método proposto para a determinação de fármacos adulterantes por HPLC-DAD

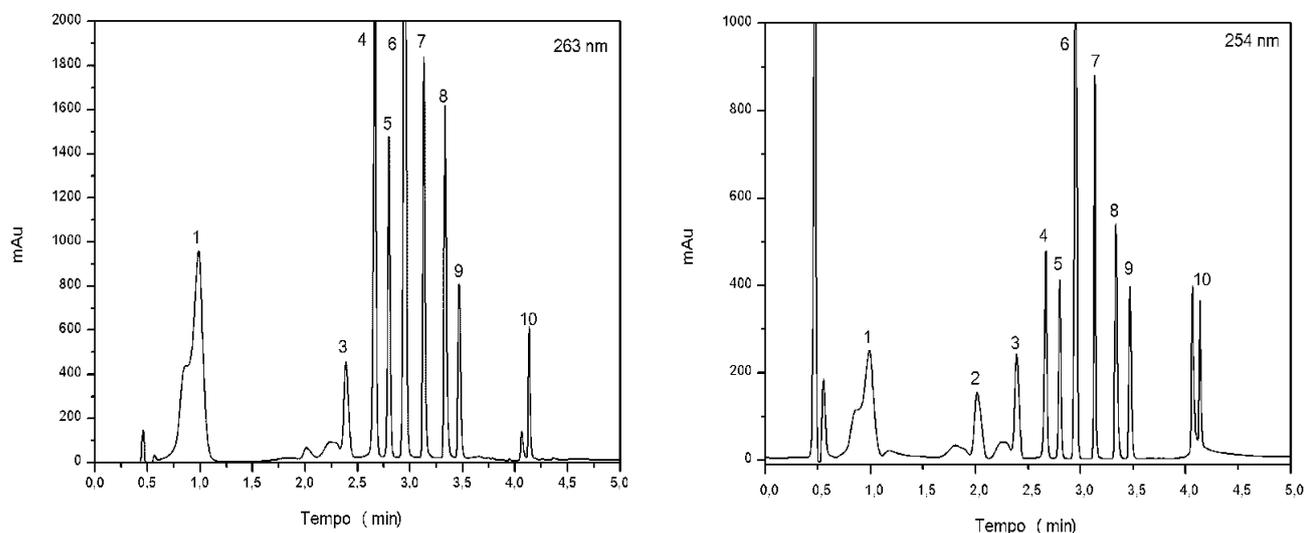
Tempo (min)	A%	B%	Fluxo (mL.min ⁻¹)
0	85	15	1.2
1	80	20	1.2
2	40	60	1.2
2,5	30	70	1.2
3,5	0	100	1.3
4	0	100	2.0
4,5	85	15	1.2

A = Ácido fórmico 0,1%; **B** = Acetonitrila; Temperatura de 45 °C; Coluna Poroshell 120 Agilent® 4.6 x 50 mm, 2.7 µm; Monitoramento dos dados em 254 e 260 nm.

Fonte: Do autor.

A Figura 19 apresenta o cromatograma final para a determinação dos analitos de interesse, onde é possível observar a separação dos dez adulterantes em menos de cinco minutos. O tempo de análise é um fator importante a ser considerado para métodos de *screening* no controle de qualidade de suplementos alimentares. Métodos rápidos possibilitam liberação de laudos de forma imediata, permitindo a suspensão da comercialização de produtos suspeitos. Adicionalmente, apesar da utilização de uma coluna cromatográfica de tamanho de partícula relativamente pequeno, a pressão durante as análises não ultrapassou 200 bar, possibilitando a transposição do método para equipamentos de HPLC convencionais.

Figura 19 - Cromatograma de separação dos adulterantes a 10 µg/mL. Condições cromatográficas: fase móvel A 0,1% de ácido fórmico, fase móvel B acetonitrila, coluna C18 Poroshel 120, temperatura 45°C.



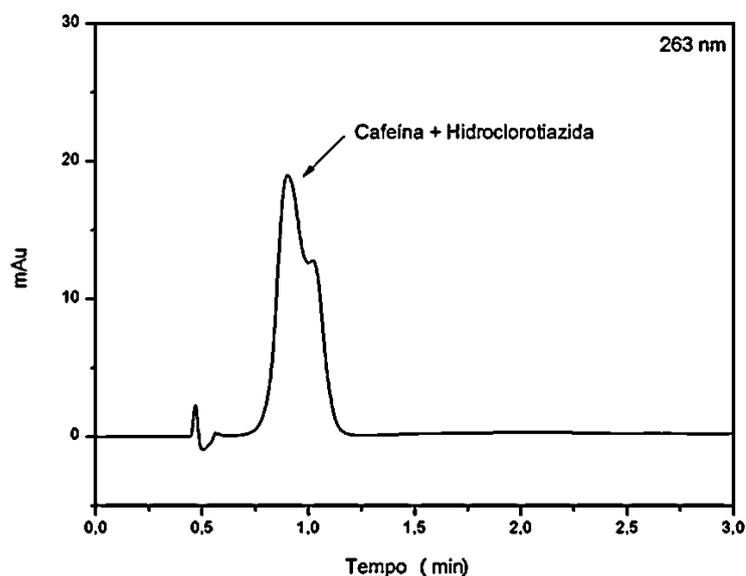
Descritores: (1) hidroclorotiazida, (2) clenbuterol, (3) ioimbina, (4) vardenafil, (5) sildenafil, (6) furosemida, (7) tadalafil, (8) testosterona, (9) espironolactona, (10) propionato de testosterona. Fonte: Do autor.

4.3.2 Validação do método por HPLC-DAD proposto

A validação do método foi baseada em diretrizes da Anvisa e as condições foram avaliadas segundo os critérios da AOAC para suplementos alimentares (AOAC, 2003; BRASIL, 2017b). A escolha destes guias de validação foi devido ao fato da Anvisa ser a agência reguladora desses produtos no Brasil, e a AOAC disponibilizar parâmetros internacionais de validação em matrizes de suplementos alimentares. Conforme exposto anteriormente, o método foi inicialmente desenvolvido com o propósito de determinação dos estimulantes sexuais e anabolizantes em suplementos alimentares. Entretanto, durante o estudo da seletividade do método, foi possível a inserção de três fármacos representantes da classe dos diuréticos, de forma que não interferissem no sinal dos analitos já estudados.

Com base nos adulterantes encontrados em suplementos alimentares pelo FDA, as outras classes farmacológicas como anorexígenos, ansiolíticos, antidepressivos, laxantes e estimulantes do sistema nervoso central foram avaliadas como possíveis interferentes do método (TUCKER et al., 2018). Entre os compostos analisados, a cafeína, um composto presente na matriz de alguns suplementos alimentares, apresentou uma interferência significativa no sinal da hidroclorotiazida (Figura 20).

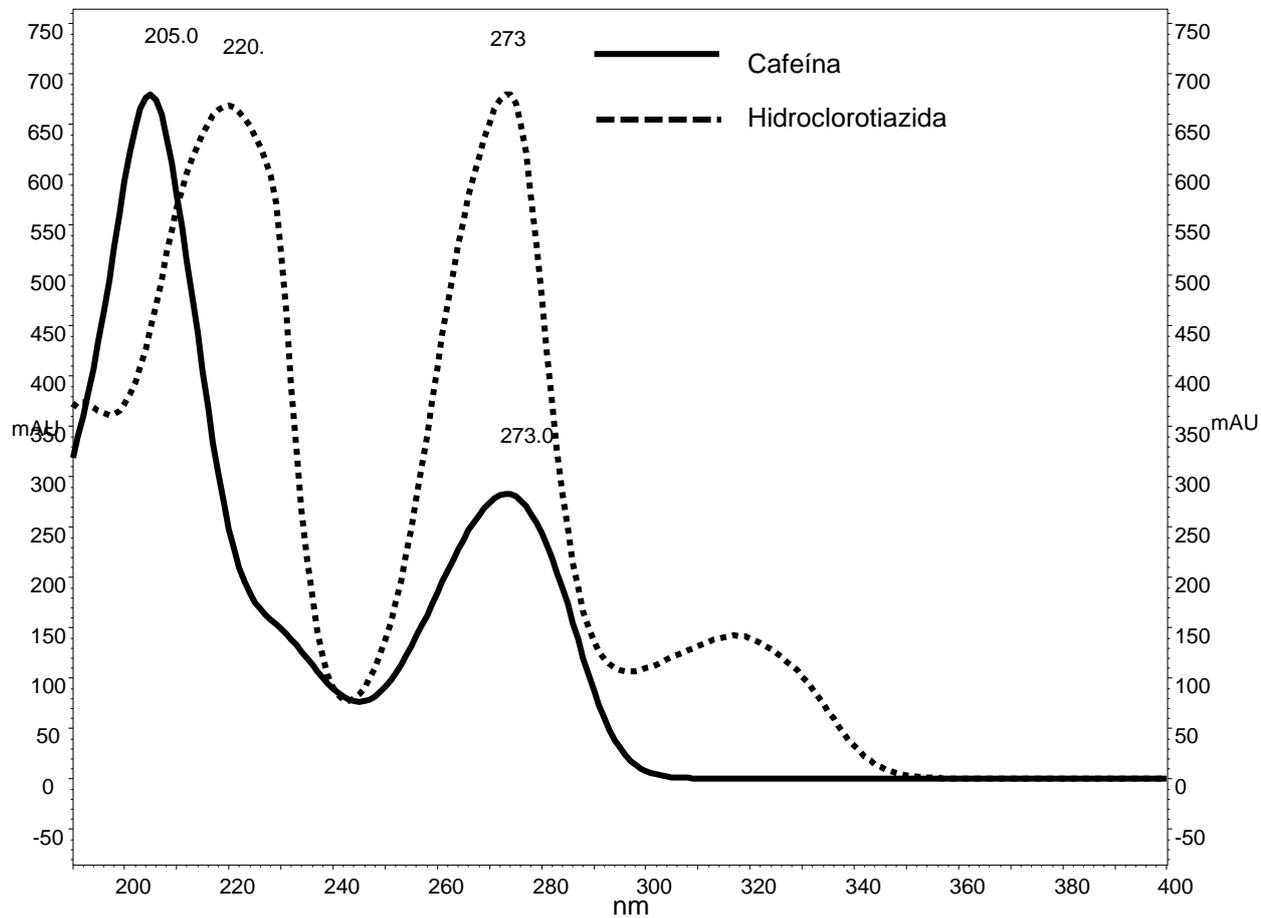
Figura 20 - Cromatograma demonstrativo da interferência da cafeína na hidroclorotiazida. Condições cromatográficas: fase móvel A 0,1% de ácido fórmico, fase móvel B acetonitrila, coluna C18 Poroshel 120, temperatura 45°C.



Fonte: Do autor.

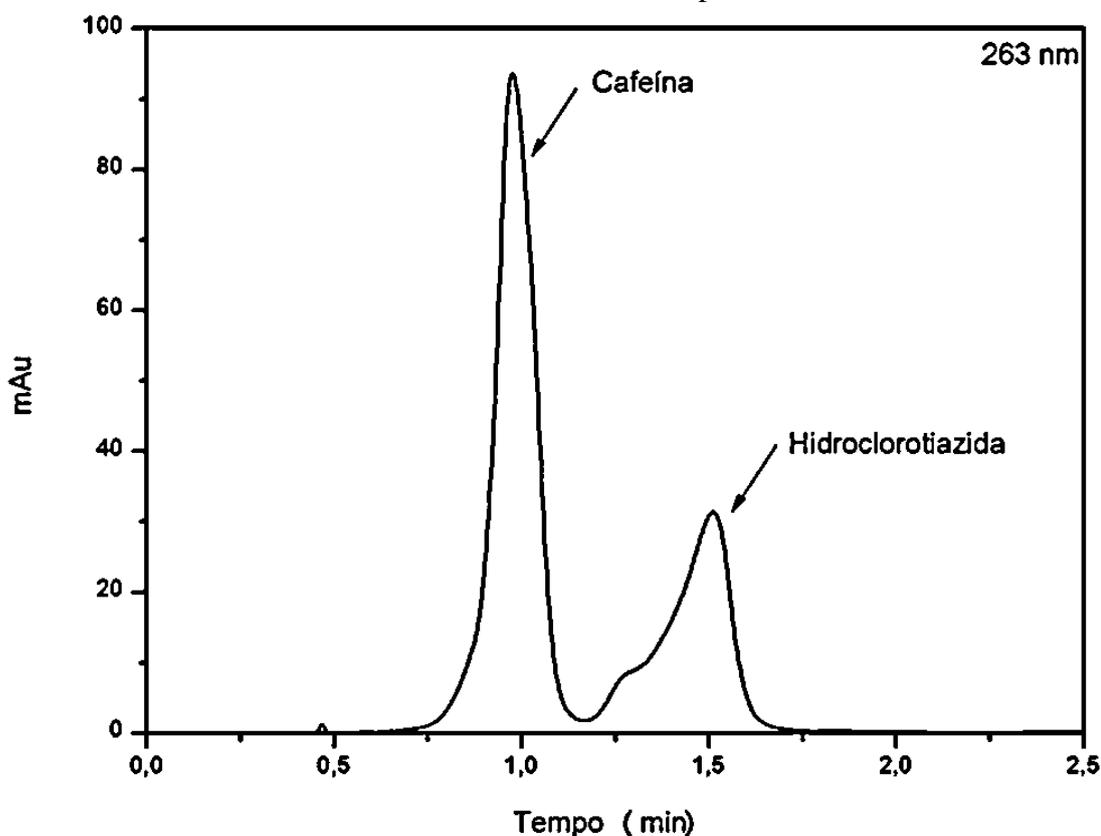
Devido às características da instrumentação e do método proposto, a confirmação da presença de cafeína ou hidroclorotiazida pode ser realizada de duas maneiras: I) através da análise de pureza do pico realizada pelo próprio *software* a fim de confirmar a presença de um dos dois compostos; II) Separação dos picos à 20 °C, uma vez que diminuindo a temperatura, aumenta a interação dos compostos com o preenchimento da fase estacionária. Tanto os espectros dos dois compostos, quanto a separação à 20 °C podem ser visualizados nas Figuras 21 e 22.

Figura 21 - Espectros de absorção da cafeína e hidroclorotiazida. Condições cromatográficas: fase móvel A 0,1% de ácido fórmico, fase móvel B acetonitrila, coluna C18 Poroshel 120, temperatura 20°C.



Fonte: Do autor

Figura 22 - Cromatograma de separação da cafeína e hidroclorotiazida. Condições cromatográficas: fase móvel A 0,1% de ácido fórmico, fase móvel B acetonitrila, coluna C18 Poroshel 120, temperatura 20°C.



Fonte: Do autor.

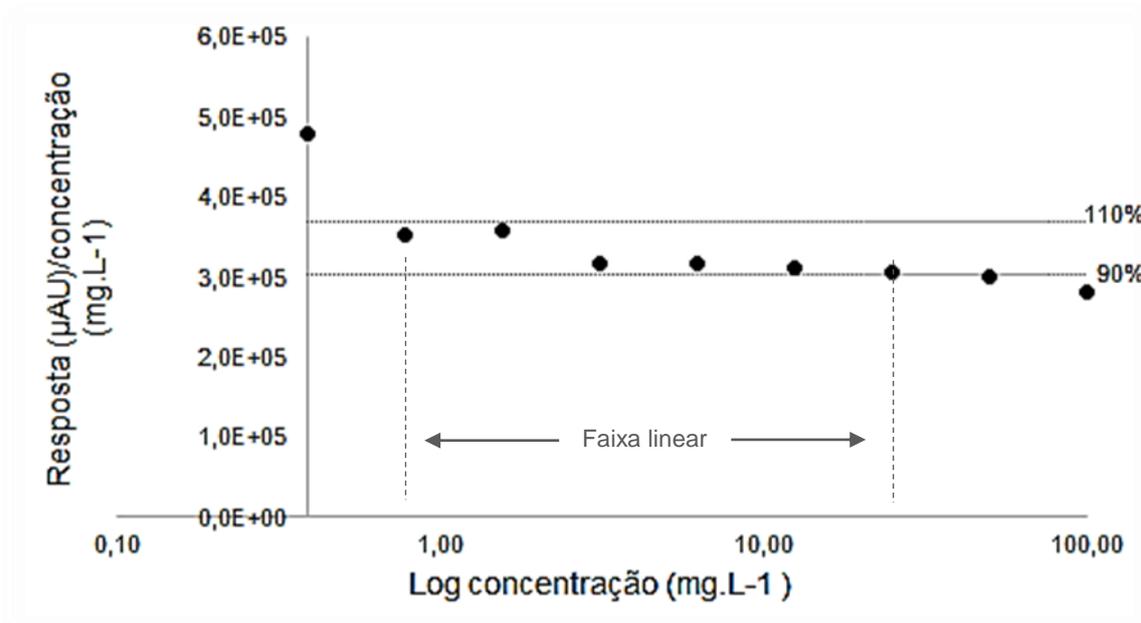
Uma vez que a validação do método ocorreu à 45 °C, o teste T foi realizado para a comparação da média das áreas da hidroclorotiazida na análise das duas temperaturas. De acordo com o teste, não houve diferença significativa ($p=0.32$, $p<0.05$), confirmando a hipótese de que a temperatura de análise não afeta a área hidroclorotiazida, mas altera a interação do analito com a coluna.

Os outros compostos analisados não interferiram no método, seja por apresentarem uma interação maior com a coluna e, conseqüentemente, a eluição ser posterior ao tempo de análise, seja pela elevada polaridade e, dessa forma, ter baixa interação com a fase estacionária ou, até mesmo, devido à ausência de grupamentos cromóforos.

Posto isto, na sequência, foram estudados a linearidade do método para cada substância e a elaboração da curva de concentração de acordo com as suas faixas de trabalho. A linearidade corresponde à capacidade do método responder à variação de concentração do analito, podendo ser representada de forma empírica com a observação do sinal:resposta, ou de forma matemática através da expressão da equação da reta, com valores de coeficiente de

correlação maiores que 0,99 (RIBANI et al., 2004). Para a avaliação da linearidade do método, foram realizadas curvas analíticas com dez concentrações distintas para cada analito, seguido da análise dos pontos que corresponderiam a faixa linear dinâmica. Essa análise foi determinada conforme descrito por Ribani e colaboradores (2004), onde se constrói um gráfico da razão sinal/ruído vs. o log da concentração. A Figura 23 exemplifica como foi feita esta análise.

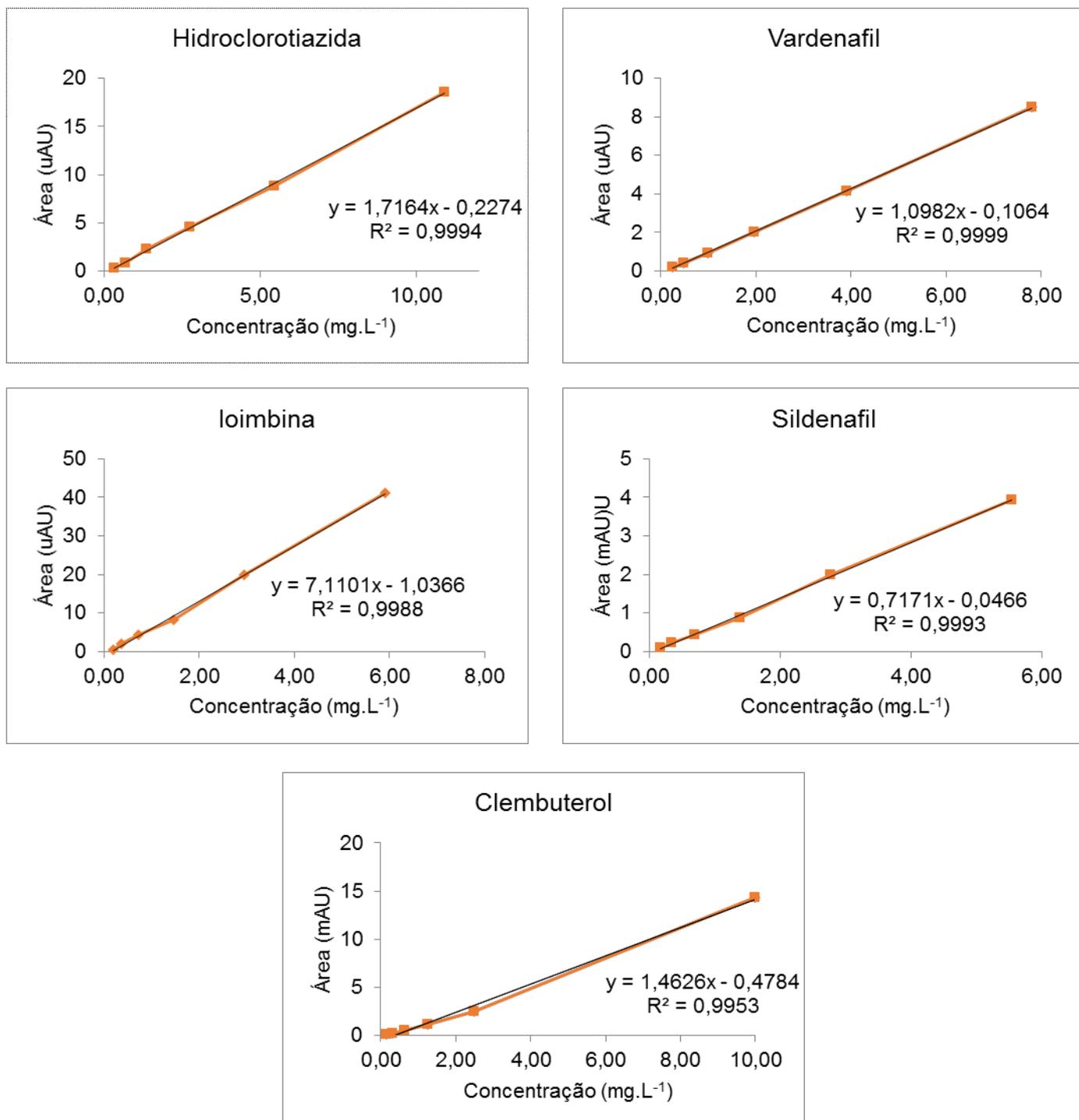
Figura 23 - Gráfico demonstrativo da determinação da faixa linear dinâmica para o propionato de testosterona, onde no eixo y encontram-se a razão sinal:ruído e no eixo x o Log da concentração analisada.



