

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

INÉLIA MARIA FRANSKOVIKI

DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA DETECÇÃO DE  
DIURÉTICOS EM SUPLEMENTOS ALIMENTARES À BASE DE PROTEÍNA DE  
SORO DE LEITE (*WHEY-PROTEIN*)

PORTO ALEGRE

2021



INÉLIA MARIA FRANSKOVIKI

DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA DETECÇÃO DE  
DIURÉTICOS EM SUPLEMENTOS ALIMENTARES À BASE DE PROTEÍNA DE  
SORO DE LEITE (*WHEY-PROTEIN*)

Dissertação apresentada ao Programa De Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia Da Universidade Federal do Rio Grande Do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de Mestra em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Profª Dra. Aline Rigon Zimmer  
Coorientadora: Dra. Pamela C. Lukasewics

PORTO ALEGRE

2021

Dissertação apresentada ao programa de Pós graduação em Ciências farmacêuticas da universidade Federal do Rio Grande do Sul em aprovado no dia 28 de setembro de 2021 pela banca constituída por:

Prof. Dr<sup>a</sup> Sara Elis Bianch

Universidade Federal do Rio Grande Do Sul

Prof. Dr<sup>a</sup> Simone Baggio Gnoatto Cristina

Universidade Federal do Rio Grande Do Sul

Prof. Dr<sup>a</sup> Renata Vidor Conti

Universidade Federal do Rio Grande Do Sul

#### CIP - Catalogação na Publicação

Franskoviaki, Inelia Maria  
DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA  
DETECÇÃO DE DIURÉTICOS EM SUPLEMENTOS ALIMENTARES À  
BASE DE PROTEÍNA DE SORO DE LEITE (WHEY-PROTEIN) /  
Inelia Maria Franskoviaki. -- 2021.  
79 f.  
Orientadora: Aline Rigon Zimmer.  
  
Coorientadora: Pamela Cristina Lukasewics.  
  
Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do  
Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de  
Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre,  
BR-RS, 2021.  
  
1. Controle de qualidade. 2. Validação de método.  
3. whey-protein. 4. Diurético. 5. Doping. I. Rigon  
Zimmer, Aline, orient. II. Lukasewics, Pamela  
Cristina, coorient. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Produção de Substâncias de Referências da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.



## **AGRADECIMENTOS**

Agradecimentos à Professora Dra. Aline Rigon Zimmer, pela disponibilidade em todos os momentos, pela orientação e incentivo.

À Farmacêutica Dra. Pamela C Lukasewicz, pela disponibilidade em todos os momentos, pela orientação e amizade.

À Professora Dra. Simone Cristina Baggio Gnoatto, chefe de departamento (FAR01), pela compreensão e incentivo. Aos Professores Pedro Eduardo Froehlich, Grace Gosmann, Renata Pereira Limberger, Jarbas Alves Montanha e Ana Maria Bergold por todo apoio. Aos colegas do laboratório 704 da Faculdade de Farmácia da UFRGS, em especial à Thais, Bianca, Gracila, Andrea, Fernanda, Nize, pela amizade em todos os momentos: os de chima e os de muito trabalho.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas pela oportunidade de aprendizado e crescimento.

À minha família, em especial a minha mãe Clementina *In Memoriam*, que é a razão da minha existência. Ao meu irmão, Antônio, pelo patrocínio desde minha graduação e incentivo em todos os momentos. Às minhas irmãs, em especial Amélia e Lúcia, pelo pãozinho caseiro, pelo carinho e amizade. Aos demais familiares pelo incentivo sempre.

Ao meu amor José Luís, pela compreensão, incentivo, carinho e muita cumplicidade.



## RESUMO

Suplementos alimentares à base de proteína do soro de leite (PSM) do tipo *Whey-Protein* (WP) são amplamente utilizados por atletas profissionais. Entretanto, há relatos na literatura de atletas que usaram estes produtos e testaram positivo no exame *antidoping*, levantando a suspeita de que tais produtos contenham substâncias consideradas como *doping*. A presença de diuréticos como Clorotiazida, Hidroclorotiazida, Furosemida, Amilorida e Clortalidona em quaisquer quantidades, em amostras de urina e sangue é caracterizada como *doping* e pode implicar em penalidade ao atleta, independente da intencionalidade ou não do uso. Assim, o objetivo desse trabalho foi desenvolver um método confiável por cromatografia líquida de alta eficiência com detector UV (CLAE-UV) para pesquisa de diuréticos em PSM. O método foi desenvolvido e validado quanto aos parâmetros de especificidade, linearidade, precisão, exatidão, robustez, efeito matriz, limite de detecção e de quantificação. Foi utilizada a coluna C8 Phenomenex, fase móvel, composta por tampão acetato de amônio 100 mM, pH 4,5 e acetonitrila em um sistema gradiente e a detecção foi realizada em 276 nm. O método foi testado através da análise de 21 amostras de PSM comerciais obtidas na região metropolitana de Porto Alegre. Sendo que, das amostras analisadas, 42,89 % tiveram resultado positivo para pelo menos um dos diuréticos pesquisados. Uma amostra apresentou resultados positivo para três diuréticos analisados. Diante dos resultados ressalta-se a importância da pesquisa de adulterantes nas amostras de PSM para o adequado controle de qualidade desses produtos e maior segurança para os consumidores.

**Palavras-chave:** Controle de qualidade. Validação de método. *Whey-Protein*. Diuréticos. *Doping*.



## ABSTRACT

Food supplements based on isolated milk proteins known as Whey Protein Concentrate (WPC) are widely used by professional athletes. Nonetheless, there are reports in the literature of athletes who used these products and tested positive in the anti-doping test causing suspicion that such products contain substances considered to be doping. The presence of diuretics such as Chlorothiazide, Hydrochlorothiazide, Furosemide, Amiloride, and Chlorthalidone in any quantities in urine and blood samples is characterized as doping and may result in a penalty for the athlete, whether intentional used or not. Thus, the objective of this work was to develop a reliable method by high-performance liquid chromatography coupled to a UV detector (HPLC-UV) to investigate the presence of diuretics in WP. The method was developed and validated for specificity, linearity, precision, accuracy, robustness, matrix effect, detection, and quantification limits. It was used a Phenomenex C8 column, mobile phase composed of 100 mM ammonium acetate buffer pH 4.5, and acetonitrile in a gradient system; detection was performed at 276 nm. The method was tested by analyzing 21 samples of commercial WP obtained from the metropolitan region of Porto Alegre. Regarding the analyzed samples, 42,89% showed positive results for at least one of the researched diuretics. One sample tested positive for three different diuretics. Thereby, the results highlighted the importance of researching adulterants in WP samples to assure proper control's quality of these products and greater safety for consumers.

**Keywords:** Quality control. Method validation. Whey-Protein. Diuretics. Doping.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estruturas químicas dos diuréticos utilizados no estudo: amilorida (AML), clorotiazida (CTZ), hidroclorotiazida (HCTZ), furosemida (FRS) e clortalidona (CTD). .....	33
Figura 2: Representação do mecanismo e local de ação dos diuréticos tiazídicos. Fonte: RANG <i>et al.</i> , (2012). ....	34
Figura 3: Comparação entre do perfil dose resposta da HCTZ e da FRS destacando a potência da FRS. Fonte: RANG <i>et al.</i> , (2012). ....	35
Figura 4: Representação do mecanismo e local de ação dos diuréticos de alça na porção ascendente da alça de Henle. Fonte: RANG <i>et al.</i> (2012). ....	36
Figura 5: Representação do mecanismo e local de ação dos diuréticos poupadores de potássio sobre a células do túbulo coletor. Fonte: RANG <i>et al.</i> (2012). ....	37
Figura 6: Espectro UV de cada diurético analisado, obtido pela varredura do detector DAD em cada tempo de retenção: 7,54 mim = Amilorida=A; 11,21 mim = Clorotiazida=B; 12,46 mim = Hidroclorotiazida=C; 19,03 mim = Clorotalidona=D; 19,94 mim = Furosemida=E. ....	52
Figura 7: Cromatograma do produto de extração da matriz mostrando a resolução dos picos dos compostos analisados no comprimento de onda de 276 nm, na concentração de 150 µg/mL para os analitos e 100 µg/mL para o PI. Onde: A, E, H = Matriz; B= Amilorida; C= Clorotiazida; D= Hidroclortiazida; F= Clorotalidona; G= Furosemida; I= Bromazepam (PI). ....	53
Figura 8: Cromatogramas da matriz de trabalho (linha rosa) e dos padrões dos compostos de interesse (linha preta) demonstrado não haver sobreposição dos picos da matriz com os diuréticos analisados na concentração de 200 µg/mL. A= Amilorida, B= Clorotiazida, C= Hidroclorotiazida, D= Clorotalidona, E= Furosemida, F= PI. ....	54
Figura 9: Gráficos de cada analito referentes ao teste de efeito matriz: em azul as retas do produto de extração da matriz e em vermelho as retas da solução SQR. Eixo X representa a razão entre a área do analito e o PI, e o eixo Y a concentração do analito. ....	61
Figura 10: Resultado das análises realizadas em 21 amostras comerciais de PW...	63
Figura 11: Percentual das análises positivas para cada diurético em relação ao total de amostras positivas avaliadas. ....	64

Figura 122: Cromatograma da amostra AM19 com resultado positivo para três diuréticos: B= clorotiazida, C= hidroclorotiazida, E= furosemida, sendo A, D e F picos referentes a matriz, e G= PI. ....64

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Resultados das análises do controle de doping realizado em laboratórios credenciados pelo WADA em 2019.....	39
Tabela 2 - Resultados positivos de análises realizadas por laboratórios credenciados pelo WADA para diuréticos e outros agentes mascarantes em 2019 .....	40
Tabela 3 - Condições Cromatográficas do Sistema Analítico CLAE-UV utilizadas no estudo .....	45
Tabela 4 - Condições de eluição da fase móvel no modo gradiente do sistema CLAE-UV.....	45
Tabela 5 - Preparo das amostras para o teste de recuperação .....	48
Tabela 6 - Tempo de retenção e pureza de pico das substâncias de interesse no estudo .....	52
Tabela 7 - Limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), equação da reta referente, o coeficiente de regressão linear, e inclinação da reta obtidos para cada analito de interesse .....	55
Tabela 8 - Resultados da precisão e exatidão obtidos para cada diurético analisado.....	57
Tabela 9 - Resultados do teste de robustez: tempo de retenção; resolução do pico cromatográfico; razão da área do pico do analito pela área do PI; concentração calculada ( $\mu\text{g/ml}$ ) e o DPR (%) de cada concentração.....	59
Tabela 10 - Determinação do efeito matriz: $r$ = coeficiente de regressão linear “ $r$ ” da reta média das soluções SQR e da matriz suplementada com SQR; valor de $p$ para a comparação dos coeficientes angulares (a) e lineares (b) das equações da reta médias obtidas para SQR e da matriz suplementada om SQR.....	60
Tabela 11 - Resultados do teste de estabilidade realizados tendo como referência o produto analisado imediatamente após o processo de extração da matriz de trabalho (controle), mostrando a quantidade recuperada antes e após a exposição as diferentes condições de armazenamento.....	62
Tabela 12 - Resultado das análises das amostras positivas de PSM para os diuréticos de interesse. Os resultados são expressos como mg do analito/g de PSM e em relação a dose recomendada do PSM pelo fabricante.....	66