Fonte: Do autor.

Conforme preconizado pelo Guia de Validação para Suplementos Alimentares e Botânicos da AOAC (2013), uma análise visual é o suficiente para a avaliação da linearidade junto a um coeficiente de correlação maior 0,99. Os curvas analíticas foram constituídas de seis pontos em triplicata, de acordo com a faixa linear de cada analito. As curvas analíticas de cada substância estudada e os seus respectivos coeficientes de correlação, são apresentadas na Figura 24.

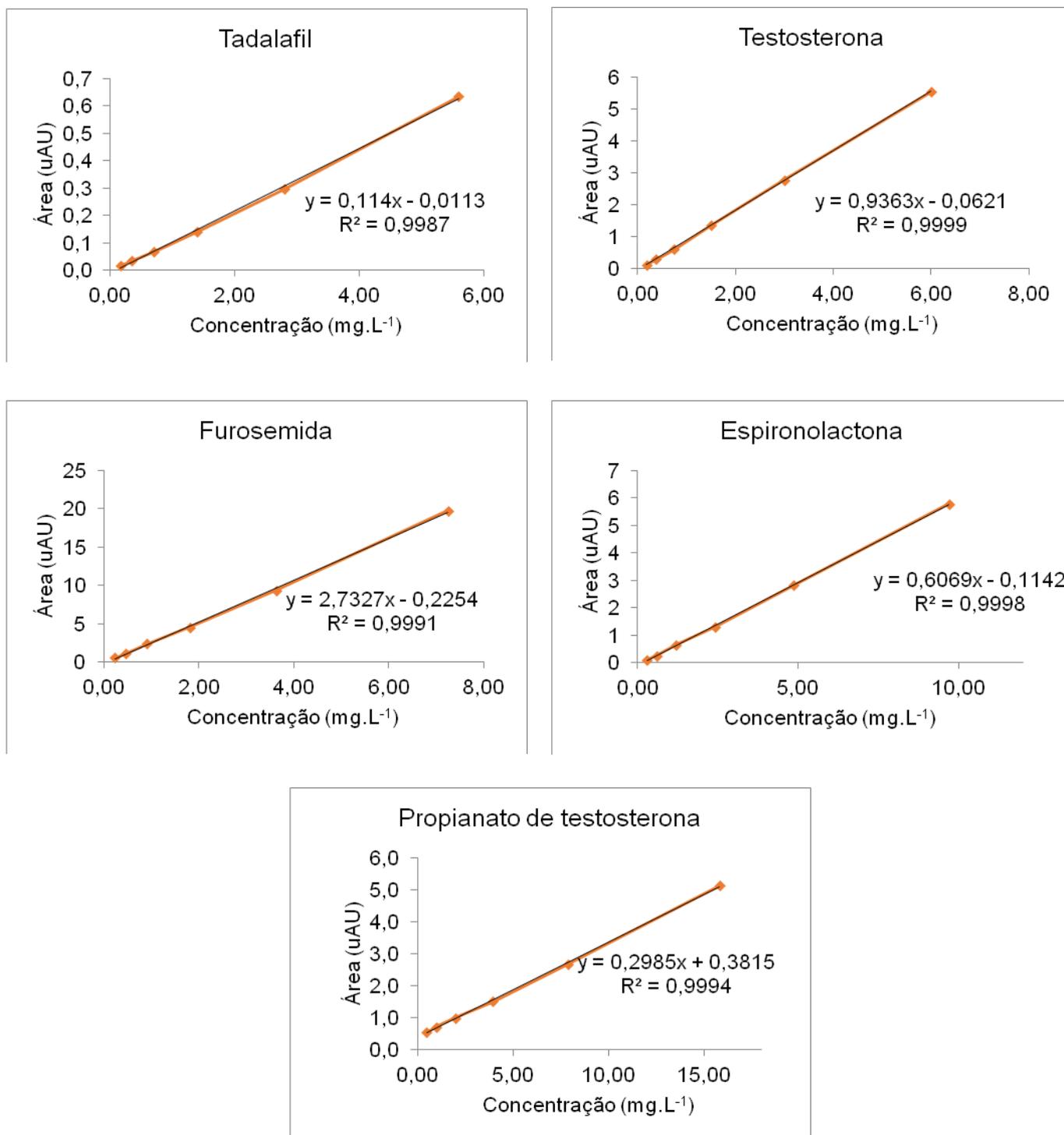
Figura 24 - Curvas analíticas para cada substância em estudo, suas respectivas equações da reta e coeficiente de correlação.



(continua)

Figura 24 – Curvas analíticas para cada substância em estudo, suas respectivas equações da reta e coeficiente de correlação.

(conclusão)



Os compostos apresentaram linearidade aceitável, visto que todos possuíam coeficientes de correlação maiores que 0,99, mostrando que o método apresenta uma boa resposta à variação de concentração (BRASIL, 2017b). Por conseguinte, foram avaliados a capacidade do método de detectar e quantificar os analitos nas menores concentrações. Os limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ) foram determinados com base na resposta sinal:ruído 3:1 para o LOD e 10:1 para o LOQ nas menores concentrações, e estão dispostos na tabela 11.

Os limites de quantificação do ensaio variaram de 0,07 mg/L a 1,46 mg/L, ou seja, é possível identificar a presença dos adulterantes que estiveram em faixas menores que os seus LOQ, contudo não é possível inferir a sua real concentração. Em estudos anteriores, foram identificados a presença de estimulantes sexuais em concentrações 18,75 mg/g para o tadalafil, 2,25 mg/mL de vardenafil, 2,82 mg/g para ioimbina e 1,46 mg/g de sildenafil (MURATT et al., 2018; POPLAWSKA et al., 2014 ZHU et al., 2005; ZOU et al., 2006), todos encontram-se dentro dos limites de quantificação do método proposto.

Na Tabela 12, além do LOD e LOQ, é possível verificar a Análise de Variância realizada com os dados obtidos, o qual demonstra que uma regressão significativa, ou seja, o método responde frente às mudanças de concentração, sem que haja um desvio da linearidade entre as triplicatas.

Tabela 12 - Parâmetros de regressão, resultados da análise de variância e apresentação dos limites de quantificação e de detecção para a determinação de hidroclorotiazida, ioimbina, vardenafil, sildenafil, clembuterol, tadalafil, bisacodil, testosterona, espironolactona e propionato de testosterona.

(continua)

Parâmetros	Hidroclorotiazida ^a	Ioimbina ^a	Vardenafil ^a	Sildenafil ^a	Clembuterol ^a
Faixa de concentração linear (mg.L ⁻¹)	0.1-10	0.1-10	0.2-10	0.1-10	0.1-10
Inclinação ± desvio padrão	1.7164 ± 0.0210	7.1101 ± 0.1247	1.0982 ± 0.0053	0.7171 ± 0.0093	1.4626 ± 0.0544
Intercepto ± desvio padrão	-0.2274 ± 0.1120	-1.0366 ± 0.3470	-0.1064 ± 0.019	-0.0466 ± 0.024	-0.4784 ± 0.2300
Coeficiente de correlação (r ²)	0.9994	0.9988	0.9999	0.9993	0.9953
Análise de variância					
Regressão linear ^b	248.25 (4.75)	844.81 (4.75)	197.59 (4.75)	61.42 (4.75)	792.32 (4.75)
Desvio da linearidade ^b	0.20 (3.26)	1.30 (3.26)	0.02 (3.26)	0.05 (3.26)	1.76 (3.26)
Limites					
LOQ	0.650	0.488	0.177	0.340	1.46
LOD	0.214	0.161	0.059	0.112	0.481

^a Dados obtidos a partir de três curvas padrões com seis pontos de análise.

^b Valores em parênteses correspondem aos valores de críticos de F para $P < 0,05$.

Tabela 12– Parâmetros de regressão, resultados da análise de variância e apresentação dos limites de quantificação e de detecção para a determinação de hidroclorotiazida, ioimbina, vardenafil, sildenafil, clembuterol, tadalafil, bisacodil, testosterona, espironolactona e propionato de testosterona.

(conclusão)

Parâmetros	Tadalafil	Furosemida	Testosterona ^a	Espironolactona ^a	Propionato de testosterona ^a
Faixa de concentração linear (mg.L ⁻¹)	0.3-10	0.1 – 5	0.1-10	0.3-10	0.5-15
Inclinação ± desvio padrão	0.1140 ± 0.0207	2.7327 ± 0.1412	0.9363 ± 0.0049	0.6069 ± 0.0041	0.2985 ± 0.0035
Intercepto ± desvio padrão	-0.113 ± 0.005	-0.2254 ± 0.141	-0.0621 ± 0.0140	-0.1142 ± 0.019	0.3815 ± 0.026
Coeficiente de correlação (r ²)	0.9987	0.9991	0.9999	0.9998	0.9994
Análise de variância					
Regressão linear ^b	741.48 (4.75)	915.10 (4.75)	19481.15 (4.75)	986.47 (4.75)	3328.17 (4.75)
Desvio da linearidade ^b	1.22 (3.26)	0.04 (3.26)	2.72 (3.26)	0.23 (3.26)	2.34 (3.26)
Limites					
LOQ	0.479	0.070	0.149	0.315	0.883
LOD	0.158	0.020	0.049	0.104	0.290

^a Dados obtido a partir de três curvas padrões com seis pontos de análise.

^b Valores em parênteses correspondem aos valores de críticos de *F* para *P* <0,05.

Outras etapas da validação foram realizadas a fim de verificar a capacidade do método em responder de forma precisa para análises realizadas em diferentes dias, ou durante injeções repetitivas e a influência da matriz na análise. A precisão intermediária corresponde a capacidade de que o mesmo método, no mesmo laboratório e nas mesmas condições irá fornecer os mesmos resultados, independente do dia (RIBANI et al., 2004). A repetibilidade demonstra as variações do método para sucessivas análises ou experimentos, ou seja, caso uma mesma amostra fosse determinada dez vezes, as repostas obtidas seriam semelhantes (MILLER; MILLER, 2005). De acordo com a AOAC (2013), tanto a precisão intermediária quanto a repetibilidade, são mensurados em desvio padrão relativo (DPR), com valores aceitáveis de até 10%. Os resultados obtidos com o presente método, descritos na Tabela 13, encontram-se dentro dos limites preconizados.

A recuperação do método corresponde a proporção de substância de interesse presente na amostra capaz de ser determinada pela metodologia proposta. Ela foi determinada a partir da adição de uma concentração conhecida da substância química de referência (SQR) em uma matriz de suplemento alimentar limpa, ou seja, que não apresentava interferências ao método. Os resultados obtidos estão dispostos na Tabela 13 e estão de acordo com os limites aceitos, que vão de 80 a 115% (AOAC, 2013).

Tabela 13 - Precisão e exatidão instrumentais do método UHPLC-DAD desenvolvido

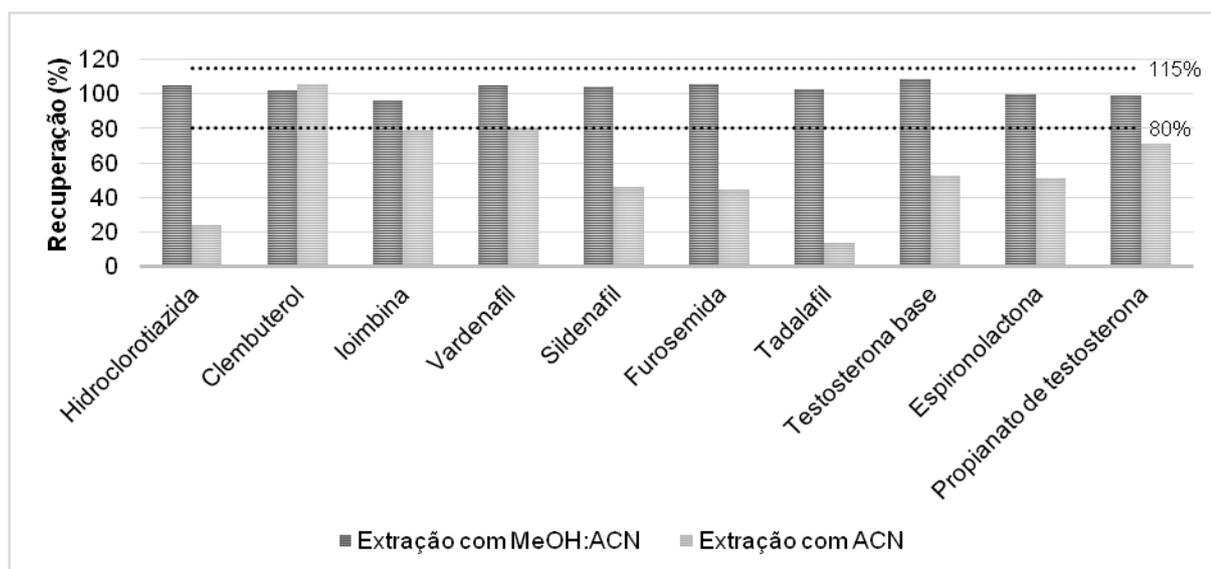
Analito	Repetibilidade (n = 6, RSD %)						Precisão Intermediária (n = 6, RSD %)			Recuperação (%) (n=3, RSD%) ²
	Área do pico cromatográfico			Tempo de retenção			Área do pico cromatográfico		Tempo de retenção	
	Nível de concentração ¹			Nível de concentração ¹			Nível de concentração ¹		Nível de concentração ¹	
	<i>Baixo</i>	<i>Intermediário</i>	<i>Alto</i>	<i>Baixo</i>	<i>Intermediário</i>	<i>Alto</i>	<i>Intermediário</i>	<i>Intermediário</i>		
Hidroclorotiazida	0,3	1,3	0,7	0,1	0,0	0,4	2,6	0,2	87,1 – 115,8 (9,2)	
Clembuterol	2,6	1,0	0,1	0,0	0,1	0,2	1,3	0,0	96,4 – 111,9 (4,9)	
Ioimbina	8,5	1,6	6,4	0,0	0,0	0,1	6,5	0,1	85,2 – 111,3 (10,7)	
Vardenafil	0,9	1,0	1,0	0,1	0,0	0,0	2,3	0,1	93,1 – 114,8 (8,8)	
Sildenafil	0,2	1,4	0,1	0,0	0,0	0,0	1,5	0,2	92,2 – 115,0 (9,1)	
Furosemida	0,6	0,9	0,6	0,0	0,0	0,0	1,4	0,0	91,6 – 115,1 (8,4)	
Tadalafil	0,9	0,8	0,6	0,0	0,0	0,0	3,2	0,1	81,2 – 115,2 (10,5)	
Testosterona base	5,5	1,0	0,7	0,0	0,0	0,0	5,0	0,0	96,2 – 115,2 (5,5)	
Espironolactona	3,4	2,1	0,2	0,0	0,0	0,0	4,2	0,3	91,8 – 109,3 (5,9)	
Propionato de testosterona	6,4	3,1	0,5	0,0	0,0	0,0	1,6	0,0	85,8 – 114,8 (10,4)	

¹ Nível de concentração baixo igual a 2 vezes o LOQ de cada analito; nível intermediário igual a 5 vezes o LOQ; e nível alto igual a 8 vezes o LOQ.

² O desvio padrão relativo é calculado entre as recuperações obtidas para uma triplicata das substâncias químicas de referência na matriz de suplemento alimentar.

Concomitante ao estudo da recuperação do método, foi realizado o estudo da recuperação da extração da amostra. O ensaio foi realizado em duas etapas, a primeira que constituiu da diluição tanto da SQR quanto do suplemento em estudo em Metanol:Acetonitrila 1:1 (v/v), seguido de filtração em algodão umidificado com diluente e posterior filtração em membrana regenerada. A recuperação do método de extração descrito anteriormente foi comparado com a diluição em acetonitrila seguida das mesmas etapas já descritas. Os resultados comparativos entre a recuperação do método e a recuperação da extração estão dispostos na Figura 25.

Figura 25 - Comparação entre diferentes solventes para a extração dos analitos de interesse da amostra de suplemento alimentar. Os resultados estão expressos em percentual de recuperação.



Fonte: Do autor.

Conforme os resultados obtidos, a extração com a mistura de solventes de acetonitrila e metanol foi mais eficiente do que a diluição com somente acetonitrila. Esse fato se deve provavelmente às características de solubilização dos compostos em estudo, uma vez que apresentam diferentes polaridades.

Por fim, foi realizado o estudo da robustez, observando a capacidade do método em responder a pequenas variações. A robustez foi realizada para temperaturas de 40 °C e 50 °C, concentração de ácido fórmico 1,0 e 0,01% e a vazão do fluxo de análise de 1,0 e 1,5 mL/min. Os resultados foram expressos de acordo com os desvio padrão de cada parâmetro. Os dados fornecidos por este estudo estão dispostos na Tabela 14.

Tabela 14 - Resultados obtidos para os estudo de robustez do método, mediante a variação de temperatura, concentração da fase móvel A e fluxo de análise.

Analito	Temperatura ¹		Concentração de HCOOH ¹		Vazão do fluxo da fase móvel ¹	
	50 °C	40°C	1,0%	0,01%	1,5 mL/min	1,0 mL/min
Hidroclorotiazida	0,06	0,04	0,18	0,11	0,18	0,11
Clembuterol	0,12	0,11	0,11	3,01	0,32	0,14
Ioimbina	0,04	0,04	0,08	0,14	0,30	0,19
Vardenafil	0,18	0,15	0,25	0,25	0,20	0,18
Sildenafil	0,24	0,20	0,23	0,17	0,20	0,18
Furosemida	0,12	0,10	0,20	0,19	0,20	0,19
Tadalafil	0,01	0,01	0,04	0,06	0,20	0,21
Testosterona	0,06	0,05	0,05	0,00	0,21	0,23
Espironolactona	0,02	0,02	0,21	0,24	0,21	0,24
Propionato de testosterona	0,03	0,02	0,09	0,01	0,07	0,44

¹ Dados obtidos através do desvio padrão para medições realizadas tanto para cima quanto para baixo em relação ao tempo de retenção do analito.

Fonte: Do autor.

A validação do método é um passo importante a fim de garantir que o mesmo é capaz de identificar e quantificar, de forma precisa e exata, as substâncias de interesse, sem sofrer influência da matriz ou de outros compostos (DECONINCK et al., 2015). Dados não confiáveis, principalmente para identificação de adulterantes em suplementos alimentares, podem acarretar em grandes problemas analíticos (RIBANI et al., 2004). Resultados falsos positivos, onde a presença do adulterante não é confirmada, provocaria prejuízos à indústria, além da diminuição da credibilidade do laboratório de análise. Por outro lado, resultados falsos negativos atingem diretamente o consumidor, visto que o adulterante está presente nos produtos, porém não foi possível identificá-lo, acarretando em malefícios à saúde de quem os consomem.

Considerando individualmente as classes farmacológicas dos estimulantes sexuais, diuréticos e esteroides anabolizantes, dentre os estudos disponíveis na literatura de investigação de adulterantes em suplementos alimentares por cromatografia líquida com detecção por massas (LC-MS/MS), o tempo de análise variou de 5 a 60 minutos (VACLAVIK; KRYNITSKY; RADER, 2015) enquanto que no método proposto, é possível realizar investigação de 10 substâncias não permitidas em suplementos em apenas 5 minutos.

Além disso, nenhum método disponível apresentou a determinação simultânea dos 10 elementos aqui estudados (GUO et al., 2015; KIM et al., 2017)

O método proposto foi validado de acordo com a diretrizes da Anvisa (2017), e teve seus requisitos atendidos de acordo com as diretrizes para a validação de suplementos alimentares AOAC (2013), demonstrando ser um método sensível, específico e confiável para a aplicação proposta.

4.3.3 *Screening* e quantificação de adulterantes em amostras de suplementos alimentares

As vantagens das análises envolvendo o HPLC-DAD frente aos outros métodos disponíveis para a investigação de adulterantes em matrizes complexas são relevantes do ponto de vista analítico e financeiro. Tal importância se deve aos pequenos volumes de amostra que são requeridos para a análise, a varredura de espectros que possibilita a detecção de analitos com diferentes comprimento de onda de absorção e a extração da pureza de pico que o torna uma ferramenta de grande valia do ponto de vista de seletividade, uma vez que permite avaliar o grau de similaridade entre o pico detectado na amostra e o pico do padrão referente. Além disso, por se tratarem de matrizes complexas, tratamentos extensivos da amostra requeridos em outras técnicas, como extrações de fase sólida, aqui são dispensáveis (PASCALI et al., 2018).

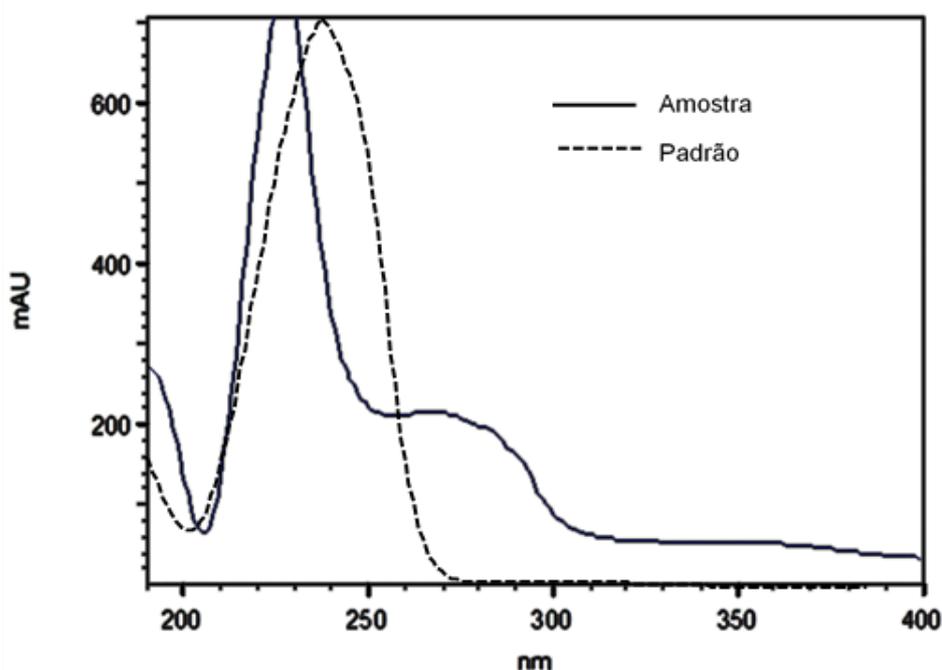
O método proposto e validado foi aplicado para a identificação de possíveis adulterações em suplementos alimentares comercializados no Brasil. Conforme descrito anteriormente, algumas amostras adquiridas encontravam-se irregulares no Brasil, devido a facilidade que o comércio virtual representa. Tal irregularidade se caracterizava pela presença de substâncias não autorizadas, erros de rotulagem e uso de alegações indevidas.

A fim de diminuir possíveis efeitos de matriz e, conseqüentemente, retirar impurezas que não fossem relevantes à análise, foi necessário a realização de um breve tratamento da amostra. Conforme estudos anteriores (DAL MOLIN, 2016; DAL MOLIN et al., 2019b) e o estudo da extração das SQR, a massa referente ao peso médio das amostras foi diluída em metanol:acetonitrila 1:1 (v/v), seguido de um filtração em algodão umidificado para a retirada de sólidos grosseiros e, então, filtrado em membrana regenerada com porosidade de 0,45 µm. Por fim, a amostra foi injetada no sistema cromatográfico, diluída na própria fase móvel até a concentração desejada. Apesar de se tratar de uma extração simples, o mesmo demonstrou-se eficiente com relação aos efeitos de matriz, uma vez que não afetou na análise dos picos cromatográficos de interesse.

Para a identificação de adulterantes na amostra, um *screening* prévio foi realizado a fim de selecionar aquelas que apresentavam sinais cromatográficos suspeitos de adulteração. A confirmação da presença de adulterantes foi analisada de duas maneiras: I) comparando os tempos de retenção do possível adulterante com o tempo de retenção da substância química de referência; II) comparação dos espectros de interesse com o espectro padrão. A extração da pureza de pico foi atribuída pelo *software* através do índice de similaridade. Foram confirmadas as adulterações com valores de similaridade maior que 0,7, podendo inferir que o pico cromatográfico de interesse apresenta 70% de semelhança tanto de espectro quanto no tempo de retenção quando comparado ao pico cromatográfico da substância química de referência (SQR). A Figura 26 demonstra a comparação de espectros do pico sugestivo da presença de propionato de testosterona em uma amostra sobreposto com a SQR utilizada na validação do método.

A quantificação dos adulterantes foi realizada através do método de adição de padrão, em que uma concentração conhecida do adulterante foi adicionado na amostra. Das 44 amostras analisadas, 15,90% (n=7) possuíam pelo menos um adulterante em sua composição, como pode ser observado na Tabela 15.

Figura 26 - Comparativo entre os espectros do pico sugestivo do propionato de testosterona na amostra (linha sólida) e do padrão de propionato de testosterona (linha pontilhada).



Fonte: Do autor.

Tabela 15 - Suplementos alimentares suspeitos de adulteração e a relação de similaridade entre as substâncias investigadas e os padrões.

Identificação da amostra	Ingredientes	Dose diária recomendada (DDR)	Substâncias encontrada ¹	Similaridade ²	Concentração por DDR	Dose terapêutica
S1	Cafeína 420 mg	2 cápsulas	Hidroclorotiazida	0,95	214,7 mg	25 a 200 mg
S2	Cafeína, carbonato de cálcio, maltodextrina, estearato de magnésio, dióxido de silício	3 cápsulas	Hidroclorotiazida	0,95	122,75 mg	25 a 200 mg
			Furosemida	0,89	38,38 mg	20 a 80 mg
			Espironolactona	0,91	51,90 mg	25 a 200 mg
S3	Guaraná em pó, laranja amarga em pó, chá <i>Camellia sinensis</i> solúvel, gengibre em pó, raiz-forte em pó, pimenta vermelha em pó	5 g	Clembuterol	0,91	23,05 mg	n.e.
S4	Guaraná (<i>Paullinea cupana</i> L., sementes), erva mate (<i>Ilex paraguariensis</i> St. Hill., folhas e talos), banana-prata (<i>Musa paradisiaca</i> L., frutos), chá verde (<i>Camellia sinensis</i> L., folhas), chá branco (<i>Camellia sinensis</i> L., folhas), chá preto (<i>Camellia sinensis</i> L., folhas), limão (<i>Citrus limmonia</i> Osbeck)	3 g	Ioimbina	0,78	180 mg	5,4 mg a 16,2 mg
			Propionato de testosterona	0,85	19,30 mg	5 a 20 mg
S5	Fosfato monocálcio, carbonato de cálcio, pirofosfato férrico, cloreto de sódio, fosfato de magnésio, sulfato de zinco, sulfato de cobre, sulfato de manganês, selenito de sódio, iodeto de potássio, sulfato de potássio, acetato de retinol, colecalciferol, acetato de tocoferol, tiamina, riboflavina, ácido ascórbico, nicotinamida, piridoxina, ácido fólico, cianocobalamina, biotina, pantotenato de cálcio, extrato de soja, lecitina de soja	30 g	Sildenafil	0,81	12,86 mg	25 a 100 mg
S6	Maltodextrina	1 comprimido	Tadalafil	0,99	11,51 mg	10 a 20 mg
S7	Arginina, zinco, selênio, trichilia catigua juss, xarope de <i>Coffea arabica</i> , <i>Solanum sessiliflorum</i> , taurino	2 cápsulas	Propionato de testosterona	0,82	15,58 mg	5 a 20 mg

¹ Resultado obtido através do método validado para a investigação de adulterantes em suplementos alimentares.

² Dados fornecidos pelo *software* EZchrom® através da comparação de espectros e tempo de retenção entre amostra e padrões. Valores aceitáveis acima de 0,7.

n.e. – Não encontrado

Fonte: Do autor

A ioimbina, presente na amostra S1 (Tabela 14), é um alcaloide indolquilamínico que atua como inibidor da enzima monoamina oxidase (SVORC; KALCHER, 2014). Seu uso se popularizou como afrodisíaco e estimulante sexual, contudo a sua segurança e eficácia no tratamento da disfunção erétil, quando comparado aos inibidores da PDE-5, é limitada (COHEN et al., 2016). Por penetrar facilmente no sistema nervoso central, esse alcaloide produz um complexo padrão de respostas com doses menores do que aquelas requeridas para produzir bloqueio alfa-adrenérgico. Estas incluem antidiurese e excitação central incluindo hipertensão e taquicardia, aumento da atividade motora, irritabilidade, vertigem, nervosismo e, até mesmo, alucinações (ZHANG et al., 2010). No Brasil, a ioimbina não encontra-se na lista de substâncias autorizadas em suplementos alimentares (BRASIL, 2018g).

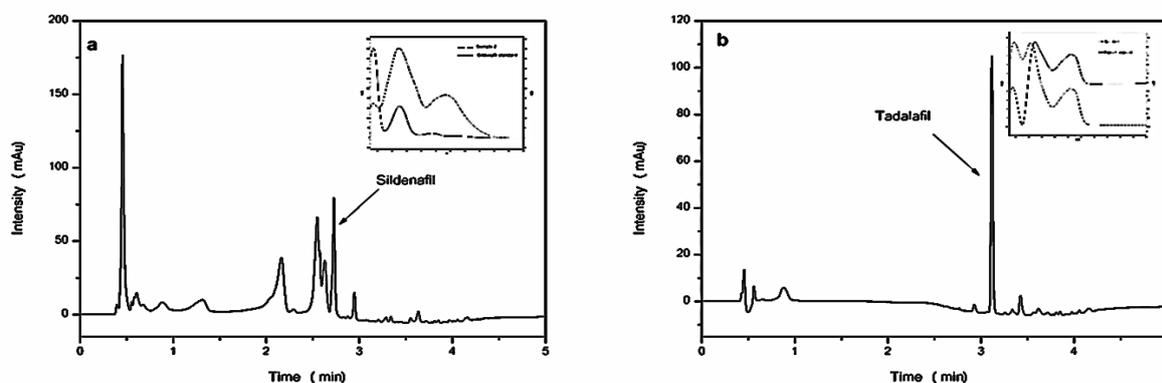
Entre os esteroides anabolizantes detectados nas amostras analisadas, estão o clenbuterol e o Propionato de testosterona. O clenbuterol é um halogenado da feniletilaminas mundialmente reconhecido como anabolizante devido ao seu efeito de aumentar massa muscular e reduzir o percentual de gordura corporal (LIU et al., 2011). Classificado como um β -agonista, o clenbuterol é uma substância ativa oralmente, de ação prolongada e que apresenta diversos efeitos adversos como taquicardia, palpitação cardíaca, nervosismo, tremores musculares e confusão, os quais podem piorar com uso a longo prazo. Nos Estados Unidos, o uso do clenbuterol é aprovado somente em animais, para a obstrução de vias aéreas, contudo, devido aos diversos casos de incidentes ocasionados, seu uso foi proibido em animais utilizados na preparação de alimentos (PAWAR; GRUNDEL, 2017; YAN et al., 2014). O propionato de testosterona, encontrado nas amostras S4 e S7, é amplamente utilizado em terapias de reposição androgênica em homens hipogonadais. Algumas farmácias de manipulação brasileiras sugerem o consumo de propionato de testosterona por via oral, em doses que variam de 5 a 20 mg por dia, mesma faixa de concentração em que o adulterante foi encontrado nas amostras analisadas. Contudo, mesmo com a inserção do éster na posição 17 da testosterona, essa molécula ainda sofre efeito de primeira passagem, o que diminui a sua eficácia (JOCKENHÖVEL, 2004). Embora seja um medicamento sujeito a controle especial, medicamentos falsificados contendo esteroides androgênicos anabolizantes são encontrados no mercado negro, o que acaba possibilitando a adição dos mesmos como adulterantes em suplementos alimentares (NEVES & CALDAS, 2017; CHO et al., 2015).

Os diuréticos são classificados como substâncias proibidas pela WADA, uma vez que são utilizados para perda de peso e podem mascarar a presença de outros agentes na urina por diluição (WADA, 2018). A adulteração com diuréticos em suplementos alimentares é uma prática recorrente, principalmente entre os produtos que apresentam o apelo comercial de

“ação diurética” (CIANCHINO et al., 2008; ROCHA; AMARAL; OLIVEIRA, 2016; NEVES; CALDAS, 2017). Em estudos anteriores, a hidroclorotiazida foi encontrada em suplementos de origem natural nas concentrações subterapêuticas, como 2,4 mg/g, e nas concentrações terapêuticas, como 45 mg/g (CARVALHO et al., 2013; MOREIRA et al., 2013). Nas amostras analisadas, considerando as recomendações apresentadas nos rótulos, a ingestão de hidroclorotiazida atinge cerca de 215 mg por dia na amostra S1 e 122 mg na amostra S2, sendo que a dose terapêutica deste fármaco é de 50 a 100 mg por dia. Doses elevadas de diuréticos podem levar a desidratações severas e perdas de eletrólitos que podem até mesmo serem fatais (YEN; EWALD, 2012). A presença de mais de um fármaco diurético em um mesmo produto também já foi observada em trabalhos anteriores (MÜLLER et al., 2018a), assim como na amostra S2, a qual foi possível detectar três diuréticos. A mesma era descrita como “*fat burnner weigth loss supplementation*”, alegação não permitida em suplementos alimentares, de acordo com as novas diretrizes da Anvisa (BRASIL, 2018g).

A presença ilegal de inibidores da fosfodiesterase-5 (PDE-5) pode acarretar sérios danos à saúde do consumidor de suplementos alimentares, uma vez que o sildenafil apresenta reação cruzada com a PDE-6, localizada na retina, e o tadalafil apresenta reação cruzada com PDE-11 presente no músculo esquelético. Essas reações cruzadas podem promover distúrbios e anormalidades visuais, enquanto que a reação cruzada com PDE-11 pode resultar em mialgia e dor na região lombar, além dos efeitos adversos já conhecidos atribuídos ao consumo destes medicamentos (ZUNTAR et al., 2018). A Figura 27 representa duas amostras (S6 e S7) com picos cromatográficos indicativos da presença de sildenafil e tadalafil.

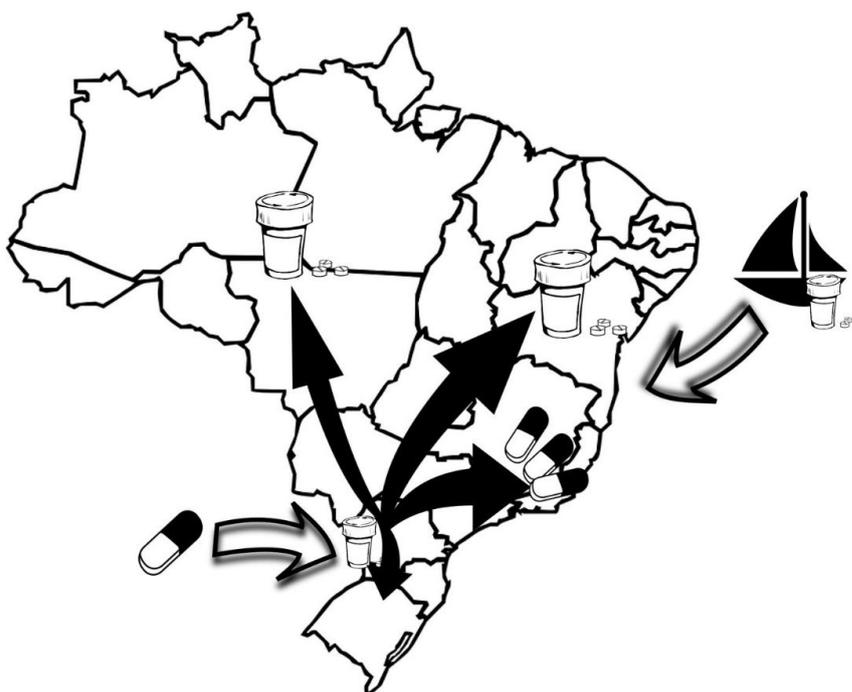
Figura 27 - Cromatograma dos picos sugestivos de adulteração por sildenafil na amostra S6 (a) e tadalafil na amostra S7 (b), com sobreposição dos espectros.



Fonte: Do autor.

Nas amostras positivas para a presença de adulterantes foram observadas características semelhantes, como I) Cinco das sete amostras eram produtos importados; II) Seis das sete amostras foram adquiridas por outros meios de comercialização que não eram lojas virtuais especializadas (mídias sociais e mercado clandestino); III) Seis das sete amostras não continham SAC, nem responsável técnico; IV) Todas as amostras apresentavam alegações que induziam ação farmacológica. Com isso, é possível inferir que a maior probabilidade de adulterações estão presentes nos produtos que chegam de alguma forma clandestina no Brasil ou então, que estão ligados de forma indireta com o contrabando ilegal de fármacos nas fronteiras. A Figura 28 representa as principais vias de entrada e distribuição dos suplementos alimentares adulterados no Brasil, com base nas informações disponibilizadas pela Receita Federal através da Lei de Acesso à Informação. Na Figura 28 são apresentadas três prováveis situações de distribuição dos produtos adulterados no país, I) o suplemento adulterado chega de forma clandestina através de portos; II) medicamentos falsificados são adicionados nos suplementos alimentares antes de chegar à fronteira para depois ser distribuído e III) o suplemento é adulterado no Brasil deliberadamente para então ser comercializado.

Figura 28 - Portas de entrada dos suplementos alimentares no Brasil. I) Através da fronteiras e portos, II) Adicionados de medicamentos falsificados e distribuídos, III) Adulteração proposital para então comercialização.



Fonte: Do autor.

Nos Estados Unidos, entre os anos de 2007 a 2016, o FDA identificou 776 suplementos alimentares contendo ingredientes não permitidos. Entre os adulterantes mais frequentes estão os estimulantes sexuais e os esteroides anabolizantes (TUCKER et al., 2018). Embora a Anvisa já tenha emitido diversos alertas quanto a qualidade de alguns produtos, não é possível inferir o número oficial de suplementos adulterados apreendidos no Brasil (BRASIL, 2012; 2016a). Neste estudo, foi possível a aquisição de sete amostras adulteradas, através de websites brasileiros, uma ferramenta de fácil acesso por parte dos consumidores. Este fato ressalta ainda mais a importância do desenvolvimento de métodos analíticos de confiança que possibilitem e investiguem a presença de substâncias não autorizadas em suplementos alimentares. Além do mais, devido aos problemas financeiros que os países subdesenvolvidos enfrentam, é praticamente inviável investimentos em equipamentos como o LC-MS/MS em laboratórios governamentais. Isto se deve ao fato que estes equipamentos demandam de reagentes altamente purificados, mão-de-obra capacitada, laboratórios com recursos específicos, manutenções recorrentes e etapas de limpeza e pré-tratamento das amostras, o que acaba elevando não somente o custo de análise, mas também o tempo quando comparado ao método proposto. A Tabela 3 demonstra uma comparação qualitativa de custos dispendidos para a análise de adulterantes em suplementos alimentares pelo método proposto, e por um método UHPLC-ESI-MS/MS desenvolvido pelo mesmo grupo de pesquisa com proposta semelhante (MÜLLER et al., 2019).

Tabela 16 - Comparativo de custos entre o método por HPLC-DAD proposto e o método por UHPLC-ESI-MS/MS¹ descrito na literatura.

	HPLC-DAD	UHPLC-ESI-MS/MS
Equipamento	US\$ 30.004,50	US\$ 104.545,12
Fase estacionária ²	\$\$	\$\$
Reagentes ³	\$	\$\$\$
Preparo de amostra	\$	\$
Manutenção	\$\$	\$\$\$\$
Insumos e ferramentas	\$\$	\$\$\$\$

¹ Trabalho desenvolvido pelo mesmo grupo de pesquisa, com proposta semelhante (Müller et al., 2019).

² Mesma coluna cromatográfica para os dois métodos.

³ Para o método de HPLC-DAD foram utilizados reagentes P.A. ou grau HPLC, enquanto que para o método por UHPLC-ESI-MS/MS foram utilizados reagentes grau LC.

Considerando a aquisição do equipamento de HPLC-DAD, insumos, manutenções preventivas e materiais básicos para o funcionamento de um laboratório, o custo de implementação do método proposto sairia cerca de U\$\$ 360.000,00, o que contemplaria uma economia de pelo menos 40% caso fosse utilizadas metodologias como UHPLC-ESI-MS/MS. Quanto a análise de uma amostra, levando em consideração apenas os insumos e reagentes utilizados, estima-se um gasto de US\$ 7,00 por análise.

4.4 ESTUDO DA TOXICIDADE *IN SILICO* E CITOTOXICIDADE *IN VITRO* DOS SUPLEMENTOS ALIMENTARES ADULTERADOS

Os resultados parciais desse capítulo foram apresentados no XX Congresso Farmacêutico de São Paulo de 2019, recebendo o prêmio de melhor trabalho científico na área de Suplementos Alimentares e Alimentos Especiais (Apêndice F). A seguir encontram-se os resultados e a discussão que farão parte do manuscrito a ser submetido à *Environmental Toxicology and Pharmacology*, o qual encontra-se em fase de elaboração (Apêndice G).