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

a.C.	Antes De Cristo
ACN	Acetonitrila
AML	Amilorida
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CG	Cromatografia Gasosa
Cl	Cromatografia Líquida
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
COI	Comitê Olímpico Internacional
CTD	Clortalidona
CTZ	Clorotiazida
CV	Coefficiente De Variação
DAD	Detector De Fotodiodo
DPR	Desvio Padrão Relativo
EM	Detector Massas
ESIMS	Ionização De Electrospray
EUA	Estados Unidos da América
FDA	Food and Drug Administration
FRS	Furosemida
HCTZ	Hidroclorotiazida
HRMS	EM De Alta Resolução
LAPS	Laboratório De Produção De Substâncias Químicas De Referência
LD	Limite De Detecção
LQ	Limite de Quantificação
MeOH	Metanol

Orbitrap	Diluição De Isótopos
Pi	Padrão Interno
SQR	Substância Química de Referência
Tr	Tempo de Retenção
UHPLC	CI De Ultra Performance
UV	Detector De Ultravioleta
WADA	<i>World Anti-Doping Agency</i>
WP	<i>Whey-Protein</i>

# SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>21</b>
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>23</b>
2.1 OBJETIVO GERAL .....	23
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	23
<b>3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>25</b>
3.1 DOPING .....	25
<b>3.1.1 Definição</b> .....	<b>25</b>
<b>3.1.2 Breve Histórico</b> .....	<b>25</b>
<b>3.1.3 Órgãos Fiscalizadores</b> .....	<b>28</b>
3.1.3.1 COI.....	28
3.1.3.2 WADA.....	29
3.2 SUPLEMENTOS ALIMENTARES .....	29
3.3 LEGISLAÇÃO BRASILEIRA RELACIONADA AOS SUPLEMENTOS ALIMENTARES .....	31
3.4 DIURÉTICOS .....	32
<b>3.4.1 Diuréticos tiazídicos</b> .....	<b>34</b>
<b>3.4.2 Diuréticos de alça</b> .....	<b>35</b>
<b>3.4.3 Diuréticos poupadores de potássio</b> .....	<b>36</b>
3.5 USOS DE DIURÉTICOS NOS ESPORTES .....	37
3.6 MÉTODOS PARA DETECÇÃO DE ADULTERAÇÃO EM SUPLEMENTOS ALIMENTARES .....	40
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>43</b>
4.1 SUBSTÂNCIAS QUÍMICAS DE REFERÊNCIA (SQR) .....	43
4.2 MATRIZ DE TRABALHO .....	43
4.3 REAGENTES .....	43
4.4 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS PARA VALIDAÇÃO DO MÉTODO CLAE-UV.....	43
<b>4.4.1 Solução SQR</b> .....	<b>43</b>
<b>4.4.2 Preparação da matriz de trabalho</b> .....	<b>44</b>
<b>4.4.3 Extração dos diuréticos da matriz</b> .....	<b>44</b>
4.5 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA .....	44

4.5.1 Fase móvel e solução diluente.....	45
4.6 VALIDAÇÃO DO MÉTODO POR CLAE-UV .....	46
4.6.1 Seletividade e especificidade do método.....	46
4.6.2 Linearidade .....	46
4.6.3 Limites de Detecção e Limites de Quantificação (LQ) .....	47
4.6.4 Precisão .....	47
4.6.5 Exatidão .....	48
4.6.5.1 Teste de recuperação.....	48
4.6.6 Robustez .....	48
4.6.7 Efeito matriz.....	49
4.7 ESTUDO DE ESTABILIDADE DO EXTRATO.....	49
4.8 ANÁLISE DAS AMOSTRAS COMERCIAIS .....	50
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>51</b>
5.1 DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO POR CLAE-UV .....	51
5.2 MÉTODOS DE PREPARO DA AMOSTRA .....	53
5.3 VALIDAÇÃO DO MÉTODO PROPOSTO PARA DETECÇÃO DE DIURÉTICOS EM PSM .....	53
5.3.1 Seletividade .....	53
5.3.2 Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) .....	54
5.3.3 Linearidade .....	55
5.3.4 Precisão .....	56
5.3.5 Exatidão .....	56
5.3.6 Robustez .....	58
5.3.7 Efeito matriz.....	60
5.3.8 Estudo da estabilidade do extrato .....	61
5.4 ANÁLISE DE AMOSTRAS COMERCIAIS POR CLAE-UV .....	63
<b>6 CONCLUSÕES .....</b>	<b>69</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>71</b>
<b>APÊNDICE.....</b>	<b>79</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Os alimentos à base da proteína do soro do leite (PSM), também conhecidos como *Whey-Protein* (WP) são extraídos do soro do leite durante a fabricação dos queijos. Esses alimentos possuem alto teor de aminoácidos e são amplamente utilizados por atletas das categorias profissionais e também por esportistas amadores (CORRÊA; NAVARRO, 2014; PARR, POKYWKO; KWIATKOWSKA, 2011). Uma vez que suplementos alimentares são indicados para complementar a dieta de pessoas saudáveis, esses produtos são isentos de registro na Agência de Vigilância Sanitária (ANVISA), desde que não contenham enzimas e probióticos em sua composição (ANVISA, 2018a). Entretanto, eles devem atender aos critérios da legislação vigente quanto à especificação de sua composição química e modo de uso. Além disso, o rótulo destes produtos deve conter a tabela nutricional e a descrição de todos os constituintes do mesmo (ANVISA, 2018b). Os WP também não podem conter na sua formulação substâncias de ação medicamentosa como hormônios, estimulantes ou qualquer outra substância que possa ser considerada *doping*, incluindo os diuréticos (ANVISA, 2018b).

O objetivo da utilização de suplementação proteica é maximizar a resposta muscular e promover a reparação do músculo esquelético após exercícios físicos (MAUGHAN *et al.*, 2018). Mesmo sendo utilizado por diversas categorias de atletas e esportistas amadores, ainda não há uma dosagem diária bem estabelecida na literatura (ANTONIO, 2018). Os atletas, contudo, precisam estar cientes de que alguns suplementos usados para complementar a dieta podem causar efeitos colaterais à saúde e conter substâncias que são classificadas como *doping*, ressaltando que muitas destas substâncias não são declaradas no rótulo (PARR *et al.*, 2009; PARR; POKYWKO, KWIATKOWSKA, 2011; WALPURGIS *et al.* 2020).

O Comitê Olímpico Internacional (COI) define como *doping* quaisquer substâncias ou marcadores presentes em quantidade anormal com intenção de melhorar o desempenho do atleta (COI, 2021). Já o Código Brasileiro de Dopagem considera *doping* a presença de substâncias proibidas em amostra biológica de atletas sendo previstas penalidades (BRASIL, 2015).

A presença de diuréticos, em quaisquer quantidades, em amostras de urina e sangue é caracterizada como *doping* e pode implicar em penalidade ao atleta. Na

literatura são descritos métodos analíticos para dosagem de vários diuréticos simultaneamente em suplementos alimentares em matrizes complexas como cápsulas, plasma e urina. Contudo, a maioria das análises são realizadas em amostras de urina e plasma, sendo o principal método analítico utilizado a cromatografia líquida com detector de massa (CL-EM), que tem um alto custo operacional (WOO *et al.*, 2013; DURAL, 2020). Entretanto, não foram encontrados na literatura métodos analíticos para determinação de diuréticos em WP utilizando cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector de ultravioleta (CLAE-UV).

Neste sentido, esse trabalho visa desenvolver metodologia analítica por CLAE-UV capaz de identificar e quantificar de forma reprodutível e simples a presença de diuréticos nos suplementos PSM do tipo WP. Além disso, visa disponibilizar uma técnica alternativa de controle de qualidade para laboratórios, que atenda às exigências da legislação.

## 2 OBJETIVOS

Nas seções abaixo estão descritos os objetivos dessa tese.

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver e validar método de extração, identificação e quantificação dos diuréticos Amilorida (AML), Clorotiazida (CTZ), Hidroclorotiazida (HCTZ), Furosemida (FRS) e Clortalidona (CTD) em suplementos alimentares derivados de proteína do soro do leite por CLAE-UV.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Desenvolver metodologia de extração de diuréticos AML, CTZ, HCTZ, FRS e CTD em suplementos alimentares PSM do tipo WP.
- b) Desenvolver metodologia por CLAE-UV para análise simultânea dos diuréticos AML, CTZ, HCTZ, FRS e CTD em suplementos alimentares PSM do tipo WP.
- c) Validar metodologia analítica por CLAE-UV para diuréticos AML, CTZ, HCTZ, FRS e CTD em suplementos alimentares PSM do tipo WP.
- d) Avaliar a presença dos diuréticos AML, CTZ, HCTZ, FRS e CTD em amostras comerciais de suplementos alimentares PSM do tipo WP.



### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 DOPING

##### 3.1.1 Definição

O termo *doping* é definido como o uso ilegal por um atleta de substâncias químicas que lhe aumentam o desempenho para obter vantagem em competições (MICHAELIS, 2021). A agência mundial antidopagem (WADA) considera como caso de *doping* o uso de qualquer uma das substâncias e métodos proibidos pelo padrão internacional atualizado, visando melhorar o desempenho, desde que não haja justificativa médica comprovada para seu uso (WORLD ANTI-DOPING AGENCY, 2021). Apesar da definição ser atual, a origem do termo faz referência a uma infusão preparada a base de uva, denominada “Dope”, utilizada por guerreiros zulus africanos em festejos e lutas religiosas (LJUNGQVIST, 2017; MÜLLER, 2009).

O termo *doping* não possui tradução para o português e foi mencionado pela primeira vez em 1886 no dicionário inglês que descreveu um composto contendo ópio usado para melhorar o desempenho em cavalos (REIS; MAGALHÃES; SANTOS LUCAS, 2019; MÜLLER, 2009). Posteriormente, o termo foi utilizado de maneira mais ampla para diversos compostos de uso humano e animal. Atualmente, o termo é utilizado para designar o uso de substâncias ilícitas para melhorar o desempenho em competições (MÜLLER, 2009).

##### 3.1.2 Breve Histórico

Historicamente o homem busca superar seus limites físicos e mentais, mesmo quando representa risco grave à saúde (MÜLLER, 2009). Relatos do uso de substâncias para melhorar o desempenho físico são observados desde a antiguidade. Uma grande variedade de produtos como extratos de plantas, produtos biológicos, como sangue humano, ritos e crenças já foram utilizados na tentativa de obter maior força e virilidade (LJUNGQVIST, 2017; MÜLLER, 2009). Na China, com objetivo de exaltar as propriedades farmacológicas da planta, o imperador Shen-Nung foi documentado em uma pintura juntamente com folhas de “Machuang” conhecido como Ephedra (DE ROSE, 2008). O extrato de Ephedra, *Ephedrales*, não somente foi muito utilizado para aumentar a disposição dos guerreiros no combate,

como também para aumentar a produtividade no trabalho e melhorar a performance dos esportistas chineses (TAVARES, 2008; MÜLLER, 2009; LJUNGQVIST, 2017). A planta foi identificada como estimulante e denominada efedrina somente em 1924. Atualmente pertence a lista de substâncias proibidas no esporte (LJUNGQVIST, 2017).

O uso de substâncias para melhorar o desempenho foi difundido no mundo todo. No período de aproximadamente 300 a.C, o médico indiano Sutruta recomendou a ingestão de testículos para aumentar a testosterona antes das competições e das batalhas (TAVARES, 2008). Já os gregos utilizavam vinho, conhaque e cogumelos para obter vantagem nas competições esportivas (YESALIS; BAHKKE, 2002). Além disso, os gregos incorporaram o esporte como forma de vida, cultuavam a beleza e a força dos atletas de tal maneira a se equipararem a Deuses (AQUINO NETO, 2001, YESALIS; BAHKKE, 2002).

Os primeiros relatos de premiação nos esportes ocorreram na Grécia antiga por volta de 400 a.C. (TAVARES, 2008). Nessa época, os atletas vencedores eram premiados com elevadas quantias em dinheiro, moradia, alimentação, isenção de imposto e isenção de serviço militar (AQUINO NETO, 2001). As práticas esportivas eram tão importantes para os gregos que conseguiam até mesmo parar guerras entre as cidades e os atletas vencedores eram considerados Deuses gregos (ROCHA; FONTES, 2016). Já nessa época foram relatados os primeiros casos de *doping*, onde os atletas utilizavam substâncias como estricnina, numa dosagem apropriada, em associação com cogumelos alucinógenos antes dos jogos (AQUINO NETO, 2001; YESALIS; BAHKKE, 2002; ROCHA; FONTES, 2016). Posteriormente, na era romana, o esporte tornou-se mais violento, atraindo inúmeros expectadores, os gladiadores eram dopados com uma mistura de estimulante e álcool para realizarem batalhas sangrentas diante do público (ROCHA; FONTES, 2016, AQUINO NETO, 2001).

O consumo de substâncias para melhorar o desempenho também foi observado na América do Sul (KAUTZNER, 2015; ROCHA; FONTES, 2016). Povos pré-colombianos mascavam folha de coca para suportar trabalhos pesados (KAUTZNER, 2015; WILLICK; MILLER; EICHNER, 2016). Embora o consumo inicialmente estivesse ligado a ritos religiosos, posteriormente foi utilizado para

percorrer longas distâncias como a jornada da fertilidade, corrida realizada durante cinco dias iniciando em Quito (RODRÍGUEZ; DÍAZ RODRÍGUEZ; DÍAZ, 2015). O atual hábito de beber mate pelos povos americanos remonta aos hábitos dos aborígenes, que utilizavam as infusões para obter a cafeína como estimulante (RODRÍGUEZ; DÍAZ RODRÍGUEZ; DÍAZ, 2015).

Nos anos 1930, inicia-se a síntese de substâncias como as anfetaminas, que substituem a estricnina no uso como *doping* (AQUINO NETO, 2001; ROCHA; FONTES, 2016). Posteriormente, em 1953, foi sintetizado o primeiro esteroide anabolizante, cinco vezes mais potente que a testosterona (AQUINO NETO, 2001; ROCHA; FONTES, 2016). Os esteroides anabolizantes, juntamente com as anfetaminas, foram não somente utilizados pelo exército soviético, como também pelos soldados americanos no pós-guerra (AQUINO NETO, 2001; ROCH; FONTES, 2016). Neste período iniciaram-se os experimentos visando demonstrar a atividade farmacológica da testosterona. Essa atividade foi comprovada através de estudos realizados em soldados norte-americanos que obtiveram rápida recuperação da musculatura lesionada e o aumento da massa muscular (PEREIRA; PADILHA, 2016; AQUINO NETO, 2010; YESALIS; BAHKKE, 2002). A partir desta descoberta, os anabolizantes e as anfetaminas passaram a ser usados em várias modalidades esportivas, já que a prática ainda não era considerada ilícita (AQUINO NETO, 2001; ROCHA; FONTES, 2016). No entanto, o uso abusivo destas substâncias para obter vantagens indevidas teve graves consequências à saúde dos atletas. Nos jogos olímpicos de verão, em 1960, realizados em Roma, Kurt Jensen, um ciclista dinamarquês, entrou em colapso e morreu após utilizar anfetaminas para aumentar seu desempenho (AQUINO NETO, 2001). Logo após em 1967, Tommy Simpson morreu durante o “*Tour de France*” também devido ao abuso de anfetaminas. Essas mortes repercutiram no mundo, dando início a um controle mais rígido das substâncias utilizadas por atletas (AQUINO NETO, 2001; PEREIRA; PADILHA, 2016).

Na Copa do Mundo da FIFA de 1966, na Inglaterra, e posteriormente nos Jogos Olímpicos de verão em 1968, na Cidade do México, foram realizadas as primeiras análises para controlar o uso das substâncias ilícitas. Os atletas foram testados apenas para estimulantes como anfetaminas, no entanto, esse controle se mostrou ineficaz, uma vez que as substâncias podem ter sido excretadas do

organismo até o momento da coleta de urina para análise (MÜLLER, 2009; WILLICK, 2016). Desde então, os testes de pesquisa de substâncias proibidas são realizados na maioria das competições esportivas e em todas as competições oficiais, além de periodicamente fora das competições em testes surpresa (MÜLLER, 2009; WILLICK, 2016). Assim, o Comitê Olímpico Internacional (COI) iniciou a política contra o *doping* com objetivo de preservar a ética, a saúde e a integridade dos atletas (AQUINO NETO, 2001; PEREIRA; PADILHA; AQUINO NETO, 2010). Visando intensificar a luta contra o *doping*, os dirigentes do COI criaram uma organização imparcial e independente denominada Agência Mundial Antidopagem (WADA) (WADA, 2021; WILLICK, 2016).

Mesmo com a política de prevenção, através das ações educativas do COI, os casos de *doping* continuam ocorrendo. Por isso, o WADA mantém um rigoroso controle *antidoping* (WADA, 2021). Atualmente, ainda se observa o uso indiscriminado de anabolizantes e complementos nutricionais, muitos deles adquiridos facilmente pela internet, o que demonstra a necessidade de intensificar a orientação dos atletas no sentido de prevenir o uso de substâncias perigosas (AQUINO NETO, 2001; SÁNCHEZ-OLIVER *et al.*, 2020).

### **3.1.3 Órgãos Fiscalizadores**

#### **3.1.3.1 COI**

O COI foi criado em Paris, em 23 de junho de 1894, tendo como objetivo organizar a primeira olimpíada da era moderna em Atenas, na Grécia (ICO, 2021). O COI é uma organização internacional sem fins lucrativos que abrange os cinco continentes. As federações esportivas fazem parte do COI e têm como objetivo construir um mundo melhor, pacífico, educando os jovens por meio do esporte (ICO, 2021). Em 1967, com os atletas utilizando abusivamente substâncias para melhorar o desempenho, o COI criou políticas *antidoping* para os jogos olímpicos (AQUINO NETO, 2001; ROCHA; FONTES, 2016). Desde então, uma das principais funções do órgão é combater o *doping* pela conscientização dos atletas dos riscos à saúde decorrentes do uso de substâncias proibidas (IOC, 2021).

### 3.1.3.2 WADA

Em fevereiro de 1999, visando à implementação de normas mais rígidas no controle antidopagem, profissionais e apreciadores do esporte se reuniram na Primeira Conferência Mundial sobre *Doping* no Esporte, realizada em Lausanne, Suíça, a qual resultou na Declaração de Lausanne (WADA, 2021). Através desta declaração foi criada a WADA, uma agência internacional e independente composta e financiada pelo movimento esportivo e pelos governos do mundo. Suas principais atividades incluem pesquisa científica, educação, elaboração e atualização anual do Código Mundial Antidopagem (WADA, 2021). Criado em 2004, este código tem por objetivo harmonizar e manter atualizadas as normas *antidopings* em todos os esportes de todos os países. Integram ao código, as normas mundiais de controle de qualidade, adaptação dos laboratórios e metodologias analíticas, assim como programas educacionais que tem o objetivo de prevenir o *doping* (GATTERER, KATHARINA *et al.*, 2020; WADA, 2021).

O WADA também é responsável por elaborar e atualizar a lista de substâncias de uso proibido no esporte. Essa lista padroniza mundialmente as substâncias banidas e agrupa as mesmas conforme o tipo de efeito obtido pelo usuário a partir de seu uso. Os diuréticos são incluídos nessa lista e pertencem a classificação S5, da qual fazem parte as substâncias de ação diurética e agentes mascarantes (WADA, 2021b).

### 3.2 SUPLEMENTOS ALIMENTARES

Os suplementos alimentares são produtos utilizados para suplementação da dieta de pessoas saudáveis e devem ser isentos de produtos farmacêuticos, como medicamentos ou seus metabólitos, não podendo ser comercializado para tratar, diagnosticar ou prevenir doenças (ANVISA, 2018b). Os suplementos alimentares, especialmente do tipo PSM, são muito consumidos no Brasil por frequentadores de academia, principalmente homens jovens (FAYH, 2013; COSTA; ROCHA; QUINTAO, 2013). Como não possuem nenhuma indicação terapêutica, esses produtos são isentos de registros em órgãos regulatórios como a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), não havendo necessidade de demonstrar eficácia e segurança com estudos clínicos (ANVISA, 2018c).

Nos Estados Unidos da América (EUA), os suplementos alimentares são definidos pela lei de saúde e educação alimentar, *The Dietary Supplement Health and Education Act* (FDA, 2021), como: “produto ingerido por via oral que contém um ou mais ingredientes naturais” (FDA, 2021). Essa mesma lei define o termo ingrediente natural como vitaminas, minerais, ervas, aminoácidos e outras substâncias utilizadas pelo homem para complementar sua dieta (FDA, 2021). Assim como no Brasil, nos EUA os produtos destinados à suplementação alimentar não necessitam demonstrar a eficácia e segurança por ensaios clínicos (MARTÍNEZ-SANZ *et al.*, 2017). A União Europeia também define suplemento alimentar como gênero alimentício que se destina a complementar a alimentação, contendo concentrados de nutrientes. Essa mesma lei define nutrientes como vitaminas e minerais (UNIÃO EUROPEIA, 2002).

Os suplementos proteicos, principalmente os derivados do tipo WP, são muito utilizados na suplementação da dieta nutricional de atletas profissionais e amadores (MAUGHAN *et al.*, 2018). A proteína hidrolisada é um suplemento muito consumido com a finalidade de repor e/ou aumentar a massa muscular (CORRÊA; NAVARRO, A.C., 2014). O WP é uma fonte de proteína de alta qualidade, rico em aminoácidos essenciais, produzido durante a fabricação do queijo e conhecido por melhorar a síntese de proteínas musculares, acelerar a recuperação muscular, melhorando a cicatrização, embora não haja unanimidade entre os pesquisadores quanto à eficácia destes produtos (DAVIES; CARSON; JAKEMAN, 2018).

Os suplementos alimentares integram a dieta nutricional dos atletas, porém nem sempre são seguros, podendo resultar em efeitos adversos para saúde, principalmente em problemas hepáticos (MAUGHAN *et al.*, 2018; CADWALLADER; MURRAY, 2015), já que podem conter contaminação cruzada durante a fabricação (JUSTA NEVES; CALDAS, 2015; CADWALLADER; MURRAY, 2015). Em certos casos, os produtos indesejados não estão presentes em uma dosagem suficiente para resultar em ação farmacológica, mas podem levar a alterações nos exames antidopings (JUSTA NEVES; CALDAS, 2015; MATHEWS, 2018). Em algumas situações, esses produtos podem ser adulterados intencionalmente para aumentar a eficácia dos suplementos, podendo conter substâncias usadas para o emagrecimento, chegando a superar a dosagem recomendada diariamente e

representando perigo à saúde dos consumidores (JUSTA NEVES; CALDAS, 2015; WALPURGIS. *et al.*, 2020; PARR *et al.*, 2011; CHRISTOU *et al.*, 2019).