4.4.1 Predição da toxicidade *in silico* dos adulterantes encontrados nas amostras

Os ensaios *in silico* tornaram-se ferramentas auxiliares que permitem avaliar os pontos de toxicidade para constituintes específicos, como flavonoides em plantas, ou como alerta para possíveis toxicidades, como potencial mutagênico de algum fármaco, por exemplo (LITTLE et al., 2017). Em adição, o consumo de suplementos alimentares vêm crescendo mundialmente, ao mesmo passo que vem aumentando os relatos de toxicidade proveniente do uso destes produtos. De acordo com Navarro e colaboradores (2017), os maiores agentes presentes em suplementos alimentares indutores de danos hepáticos são os esteroides anabolizantes, chá verde e suplementos contendo multiingredientes.

No Brasil, por ser recente o enquadramento legal dos suplementos alimentares, os órgãos responsáveis pela regulamentação desses produtos ainda não disponibilizaram nutrivigilância dos alimentos como forma de rastreio de efeitos adversos, e a mesma é pouco reconhecida mundialmente, especialmente quando se trata desta categoria de produtos. Dessa forma, o estudo de toxicidade *in silico* serviu como ferramenta primária para avaliar se os possíveis efeitos tóxicos dos suplementos adulterados estudados são provenientes apenas dos compostos adulterantes, da matriz do produto ou de um sinergismo entre as substâncias não permitidas e os ingredientes declarados no rótulo.

Para a avaliação dos riscos de toxicidade *in silico*, optou-se pelo estudo dos fármacos adulterantes encontrados nas amostras, de acordo com a Tabela 15, juntamente com a cafeína, composto este presente em cinco das sete amostras adulteradas. Portanto, foram investigados os riscos de mutagenicidade, carcinogenicidade, cardiotoxicidade, irritação da pele, toxicidade do sistema reprodutivo, hepatotoxicidade e citotoxicidade através de cinco plataformas *online*. Foram atribuídas uma escala de toxicidade com base nos dados obtidos, para melhor visualização dos riscos. De acordo com os resultados apresentados na Tabela 17, todos os compostos, com exceção da furosemida, apresentam uma alta probabilidade de toxicidade.

De acordo com Dearden (2003), o estudo *in silico* permite a avaliação da toxicidade antes mesmo da síntese de novas moléculas, o que auxilia na prevenção de eventuais falhas ou efeitos adversos do fármaco. A predição ocorre basicamente através da relação estrutura-atividade, o que muitas vezes acaba por atribuir efeitos tóxicos até mesmo para medicamentos que estão há muito tempo disponíveis no mercado. No presente estudo, um modelo ideal de predição seria aquele que avaliaria a toxicidade da matriz dos suplementos alimentares, juntamente com os adulterantes encontrados. Porém, devido a adição de multiingredientes por parte dos fabricantes nos produtos, torna-se difícil este tipo de análise e, portanto, fica inviável atribuir os resultados à um produto em específico. Dessa forma, o estudo *in vitro* serviu como ferramenta complementar para a avaliação da citotoxicidade das amostras.

Tabela 17 - Predição da toxicidade dos adulterantes encontrados em suplementos alimentares e da cafeína, presente como composto majoritário das amostras, obtido via simulação computacional.

Adulterante	Mutagenicidade	Carcinogenicidade	Cardiotoxicidade	Irritação	Toxicidade		
					do sistema	Hepatotoxicidade	Citotoxicidade reprodutivo
Hidroclorotiazida	(+++) ^{1,2,3,4,5}	(+++) ^{2,4,5}	(+) ^{1,4}	ND ^{1,5}	(+++) ⁵	(+++) ^{1,2}	(+++) ³
Furosemida	(++) ^{1,3,4,5}	(+) ^{2,3,4,5}	(++) ⁴	ND ^{1,5}	ND ⁵	(++) ²	ND ³
Espironolactona	ND ^{1,3,4,5}	(++) ^{2,3,4,5}	(++) ^{1,4}	ND ^{1,5}	(+++) ⁵	(++) ²	(+) ³
Clembuterol	(+++) ^{1,4}	(++) ^{2,3}	(+) ^{1,4}	(+) ^{1,5}	(+++) ⁵	(+) ^{1,2}	(+) ³
Propionato de testosterona	(+) ^{1,2,3,4,5}	(++) ^{2,3,4,5}	(+) ^{1,4}	ND ^{1,5}	(+++) ⁵	(+) ^{1,2}	(+) ³
Sildenafil	(+) ^{1,2,3,4,5}	(+) ^{2,3,4,5}	(+) ^{1,4}	ND ^{1,5}	(+) ⁵	(+++) ^{1,2}	n.e.
Tadalafil	(++) ^{1,2,3,4,5}	(++) ^{2,3}	(++) ⁴	ND ^{1,5}	(+) ⁵	(+++) ^{1,2}	(+++) ³
Cafeína	(+++) ^{1,2,3,4,5}	(++) ^{4,5}	(++) ⁴	ND ^{1,5}	(+++) ⁵	(+++) ¹	(+) ³

¹ pkCSM; ² ProTOX; ³ Lazar; ⁴ preADMET; ⁵ OSIRIS property explorer.

(+) baixo risco; (++) médio risco; (+++) alto risco; (ND) risco não detectado; (ne) não encontrado.

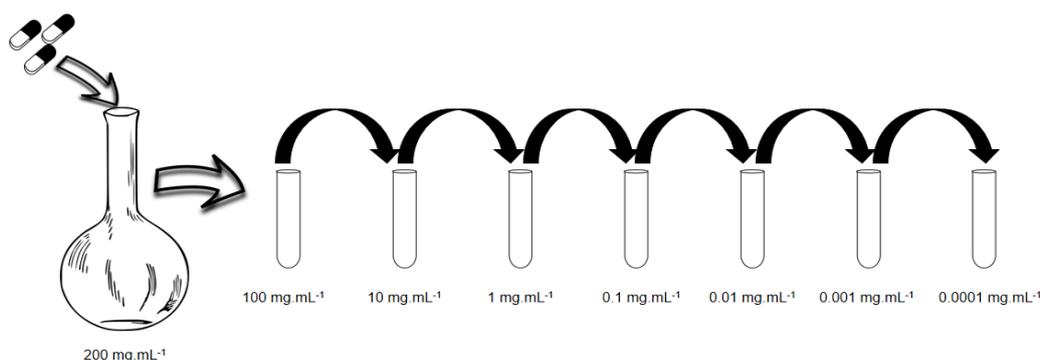
Fonte: Do autor.

4.4.2 Estudo da citotoxicidade *in vitro* das amostras de suplementos alimentares adulteradas

Inúmeros casos de toxicidade relacionada aos suplementos alimentares têm sido descrito na literatura (BROWN, 2017b), contudo há poucos relatos que atribuam a toxicidade aos adulterantes ou a associação entre eles e o suplemento. O ensaio de citotoxicidade para o presente trabalho visou avaliar a toxicidade dos suplementos adulterados em uma faixa de concentração, e a comparação dos resultados com a predição *in silico* a fim de avaliar se a toxicidade é inerente à substância adicionada ou se há alguma relação entre a matriz e o adulterante. Além do mais, ensaios que envolvam modelos de cultura celular em geral tornam-se mais econômicos, e possibilitam uma abordagem melhor de absorção, distribuição e metabolismo (WOLFE; LIU, 2007).

Por se tratar de um estudo pioneiro de citotoxicidade *in vitro* em suplementos alimentares adulterados, foi realizado um protocolo de diluição adaptado das diretrizes da Organização de Cooperação Econômica e Desenvolvimento (do inglês *Organization for Economic Co-operation and development, OECD*) (OECD, 2010). Inicialmente, as amostras foram diluídas em Metanol:DMSO 1:1 (v/v) até a concentração de 200 mg/mL. Posteriormente, as amostras foram diluídas em sete concentrações em meio RPMI, variando da faixa de 100 mg/mL à 0,0001 mg/mL, respeitando os picos plasmáticos dos fármacos encontrados, conforme observado na Figura 29, para então serem adicionadas às células e realizar os ensaios específicos.

Figura 29 - Diluição das amostras para estudo de citotoxicidade. Inicialmente a amostra era diluída em Metanol:DMSO 1:1 (v/v) até a concentração de 200 mg/mL. Posteriormente, a amostra foi diluída sete vezes em meio RPMI.



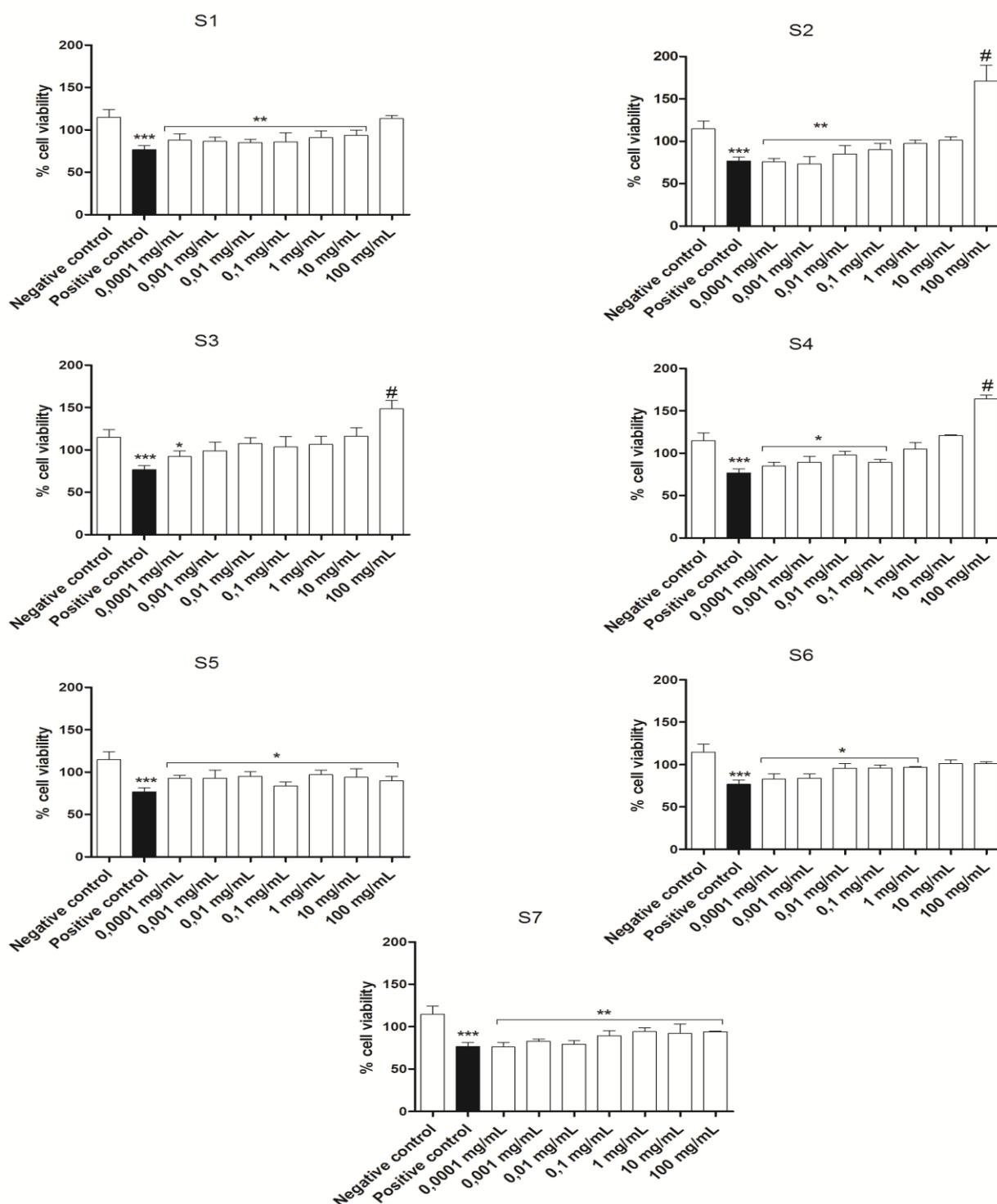
Fonte: Do autor.

Basicamente, o ensaio de MTT avalia tanto a capacidade das células sobreviverem ao agente em estudo, quanto de se proliferarem, de forma rápida e com alto grau de precisão (MOSMANN, 1983). A Figura 30 representa a viabilidade celular através do ensaio de MTT de 24 horas de incubação, para as amostras adulteradas em sete concentrações, juntamente com os controles negativos e positivos. Quando os valores obtidos são significativamente menores que o controle negativo, significa que houve morte celular. Por outro lado, valores significativamente maiores indicam uma proliferação celular. Todas as amostras apresentaram diminuição na viabilidade celular em pelo menos uma concentração, com exceção da amostra S3. Conforme a Tabela 15, a amostra S3 continha como adulterante o clembuterol, substância que apresenta baixa risco de toxicidade de acordo as predições toxicológicas via modelo computacional (Tabela 17). Além disso, no rótulo estavam declaradas algumas substâncias naturalmente antioxidantes como a *Paullinia cupana* e *Camellia sinensis*. Em um estudo anterior, o extrato de guaraná aumentou a proliferação celular de PBMC em 50% em concentrações de 10 mg/mL (ANVERSA et al., 2015), assim como nas amostras S3 e S4, que aumentaram a viabilidade celular em concentrações mais elevadas e também continham extrato de guaraná em sua composição.

Por outro lado, a espironolactona, presente na amostra S2 por exemplo, induz a apoptose celular de células mononucleada devido a supressão na produção de citocinas (MIKKELSEN et al., 2006). A furosemida, também encontrada na amostra S2, em concentrações maiores que 10^{-2} M promovem efeitos citotóxicos direto nos monócitos e atividade imunossupressora sobre os mesmos (YUENGRIGUL; CHIN; NUSSBAUM, 1999). A hidroclorotiazida (amostras S1 e S2) e o tadalafil (amostra S6), de acordo com os estudos de toxicidade *in silico* são potencialmente citotóxicos, efeito esse observado apenas em menores concentrações.

De acordo com a classificação ISO 10993, são considerados levemente citotóxicos quando a viabilidade celular se encontra na faixa de 80-89%, como nas amostras S1, S2, S3 e S5, e moderadamente citotóxico quando a diminuição ocorre na faixa de 50-79%, como na amostra S7 (ISO, 1999).

Figura 30 - Ensaio de viabilidade celular (MTT) após 24 horas de incubação. Os resultados são expressos em percentual do controle negativo (100%). Os dados são apresentados como % do grupo controle não tratado (CN), expressos como média \pm desvio padrão. As análises foram realizadas por Anova de uma via seguido do teste de post hoc de Dunnett. Valores com $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes. Sendo * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.



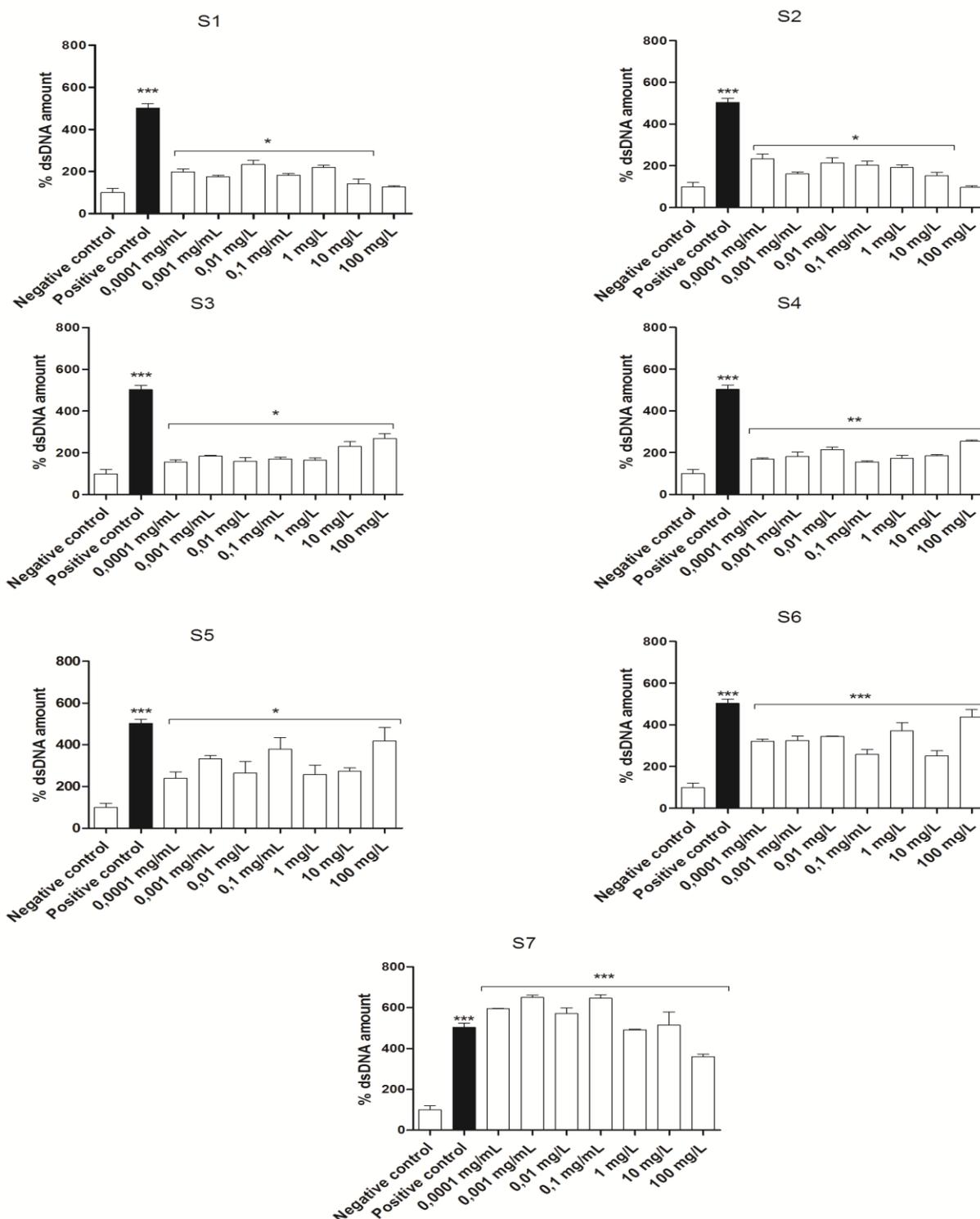
No geral, é possível inferir que todos os compostos, com exceção das amostras S3 e S4, tiveram uma redução da viabilidade celular significativa, quando comparado com o controle negativo. Contudo, não é possível induzir efeitos severamente citotóxicos, uma vez que não foram observadas diminuição da viabilidade celular menor que 50%.

O ensaio de coloração por Picogreen® para a quantificação das moléculas da fita dupla de DNA (dsDNA) em soluções, em concentrações de até 25 pg/mL de DNA. Basicamente, no ensaio de Picogreen® a fluorescência é emitida quando o reagente se liga no dsDNA, principalmente quando o DNA é atacado por alguma substância genotóxica (CADONÁ et al., 2014). O ensaio de dsDNA é considerado uma ferramenta auxiliar para confirmar os resultados obtidos de viabilidade celular, como parâmetro de mortalidade por lise e liberação do dsDNA (SIQUEIRA et al., 2018). A Figura 31 representa a quantificação do dsDNA das PBMC quando colocadas em contato com as sete amostras estudadas, em diferentes concentrações. Foram observados danos significativos para todas as amostras quando comparado ao controle negativo.

A amostra S7, que continha propionato de testosterona, apresentou diminuição da viabilidade celular em todas as concentrações (Figura 30), foi a mais se destacou na quantificação de dsDNA em solução. Em contrapartida, a amostra S3, que continha clenbuterol como adulterante, não apresentou efeitos citotóxicos, mas foram observados danos no DNA proporcional à concentração. Nos estudos realizados por modelo computacional, o clenbuterol apresentou baixo grau citotóxico, entretanto elevado risco de mutagenicidade, o que pode ser levado em consideração para justificar os resultados. De acordo com Ramanathan e colaboradores (2003), há uma relação entre substâncias mutagênicas, principalmente devido ao aumento de espécies reativa de oxigênio, e o aumento de liberação de dsDNA

De acordo com Leão e colaboradores (2018), a hidroclorotiazida, presente nas amostras S1 e S2 induz dano ao DNA independente da concentração, substância com elevado risco de mutagenicidade de acordo com as predições de toxicidade *in silico* da Tabela 17. A cafeína, presente nas amostras S1, S2, S3, S4 e S7 também apresenta alto risco de mutagenicidade. Ainda, estudos anteriores sugerem que o sildenafil, presente na amostra S5, interage com o DNA por meio de reconhecimento através de um mecanismo que envolve o anel de metilpiperazina e sítios específicos do DNA, sendo que a ligação do sildenafil ao dsDNA é mais pronunciada em faixas de pH de 4 a 5 (RAUF et al., 2007).