Segundo o WADA, é de responsabilidade do atleta que sua amostra seja isenta de substâncias proibidas e seus marcadores no momento da análise de controle antidoping (WADA, 2021). Desta forma, se ocorrer o *doping* por uso de suplementos contaminados, a punição é direcionada ao atleta e não à empresa fabricante do produto. Nesse sentido, é necessário que as legislações relacionadas e esses suplementos sejam aprimoradas para garantir a segurança destes produtos (MATHEWS, 2018).

### 3.3 LEGISLAÇÃO BRASILEIRA RELACIONADA AOS SUPLEMENTOS ALIMENTARES

Até 2018, a legislação brasileira não incluía a palavra suplementos em suas normas, sendo que a mesma fazia referência à alimentação para atletas. A palavra suplemento somente foi introduzida na legislação brasileira pela RDC nº 243 de 2018, a qual definiu suplemento alimentar como: “produto para ingestão oral, apresentado em formas farmacêuticas, destinado a suplementar a alimentação de indivíduos saudáveis com nutrientes, substâncias bioativas, enzimas ou probióticos, isolados ou combinados” (BRASIL, 2018b). Essa resolução revogou a RDC nº 18/2010, e definiu que não pode haver na composição dos suplementos alimentares substâncias proibidas pelo WADA. (RDC 243). Já a Instrução Normativa nº 28/2018 complementa a RDC nº 243/2018 definindo os limites máximos e mínimos dos constituintes presentes em suplementos alimentares (ANVISA, 2018d).

A ANVISA também estabeleceu através da RDC nº 239/2018 os aditivos como adoçantes e edulcorantes, autorizados para uso em suplementos alimentares, as suas respectivas funções e limites máximos, sendo que todos os aditivos devem atender às especificações de qualidade segundo a legislação vigente (BRASIL, 2018). Ao todo, no ano de 2018, foram publicadas 4 resoluções e uma instrução normativa a fim de regulamentar os suplementos alimentares no Brasil (Quadro 1).

**Quadro 1:** Legislação brasileira referente aos suplementos alimentares.

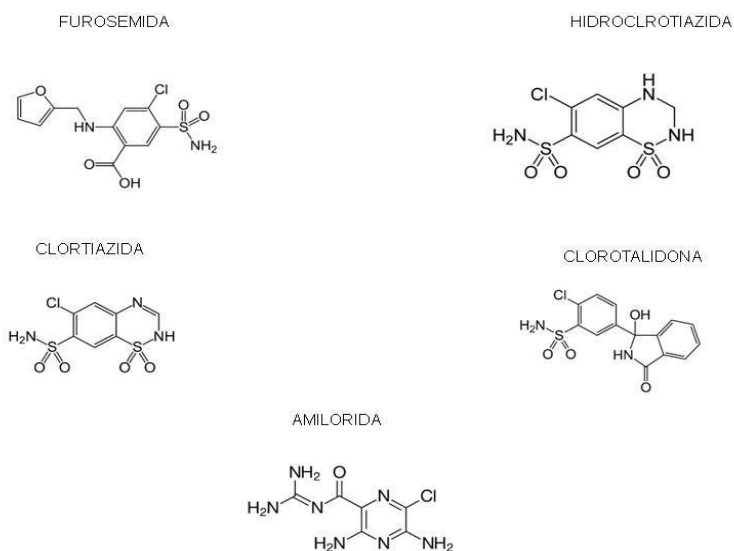
<b>Normas</b>	<b>Emendas</b>
RDC nº 239/2018	Estabelece os aditivos alimentares e coadjuvantes de tecnologia autorizados para uso em suplementos alimentares
RDC nº 240/2018	Dispõe sobre as categorias de alimentos e embalagens isentos e com obrigatoriedade de registro sanitário. Altera a Resolução nº RDC 27 de 6 de agosto 2010
RDC nº 241/2018	Dispõe sobre os requisitos para comprovação da segurança e dos benefícios à saúde dos probióticos para uso em alimentos.
RDC nº 243/2018	Dispõe sobre os requisitos sanitários dos suplementos alimentares.
Instrução Normativa nº 28/2018	Estabelece as listas de constituintes, de limites de uso, de alegações e de rotulagem complementar dos suplementos alimentares

### 3.4 DIURÉTICOS

Os diuréticos são classificados de acordo com seu principal mecanismo de ação e estrutura química em: diuréticos tiazídicos, de alça, poupadores de potássio, inibidores da anidrase carbônica e antagonistas da aldosterona. São substâncias sintéticas, com estruturas químicas variadas e que possuem absorção e eliminação diferente de acordo com sua classe farmacológica (OGA, 2014; RANG *et al.*, 2012).

Os fármacos da classe dos diuréticos são empregados no tratamento de hipertensão, insuficiência cardíaca e insuficiência renal (OGA, 2014; RANG *et al.*, 2012). Essa classe terapêutica é a mais utilizada no tratamento da hipertensão devido ao baixo custo dos fármacos (MARTELLI; LONGO; SERIANI, 2008; ALMEIDA *et al.*, 2017) Os diuréticos agem nos rins diminuindo a reabsorção do íon sódio e do íon cloreto, aumentando a perda de água e a excreção do NaCl (RANG *et al.*, 2012; BRUNTO *et al.*, 2012). Os principais efeitos indesejáveis são atribuídos ao aumento excessivo da diurese, que, por conseguinte, pode levar a depleção do

potássio e magnésio, hipotensão, e até mesmo afetar o funcionamento do músculo cardíaco. O local e o mecanismo de ação se diferenciam conforme a classe do fármaco (BRUNTO *et al.*, 2012). A Figura 1 apresenta a estrutura química dos diuréticos utilizados neste estudo.

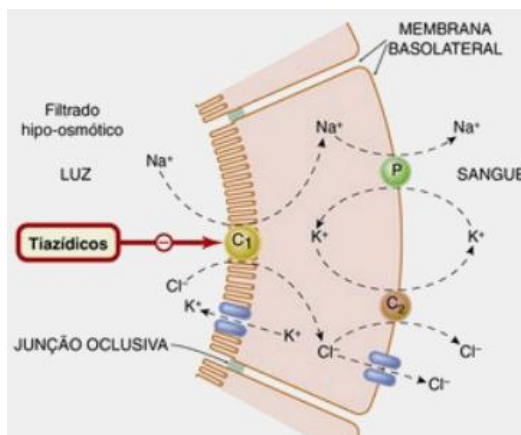


**Figura 1:** Estruturas químicas dos diuréticos utilizados no estudo: amilorida (AML), clortiazida (CTZ), hidroclorotiazida (HCTZ), furosemida (FRS) e clortalidona (CTD).

### 3.4.1 Diuréticos tiazídicos

Os diuréticos tiazídicos foram os primeiros a serem utilizados como anti-hipertensivos e são utilizados até hoje de forma isolada ou em associação com outros anti-hipertensivos, especialmente com os poupadores de potássio ou com os inibidores da enzima conversora da angiotensina II (RANG *et al.*, 2012). Os principais representantes deste grupo são: CTZ, HCTZ, CTD (RANG *et al.*, 2012; MARTELLI; LONGO; SERIANI, 2008). Quanto à farmacocinética, a CTZ e a HCTZ apresentam comportamento semelhante, com início de ação em 2h, pico da ação de 4 a 6h e tempo de meia-vida plasmática de 6 a 9h. No entanto, a CTD possui uma farmacocinética diferenciada dos demais diuréticos tiazídicos, apresentando um início de ação de 1h a 3h, pico da ação de 1 a 5h e tempo de meia-vida plasmática de 1,5 a 4h. (DRUGBANK ,2021; MARTELLI; LONGO; SERIANI, 2008).

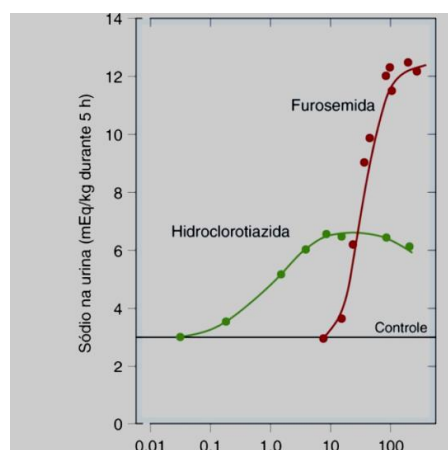
Os medicamentos dessa classe agem na porção inicial dos túbulos contorcidos distais renais, bloqueando o co-transportador de sódio-cloreto na membrana luminal das células tubulares conforme demonstrado na Figura 2 (RANG *et al.*, 2012; BRUNTO *et al.*, 2012).



**Figura 2:** Representação do mecanismo e local de ação dos diuréticos tiazídicos.  
**Fonte:** RANG *et al.*, (2012).

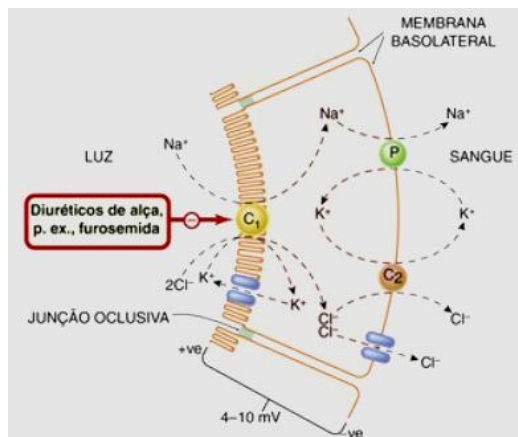
### 3.4.2 Diuréticos de alça

Os diuréticos de alça são os mais potentes entre os diuréticos, possuindo início de ação rápido, e potência de ação bem superior aos diuréticos tiazídicos, conforme demonstra a Figura 3. Entre os fármacos desta classe a FRS, seu principal representante, possui o pico de ação mais rápido, de aproximadamente meia a 1h após administração por via oral, atingindo o pico máximo em 3 a 5h, com tempo de meia-vida plasmática de cerca de 60min podendo ser aumentado em paciente com problemas reanis (DRUGBANK ,201; RANG, H. P. *et al.*, 2012). Os diuréticos de alça possuem a capacidade de excretar de 20% a 25% do sódio existente no filtrado glomerular (RANG, H. P. *et al.*, 2012; BRUNTO *et al.*, 2012). A excreção do sódio é feita através do bloqueio do cotransporte ativo de sódio, cloreto e potássio na membrana luminal da alça de Henle conforme mostra a Figura 4. (RANG, H. P. *et al.*, 2012).



**Figura 3:** Comparação entre do perfil dose resposta da HCTZ e da FRS destacando a potência da FRS.

**Fonte:** RANG *et al.*, (2012).

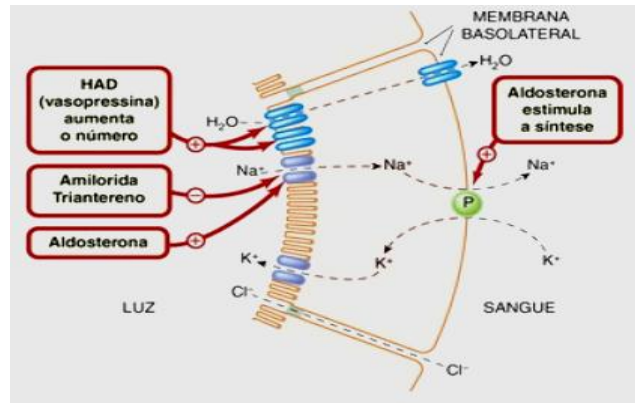


**Figura 4:** Representação do mecanismo e local de ação dos diuréticos de alça na porção ascendente da alça de Henle.

Fonte: RANG *et al.* (2012).

### 3.4.3 Diuréticos poupadores de potássio

Os diuréticos da classe dos poupadores de potássio agem de maneira distinta e possuem efeitos diuréticos menos potentes que os diuréticos de alça e efeitos indesejáveis leves. Os principais representantes dessa classe terapêutica são: AML e espironolactona (BRUNTO *et al.*, 2012; ALMEIDA *et al.*, 2017). O mais importante efeito adverso da classe é a hiperpotassemia, enquanto o uso da espironolactona também pode levar a ginecomastia, ciclo menstrual anormal e perda de libido (BRUNTO *et al.*, 2012). Em relação à farmacocinética, o efeito diurético da AML inicia em 2h após a administração oral, atingindo o pico máximo de concentração plasmática entre 6 e 10h, e os efeitos diuréticos podem durar até 24h (BRUNTO *et al.*, 2012). A espironolactona age competido pelo receptor da aldosterona, enquanto a AML bloqueia os canais de sódio da membrana luminal das células epiteliais do túbulo coletor, conforme Figura 5 (BRUNTO *et al.*, 2012).



**Figura 5:** Representação do mecanismo e local de ação dos diuréticos poupadores de potássio sobre a células do túbulo coletor.

Fonte: RANG *et al.* (2012).

### 3.5 USOS DE DIURÉTICOS NOS ESPORTES

Não existem indicações de que os diuréticos possam contribuir diretamente para melhorar o desempenho dos atletas (OGA, S., 2014). Pelo contrário, testes realizados em atletas demonstram que os diuréticos podem ser prejudiciais ao tônus muscular, principalmente pela redução do volume plasmático e a redução do potássio (OGA, 2014). Entretanto, os diuréticos são utilizados por atletas, pois aumentam a diurese levando a uma perda de peso temporária e artificial (CADWALLADER *et al.*, 2010). O uso destas substâncias ocorre principalmente em esportes subdivididos em categorias de peso, como por exemplo, judô, karatê, boxe, fisiculturismo, ginástica olímpica entre outros (AGUILAR-NAVARRO *et al.*, 2020). Outro uso dos diuréticos é com o intuito de diluir a urina da amostra antidopagem, e isso ocorre em qualquer modalidade esportiva (AGUILAR-NAVARRO, M. *et al.* 2020; HEUBERGER; VAN DIJKMAN; COHEN, 2018). Esse procedimento tem por objetivo dificultar a detecção de substâncias proibidas, facilitando a eliminação das mesmas, por diluição ou por alteração do pH urinário, inibindo a reabsorção passiva (CADWALLADER; MURRAY, 2015; CADWALLADER *et al.*, 2010). Conseqüentemente, o aumento da diurese e a diluição da urina podem diminuir drasticamente a concentração de substâncias ilícitas presentes na mesma, levando ao diagnóstico de falsos negativos (CADWALLADER *et al.*, 2010; HEUBERGER; VAN DIJKMAN; COHEN, 2018).

A presença de diuréticos e agentes mascarantes em amostras analisadas por laboratórios credenciados pelo WADA tem aumentado consideravelmente. No ano de 2008 representaram 7,9% dos casos analisados, enquanto em 2017 o número cresceu para 15% do total (WADA, 2021). Segundo relatórios apresentados pelo WADA, em 2018 houve uma queda de 1%, chegando a 14%, porém em 2019 a presença de diuréticos apresentou um crescimento no total de amostras avaliadas, atingindo o segundo lugar entre as substâncias detectadas, sendo superados somente pelos anabolizantes (Tabela 1) (WADA, 2021). Esses dados também apontam que a FRS e a HCTZ são os diuréticos mais frequentemente detectados, representando 29% e 21% dos casos, respectivamente, conforme Tabela 2 (WADA, 2021).

A FRS é o diurético mais encontrado em análises realizadas pelo WADA. A elevada presença deste diurético nas análises pode estar relacionada a sua alta potência e rápida absorção e eliminação, sendo indetectáveis concentrações na urina até 48 horas após a última administração (WADA, 2021; OGA, 2014; CADWALLADER; MURRAY, 2015; CADWALLADER *et al.*, 2010).

**Tabela 1:** Resultados das análises do controle de doping realizado em laboratórios credenciados pelo WADA em 2019

<b>Grupo de substâncias</b>	<b>Número de ocorrências</b>	<b>Percentual de ocorrência %</b>
Agentes anabolizantes	1825	44%
Diuréticos e outros agentes mascarantes	677	16%
Agentes estimulantes	611	15%
Moduladores Hormonais e Metabólicos	362	9%
Glicocorticoides	230	6%
Beta-2 agonista	156	4%
Canabinoides	130	3%
Hormônios Peptídicos, Fatores de Crescimento e Substâncias Relacionadas	138	3%
Narcóticos	30	1%
Beta-bloqueadores	20	Menos de 1%
Transferência de oxigênio	2	Menos de 1%
Manipulação química e física		Menos de 1%
Total de casos	4180	

**Fonte:** WADA (2021b).

**Tabela 2:** Resultados positivos de análises realizadas por laboratórios credenciados pelo WADA para diuréticos e outros agentes mascarantes em 2019

Diuréticos e outros agentes mascarantes	Número de ocorrências	Percentual de ocorrência %
Furosemida	199	29%
Hidroclorotiazida	141	21%
Carenona	69	10%
Dorzolamida	50	7%
Clorotiazida	48	7%
Probenicida	27	4%
Triatereno	25	4%
Espironolactona	18	3%
Torosamida	16	2%
indapemida	15	2%
Amilorida	14	2%
Acetoazolamida	13	2%
4-amino-6-cloro1,3benzilsulfonamida (ACB)	11	2%
Clorotalidona	9	1%
Brinzolamida	7	1%
Bumetamida	4	Menos de 1%
Altiazida	2	Menos de 1%
Metazolamida	1	Menos de 1%
Bemetazida	1	Menos de 1%
Hidroxietileno de amido	1	Menos de 1%
Total de casos	667	

Fonte: WADA (2021b).

### 3.6 MÉTODOS PARA DETECÇÃO DE ADULTERAÇÃO EM SUPLEMENTOS ALIMENTARES

A cromatografia gasosa acoplada espectroscopia de massas (GC-EM) por muitos anos tem sido utilizada para análise de adulterantes e suplementos alimentares (CAVALCANTI *et al.*, 2013; PARR *et al.*, 2009; PARR *et al.*, 2011). Essa técnica requer moléculas voláteis e estáveis termicamente (PATEL *et al.*, 2014). Entretanto, nos últimos anos a GC-EM vem sendo substituída pela cromatografia líquida acoplada a espectroscopia de massa (CL-EM/EM) para detectar moléculas

não voláteis em amostras líquidas (CHO *et al.*, 2014; WOO *et al.*, 2013). O CL-EM/EM é uma técnica sensível e seletiva, capaz de separar facilmente um composto em uma matriz complexa, sendo muito utilizada para caracterização de adulterantes farmacêuticos (PATEL *et al.*, 2014). Essa técnica também é a mais utilizada para detecção de diuréticos em amostra de urina no controle antidoping pelo WADA, permitindo a identificação de substâncias ácidas e básicas pela ionização dos compostos. Além disso, minimiza as etapas de tratamento das amostras, com a vantagem de não necessitar da etapa de derivação utilizada para tornar a substância mais volátil (AKAMATSU; MITSUHASHI, 2013; CADWALLADER *et al.*, 2010). Essa técnica, porém, tem a desvantagem de não ser muito acessível à rotina laboratorial, devido ao alto custo associado (DURAL, 2020; LIU; WOO; KOH, 2001).

Uma técnica alternativa ao CL-EM/EM é CLAE-UV possuindo custos mais acessíveis. Essa técnica permite identificar e quantificar várias substâncias em uma única análise, presentes em matrizes complexas, incluindo diuréticos em suplementos alimentares. Além disso, o CLAE-UV é uma técnica estabelecida na rotina de muitos laboratórios de controle de qualidade. No entanto, essa técnica possui limite de detecção mais elevado, apresentando limitações na identificação de substâncias análogas ou de novas moléculas (DURAL, 2020; LIU; WOO; KOH, 2001; WOO *et al.* 2013; DECONINCK *et al.*, 2016; MUSCHIETTI; REDKO; ULLOA, 2020). O quadro 2 traz os principais métodos de análises utilizados para a detecção de adulterantes em diversos suplementos alimentares encontrados na literatura científica.

**Quadro 2:** Método de Análises de Contaminantes em Diferentes Matrizes

<b>Adulterante</b>	<b>Matriz</b>	<b>Método</b>	<b>Sensibilidade</b>	<b>Referência</b>
Diuréticos	Urina	LC-EM/EM	1 a 20 ng/ml	DE WILDE, L. <i>et al.</i> , 2018
Teofilina Cafeína Sibutramina	Chá Cápsula gel	LC-EM/EM Para confirmação	5 ng/ml	PASCALI, J. P. <i>et al.</i> , 2018
Sildenafil	Cápsula Pó comprimidos fitoterápicos	CLAE-UV	6,5 ng/ml	DURAL, E., 2020
Anabolizantes Beta agonistas Hormônio metabolitos Diuréticos Estimulantes anorexígenos	Whey-protein e	CL de diluição de isótopos e EM de alta resolução (LC- Orbitrap-HRMS)	1,25 ng/g 5 a 10 ng/g 5 a 12,5 ng/g 6,25 a 62,5 ng/g 3,16 a 25 ng/g	ROIFFÉ, R. R. <i>et al.</i> , 2019
Anorexígenos Antidepressivos Diuréticos laxantes	Pó Cápsulas e comprimidos e	CL de ultra performance acoplado a EM com ionização de electrospray (UHPLC- ESIMS/ EM)	0,15 a 3,95 µg/L	MÜLLER, L. S. <i>et al.</i> , 2019
Cafeína	Comprimidos Cápsulas com conteúdo sólido e cápsulas com conteúdo líquido Decompostos vegetais	GC-EM/EM	25 µg/ml	NEVES, D. B. da J.; CALDAS, E. D., 2017
Anabolizantes	Comprimidos de suspensão- aquosa e suspensão- oleosas de suplementos declarados como dietéticos	GC-EM/EM	2.5 a 10 mg/mL	NEVES, D. B. da J.; CALDAS, E. D., 2017b
Cafeína	Cápsulas de produtos vegetais usados para perda de peso	CLAE-UV LC-EM/EM confirmação	0,16 µg/ml	VIANA <i>et al.</i> , 2018
Diuréticos	Cápsulas, pó e comprimido	CLAE-UV e LC- EM/EM	0,25 a 3 ng/ml	WOO <i>et al.</i> , 2013

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 SUBSTÂNCIAS QUÍMICAS DE REFERÊNCIA (SQR)

Foram utilizadas substâncias químicas de referência para validação da metodologia analítica com teor de pureza superior a 99,00 %.