Figura 31 – Quantificação do dsDNA livre em solução após os tratamentos. Os resultados são expressos em percentual do controle negativo (100%). Os dados são apresentados como % do grupo controle não tratado (CN), expressos como média \pm desvio padrão. As análises foram realizadas por Anova de uma via seguido do teste de post hoc de Dunnett. Valores com $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes. Sendo * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

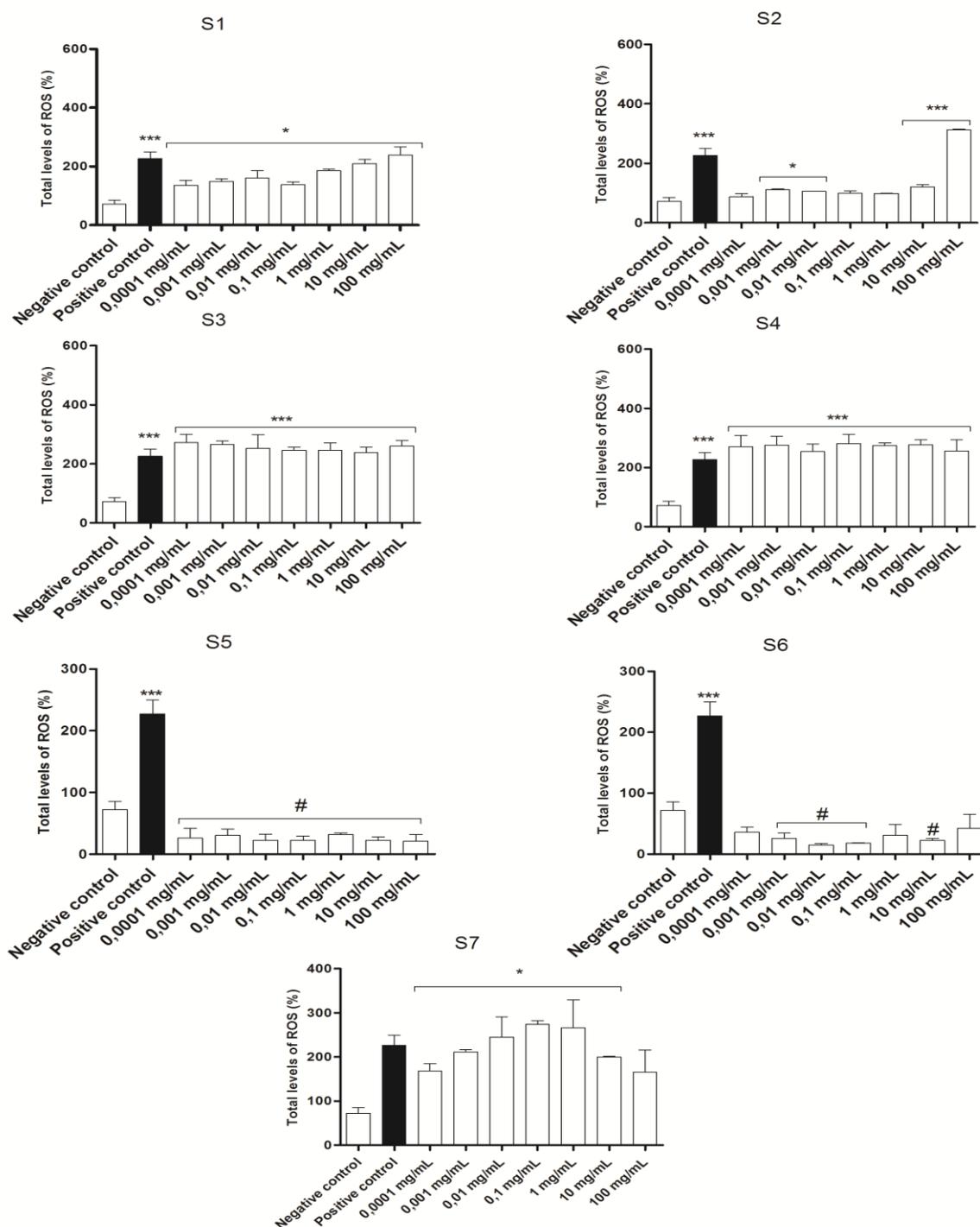


Espécies reativas de oxigênio (EROs) são uma família de vida curta de subprodutos altamente reativos do metabolismo do oxigênio. Eles incluem o ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), ânion hidroxil ($OH^{\bullet-}$), e peróxido de hidrogênio (H_2O_2). As EROs são geradas pelo metabolismo de O_2 nas mitocôndrias por oxidases específicas, incluindo NADPH oxidase, xanteno oxidase e enzimas metabolizadoras do ácido araquidônico (WILCOX, 2002). A determinação de EROs consiste na habilidade do reagente diacetato de 2,7-diclorofluoresceína (DCFH-DA) em atravessar a membrana celular e ser diacetilado pelas enzimas mitocondriais, originando 2,7-diclorohidrofluoresceína. Esse produto reage com as EROS, principalmente o H_2O_2 , produzindo DCFH, que emite fluorescência (SIQUEIRA et al., 2018).

A Figura 32 apresenta os resultados do ensaio de quantificação das EROs das PBMCS tratadas e os seus respectivos controles. Entre os resultados obtidos, destacam-se as amostras S5 e S6 que promoveram uma diminuição significativa nos níveis de EROs. Essas amostras continham sildenafil e tadalafil, representantes da classe farmacológica dos inibidores da fosfodiesterase-5. Os iPDE-5 são uma guanosina 3',5' monofosfato cíclico hidrolase específica, de ação na disfunção sexual. Gao e colaboradores (2017) investigaram a diminuição de espécies reativas de oxigênio com um novo inibidor PDE-5, o icarisida-II. De acordo com o estudo, esse iPDE-5 atenuou a disfunção mitocondrial induzida por H_2O_2 e diminuiu a autofagia das células neuronais dos ratos por altas concentrações de H_2O_2 . O icarisida-II demonstrou ser um relevante agente antioxidante como modulador intracelular da atividade oxidativa, efeito esse já observado em outros representantes da classe do iPDE-5. Conforme Perk e colaboradores (2008), o tratamento com 100 mg de citrato de sildenafil em amostras de sangue apresentou efeitos protetivos contra o estresse oxidativo por inibição da formação de espécies de radical livre através do aumento nas atividades da superóxido dismutase e da catalase.

Zhou e colaboradores (2007) investigaram os efeitos dos diuréticos tiazídicos na redução do estresse pela hipertensão. Ao contrário do que se esperava, os tiazídicos não reduziram o estresse oxidativo, nem melhoraram a função endotelial por liberação de óxido nítrico. Nas amostras que continham diuréticos (S1 e S2), foram observados maiores níveis de EROs, principalmente nas maiores concentrações.

Figura 32 – Quantificação de espécies reativas de oxigênio em PBMCs após o tratamento. Os resultados são expressos em percentual do controle negativo (100%). Os dados são apresentados como % do grupo controle não tratado (CN), expressos como média \pm desvio padrão. As análises foram realizadas por Anova de uma via seguido do teste de post hoc de Dunnett. Valores com $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes. Sendo * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.



Fonte: Do autor.

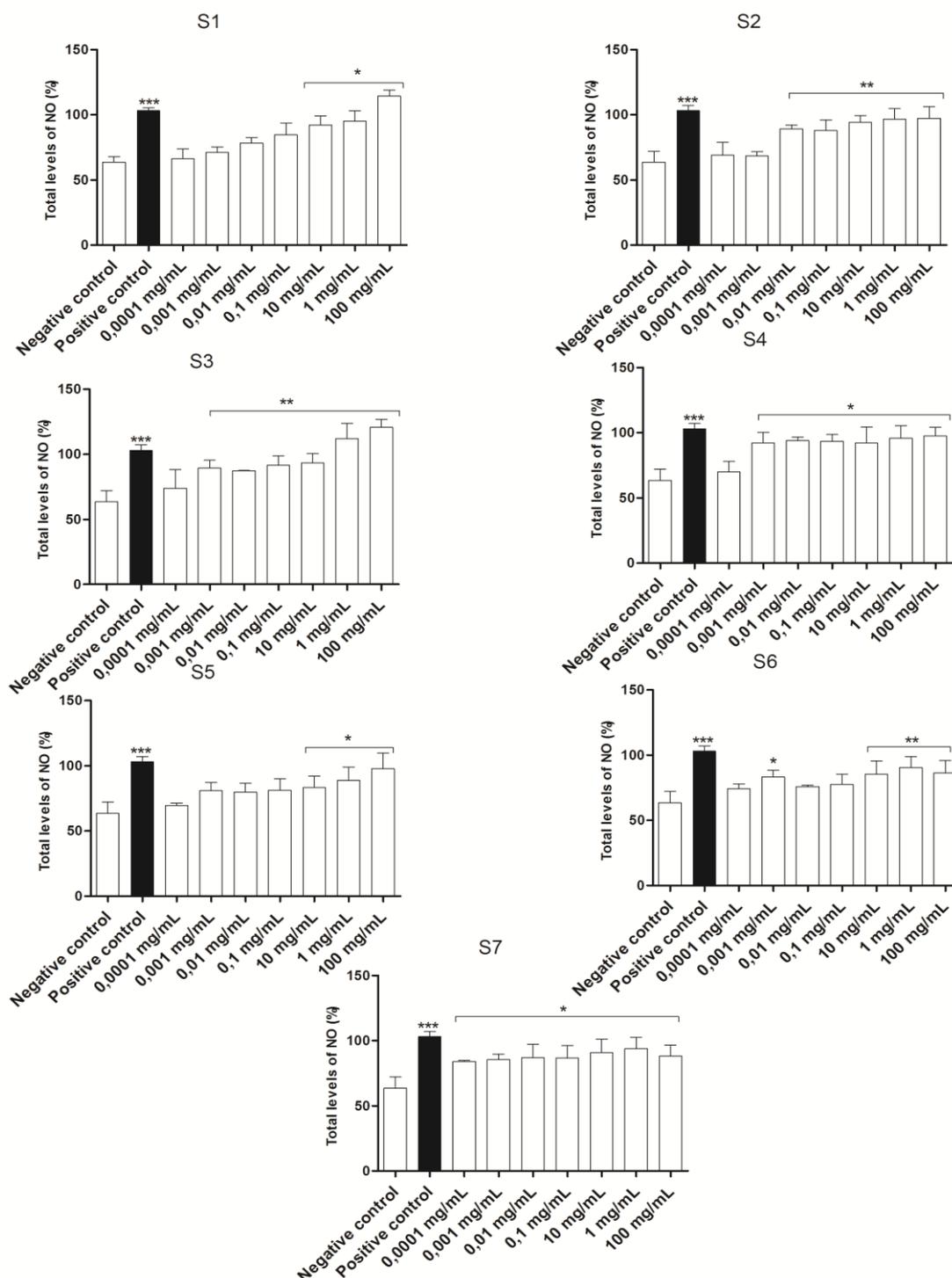
Apesar da cafeína ser conhecida pelo seu potencial antioxidante (DEVASAGAYAM et al., 1996), a sua presença na composição das amostras S1, S2, S3, S4 e S7 não inibiu a liberação das espécies reativas de oxigênio. As amostras que continham fármacos de efeitos anabolizantes na sua composição, como clenbuterol na amostra S3, e propionato de testosterona na S4 e S7 apresentaram níveis de EROs significativamente maiores, quando comparado ao controle negativo.

O ensaio de óxido nítrico tem por finalidade detectar a presença de nitrito orgânico através de reações específicas. O óxido nítrico (ON) é um gás lipossolúvel, produzido pelas células do sistema imune através da ação de enzimas denominadas óxido nítrico sintases (NOS) sobre o ácido aminado L-arginina. Em situações patológicas, em que o sistema imune é estimulado, o ON passa a ser produzido em grandes quantidades, promovendo efeitos citotóxicos (MATHEUS et al., 2003). A Figura 33 mostra os ensaios de ON realizados com as amostras analisadas. Nos resultados encontrados, todas amostras promoveram liberação de óxido nítrico nas concentrações mais elevadas.

Como esperado, as amostras contendo iPDE-5 apresentaram liberação de ON nas concentrações mais elevadas, uma vez que eles estimulam a ação do ON, prevenindo a hidrólise cGMP (PERK et al., 2008). De acordo com Farquharson e Struthers (2000), a espirolactona (amostra S2) também demonstrou aumentar a bioatividade do ON, o que é vantajoso para pacientes com insuficiência cardíaca, uma vez que melhora a disfunção endotelial.

O estresse oxidativo celular ocorre quando espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ERNs) se acumulam em excesso no organismo. Quando o ON reage com o ânion superóxido formando peróxinitrito (ONOO^-), um poderoso agente oxidante, ocorre deficiência de óxido nítrico por inativação, podendo acarretar em diversos malefícios como hipertensão, proteinúria e insuficiência renal crônica (MODLINGER; WILCOX; ASLAM, 2004). Dessa forma, as amostras que promoveram liberação de EROs e de ON, como as amostras S3, S4 e S7 podem levar aos danos acima descrito para aqueles que os consomem.

Figura 33 – Quantificação da liberação de óxido nítrico após o tratamento. Os resultados são expressos em percentual do controle negativo (100%). Os dados são apresentados como % do grupo controle não tratado (CN), expressos como média \pm desvio padrão. As análises foram realizadas por Anova de uma via seguido do teste de post hoc de Dunnett. Valores com $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes. Sendo * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

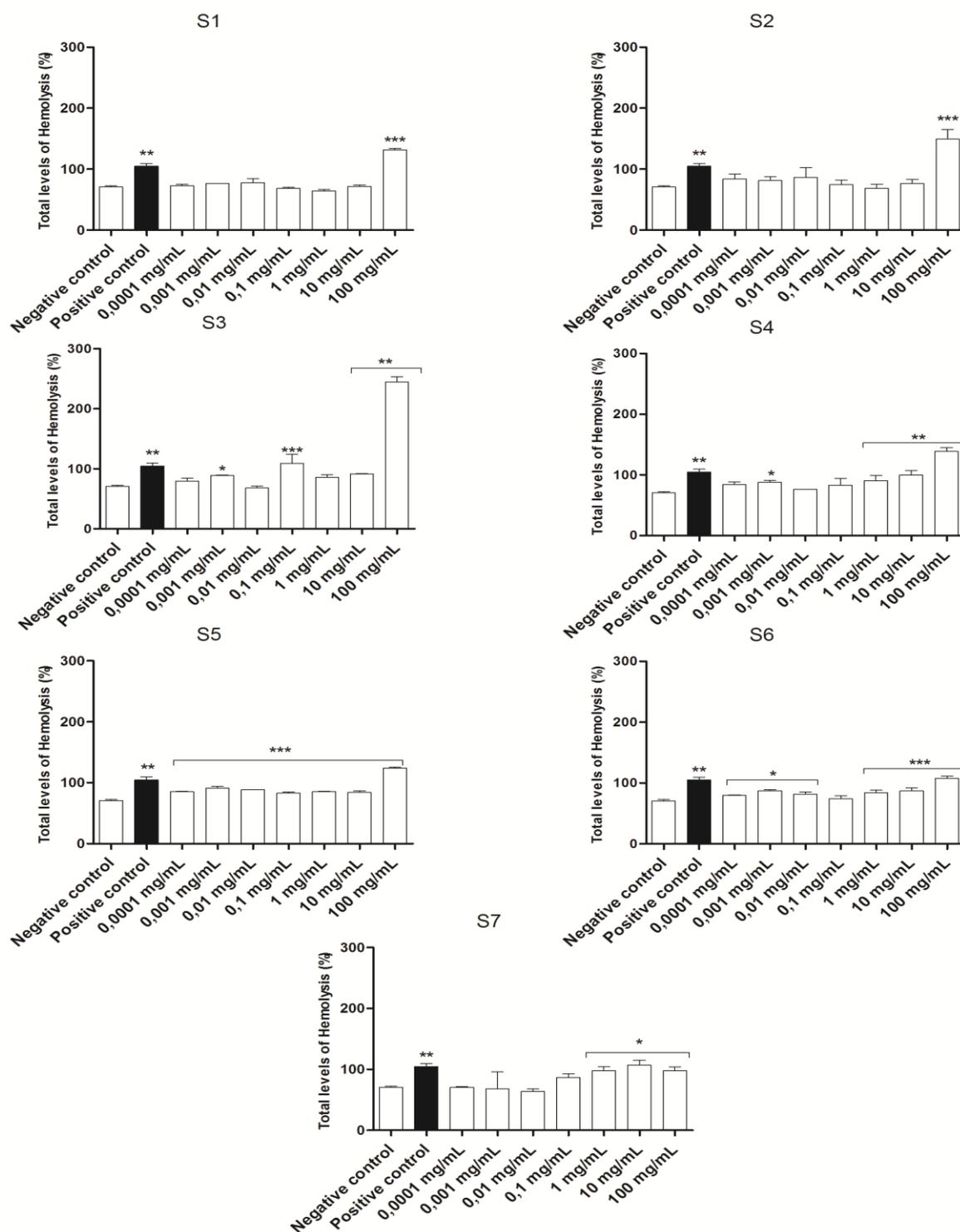


Fonte: Do autor.

A hemólise consiste na liberação de hemoglobina dos eritrócitos no plasma. A hemoglobina liberada pode causar irritação vascular, anemia, icterícia e insuficiência renal aguda (AMIN; DANNENFELSER, 2006). A Figura 34 apresenta os resultados do ensaio de hemólise dos eritrócitos tratados com os suplementos alimentares adulterados.

A ação hemolítica da testosterona é descrita há muito tempo. De acordo com Biagi, Guerra e Barbaro (1970) a atividade hemolítica ocorre como consequência da inserção do esteroide na interface lipídio-aquosa da superfície dos eritrócitos. As amostras S4 e S7, que continham propionato de testosterona, apresentaram hemólise celular significativamente maior quando comparado ao controle negativo, nas concentrações mais elevadas. Entre os resultados observados, destacam-se as amostras S5 e S6, que apresentaram hemólise em quase todas concentrações. Em um estudo recente, foi observado que o sildenafil (amostra S5) causa hemólise *in vitro* dos eritrócitos em altas concentrações, com alterações significativas como alteração no formato celular e redução no tamanho da célula (GUHA; KOHAD; BHAR, 2016). Nas outras amostras estudadas, a hemólise foi observada apenas nas concentrações mais elevadas, sugerindo uma maior atenção ao consumo desenfreado desses produtos.

Figura 34 - Resultados da quantificação da hemólise dos eritrócitos após os tratamentos. Os resultados são expressos em percentual do controle negativo (100%). Os dados são apresentados como % do grupo controle não tratado (CN), expressos como média \pm desvio padrão. As análises foram realizadas por Anova de uma via seguido do teste de post hoc de Dunnett. Valores com $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes. Sendo * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.



No geral, todas as amostras de suplementos alimentares analisadas apresentaram danos celulares por diferentes mecanismos. Quanto maior a concentração, mais evidente a citotoxicidade observada. Sildenafil e tadalafil apresentaram baixo risco de toxicidade na análise via modelo computacional, entretanto promoveram diminuição da viabilidade celular e liberação da fita dupla de DNA. O propionato de testosterona, presente nas amostras S4 e S7 também apresentou baixo risco nos estudos *in silico*, contudo, as amostras que continham este adulterante, apresentaram danos celulares significativos em todos os ensaios. Um agravante para os achados é o consumo irracional de suplementos alimentares e as suas associações com outros produtos. Além dos riscos já descritos acima, o abuso de suplementos alimentares pode trazer danos imensuráveis à saúde do consumidor, além de que a associação de consumo entre eles produto torna-se um desafio do ponto de vista de saúde pública, uma vez que a identificação por parte dos órgãos responsáveis de substâncias responsáveis por possíveis danos ou intoxicações torna-se praticamente inviável.

A Tabela 18 resume e compara alguns achados da predição de toxicidade *in silico* com os resultados do ensaio de citotoxicidade *in vitro*. Apesar da necessidade de maiores estudos envolvendo a matriz dos suplementos alimentares, é possível inferir preliminarmente de que os danos causados não são inerentes apenas à presença dos adulterantes, mas sim de forma conjunta entre a matriz e a substância detectada.

Tabela 18 - Resumo comparativo da toxicidade *in silico* e citotoxicidade *in vitro* das amostras de suplemento alimentares estudadas.

Amostra	Adulterante	Citotoxicidade <i>in silico</i>	Mutagenicidade <i>in silico</i>	Diminuição			Liberação de ON	Hemólise
				da viabilidade celular	Liberação de dsDNA	Liberação de EROs		
S1	Hidroclorotiazida	SIM	SIM	SIM	SIM	SIM	SIM	SIM ²
S2	Hidroclorotiazida	SIM	SIM	SIM	SIM	SIM	SIM	SIM ²
	Furosemida	NÃO	SIM					
S3	Espironolactona	NÃO	NÃO	SIM	SIM	SIM	SIM	SIM
	Clembuterol	NÃO	SIM					
S4	Propionato de testosterona	NÃO	NÃO	SIM	SIM	SIM	SIM	SIM ²
S5	Sildenafil	NÃO	NÃO	SIM	SIM	NÃO	SIM ¹	SIM
S6	Tadalafil	SIM	SIM	SIM	SIM	NÃO	SIM ¹	SIM
S7	Propionato de testosterona	NÃO	NÃO	SIM	SIM	SIM	SIM	SIM

¹ Ação farmacológica esperada observada apenas em elevadas concentrações.

² Efeito significativo apenas nas concentrações mais elevadas.

Fonte: Do autor.

As informações obtidas nesse trabalho, ainda que necessitem de investigações maiores, como estudo dos mecanismos de interação, avaliação toxicológica da matriz, entre outras, são suficientes para alertar os consumidores dos suplementos alimentares, principalmente quando estes contêm substâncias não permitidas. De acordo com Roberts e colaboradores (2019) a natureza complexa e variável dos suplementos alimentares de origem botânica, os relatos de efeitos adversos levaram a preocupações de impacto negativo à saúde do consumidor. Ainda, eles afirmam que o teste de toxicidade de grande número de produtos disponíveis é inviável devido às inúmeras combinações e formulações disponíveis. Apesar de algumas amostras apresentarem um aumento na proliferação celular durante o ensaio de viabilidade celular, a genotoxicidade secundária não deve ser descartada, uma vez que outros eventos citotóxicos foram observados como, por exemplo, hemólise celular, liberação de óxido nítrico e até mesmo liberação de espécies reativas de oxigênio.