### 4.2 MATRIZ DE TRABALHO

A matriz utilizada no desenvolvimento e validação do método analítico foi constituída de uma mistura de PSM, a partir de amostras previamente analisada no Laboratório de Produção de Padrões Secundários (LAPPS) da UFRGS, por método qualitativo CLAE-UV, que tiveram resultado negativos para os diuréticos de interesse.

### 4.3 REAGENTES

Os reagentes químicos utilizados para o desenvolvimento do método analítico foram: Metanol (MeOH) grau CLAE (Merck®); Acetonitrila (ACN) grau CLAE (Merck®); ácido acético (CH<sub>3</sub>COOH) grau CLAE (Merck®); Acetato de amônio (C<sub>2</sub>H<sub>7</sub>NO<sub>2</sub>) (Merck®); e água ultrapura.

### 4.4 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS PARA VALIDAÇÃO DO MÉTODO CLAE-UV

#### 4.4.1 Solução SQR

A solução SQR dos diuréticos AML, CTZ, HCTZ, FRS e CTD foi preparada ao abrigo da luz e armazenada em frasco âmbar. Como padrão interno (PI) foi utilizado o Bromazepam, o qual foi preparado da mesma maneira que a SQR. A preparação deu-se através da pesagem exata de cerca de 100 mg de cada substância em balão âmbar de 50 mL. Após as amostras foram dissolvidas com aproximadamente 30 mL de MeOH, levadas ao banho de ultrassom por 10 min, e foi ajustado o volume para se obter uma solução de concentração de 2 mg/mL (2000 µg/ml) de cada diurético. A solução foi filtrada em filtro de 0,45 µm e armazenada em frasco âmbar em geladeira para ser utilizada como solução-mãe.

#### **4.4.2 Preparação da matriz de trabalho**

Foi preparada uma mistura de diferentes amostras de *WP*, negativas para os diuréticos de interesse. A mistura foi tamisada para que se obtivesse uma mistura homogênea em gral e pistil. Posteriormente, a mistura foi colocada em um saco plástico e agitada manualmente por 5 minutos até completar a homogeneização.

#### **4.4.3 Extração dos diuréticos da matriz**

Para o ensaio de extração dos diuréticos da matriz foi pesado exatamente cerca de 500 mg da matriz de trabalho, a qual foi suplementada com a SQR preparada conforme item 4.4.1 (“Solução SQR”), em quantidade suficiente para obter-se a concentração desejada. Então foi completado o volume da solução em até 5 mL e a mistura foi levada ao vortex, agitada por 2 min, e posteriormente submetida ao banho de ultrassom por 30 min. A mistura foi centrifugada por quinze minutos a 2500 rpm de rotação, retirado o sobrenadante e filtrado com seringa e filtro 0,45 µm Millipore (Marck®) antes da injeção em duplicata no sistema CLAE-UV.

### **4.5 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA**

Para o desenvolvimento e a validação do método analítico, foi utilizado o cromatográfico SHIMADZU® modelo LC-20AT equipado com detector UV (DAD) modelo SPD-M101010AV<sub>vp</sub>, degaseificador DGU-20A<sub>3</sub> e injetor automático acoplado ao forno SHIMADZU® modelo CTO-20A. A análise dos dados foi realizada através do software LC-SOLUTIONS®. No desenvolvimento do método, foram testadas colunas cromatográficas C8 com 18 cm e 25 cm de comprimento, assim como diferentes fases móveis contendo MeOH e ACN em diferentes proporções. Após otimização da metodologia analítica, foram estabelecidas as condições de análise conforme demonstrado nas Tabelas 3 e 4.

**Tabela 3:** Condições Cromatográficas do Sistema Analítico CLAE-UV utilizadas no estudo

<b>Componentes</b>	<b>Descrição</b>
Coluna	C8, 250x4,60mm, 5 µm, Phenomenex
Pré-coluna	C8
Fase móvel	ACN/Tampão Acetato de amônio 100 mM, pH 4,5
Comprimento de onda	276 nm
Volume de injeção	20 µl
Temperatura da coluna	35 °C
Fluxo da fase móvel	0,9 mL/mim

**Tabela 4:** Condições de eluição da fase móvel no modo gradiente do sistema CLAE-UV

<b>Tempo de eluição (minutos)</b>	<b>Porcentagem tampão acetato de amônio pH 4,5</b>	<b>Porcentagem de ACN</b>
0,01	90	10
4,0	87	13
15	65	35
20	60	40
23	65	35
26	87	13
30	90	10
35	90	10

#### 4.5.1 Fase móvel e solução diluente

A fase móvel foi preparada utilizando água ultrapura para o preparo do tampão acetato de amônio 100 mM, sendo utilizado CH<sub>3</sub>COOH grau CLAE (Merck®) para corrigir o pH para 4,5. Empregou-se essa solução juntamente com ACN no equipamento CLAE-UV como eluente em um sistema gradiente conforme a tabela 4.

## 4.6 VALIDAÇÃO DO MÉTODO POR CLAE-UV

A validação do método analítico seguiu as diretrizes da RCD nº 166 de 2017 e do *Standard Practices for Method Validation in Forensic Toxicology* (ANVISA, 2017a; Academy Standards Board, 2019). A metodologia analítica por CLAE-UV foi validada de acordo com os parâmetros de seletividade, especificidade, linearidade, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), precisão, exatidão, robustez e efeito da matriz. Na realização dos ensaios foi utilizado o produto da extração da mistura de PSM do tipo WP suplementada com a solução SQR.

### 4.6.1 Seletividade e especificidade do método

A seletividade é definida como a capacidade do método de medir exatamente o analito em presença de outros interferentes como componentes da matriz e outros contaminantes (ANVISA, 2019a). A seletividade do método foi avaliada através da comparação do tempo de retenção ( $T_r$ ) de cada diurético nas amostras com os tempos de retenção obtidos pela injeção no CLAE das soluções da SRQ contendo os diuréticos individualmente, e em conjunto com todos os diuréticos de interesse e o PI. Já para avaliar possíveis interferentes da matriz, foi injetada no CLAE uma solução do extraído da matriz de trabalho preparada conforme item 4.4.2 e extraída de acordo com item 4.4.3. A especificidade do método também foi avaliada através da determinação do espectro UV de cada substância e da pureza de pico cromatográfico obtido pelo do software LC-SOLUTIONS.

### 4.6.2 Linearidade

Para avaliar a linearidade do método por CLAE-UV foram preparadas três curvas padrão do extraído da matriz de trabalho em diferentes concentrações e o PI, sendo esse mantido na concentração fixa de 100 µg/ml. Foram preparadas três curvas padrão com seis concentrações distintas dos diuréticos de interesse de 20, 60, 100, 140, 180, 220 µg/ml e cada concentração foi injetada em duplicata no sistema cromatográfico.

Os resultados foram avaliados através do gráfico de concentrações das soluções de diuréticos em µg/ml (eixo X) versus a razão das médias das áreas dos diuréticos e do PI (eixo Y). O gráfico foi construído separadamente para cada diurético analisado. Em cada gráfico foi determinado o Coeficiente de Correlação de Pearson “r” e a equação da reta. A equação da reta foi analisada através do estudo da regressão linear, pelo método de mínimos quadrados e validada pela análise de variância (ANOVA).

#### **4.6.3 Limites de Detecção e Limites de Quantificação (LQ)**

O limite de detecção (LD) e de quantificação (LQ) foram estimados através das equações 1 e 2, respectivamente. Os dados destas equações foram obtidos das curvas padrão analisadas em diferentes dias, sendo que foi calculado individualmente para cada diurético.

$$\text{Equação 1. } LD = (DP \times 3,3) / IC$$

$$\text{Equação 2. } LQ = (DP \times 10) / IC$$

\*DP: Desvio padrão médio do intercepto y de três curvas padrão

IC: Inclinação da curva média das três curvas padrão

#### **4.6.4 Precisão**

A precisão do método foi avaliada através da determinação de três concentrações 60 µg/mL (baixa), 120 µg/mL (média) e 220 µg/mL (alta), com cinco extrações da matriz para cada concentração, conforme descrito no item 4.4.3, e injetadas em duplicatas. As áreas foram avaliadas pela média e desvio padrão das duas injeções. A média das áreas de cada concentração foi dividida pela média das áreas do PI (bromazepam). As referidas análises foram realizadas em três dias distintos, totalizando 45 soluções extraídas analisadas. A repetibilidade intra-dia foi avaliada pelo cálculo do coeficiente de variação (CV%) das cinco amostras extraídas de cada concentração. Já a precisão inter-dia foi avaliada através do cálculo do coeficiente de variação (CV%) das análises realizadas em dias diferentes,

totalizando 15 amostras de cada concentração. Os resultados obtidos foram comparados através da análise de variância (ANOVA) considerando um  $\alpha$  0,05.

#### 4.6.5 Exatidão

##### 4.6.5.1 Teste de recuperação

Para o teste de recuperação foram utilizadas as soluções extraídas em três concentrações, sendo cinco repetições de cada concentração 60  $\mu\text{g/mL}$  (baixa), 120  $\mu\text{g/mL}$  (média), 220  $\mu\text{g/mL}$  (alta), preparadas conforme item 4.4.3 e Tabela 5. O ensaio foi realizado em três diferentes dias. As soluções extraídas e a solução SQR foram injetados em duplicata no sistema CLAE-UV. A recuperação foi calculada conforme a equação 3.

$$\text{Equação 3. } C_{ext} = (R_{Aext} * C_{SQR}) / R_{SQR}$$

\*  $C_{ext}$  = concentração do diurético recuperado

$R_{Aext}$  = Razão das áreas do diurético de interesse pela área do PI do extraído

$C_{SQR}$  = Concentração do diurético de interesse da solução SQR

$R_{SQR}$  = Razão das áreas do diurético de interesse pela área do Pi na solução SQR

Tabela 5: Preparo das amostras para o teste de recuperação

Número de amostras analisadas (n)	Volume de cada diurético adicionado (mL) (solução- mãe)	Volume do padrão interno adicionado (mL)	Concentração final ( $\mu\text{g/mL}$ )
5	0,015	0,5	60
5	0,3	0,5	120
5	1,1	0,5	220

#### 4.6.6 Robustez

A robustez do método analítico foi avaliada através da alteração de parâmetros como fluxo do eluente, alterado de 0,9 mL/min para 0,8 mL/min ou para 1,0 mL/min; e temperatura do forno, modificada de 35 °C para 37 °C ou para 33 °C.

A análise das diferentes condições cromatográficas foi realizada em duplicata e separadamente utilizando a solução SQR na concentração de 100 µg/ml.

#### **4.6.7 Efeito matriz**

Para avaliação do efeito matriz foram construídas três curvas na presença da matriz de trabalho suplementadas com a solução SQR e três curvas somente com a solução SQR. Todas as soluções foram preparadas de maneira independentes. As curvas possuíam seis pontos de concentrações (20, 60, 100, 140, 180, 220 µg/mL), juntamente com o PI na concentração de 100 µg/mL. Foi avaliado o paralelismo das curvas através do teste t da variância das inclinações das retas, com nível de significância de 95% (ANVISA, 2017b)

#### **4.7 ESTUDO DE ESTABILIDADE DO EXTRATO**

A estabilidade da solução extraída foi avaliada em três situações distintas: através do tempo de permanência na bancada, tempo no equipamento e tempo em geladeira.

No primeiro dia de validação do método foram preparados nove vials contendo o extraído, preparado conforme item 4.4.3, sendo três vails com a concentração baixa de 60 µg/mL (B1), três vails com a concentração média de 120 µg/mL (M1), e três vails com a concentração alta de 220 µg/mL (A1). Foi injetado no sistema CLAE-UV em duplicata os três vials de cada concentração B1, M1 e A1 imediatamente após o preparo do extraído e re-injetadas após 30h. Durante esse período os extraídos permaneceram na raque do equipamento. Foram colocadas também na bancada por 48h, três vails contendo as três concentrações B1, M1 e A1, e três vails de mesmas concentrações foram levados a geladeira, onde permaneceram por sete dias. Transcorrido o tempo de bancada e de geladeira, as amostras contendo os extraídos foram injetadas no sistema CLAE-UV em duplicata. Foi calculada a recuperação em porcentagem para cada amostra. Os resultados das amostras que permaneceram no equipamento, na bancada e na geladeira foram comparados com os resultados obtidos para as amostras injetadas logo após o preparo, para avaliar a estabilidade do extrato.

#### 4.8 ANÁLISE DAS AMOSTRAS COMERCIAIS

Para testar a aplicabilidade do método analítico foram coletadas 21 amostras comerciais de usuários dos suplementos PSM do tipo WP residentes na região metropolitana de Porto Alegre. Cada indivíduo cedeu aproximadamente 20g da mostra de PSM. As amostras foram levadas ao LAPPS, na Faculdade de Farmácia da UFRGS. Cada amostra foi homogeneizada em gral sendo pesado 500 mg da mesma em um falcon, adicionado 0,5 mL da solução-mãe (SRQ) e de PI na concentração de 2000 µg/ mL e 4,5 ml de MeOH para realização da extração dos possíveis contaminantes. Após adição do solvente, as amostras foram agitadas por aproximadamente dois minutos no vórtex e levadas ao ultrassom por trinta minutos. Posteriormente, a mistura foi centrifugada por quinze minutos a 2500 rpm de rotação, retirado o sobrenadante e filtrado com seringa e filtro 0,45 µm (Millipore-Merck®) antes da injeção em duplicata no sistema CLAE-UV. Concomitante foi injetada uma solução SRQ contendo os diuréticos em estudo e o PI com concentração definida. Foi realizada a média das áreas de cada substância. Para o cálculo da concentração dos diuréticos nas amostras positivas procedeu-se conforme equação 3.

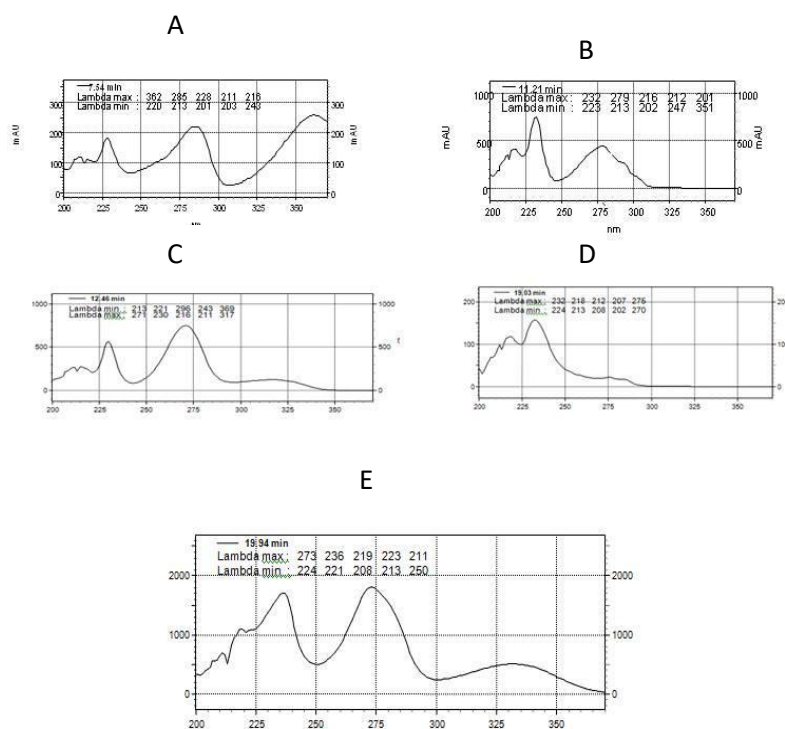
## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO POR CLAE-UV

O método CLAE-UV é amplamente empregado na indústria para controle de qualidade e preconizado em vários códigos oficiais (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010). Nesse estudo, o desenvolvimento do método por CLAE-UV iniciou-se através da avaliação do perfil cromatográfico da solução SQR contendo os diuréticos ALM, CTZ, HCTZ, CTZ, FRS e o PI (Bromazepam).

Nesse estudo optou-se por utilizar um único comprimento de onda de análise de 276 nm, de forma a desenvolver um método acessível e prático para controle de qualidade de rotina, a ser realizado em equipamento CLAE-UV, sem necessidade do uso de detector de fotodiodo (DAD), uma vez que todos os diuréticos absorvem neste comprimento, conforme pode ser observado na Figura 6. Além disso, o comprimento de onda selecionado foi o que apresentou menor interferência dos componentes da matriz. Para obter melhor resolução dos picos das substâncias de interesse foi utilizado um sistema gradiente, sendo o eluente composto por ACN e tampão acetato anônimo 100 nm (pH 4,5). A concentração do tampão favoreceu a menor formação de cauda na eluição do diurético AML (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).

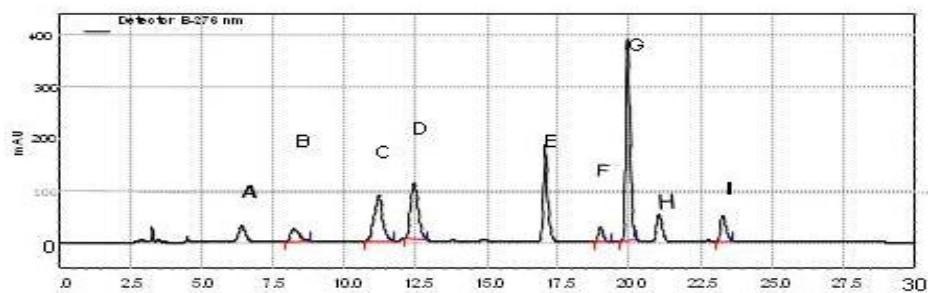
A temperatura do forno de escolha foi de 35 °C, na qual obteve-se melhor resolução dos picos dos compostos de interesse. A identificação de cada diurético foi realizada através da análise em separado do tempo de retenção de cada substância na solução SQR, bem como da pureza de pico, conforme pode ser observado na Tabela 6. Na Figura 7 pode-se observar o perfil cromatográfico obtido para a mistura dos diuréticos, com a adequada separação dos picos de cada analito, bem como os picos provenientes da matriz.



**Figura 6:** Espectro UV de cada diurético analisado, obtido pela varredura do detector DAD em cada tempo de retenção: 7,54 mim = Amilorida=A; 11,21 mim = Clortiazida=B; 12,46 mim = Hidroclorotiazida=C; 19,03 mim = Clortalidona=D; 19,94 mim = Furosemida=E.

**Tabela 6:** Tempo de retenção e pureza de pico das substâncias de interesse no estudo

Substância de Análise	Tr (minutos)	Pureza de Pico
AML	7,54	0,991
CTZ	11,21	0,997
HCTZ	12,46	0,998
CTD	19,00	0,998
FRS	19,94	0,999
PI	23,27	0,999



**Figura 7:** Cromatograma do produto de extração da matriz mostrando a resolução dos picos dos compostos analisados no comprimento de onda de 276 nm, na concentração de 150 µg/mL para os analitos e 100 µg/mL para o PI. Onde: A, E, H = Matriz; B= Amilorida; C= Clorotiazida; D= Hidroclortiazida; F= Clorotalidona; G= Furosemda; I= Bromazepam (PI).

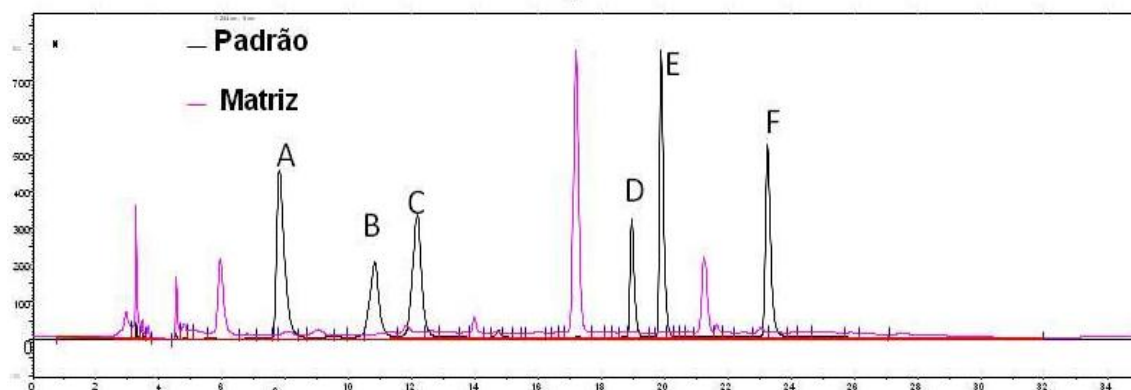
## 5.2 MÉTODOS DE PREPARO DA AMOSTRA

A escolha do método de preparo da amostra a partir de uma matriz complexa é sempre um desafio devido à presença de interferente na análise. A extração sólido-líquido e a separação por centrifugação, mostrou-se uma estratégia viável de ser aplicada em uma rotina de laboratório de controle de qualidade por ser um método rápido e de fácil execução. A ACN, apesar de precipitar proteínas, permite a extração de substâncias de maior diferença de polaridade, quando comparada ao MeOH. Então, o solvente de escolha para extração mais seletiva dos diuréticos foi o MeOH que é um dos solventes mais utilizados para a extração de adulterantes em suplementos alimentares (POLSON *et al.*, 2003; MÜLLER *et al.*, 2019; KI *et al.*, 2019). Desta forma, as amostras foram extraídas com MeOH, levadas ao vortex por dois minutos, submetidas ao banho de ultrassom por trinta minutos e posteriormente centrifugadas por quinze minutos a 2500 rpm.

## 5.3 VALIDAÇÃO DO MÉTODO PROPOSTO PARA DETECÇÃO DE DIURÉTICOS EM PSM

### 5.3.1 Seletividade

O método mostrou-se seletivo, não havendo interferentes da matriz, o qual foi comprovado pela determinação da pureza de pico (Tabela 6) e pela sobreposição dos cromatogramas da solução SQR e do extraído, conforme Figura 8.



**Figura 8:** Cromatogramas da matriz de trabalho (linha rosa) e dos padrões dos compostos de interesse (linha preta) demonstrado não haver sobreposição dos picos da matriz com os diuréticos analisados na concentração de 200 µg/mL. A= Amilorida, B= Clorotiazida, C= Hidroclorotiazida, D= Clortalidona, E= Furosemida, F= Pl.