Não só do ponto de vista toxicológico a presença de fármacos preocupa as autoridades, mas também as interações desconhecidas que podem ocorrer entre os constituintes de origem vegetal e o fármacos. Conforme Zhou e colaboradores (2007) alguns fármacos substratos para o citocromo P450s e/ou glicoproteína-P, quando interagem com determinadas espécies botânicas podem afetar significativamente na concentração plasmática dos fármacos. Nesses casos, estudos *in silico* e *in vitro* são ferramentas indispensáveis tanto para o desenvolvimento de novos produtos, como para a avaliação de efeitos adversos correlacionados àqueles já disponíveis no mercado.

Por fim, a subnotificação dos suplementos alimentares adulterados tornou-se um relevante problema de saúde pública, pois além de dificultar o rastreio dos produtos e retirada dos mesmos do mercado, diminuiu o conhecimento dos riscos tanto pelas autoridades responsáveis quanto pelo consumidor. Estudos que alertem aos consumidores dos riscos que estes produtos podem acarretar à saúde, além da disponibilização de alertas e ferramentas que possibilitem identificar a qualidade dos suplementos alimentares, sejam elas analíticas, observacionais ou descritivas são emergentes mundialmente.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Considerando os aspectos regulatórios dos suplementos alimentares, os produtos adquiridos demonstraram diversas não-conformidades em comparação com a legislação vigente, seja pelas atribuições não autorizadas e sem comprovação científica, presença de ingredientes não autorizados ou por ferramentas publicitárias que divergem das diretrizes da Anvisa. Uma das estratégias observadas para induzir o consumidor a compra é o uso de apelos comerciais não permitidos, pois nem sempre são comprovados cientificamente. Grande parte das atribuições declaradas pelos fabricantes referem-se a efeitos ergogênicos ou emagrecedores, o que ludibria o consumidor de que o produto realmente funciona. Contudo, para a maioria dos ingredientes estudados, não houve comprovação científica para tais alegações. Para o enquadramento legal dos produtos nas novas diretrizes serão necessárias diversas mudanças. Cerca de 98% (n = 43) das amostras não estavam em conformidade quanto as alegações utilizadas nos rótulos, e 34,1% (n = 15) continham ingredientes que não estavam presentes na lista de substâncias autorizadas em suplementos alimentares pela Anvisa. Ainda, foi possível a aquisição de dois produtos (4,5%) contendo medicamentos anabolizantes, substâncias estas proibidas em alimentos no Brasil, observando-se os riscos que a aquisição facilitada desses produtos pelo mercado virtual proporciona.

Quanto a avaliação da composição centesimal, a comparação entre as informações contidas nos rótulos e o teores reais não foi viável para todas amostras. Dos 44 suplementos alimentares adquiridos, 11,4% não apresentavam sequer tabelas contendo as informações nutricionais e 29,5% continham a tabela nutricional, mas não apresentavam os teores dos nutrientes exigidos pela legislação. Quanto aos teores de proteínas, quatro de dezesseis amostras (25%) amostras apresentavam valores até 78,7% abaixo do declarado. Já para os teores de lipídios, sete estavam não conformes com valores até 93,6% acima do declarado. Por fim, quanto aos teores de carboidratos, 10 estavam fora dos limites permitidos por lei, sendo que foram encontrados teores acima de 300% daquele informado no rótulo.

O presente trabalho desenvolveu e validou um método analítico sensível, específico e exato para investigação de possíveis adulterantes em suplementos alimentares. Em cinco minutos, o método é capaz de detectar 10 diferentes substâncias não autorizadas em suplementos alimentares em pequenas concentrações. Além disso, o método mostrou uma economia de até 40% quando comparado a outros métodos convencionais para este tipo de análise, como o LC-MS/MS. O método validado foi aplicado em 44 amostras de suplementos alimentares. Sete amostras (16%) possuíam pelo menos uma substância não permitida como,

por exemplo, clenbuterol, tadalafil, hidroclorotiazida, ioimbina entre outras. A presença desses fármacos foi comprovada através da extração da pureza do pico e comparação entre os espectros. A concentração exata de cada analito foi calculada por meio do método de adição do padrão, confirmando-se a adição proposital destas substâncias, uma vez que se encontravam em doses de escala terapêutica ou acima dessas. As amostras adulteradas apresentavam características comuns entre si, como: o uso de alegações não permitidas, induzindo a presença de substâncias farmacológicas; a grande maioria era proveniente de outros países, não continham informações referentes ao SAC ou responsável técnico pelo produto; e seis das sete amostras foram adquiridas em lojas não especializadas, como mídias sociais ou mercado negro virtual.

Para a avaliação da toxicidade das amostras estudadas, foram avaliadas as predições de toxicidade *in silico* dos fármacos encontrados nas amostras de suplementos alimentares, a fim de comparar com os resultados obtidos na citotoxicidade *in vitro*. Apesar de requerer estudos maiores, foi possível inferir que a toxicidade dos suplementos estudados não deve ser atribuída apenas à presença dos compostos adulterantes, mas sim a uma relação entre os multiingredientes presentes na matriz e os adulterantes encontrados. Todas as amostras de suplementos avaliadas apresentaram danos celulares por diferentes mecanismos, com maior destaque para as elevadas concentrações, alertando para o consumo desenfreado desses produtos;

A conscientização da população para o consumo indevido, e muitas vezes inapropriado, dos suplementos alimentares é o principal alerta a ser feito, uma vez que por se tratarem de alimentos, o consumidor acredita que não irão promover danos à saúde, diferentemente dos resultados aqui encontrados. Cabe ressaltar ainda que a associações entre os produtos torna-se uma prática extremamente perigosa para a saúde do consumidor, uma vez que devido ao desconhecimento das substâncias ali presente, os efeitos adversos atribuídos tornam-se imensuráveis e de difícil investigação por parte dos órgãos responsáveis.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABERNETHY, D.R. et al. Metal impurities in food and drugs. **Pharmaceutical Research**, v. 27, n. 5, p. 750-755, 2010.

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 em 28 jan 2020.

ACHESON, K.J. et al. Caffeine and coffee: their influence on metabolic rate and substrate utilization in normal weight and obese individuals. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 33, n.5, p. 989-997, 2016.

ADAMS, R.B.; EGBO, K.N.; DEMMING-ADAMS, B. High-dose vitamin C supplements diminish the benefits of exercise in athletic training and disease prevention. **Nutrition Food Science**, v. 44, n. 2, p. 95-101, 2013.

ALVES; C.; LIMA, R. V. B. Dietary supplements use by adolescents. **Jornal de Pediatria**, v. 85, n.4, p. 287-294, 2009.

AMIN, K; DANNENFELSER, R. M. *In vitro* hemolysis: guidance for pharmaceutical scientists. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 95, n. 6, 2006.

ANDERSSON, K. E. Pharmacology of penile erection. **Pharmacological Reviews**, vol. 53, p. 417–450, 2001.

ANVERSA, A. M. et al. The *in vitro* effect of guaraná (*Paullinia cupana*) extract on human peripheral blood mononuclear cells exposed to a high glucose level. **20th Brazilian Diabetes Society Congress**, v.7, n. A 2015.

AOAC. Guidelines for dietary supplements and botanicals. AOAC Official methods: Appendix K, p. 32, 2013

APPLEGATE, E. A.; GRIVETTI, L. E. Search for the competitive edge: a history of dietary fads and supplements. **American Society of Nutrition Sciences**, v. 127, p. 869-973, 1997.

ASAIKKUTTI A. et al. Effect of different levels dietary vitamin C on growth performance, muscle composition, antioxidant and enzyme activity of freshwater prawn, *Macrobrachium malcolmsonii*. **Aquaculture Reports**, v. 3, p. 229-236, 2016.

ASHOU, S. et al. Chromium picolinate reduces insulin resistance in polycystic ovary syndrome: Randomized controlled trial. **Journal of Obstetrics and Gynaecology**, v. 42, n.3, p. 279-285, 2016.

BALAYSSAC, S. et al. Analysis of herbal dietary supplements for sexual performance enhancement: first characterization of propoxyphenyl-thiohydroxyhomosildenafil and identification of sildenafil, thiosildenafil, phentolamine, and tetrahydropalmatine as adulterants. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 63, p. 135-150, 2012.

BASS, D. A. et al. Flow cytometric studies of oxidative product formation by neutrophils: a graded response to membrane stimulation. **The Journal of Immunology**. v. 130, p. 1910-1917, 1983.

BELL, A. et al. A look at nutritional supplements use in adolescents. **Journal of Adolescent Health**, v. 34, p. 508-516, 2004.

BIAGI, G. L.; GUERA, M. C.; BARBARO, A. M. Relationship between lipophilic character and hemolytic activity of testosterone and testosterone ester. **Journal of Medicine Chemistry**, v. 13, n. 5, 1970.

BOER, Y.S.; SHERKER, A.H. Herbal and dietary supplement – induced liver injury. **Clinical Liver Disturbes**, v. 21, p. 135-149, 2017.

BOND, P.; LLEWELLYN W.; MOL P.V. Anabolic androgenic steroid-induced hepatotoxicity. **Medical Hypothesis**, v. 93, p. 150-153, 2016.

BRASIL. Decreto-Lei nº 986, de 21 de outubro de 1969. Institui normas básicas sobre alimentos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 21 de out. de 1969. Disponível em: <<http://www2.camara.leg.br/legin/fed/declei/1960-1969/decreto-lei-986-21-outubro-1969-377556-publicacaooriginal-1-pe.html>>. Acesso em 19 de jan. de 2018.

BRASIL. Lei nº 6437, de 20 de agosto de 1977. Configura infrações à legislação sanitária federal, estabelece as sanções respectivas, e dá outras providências. **Casa Civil**, Brasília, DF, 1977. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/l6437.htm>. Acesso em 17 de out. 2019.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária (SVS/MS). Portaria nº 32, de 13 de janeiro de 1998. Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de Suplementos Vitamínicos e ou de Minerais. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 13 de jan. 1998.

BRASIL, ANVISA. Resolução nº 16, de 30 de abril de 1999. Aprova o regulamento técnico de procedimentos para registro de Alimentos e Novos ingredientes, constante do anexo desta Portaria. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 30 de abr. 1999(a).

BRASIL, ANVISA. Resolução nº 18, de 19 de novembro de 1999. Regulamento técnico que estabelece as diretrizes para análise e comprovação de propriedade funcionais e ou se saúde alegadas em rotulagem de alimentos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 19 de nov. 1999(b).

BRASIL, ANVISA. RDC nº 02, de 07 de janeiro de 2002. Regulamento técnico de substâncias bioativas e probióticos isolados com alegação de propriedade funcional e/ou saúde. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 07 jan. 2002(a). Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2718376/RDC_02_2002_COMP.pdf/68a25113-35e2-4327-a75f-ae22e714ca7c>. Acesso em 10 de nov. 2019.

BRASIL, ANVISA. Resolução nº 571, de 8 de abril de 2002. Suspensão de fabricação e venda de medicamentos contendo fenolftaleína. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 08 abr. 2002. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2002/571_02re.htm>. Acesso em: 07 de jun. 2018.

BRASIL, ANVISA. Resolução - RDC nº 259, de 20 de setembro de 2002. Aprova o regulamento técnico sobre rotulagem de alimentos embalados e revoga a Portaria nº 42, de 14 de janeiro de 1998. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil.**, Poder Executivo, Brasília, DF, 23 set 2002(b); Seção 1. p. 33.

BRASIL, ANVISA. Resolução nº 132, de 29 de maio de 2003. Institui a categoria de registro de medicamentos específicos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DGF, 29 de maio de 2003.

BRASIL, ANVISA. Resolução nº 360, de 23 de dezembro de 2003. Regulamento técnico sobre rotulagem nutricional de alimentos embalados. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**, Brasília, DF, 2003(b). Disponível: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/33880/2568070/res0360_23_12_2003.pdf/5d4fc713-9c66-4512-b3c1-afee57e7d9bc>. Acesso em 04 out. de 2019.

BRASIL, ANVISA. 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 abr. de 2010 (a). Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2718376/RDC_18_2010_COMP.pdf/1f6e1baf-fd83-4408-8e97-07578fe3db18>. Acesso em: 07 de jun. de 2018.

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(b).

BRASIL, ANVISA. **Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira 1ª Edição**. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Brasília, DF, 2011.

BRASIL, ANVISA. Anvisa alerta risco de consumo de suplemento alimentar. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**, Brasília, DF, 10 jul. 2012. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/anvisa+portal/anvisa/sala+de+imprensa/assunto+de+interesse/noticias/anvisa+alerta+para+risco+de+consumo+de+suplemento+alimentar%20>>. Acesso em: 15 de jun. de 2017.

BRASIL, ANVISA. Resolução nº 26, de 13 de maio de 2014. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos e registro e notificação de produtos tradicionais fitoterápicos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF 13 de maio de 2014a.

BRASIL, ANVISA. RDC nº 50, de 25 de setembro de 2014. Anvisa aprova novo regulamento técnico para anorexígenos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 26 set. 2014(b). Disponível em: <<http://pesquisa.in.gov.br/imprensa/jsp/visualiza/index.jsp?data=26/09/2014&jornal=1&pagi>>

na=66&totalArquivos=240>. Acesso em: 07 de jun. 2018.

BRASIL, ANVISA. Medicamentos sem registro tem divulgação suspensa. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**, Brasília, DF, 02 ago. 2016. Disponível em:

<http://portal.anvisa.gov.br/resultado-de-busca?p_p_id=101&p_p_lifecycle=0&p_p_state=maximized&p_p_mode=view&p_p_col_id=column-1&p_p_col_count=1&_101_struts_action=%2Fasset_publisher%2Fview_content&_101_assetEntryId=2918924&_101_type=content&_101_groupId=219201&_101_urlTitle=medicamentos-sem-registro-tem-divulgacao-suspensa&inheritRedirect=true>. Acesso em 01 de jul. de 2018.

BRASIL, ANVISA. Suplementos alimentares: Documento base para discussão regulatória. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**, Brasília, DF, 03 jul. 2017(a). Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/documents/3845226/0/Documento+Base.pdf/8a931dd3-6de7-4bd7-8546-23e91f73f331>>. Acesso em 18 de maio de 2018.

BRASIL, ANVISA. RDC nº 166, de 24 de julho de 2017. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 24 jul. 2017(b). Disponível em: <<https://www20.anvisa.gov.br/coifa/pdf/rdc166.pdf>>. Acesso em 06 de jul. de 2018.

BRASIL. Consultas Públicas. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 29 dez. 2017(c). Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/3898888/CONSULTA+PUBLICA+N+457+GGALI.pdf/33b58cec-33cd-4295-867c-4ff44e01ca88>>. Acesso em 18 de maio de 2018.

BRASIL, ANVISA. Publicadas novas regras para Suplementos Alimentares. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**, Brasília, DF, 02 de mar. 2018(a). Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/noticias/-/asset_publisher/FXrpx9qY7FbU/content/publicadas-novas-regras-para-suplementos-alimentares/219201?p_p_auth=mz8pyuL0&inheritRedirect=false>. Acesso em 18 de maio de 2018.

BRASIL, ANVISA. Fiscalização de Monitoramento: Produtos irregulares. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**, Brasília DF, 2018(b). Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/produtos-irregulares/-/produtos/#/>>. Acesso em 23 de maio de 2018.

BRASIL, ANVISA. Alimentos Para Atletas. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**, Brasília, DF, 2018(c). Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/alimentos-para-atletas>>. Acesso em: 29 de jun. de 2018.

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(d). 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 out. 2019.

BRASIL, ANVISA. RDC nº 242, de 26 de julho de 2018. Altera a Resolução - RDC nº 27, de 6 de agosto de 2010, que dispõe sobre as categorias de alimentos e embalagens isentos e com obrigatoriedade de registro sanitário. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 27 jul. 2018(e). 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 out. 2019.

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(f). Disponível em:

<http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/3898888/IN_28_2018_.pdf/84235aa6-978d-4240-bc02-1080a0d2cbfd>. Acesso em 04 de out. 2019.

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(g). Disponível em:

<http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/3898888/IN_28_2018_.pdf/84235aa6-978d-4240-bc02-1080a0d2cbfd>. Acesso em 04 de out. 2019.

BRASIL, ANVISA. Rotulagem de Alimentos. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**, Brasília, DF, 08 maio de 2019. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/rotulagem-de-alimentos>>. Acesso em 04 out 2019.

BRASIL, ANVISA. RDC nº 265, de 8 de fevereiro de 2019. Dispõe sobre a atualização do Anexo I (Lista de substâncias entorpecentes, psicotrópicas, percussores e outras de controle especial) da Portaria SVS/MS Nº 344, de 12 de maio de 1998. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 12 de fevereiro de 2019(b). Disponível em: <

<http://portal.anvisa.gov.br/documents/33868/3233591/65+-+RDC+N%C2%BA+265-2019-DOU.pdf/0077d532-de92-43eb-8ce9-c39f5501b1ba>>. Acesso em 10 de novembro de 2019.

BRASNUTRI. Números do setor de Suplementos Alimentares. **Associação Brasileira dos Fabricantes de Suplementos Nutricionais e Alimentos para fins Especiais**, São Paulo, 2017. Disponível em:

<http://www.brasnutri.org.br/arquivos/numeros_setor/2017_atualizado.pdf>. Acesso em 20 de mar. de 2018.

BROWN, A.C. An overview of herb and dietary supplement efficacy, safety and government regulations in the United States with suggested improvements. Part 1 of 5 series. **Food and Chemical Toxicology**, v.107, p. 449-471, 2017a.

BROWN, A.C. An overview of herb and dietary supplement efficacy, safety and government regulations in the United States with suggested improvements. Part 2 of 5 series. **Food and Chemical Toxicology**, v.107, p. 472-501, 2017b.

-
CACHOT, T.J. Hepatotoxicidad asociada a hierbas y suplementos dietéticos. **Medicine Clinical (Barcelona)**, v, 147, p.e372, 2016.

CADONÁ, F. C. et al. Genomodifier capacity assay: a non-cell test using dsDNA molecules to evaluate genotoxic/genoprotective properties of chemical compounds. **Analytical Methods**, v 6, n. 8859, 2014.

CALAPAI, G. Antiobesity and cardiovascular toxic effects of Citrus aurantium extracts in the rat: a preliminary report. **Fitoterapia**, v. 70, p. 586-592, 1999.

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, nov. 2012.

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

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

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

CHOI, S.J. et al. Oral branched-chain amino acid supplements that reduce brain serotonin during exercise in rats also lower brain catecholamines. **Amino acids**, v. 45, p.1133-1142, 2013.

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

COHEN, P. A., et al.. Pharmaceutical quantities of yohimbine found in dietary supplements in the USA. **Drug Testing and Analysis**, v. 8, p. 357-369, 2016.

COLLINS, C. Cem anos das palavras cromatografia e cromatograma. **Química Nova**, v.29, n.4, p.889-890, 2006.

CORREIA, D. **Determinação voltamétrica de 1,4-benzodiazepínicos e dietilpropiona como adulterantes em fitoterápicos para emagrecimento**. Dissertação de mestrado, Departamento de Pós Graduação em Química, Universidade Federal de Santa Maria, 2008.

DAL MOLIN, T. R. **Investigação de adulterantes em suplementos alimentares por cromatografia de troca iônica com detecção condutométrica**. 2016. 94 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) -Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2016.

DAL MOLIN, T. R. et al. Marco regulatório dos suplementos alimentares e o desafio à saúde pública. **Revista de Saúde Pública**, v. 53, 2019.

DAL MOLIN, T. R. et al. A new approach do ion chromatography with conductivity detection for adulterants investigation in dietary supplements. **Biomedical Chromatography**, v. e4669, p. 1-10, 2019b.

DAMIANO F. et al. Analysis of illicit dietary supplements sold in the Italian market: Identification of a sildenafil thioderivate as adulterant using UPLC-TOF/MS and GC/MS. **Science and Justice**, v. 54, p. 228-237, 2014.

DEARDEN, J. C. *In silico* prediction of drug toxicity. **Journal of Computer Aided Molecular Design**, v. 17, p. 119-127, 2003.

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.

DECONINCK, E. et al. Development of stationary phase optimized selectivity liquid chromatography based screening method for adulterants of food supplements for the treatment of pain. **Talanta**, v. 138, p. 240-246, 2015.

DELDICQUE, L.; FRANCAUX, M. Potential harmful effects of dietary supplements in sports medicine. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**, v. 19, n. 6, p. 439-445, 2016.

DEUSTER, P.A. et al. A-Z of nutritional supplements: dietary supplements, sports nutrition foods and ergogenic aids for health and performance: Part 46. **Brazilian Journal of Sports Medicine**, v. 47, p. 809-810, 2013.

DEVASAGAYAM, T. P. A. et al. Caffeine as an antioxidant: inhibition of lipid peroxidation induced by reactive oxygen species. **Biochimica and Biophysica Acta**, v. 1282, p. 63-70, 1996

DICKINSON, A. History and overview of DSHEA. **Fitoterapia**, v. 82, p. 5-10, 2011.

DILorenzo C. et al. Development and validation of HPLC method to measure active amines in plant food supplements containing Citrus aurantium L **Food Control**, v. 46, p. 136-142, 2014.

DISILVESTRO, R. A.; DY, E. Comparison of acute absorption of commercially available chromium supplements. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 21, p. 120-124, 2007.

DOMINGUES, S. F., MARINS, J. C. B. Utilização de recursos ergogênicos e suplementos alimentares por praticantes de musculação em Belo Horizonte – MG. **Fitness & Performance**, v. 6, n. 4, p. 219-226, 2007.

DRISCOL, M.S. et al.. Nutrition and the deleterious side effects of nutritional supplements. **Clinical Dermatology**, v. 28, p. 371-379, 2010.

DUNN, J. D. et al. Using a portable ion mobility spectrometer to screen dietary supplements for sibutramine. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 54, p. 469-474, 2011.

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.

EARDLEY, I. et al. Pharmacotherapy for erectile dysfunction. **The Journal of Sexual Medicine**, vol. 7, p. 524–540, 2010.

EMBRAPA. **Princípios da Secagem dos Alimentos**. Planaltina, DF. Ed: Embrapa Cerrados, 2010, 51p.

ESPOSTI, M. D. Measuring mitochondrial reactive oxygen species. **Methods**. v. 26, p. 335-340, 2002.

FARQUHARSON, C. A. J.; STRUTHERS, A. D. Spironolactone increases nitric oxide bioactivity, improves endothelial vasodilator dysfunction, and suppress vascular angiotensin I/angiotensin II conversion in patients with chronic heart failure. **Circulation**, v. 15, 2000.

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

FERNSTROM, J.D. Large neutral amino acids: dietary effects on brain neurochemistry. **Amino acids**, v. 45, p.419-430, 2013.

FLESHNER, N. et al. Evidence for contamination of herbal erectile dysfunction products with phosphodiesterase type 5 inhibitors. **The Journal of Urology**, vol. 174, p. 636–641, 2006.

FRIZON, F., MACEDO, S. M. D., Uso de esteroides andrógenos anabólicos por praticantes de atividade física das principais academias de Erechim e Passo Fundo/RS. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 26, n. 3, p. 227-232, 2005.

FRONZA, A. B.; et al. **Associação entre audição, tabagismo e genotoxicidade em adultos jovens**. 2010. 121f. Dissertação (Mestrado em Distúrbios da Comunicação Humana). Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2010.

GAO, J. et al. Icariside II, a novel phosphodiesterase-5 inhibitor, protects against H₂O₂-induced PC12 cells death by inhibiting mitochondria-mediated autophagy. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 21, n. 2, p. 375-386, 2017.

GARCÍA-CORTÉS, M. et al. Hepatotoxicity by dietary supplements: a tabular listing and clinical characteristics. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 537, p. 1-23, 2016.

GE, X. et al. Structural elucidation of a PDE-5 inhibitor detected as an adulterant in a health supplement. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 48, p. 1070-1075, 2008.

GEYER, H. et al. Analysis of non-hormonal nutritional supplements for anabolic-androgenic steroids – Results of an International Study. **International Journal of Sports Medicine**, v. 25, p. 124-129, 2004.

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

GOLDSTEIN, E.R et al. International society of sports nutrition position stand: caffeine and performance. **Journal of International Society of Sports Nutrition**. v.7, n.5, p.1-5, 2010.

GLISSON, J. K.; WALKER, L. A. How physicians should evaluated dietary supplements. **The American Journal of Medicine**, v. 123, n. 7, July 2010.

GOLDSTEIN, I. Oral phentolamine: an alpha-1, alpha-2 adrenergic antagonist for the treatment of erectile dysfunction. **International Journal of Impotence Research**, vol. 12, p. 75–80, 2000.

GOMEZ-CABRERA, M.C. et al. Oral administration of vitamin C decreases muscle mitochondrial biogenesis and hampers training-induce adaptations in endurance performance. **American Journal Clinical Nutrition**, v. 87, p.142-149, 2008.

GOSETTI, F. et al. Ultra high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry determination and profiling of prohibited steroids in human biological matrices. A review. **Journal of Chromatography B**, v. 927, p. 22-36, 2013.

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

GRATZ, S. R., FLURER, C. L., WOLNIK, K. A. Analysis of undeclared synthetic phosphodiesterase-5 inhibitors in dietary supplements and herbal matrices by LC-ESI-MS and LC-UV. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, vol. 36, p. 525–533, 2004.

GRAY, S.; WOOLF, A.D. Citrus aurantium used for weight loss by an adolescent with anorexia nervosa. **Journal of Adolescent Health**, v. 37, p. 415-416, 2005.

GRYNIEWICZ, C. M. et al. Detection of undeclared erectile dysfunction drugs and analogues in dietary supplements by ion mobility spectrometer. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 49, p. 601-606, 2009.

GUHA, T.; KOHAD, H.; BHAR, R. Sildenafil citrate (Viagra) reduces surface roughness of human erythrocytes: Atomic-force-microscopic study. **Journal of Microscopy and Ultrastructure**, v. 4, p. 63-68, 2016.

GUO, B., et al. Wide-scope screening of illegal adulterants in dietary supplements and herbal supplements via rapid polarity-switching and multistage accurate mass confirmation using an

LC-IT/TOF hybrid instrument. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 63, p. 6957-6967, 2015.

GURLEY B. J.; STEELMAN, S. C.; THOMAS, S. L. Multi-ingredient, caffeine-containing dietary supplements: history, safety and efficacy. **Clinical Therapeutics**, v. 37, n. 2, p. 275-301, 2015.

HAAZ, S. et al. Citrus aurantium and synephrine alkaloids in treatment of overweight and obesity: an update. **Obesity Reviews**, v.7, p. 79-88, 2006.

HAMZA, R.T., HAMED, A.I., SALLAM, M.T. Effect of zinc supplementation on growth hormone insulin growth factor axis in short Egyptian children with zinc deficiency. **Italian Journal of Pediatric**, v. 38, n. 21, 2012.

HANSEN, D.K. et al. Physiological effects following administration of Citrus aurantium for 28 days in rats. **Toxicological Apply Pharmacy**, v. 261, p.236-247, 2012.

HARRIS, D.C. **Análise Química Quantitativa**. 8ª ed. Rio de Janeiro: LTC, 2012, 898p.

HONG, E. et al. Modern analytical methods for the detection of food fraud and adulteration by food category. **Journal of Science Food and Agriculture**, v. 97, p. 3877-3896, 2017.

HUANG, Z. et al. Simultaneous determination of sibutramine and N-di-desmethylsibutramine in dietary supplements for weight control by HPLC-ESI-MS. **Journal of Chromatographic Science**, v. 46, set. 2008.

IHRSA – International Health, Racquet & Sportsclub Association. **The 2016 IHRSA Global Report**. 2016. Disponível em: <<https://www.ihrsa.org/publications/the-2017-ihrsa-global-report>>. Acesso em: 18 de maio de 2018.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos físico- químicos para análise de alimentos**. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008, 1020p.

INMETRO. **Programa de Análise de Produtos: Relatório final sobre a análise em suplementos proteicos para atletas – whey protein**. 2014. Disponível em: <http://www.inmetro.gov.br/consumidor/produtos/Relatorio_Whey_Final.pdf>. Acesso em 17 out. 2019.

ISHIKAWA T., YUASA I., ENDOH M. Non-specific drug distribution in an autopsy case report of fatal caffeine intoxication. **Legal Medicine**, v. 17, p. 535-538, 2015.

ISO. Document 10993-5:1999, **Biological evaluation of medical devices**, Part 5, Tests for cytotoxicity: in vitro methods, 1999.

JAIN, S.K; RAINS, J.L; CROAD, J.L. Effect of chromium niacinate and chromium picolinate supplementation on lipid peroxidation, TNF- α , IL-6, CRP, Glycated hemoglobin, triglycerides and cholesterol levels in blood of Streptozotocin-treated Diabetic rats. **Free Radical Biologic Medicine**, v. 43, n.8, p.1124-1131, 2007.

JOCKENHÖVEL, F. Testosterone therapy-what, when and to whom? **Aging Male**, v. 7, n.4, p. 319-324, 2004.

KAFROUNI, M. I.; ANDERS, R. A.; VERMA, S. Hepatotoxicity associated with dietary supplements containing anabolic steroids. **Clinical Gastroenterology and Hepatology**, v. 5, p. 809-812, 2007.

KANAYAMA, G. et al. Long-term psychiatric and medical consequences of anabolic-androgenic steroid abuse. A looming public health concern? **Drug Alcohol Dependence**, v. 98, p.1-12, 2008.

KANDAROVA, H.; LETASIOVA, S. Alternative methods in toxicology: pre-validated and validated methods. **Interdisciplinary toxicology**, v. 4, n.3, p. 107-113, 2011.

KATZUNG, B. G. et al. **Farmacologia Básica e Clínica**. 12 ed. Porto Alegre: AMGH Editora, 2004, 1244p.

KEE, C. L. et al. A review of synthetic phosphodiesterase type 5 inhibitors (PDE-5i) found ad adulterants in dietary supplements. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 147, p. 250-277, 2018.

KERN, S. E. et al. Isolation and structural characterization of a new tadalafil analogue (2-hydroxyethylnortadalafil) found in dietary supplement. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 103, p. 99-103, 2015.

KIM, E. H., et al. Reliable screening and confirmation of 156 multi-class illegal adulterants in dietary supplements based on extracted common ion chromatograms by ultra-high-performance liquid chromatography-quadrupole/time of flight-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1491, p. 43-56, 2017.

KLEIVELAND CR. Peripheral Blood Mononuclear Cells. In: Verhoeckx K, Cotter P, López-Expósito I, et al.,. **The Impact of Food Bioactives on Health: in vitro and ex vivo models** Norway:Springer. Chapter 15, 2015.

KLONTZ, K. C. et al. The role of adverse event reporting in the FDA response to a multistate outbreak of liver disease associated with dietary supplement. **Public Health Reports**, v. 130, p. 526-532, 2015.

KOEHLER K. et al. Serum testosterone and urinary excretion of steroid hormone metabolites after administration of high-dose zinc supplement. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 63, p. 65-70, 2009.

KREIDER, R. B. et al. ISSN exercise & sport nutrition review: research & recommendations. **Journal of International Society of Sports Nutrition**, v. 7, n. 7, 2010.

KRUMBACH, C.J., ELLIS, D.R., DRISKELL, J.A.A report of vitamin and mineral supplement use among university athletes in a Division I Institution. **International Journal of Sport Nutrition**, v. 9, p. 416-425, 1999.

KUROBE, K. et al. Combined effect of coffee ingestion and repeated bouts of low-intensity exercise on fat oxidation. **Clinical Physiological Function Imaging**, v. 37, p.148-154, 2017.

LATTAVO A.; KOPPERUD A.; ROGERS, P.D. Creatine and others supplements. **Pediatric Clinical of North America**, v. 54, p. 735-760, 2007.

LEÃO, M. F. M. et al. Cytotoxicity and genotoxic effect of antihypertensives distributed in Brazil by social programs: Are they safe? **Environmental toxicology and pharmacology**, v. 63, p. 1-5, 2018.

LEDOUX, M A. et al. A quality dietary supplement: before you start and after it's marketed – a conference report. **European Journal of Nutritional**, v. 54, S1-S8, 2015.

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

LI, N. et al. A rapid and reliable UPLC-MS/MS method for the identification and quantification of fourteen synthetic anti-diabetic drugs in adulterated Chinese proprietary medicines and dietary supplements. **Biomedical Chromatography**, v. 24, n. 11, p. 1255-1260, 2010.

LITTLE, J. G. et al. *In silico* approach to safety of botanical dietary supplement ingredients utilizing constituent-level characterization. **Food Chemical and Toxicology**, v. 107, p. 418-429.

LIU, B. et al. Determination of clenbuterol in porcine tissues using solid-phase extraction combined with ultrasound-assisted dispersive liquid-liquid microextraction and HPLC-UV detection. **Journal of Chromatography B**, v. 879, p. 90-94, 2011.

LIU, B. et al. Chemical properties and biotoxicity of several chromium picolinate derivatives. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 164, p.110-118, 2016.

LU, Y. L. et al. Detection of adulteration of anti-hypertension dietary supplements and traditional Chinese medicines with synthetic drugs using LC/MS. **Food Additives and Contaminants**, v. 27, n. 7, p. 893-902, Jul. 2010.

LUKASKI H.C., et al. Chromium supplementation and resistance training: effects on body composition, strength, and trace element status of men. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 63, p. 954-965, 1996.

LUKASKI, H.C. Chromium as a supplements. **Annual Review Nutrition**, v. 19, p.279-302, 1999.

MATHEUS, M. E., et al. Ação dos extratos de açaí (*Euterpe oleraceae* Mart.) sobre a produção de óxido nítrico em células RAW 264.7. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 13, p. 03-05, 2003.

MATHON, C. et al. Screening and determination of sibutramine in adulterated herbal slimming supplements by HPTLC-UV densiometry. **Food Additives and Contaminants: Part A**, v. 31, n. 1, 2013.

MAUGHAM, R.J.; KING, D. S.; LEA, T. Dietary supplements. **Journal of Sports Sciences**, v. 22, p. 95-113, 2004

MENASHE, B.W. et al. Phenylephrine (Neo-synephrine) terminated ventricular tachycardia. **Circulation**, v. 50, p. 656-666, 1974.

MIKKELSEN, M. et al. Spironolactone induces apoptosis in human mononuclear cells. Association between apoptosis and cytokine suppression. **Apoptosis**, v. 11, p. 573-579, 2007.

MILLER, J.N.; MILLER, J.C. **Statistics and chemometrics for analytical chemistry**. 5th edition. England: Pearson, 2005.

MODLINGER, P. S.; WILCOX, C. S.; ASLAM, S. Nitric oxide, oxidative stress, and progression of chronic renal failure. **Seminars in Nephrology**, v.24, n. 4, 2004.

MORALES, A. Yohimbine in erectile dysfunction: the facts. **International Journal of Impotence Research**, v. 12, s. 1, S70-74, 2000.

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

MOREIRA, A. P. L.; MARTINI, M.; CARVALHO, L. M. Capillary electrophoresis 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. Simultaneous analysis of antihypertensive drugs and diuretics as adulterants in herbal-based products by ultra-high performance liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. **Analytical Methods**, v. 8, p. 881-1888, 2016.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays". **Journal of Immunological Methods**, v. 65, v. 1–2, p. 55–63, 1983.

MOYAD, M. A. et al. Prevention and treatment of erectile dysfunction using lifestyle changes and dietary supplements: what works and what is worthless, part II. **Urologic Clinics of North America**, v. 31, p. 259-273, 2004.

MULLEN, J. E. et al. Perturbation of the hematopoietic profile by anabolic androgenic steroids. **Journal of Hormones**, 2014.

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.

- 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, 2018b.
- MÜLLER, L. S. et al. An Ultra-High Performance Liquid Chromatography–Electrospray Tandem Mass Spectrometric Method for Screening and Simultaneous Determination of Anorexic, Anxiolytic, Antidepressant, Diuretic, Laxative and Stimulant Drugs in Dietary Supplements Marketed for Weight Loss. **Journal of Chromatographic Science**, v. 6, p. 528-540, 2019.
- 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.
- NASSEB, M.A.; VOLPE, S.L. Protein and exercise in the prevention of sarcopenia and aging. **Nutrition Research**, v. 40, p.1-20, 2017.
- NAVARRO, V. J. et al. Liver injury from herbals and dietary supplements in the U.S. Drug-Induced Liver Injury network. **Hepatology**, v. 60, n.4, 2014.
- 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.
- NEVES, D.B.J; CALDAS, E.D. Determination of caffeine and identification of undeclared substances in dietary supplements and caffeine dietary exposure assessment. **Food and Chemical Toxicology**, v. 105, p. 194-202, 2017.
- NOGUEIRA, F. R. S. et al. Prevalência do uso de recursos ergogênicos em praticantes de musculação na cidade de João Pessoa, Paraíba. **Revista Brasileira de Ciência do Esporte**, v. 37, n. 1, 56-64, 2016.
- OECD. Organization for Economic Co-operation and Development. <No 29> Guidance document on using cytotoxicity tests to estimate starting doses for acute oral systemic toxicity tests. 2010.
- OLIVEIRA, L. C. B. P. et al. Análise centesimal comparativa de suplementos de proteínas do soro do leite bovino: whey protein. **Revista Brasileira de Nutrição Esportiva**, v. 9, n. 51, p. 223-231, 2015.
- ORTIZ, R.S.; ANTUNES, M.V.; LINDEN, R. Determinação de citrato de sildenafil e de tadalafila por cromatografia líquida de ultraeficiência com detecção por arranjo de diodos (CLUE-DAD). **Química Nova**, v. 33, n.2, p.389-393, 2010.
- PADDON-JONES D. et al. Role of dietary protein in the sarcopenia of aging. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 87, n.5, p.1562S-1566S, 2008.

PADDON-JONES D.; RASMUSSEN, B.B. Dietary protein recommendations and the prevention of sarcopenia: Protein, amino acid metabolism and therapy. **Current Opinion of Clinical Nutritional and Metabolic Care**, v. 12, n.1, p. 86-90, 2009.

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

PAIVA, A. N. et al. Beneficial effects of oral chromium picolinate supplementation on glycemic control in patients with type 2 diabetes: A randomized clinical study. **Journal of Trace Elemnet Medical Biology**, v. 35, p. 66-72, 2015.

PALMAS, A., ASSIS, M. Uso de esteroides anabólicos androgênicos e aceleradores metabólicos entre os professores de educação física que atuam em academia de ginástica. **Revista Brasileira de Ciências do Esporte**, v. 27, n. 1, 2005.

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, e28-e31, 2018.

PATEL, D. N. et al. Screening of synthetic PDE-5 inhibitors and their analogues as adulterants: Analytical techniques and challenges. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 87, p. 176-190, 2014.

PATEL, S. Functional food relevance of whey protein: A review of recent findings and scope ahead. **Journal of Functional Foods**, v. 19, p. 308-319, 2015.

PAWAR, R.S.; GRUNDEL, E. Overview of regulation of dietary supplements in the USA and issues of adulteration withy phenethylamines (PEAs). **Drug Testing and Analysis**, v. 9, 500-517, 2017.

PAPPIS, L. **Avaliação do perfil de segurança e do potencial cicatrizante e anti-inflamatório do extrato bruto das folhas da espécie *Randia ferox* (cham & schlecht) dc.** 2019. 65p. Qualificação (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2019.

PETRÓCZI, A.; TAYLOR G.; NAUGHTON, D. P. Mission impossible? Regulatory and enforcement issues to ensure safety of dietary supplements. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, p. 393-402, 2011.

PERK, H. et al. Sildenafil citrate as phosphodiesterase inhibitor has an antioxidant effect in the blood of men. **Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics**, v. 33, p. 635-640, 2008.

PIERSMA, A. H. Alternative methods do developmental toxicity testing. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 98, p. 427-431, 2006.

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

PITCHFORD, N.W. et al. Effect of caffeine on cycling time-trial performance on heat. **Journal of Science and Medicine Sports**, v. 17, p. 445-449, 2014.

POPLAWASKA, M. et al. Determination of flibanserin and tadalafil in supplements for women sexual desire enhancement using high-performance liquid chromatography with tandem mass spectrometer, diode array detector and charged aerosol detector. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 94, p. 45-53, 2014.

POORTMANS, J.R. et al. Protein turnover, amino acid requirements and recommendations for athletes and active population. **Brazilian Journal of Medical Biological Research**, v.45, n.10, p. 875-890, 2012

RAHNEMA, C. D.; CROSNOE, L. E.; KIM, E. D. Designer steroids – over-the-counter supplements and their androgenic component: review and increasing problem. **Andrology**, v. 3, p. 150-155, 2014.

RAMANATHAN, K. et al. A fluorescence based assay for DNA damage induced by radiation, chemical mutagens and enzymes. **Current Applied Physics**, v. 3, p. 99-106, 2003.

RANG, H. P. et al. Pharmacology, Seventh ed., **Elsevier**, 2012.

RAUF, S. et al. Studies on sildenafil citrate (Viagra) interaction with DNA using electrochemical DNA sensor. **Biosensor and Bioelectronics**, v. 22, 2471-2477, 2007.

REEPMEYER, J.; WOODRUFF, J.T. Use of liquid chromatography-mass spectrometry and a chemical cleavage reaction for the structure elucidation of a new sildenafil analogue detected as an adulterant in an herbal dietary supplement. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 44, p. 887-893, 2007.

REEPMEYER, J.; WOODRUFF, J. T.; D`ÁVIGNON, D. A. Structure elucidation of a novel analogue of sildenafil detected as an adulterant in an herbal dietary supplement. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, vol. 43, p. 1615–1621, 2007.

RIBANI, M. et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, 771-780, 2004.

ROBERTS, G. K. et al. Finding a bad actor: Challenges in identifying toxic constituents in botanical dietary supplements. **Food and Chemical Toxicology**, v. 124, p. 431-438, 2019.

ROCHA, T.; AMARAL, J. S.; OLVEIRA, B. P. P. Adulteration of dietary supplements by the illegal addition of synthetic drugs: A review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 15, 2016.

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.

SABUCEDO, A. J. et al. Sex, lies and niagra. **The Journal of the American Medical Association**, vol. 291, p. 560–562, 2004.

SALGUEIRO, A. C. F. et al. *In vitro* and *in silico* antioxidante and toxicological activities of *Achyroline satureioides*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 194, p. 6-14, 2016.

- SBME – Sociedade Brasileira de Medicina do Exercício e do Esporte. Modificações dietéticas, reposição hídrica, suplementos alimentares e drogas: comprovação da ação ergogênica e potenciais riscos para a saúde. **Revista Brasileira Medicina do Esporte**, v. 9, n° 2 Março/Abril, 2003.
- SCOFIELD, D. E.; UNRUH, S. Dietary supplements use among adolescent athletes in central Nebraska and their sources of information. **Journal of Strength and Conditional Research**, v. 20, p. 452-455, 2006.
- SHI, Y. et al. Development of a liquid chromatography tandem mass spectrometry method for simultaneous determination of eight adulterants in slimming food supplements. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, n. 42, p. 7655-7662, 2011.
- SHINDE, U. A. et al. Insulin sensitizing action of chromium picolinate in various experimental models of diabetes mellitus. **Journal of Trace Element Medicine Biology**, v. 8p. 23-32, 2004.
- SIQUEIRA, F. S. et al. Sulfamethoxazole derivates complexed with metals: a new alternative against biofilms of rapidly growing mycobacteria. **Biofouling**, 2018.
- SINGH, S. et al. Strategies for characterizing sildenafil, vardenafil, tadalafil and their analogues in herbal dietary supplements, and detecting counterfeit products containing these drugs. **Trends in Analytical Chemistry**, vol. 28, n° 1, 2009.
- SILVA, L. V.; SOUZA, S. V. C. Qualidade de suplementos proteico: avaliação da composição e rotulagem. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 75, n. 1703, 2016.
- SKOOG, D.A.; HOOLER, F.J.; NIEMAN, T.A. **Principles of instrumental analysis**. 4th ed. New York: Fort Worth, 1992.
- SONG, F. et al. Screening of multiple weight loss and related drugs in dietary supplement materials by flow injection tandem mass spectrometry and their confirmation by liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 88, p. 136-143, 2014.
- SPILLANEE, M.; EMERSON, C.; WILLOUGHBY, D.S. The effects of 8 weeks of heaving resistance training and branched-chain amino acid supplementation on body composition and muscle performance. **Nutritional Health**, v. 21, n.4, p. 263-273.
- STOHS, S.J. Assessment of the adverse event reports associated with Citrus aurantium (bitter orange) from April 2004 to October 2009. **Journal of Functional Foods**, v.2, p. 235-238, 2011.
- SVORC, L., KALCHER K. Flow-injection amperometric determination of yohimbine alkaloid in dietary supplements using a boron-doped diamond electrode. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 205, p. 215-218, 2014.
- TAGHIYAR M, et al. The effect of vitamin C and E supplementation on muscle damage and oxidative stress in female athletes: a clinical trial. **International Journal of Prevent Medicine**, v. 4, s. 1, p. S16-S23, 2013.

THOMPSON, R. D.; CARLSON, M. Liquid chromatography determination of Dehydroepiandrosterone (DHEA) in dietary supplements products. **Journal of AOAC International**, v. 83, n. 4, 2000.

TIPTON, K.D. et al. Ingestion of casein and whey proteins result in muscle anabolism after resistance exercise. **Official Journal of the American College of Sports Nutrition**, v. 36, n. 12, p. 2073-2081, 2004.

TUCKER, J. et al. (2018). Unapproved pharmaceutical ingredients included in dietary supplements associated with US Food and Drug Administration Warnings. **JAMA Network open**, v. 1, n. 6, 2018.

USA. NADA 140-973 Ventipulmin® syrup – original approval, **Estados Unidos da América**, 11 may 2002. Disponível em: <<https://www.fda.gov/animalveterinary/products/approvedanimaldrugproducts/foiadrugsummaries/ucm054881.htm>>. Acesso em: 15 de junho de 2018.

USA. Dietary Supplement Health and Education Act, **United States Food and Drugs Administration**. 1994. Disponível em: <https://ods.od.nih.gov/About/DSHEA_Wording.aspx>. Acesso em 19 de jan. de 2018.

USA. FDA prohibit sales of dietary supplements containing Ephedra. **United States Food and Drug Administration**. 2004. Disponível em: <https://ods.od.nih.gov/Health_Information/Ephedra.aspx>. Acesso em 15 de junho de 2018.

USA, Dietary Supplements. **United States Food and Drugs Administration**, Estados Unidos da América, 22 set. 2014. Disponível em: <<http://www.fda.gov/Food/DietarySupplements/>>. Acesso em 15 de junho de 2017.

USA. Recall Dietary Supplements. United States Food and Drugs Administration, **United States Food and Drugs Administration**, 22 outubro 2019. Disponível em: <<http://www.fda.gov/Food/DietarySupplements/>>. Acesso em 22 de outubro de 2019..

USP, UNITED STATES PHARMACOPEIA. Dietary Supplements. <2251> Adulteration of dietary supplements with drugs and drug analogs. First Supplement to USP39- NF 34, December 1, 2015.

VACLAVIK, L., KRYNITSKY A. J., RADER, J. I. Mass spectrometric analysis of pharmaceutical adulterants in products labeled as botanical dietary supplements or herbal remedies: a review. **Analytical Bioanalytical Chemistry**, v. 406, p. 6767-6790, 2014.

VENHUIS, B. J., DE KASTE, D. Towards a decade of detecting new analogues of sildenafil, tadalafil and vardenafil in food supplements: A history, analytical aspects and health risks. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, vol. 69, p. 196–208, 2012.

VIANA, C. et al. Liquid chromatographic determination of caffeine and adrenergic stimulants in food supplements sold in Brazil e-commerce for weight loss and physical fitness. **Food Additives and Contaminants: Part A**, 2016.

WADA. World Anti-doping Agency. Prohibited List Documents, 2018. Disponível em: <<https://www.wada-ama.org/en/resources/science-medicine/prohibited-list-documents>>. Acesso em 11 jun. 2018.

WALLACE T. C. et al. **Dietary supplement regulation in United States**. EUA: Springer, 2013. 53p.

WILCOX, C. S. Reactive oxygen species: roles in blood pressure and kidney function. **Current Hypertension Opinion**, v. 4, p. 160-166, 2002.

WILLBORN, C.D. et al. (ZMA) supplementation on training adaptations and markers of anabolism and catabolism. **Journal of International Society of Sports Nutrition**, v. 1, n.2, p. 12-20, 2014.

WILKOFF, D. et al. Systematic review of the potential adverse effects of caffeine consumption in healthy adults, pregnant women, adolescents and children. **Food Chemical and Toxicology**, p. 1-64, 2010.

WILMS, L. C. et al. Protection by quercetin and quercetin-rich fruit juice against induction of oxidative DNA damage and formation of BPDE-DNA adducts in human lymphocytes. **Mutation Research**, v.582, n.1-2, p.155-162, 2005.

WISNIK P. The effect of branched chain amino acids on psychomotor performance during treadmill exercise of changing intensity simulating a soccer game. **Applied Physiology, Nutrition and Metabolism**, v. 36, p. 856-862, 2011.

WOLFE, K. L.; LIU, R. H. Cellular antioxidante activity (CAA) assay for assessing antioxidants, foods, and dietary supplements. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 8896-8907, 2007.

YAN, P. et al. Ultrasensitive detection of clenbuterol by quantum dots based electrochemicaluminescent immunosensor using gold nanoparticles as substrate and electron transport accelerator. **Sensors and actuators B: chemical**, v. 191, p. 508-515, 2014.

YEN M., EWALD M. B. Toxicity of weight loss agents. **Journal of Medical Toxicology**, v. 8, n. 2, p. 145-152, 2012

YUENGRIGUL, A.; CHIN, T. W.; NUSSBAUM, E. Immunosuppressive and cytotoxic effects of furosemide on human peripheral blood mononuclear cells. **Annals of Allergy, Asthma & Immunology**, v. 83, n. 9, p. 559-566, 1999.

ZHANG, Y. et al. Simultaneous determination of yohimbine, sildenafil, vardenafil and tadalafil in dietary supplements using high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Separation Science**. vol. 33, p. 2109–2114, 2010.

ZHANG, G. et al. Separation and structural elucidation of a new tadalafil analogue diethylaminopretadalafil included as an adulterant in dietary supplements. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 94, p. 210-214, 2014

ZHU, X. et al. Simultaneous determination of sildenafil, vardenafil and tadalafil as forbidden components in natural dietary supplements for male sexual potency by high-performance liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1066, p. 89-95, 2005.

ZHOU, S. F. et al. Identification of drugs that interact with herbs in drug development. **Drug discovery today**, v. 12, n. 15/16, 2007.

ZOU, P. et al. Simultaneous determination of synthetic phosphodiesterase-5 inhibitors found in a dietary supplement and pre-mixed bulk powders for dietary supplements using high-performance liquid chromatography with diode array detection and liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, vol. 1104, p. 113–122, 2006.

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

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

APÊNDICE A

DAL MOLIN, T. R. et al. Marco regulatório dos suplementos alimentares e o desafio à saúde pública. *Revista de Saúde Pública*, v. 53, 2019.

Rev Saúde Pública. 2019;53:90

Artigo Original

RSP

<http://www.rsp.fsp.unp.br/>Revista de
Saúde PúblicaMarco regulatório dos suplementos
alimentares e o desafio à saúde públicaThais Ramos Dal Molin¹, Gabriela Camera Lea², Larissa Sabo Müller³, Diana Tomazzi Muratt⁴, Gabriela Zanella Marcon⁵, Leandro Machado de Carvalho⁶, Carine Viana⁷

¹ Universidade Federal de Santa Maria. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Santa Maria, RS, Brasil
² Universidade Federal de Santa Maria. Programa de Pós-Graduação em Química. Santa Maria, RS, Brasil
³ Universidade Federal de Santa Maria. Departamento de Química. Santa Maria, RS, Brasil
⁴ Universidade Federal de Santa Maria. Departamento de Farmácia Industrial. Santa Maria, RS, Brasil

RESUMO

OBJETIVO: O novo marco regulatório para os suplementos alimentares no Brasil instigou a presente análise do panorama atual desses produtos e os desafios impostos pelas novas diretrizes.

MÉTODOS: Foi realizado um estudo qualitativo, observacional e descritivo dos suplementos alimentares comercializados em lojas virtuais brasileiras, com o auxílio da ferramenta de busca Google. Os ingredientes declarados nos rótulos, bem como os efeitos atribuídos a esses produtos e as alegações comerciais utilizadas como forma de promovê-los foram levados em consideração a fim de avaliarmos as mudanças necessárias para o enquadramento legal nas novas diretrizes. Por fim, com o auxílio de base de dados, foram comparados os efeitos declarados pelos fabricantes e atribuídos a determinados ingredientes com as evidências científicas descritas na literatura.

RESULTADOS: No total, foram adquiridos 44 suplementos alimentares provenientes de lojas virtuais brasileiras (n = 7). Das amostras estudadas, 34,2% não poderiam ser enquadradas na categoria Suplementos Alimentares, conforme preconiza a nova regulação da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, em decorrência de presença de substâncias não permitidas; 16% dos produtos deveriam ser comercializados como medicamentos. Quanto aos apelos comerciais, 97,7% apresentavam expressões não permitidas. Inúmeras alegações de efeitos atribuídos a determinados produtos, por não possuírem comprovação científica, foram caracterizadas como fraude contra o consumidor.

CONCLUSÕES: Dada a extensa gama de suplementos alimentares e pontos de comercialização, as mudanças necessárias representam um grande desafio regulatório e de produção, esforço este que visa a proteger a saúde dos consumidores. Algumas lacunas previamente existentes ao marco regulatório ainda não foram totalmente solucionadas.

DESCRITORES: Suplementos Nutricionais. Comercialização de Produtos. Qualidade de Produtos para o Consumidor, legislação & jurisprudência. Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

Correspondência:
Carine Viana
Departamento de Farmácia Industrial
Universidade Federal de Santa Maria,
Campus Carmoá
97105-900 Santa Maria, RS, Brasil
E-mail: carineviana@yahoo.com.br

Recebido: 10 out 2018

Aprovado: 1 abr 2019

Como citar: Dal Molin TR, Lea 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*. 2019;53:90.

Copyright: Este é um artigo de acesso aberto distribuído sob os termos da Licença de Atribuição Creative Commons, que permite uso restrito, distribuição e reprodução em qualquer meio, desde que o autor e a fonte originais sejam creditados.



<https://doi.org/10.11606/S1518-8787.2019053001263>

1

APÊNDICE B

DAL MOLIN, T. R. et al. Composição centesimal de suplementos alimentares adquiridos via internet no Brasil. (*Manuscript submitted*)

COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DE PRODUTOS COMERCIALIZADOS COMO SUPLEMENTOS ALIMENTARES EM LOJAS VIRTUAIS BRASILEIRAS

Thais Ramos Dal Molin^{1*}, Giane Engel Montagner², Aline de Oliveira Fogaça², Carine Viana
Silva¹

¹ Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêutica, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria – RS, Brasil

² Programa de Pós-Graduação em Nanociências, Universidade Franciscana (UFN), Santa Maria – RS, Brasil

*Autor correspondente: carineviana@yahoo.com.br, Departamento de Farmácia Industrial, Universidade Federal de Santa Maria, Campus Camobi, CEP 97105-900, Santa Maria-RS, Brasil.

APÊNDICE C

DAL MOLIN, T. R. et al. Screening and quantification of adulterants in dietary supplements: an alternative chromatographic method for quality control (*Manuscript submitted*)

Screening and quantification of adulterants in dietary supplements: an alternative chromatographic method for quality control

Thaís R. Dal Molin^a, Géssica Domingos da Silveira^b, Carolina Urquhart Gonzalez^c, Leandro M. de Carvalho^{a,d}, Paulo Cícero do Nascimento, Carine Viana^{*a,c}

^a *Graduate Programme in Pharmaceutical Sciences, Federal University of Santa Maria (UFSM), Campus universitário, PO Box 5051, Zip – Code 97105-900, Santa Maria-RS, Brazil.*

^b *Chemistry Institute, University of Campinas, Campinas, SP. Brazil, Zip-Code: 13086-861*

^c *Departamento of Industrial Pharmacy, Federal University of Santa Maria (UFSM), Campus universitário, Santa Maria-RS, Brazil*

^d *Department of Chemistry, Federal University of Santa Maria (UFSM), Campus universitário, Santa Maria-RS, Brazil.*

* Corresponding author

Address correspondence to Carine Viana, Federal University of Santa Maria (UFSM), Campus universitário, Santa Maria-RS, Brazil, PO Box 5051, Zip – Code 97105-900. Phone number: +55 55 32208870. E-mail: carineviana@yahoo.com.br

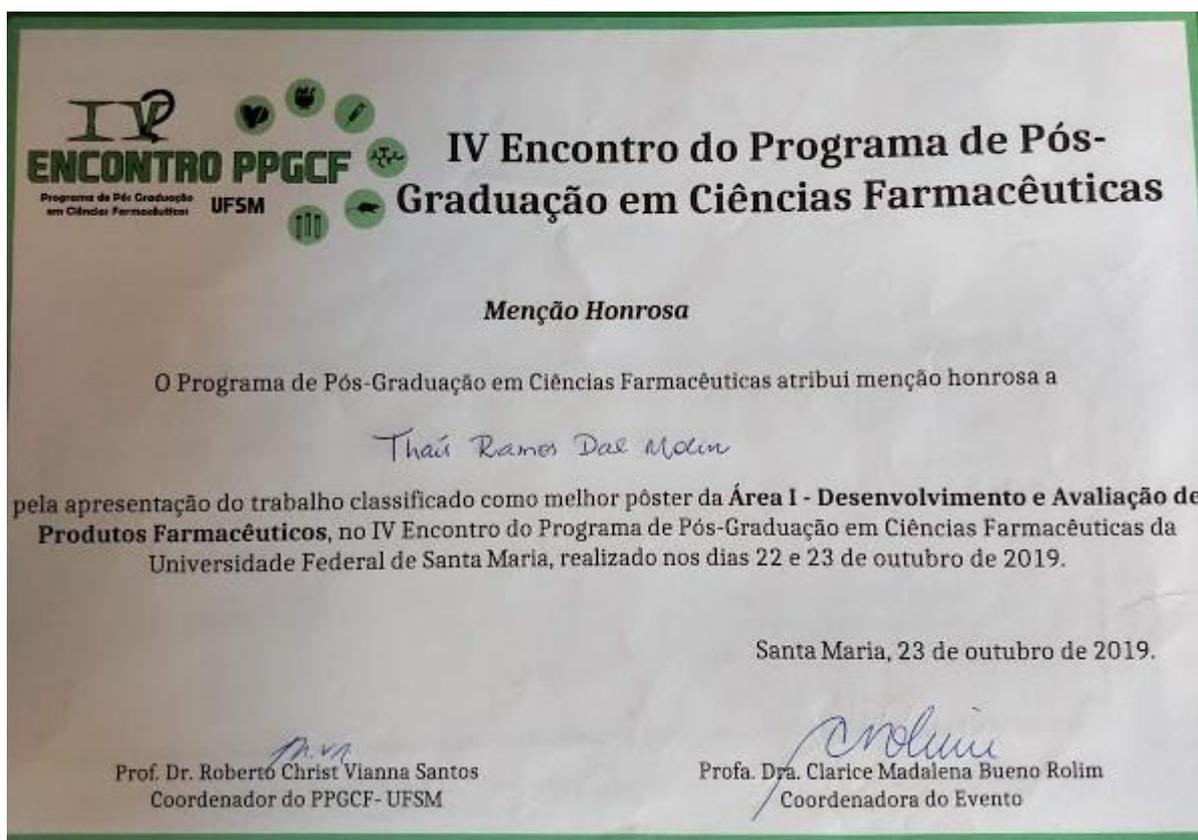
APÊNDICE D

DAL MOLIN, T. R. et al. Desenvolvimento de um método analítico para a determinação de adulterantes e suplementos alimentares. I PNC&E, Rio de Janeiro, 2018.



APÊNDICE E

DAL MOLIN, T. R.; VIANA, C. Desenvolvimento de um método de baixo custo para a investigação de adulterantes em suplementos alimentares. IV Encontro do PPGCF, Santa Maria, 2019.



APÊNDICE F

DAL MOLIN, T. R. et al. Adulterated dietary supplements commercialized in Brazil can inducing cytotoxicity *in vitro*. XX Congresso Farmacêutico de São Paulo, 2019.



XX CONGRESSO FARMACÊUTICO DE SÃO PAULO

CRF SP
CONSELHO REGIONAL DE FARMÁCIA DO ESTADO DE SÃO PAULO

INOVAÇÃO EM PRODUTOS E SERVIÇOS FARMACÊUTICOS
XX CONGRESSO FARMACÊUTICO DE SÃO PAULO
XII SEMINÁRIO INTERNACIONAL DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
EXPOFAR 2019

Certificado

ADULTERATED DIETARY SUPPLEMENTS COMMERCIALIZED IN BRAZIL CAN INDUCING CYTOTOXICITY IN VITRO

MOLIN, T. R. D., PAPPIS, L., MACHADO, A. K., SAGRILLO, M., SILVEIRA, G. D. D., CARVALHO, L. M. D., VIANA, C.

Recebeu a distinção de melhor trabalho científico da área *Suplementos Alimentares e Alimentos Especiais* durante o XX Congresso Farmacêutico de São Paulo.

São Paulo, 12 de outubro de 2019

Dr. Marcos Machado Ferreira
Dr. Marcos Machado Ferreira
Presidente do CRF-SP

Prof. Dr. Leoberto Costa Tavares
Prof. Dr. Leoberto Costa Tavares
Presidente da Comissão Executiva

Profa. Dra. Suely Vilela
Profa. Dra. Suely Vilela
Presidente da Comissão Científica

Profa. Dra. Ana Cristina Lo Prete
Profa. Dra. Ana Cristina Lo Prete
Coordenadora da Comissão de Trabalhos Científicos

APÊNDICE G

DAL MOLIN, T. R. et al. Evaluation of *in silico* and *in vitro* toxicology of adulterants and dietary supplements adulterated commercialized in Brazil. (*Manuscript under construction*).

Evaluation of *in silico* and *in vitro* toxicology of adulterants and dietary supplements adulterated commercialized in Brazil

Thaís R. Dal Molin^a, Lauren Pappis^a, Alencar K. Machado^b, Michele R. Sagrillo^b, Leandro M. de Carvalho^{a,c}, Carine Viana^{*a}

^a*Graduate Programme in Pharmaceutical Sciences, Federal University of Santa Maria (UFSM), Campus universitário, PO Box 5051, Zip – Code 97105-900, Santa Maria-RS, Brazil.*

^b*Franciscan University, Rua dos Andradas, 1614, Zip-Code 97010-032, Santa Maria-RS, Brazil.*

^c*Department of Chemistry, Federal University of Santa Maria (UFSM), Campus universitário, Santa Maria-RS, Brazil.*

* Corresponding author

Address correspondence to Carine Viana, Federal University of Santa Maria (UFSM), Campus universitário, Santa Maria-RS, Brazil, PO Box 5051, Zip – Code 97105-900. Phone number: +55 55 32208870. E-mail: carineviana@yahoo.com.br