### 5.3.2 Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)

Conforme os guias oficiais LD e LQ podem ser calculados de acordo com a equação descrita no item 4.6.3. O LD é a menor quantidade do analito que pode ser detectada na amostra. Porém, não pode ser quantificado em condições experimentais, uma vez que o menor valor quantificado nas condições experimentais é denominado LQ (ANVISA, 2017b). Os resultados podem ser vistos na Tabela 7. O método mostrou-se mais sensível para a detecção da Clortalidona, a qual apresentou o menor LD e LQ, de 0,900 e 2,73 µg/ml, respectivamente. Já a Amilorida apresentou os maiores valores de LD e LQ (5,13 e 15,55 µg/ml, respectivamente), evidenciando uma menor sensibilidade para detecção esse analito.

**Tabela 7:** Limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), equação da reta referente, o coeficiente de regressão linear, e inclinação da reta obtidos para cada analito de interesse.

Substância	Equação da Reta média	Coeficiente de regressão linear (r)	Dp dos interceptos das retas	Inclinação da reta	LD (µg/ml)	LQ (µg/ml)
Amilorida	$Y=0,0078X-0,1247$	0,9944	0,01221	0,0078	5,13	15,55
Clortiazida	$Y=0,00286+0,0961$	0,9967	0,03457	0,0286	3,98	12,08
Hidroclortiazida	$Y=0,00289X+0,1188$	0,9967	0,03552	0,0289	4,06	12,29
Clortalidona	$Y=0,00037X+0,0027$	0,9957	0,000737	0,0027	0,900	2,73
Furosemida	$Y=0,0365+0,0983$	0,9980	0,03719	0,0365	3,36	10,18

### 5.3.3 Linearidade

A linearidade do método foi avaliada a partir da análise de seis concentrações diferentes do extraído da matriz de trabalho, injetadas em duplicata no sistema cromatográfico, sendo realizado em três diferentes dias conforme descrito no item 4.6.2. A relação entre as concentrações dos analitos e as razões entre as áreas dos picos das substâncias em análise e a área do pico do PI foram submetidas a análise de regressão linear para determinação da equação da reta e do coeficiente de determinação “r”. Os resultados estão descritos na Tabela 7. As retas mostraram comportamento linear, com valores de  $r > 0,99$ , conforme preconiza os compêndios oficiais da ANVISA (ANVISA, 2017a).

Os resultados do ensaio de linearidade também foram submetidos à análise de variância (ANOVA) conforme Tabela S1 do material suplementar. Os resultados obtidos indicam que as curvas padrão obtidas apresentam regressão linear significativa, e ausência de desvio de linearidade.

#### **5.3.4 Precisão**

A precisão é a medida usada para avaliar a proximidade dos resultados entre uma série de amostras homogêneas. A repetibilidade ou precisão intra-dia é a concordância dos resultados obtidos no mesmo dia, pelo mesmo analista e mesmo instrumento de análise. Enquanto a precisão inter-dia avalia a habilidade do método em fornecer resultados precisos em dias diferentes com curvas de calibração distintas. A avaliação da precisão intra-dia e inter-dia foi realizada através do coeficiente de variação (CV%) conforme descrito no item 4.6.4 e as amostras preparadas conforme o item 4.4.3. Os resultados obtidos foram submetidos à análise da variância (ANOVA) e podem ser observados na Tabela 8. A precisão do método analítico demonstrou resultados satisfatórios para os três níveis de concentração avaliados (baixo, médio e alto) com valores de CV% < 4 % para FRS, < 5 % para CTD e HCTZ, e < 8% AML e CTZ. Os valores de CV% obtidos não excedem os limites de até 20% para as concentrações baixas e de até 15% para as concentrações médias e altas, conforme preconizado pela legislação para matrizes complexas.

#### **5.3.5 Exatidão**

A análise de exatidão objetiva verificar o quanto o resultado do método de estudo se aproxima do valor real (Anvisa,2017a). A exatidão deve ser verificada após determinada a linearidade, sendo utilizado no mínimo nove pontos com três concentrações diferentes (baixa, média e alta), dentro do intervalo de linear do método analítico (ANVISA,2017a). A exatidão é expressa pela relação da concentração média determinada experimentalmente e a concentração real (ANVISA,2017a). A avaliação da exatidão foi realizada conforme descrito no item 4.6.5 e os resultados podem ser observados na Tabela 8. A exatidão do método

analítico demonstrou resultados satisfatórios para os três níveis de concentração avaliados (baixo, médio e alto) com valores de médios de recuperação entre 95,88 e 104,25 % para todos os diuréticos analisados.

**Tabela 8:** Resultados da precisão e exatidão obtidos para cada diurético analisado.

<b>Analito</b>	<b>Controles (µg/ml)</b>	<b>CV% intra-dia</b>	<b>CV% inter-dia</b>	<b>Concentração Média recuperada (µg/ml)</b>	<b>Recuperação Média (%)</b>
Amilorida	60	6,17/2,02/6,16	5,05	57,53	95,88
	120	5,01/3,36/3,09	3,76	117,21	97,67
	220	2,86/5,92/1,86	7,96	218,04	99,10
Clorotiazida	60	8,84/5,62/3,26	6,21	60,85	101,41
	120	2,17/2,25/2,78	4,00	120,63	100,52
	220	1,03/1,04/0,62	3,61	227,17	103,25
Hidroclorotiazida	60	4,33/4,13/6,64	4,81	59,02	98,36
	120	3,62/3,58/4,19	3,86	125,11	104,25
	220	1,56/3,08/1,70	3,40	220,72	100,32
Clorotalidona	60	4,66/1,90/2,31	3,89	57,67	96,12
	120	4,48/2,00/3,16	3,14	122,38	101,98
	220	2,41/1,73/2,74	2,16	226,14	102,79
Furosemida	60	1,40/0,86/2,92	3,31	62,05	103,41
	120	2,93/2,50/1,98	2,53	124,52	103,76
	220	0,83/2,96/3,53	2,71	221,83	100,83

### 5.3.6 Robustez

O ensaio da robustez foi realizado conforme o item 4.6.6. Pode-se observar pequenas alterações nos tempos de retenção, e na razão da área do pico do analito pela área do PI (Tabela 9). Embora possa se verificar uma alteração maior da resolução entre os picos cromatográficos com as mudanças no método analítico, os valores obtidos ainda são muito superiores do mínimo recomendável ( $>2,0$ ). Quanto à concentração determinada, os diuréticos Clorotiazida e Clorotalidona apresentaram o maior DPR de 2,05 %, e o analito com menor variabilidade na concentração foi a furosemida, com DPR de 1,47% (Tabela 9).

**Tabela 9:** Resultados do teste de robustez: tempo de retenção; resolução do pico cromatográfico; razão da área do pico do analito pela área do PI; concentração calculada ( $\mu\text{g/ml}$ ) e o DPR (%) de cada concentração

Substância	Tempo de retenção	Resolução do pico	Razão das áreas	Concentração ( $\mu\text{g/ml}$ )	DPR (%) das concentrações
<b>Amilorida</b>					
M	7,54	3,5	0,611	100,00	1,49
Mf+	7,63	3,0	0,592	96,840	
Mf-	7,41	3,8	0,610	99,780	
Mt+	7,50	4,2	0,611	99,950	
Mt-	7,58	3,0	0,612	100,110	
<b>Clorotiazida</b>					
M	11,21	4,2	2,241	100,044	2,05
Mf+	11,13	3,5	2,350	104,910	
Mf-	11,32	4,3	2,234	99,732	
Mt+	11,15	4,8	2,281	101,830	
Mt-	11,21	4,1	2,260	100,890	
<b>Hidroclorotiazida</b>					
M	12,46	5,0	3,251	100,030	1,97
Mf+	12,32	4,5	3,330	102,461	
Mf-	12,51	5,5	3,156	97,107	
Mt+	12,30	5,8	3,230	99,380	
Mt-	12,52	4,9	3,280	100,920	
<b>Clorotalidona</b>					
M	19,00	5,6	0,371	100,270	2,05
Mf+	18,86	5,4	0,361	97,567	
Mf-	19,08	5,9	0,351	94,864	
Mt+	19,00	5,9	0,356	96,216	
Mt-	18,93	4,8	0,360	97,297	
<b>Furosemida</b>					
M	19,94	7,7	3,781	100,026	1,47
Mf+	19,84	7,2	3,752	99,259	
Mf-	20,05	7,8	3,805	100,661	
Mt+	19,98	7,9	3,671	97,116	
Mt-	19,80	7,5	3,703	97,962	

\*M = método proposto: fluxo 0,9 mL/min, temperatura 35°C; Mf+ = fluxo 1,0 33 °C.mL/min, Mf- = fluxo 0,8 mL/min, Mt+ = temperatura 37 °C; Mt- = temperatura

### 5.3.7 Efeito matriz

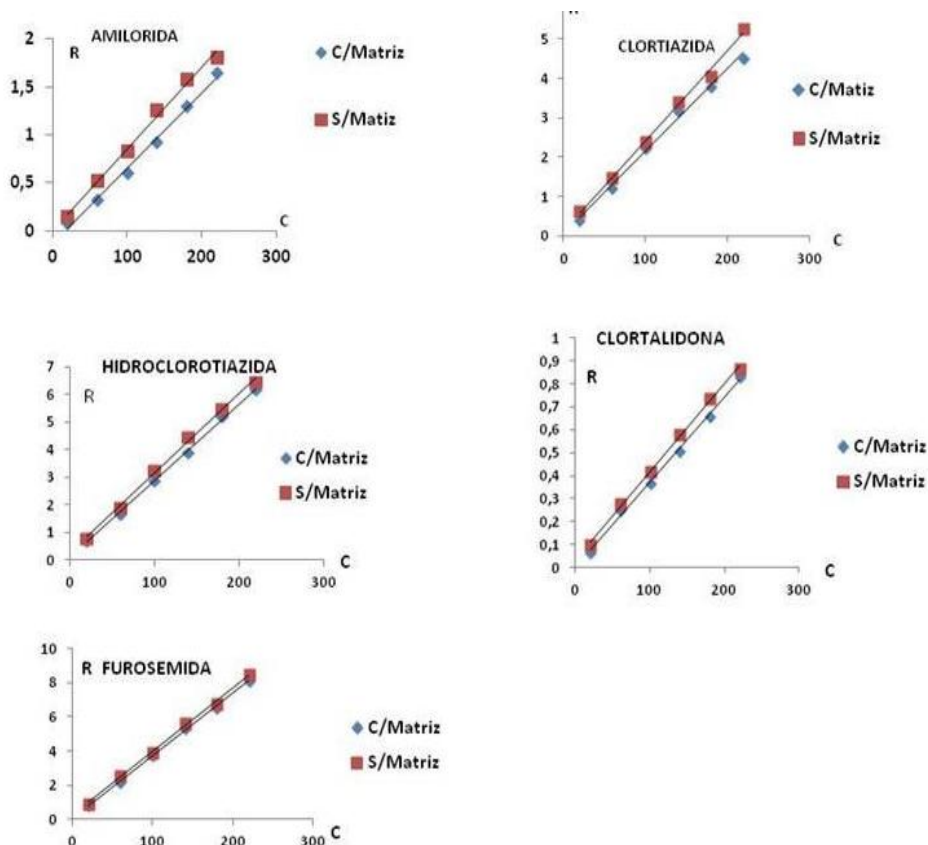
O efeito matriz é definido como o aumento ou diminuição da resposta na análise relacionado à amostra de matrizes complexas, o qual pode interferir no resultado das análises (ANVISA, 2017b). O efeito matriz pode ser calculado pela comparação da resposta analítica do extrato da matriz complexa suplementada com a solução SQR e a resposta analítica da solução padrão, mas mesmas concentrações. Quando a diferença da resposta não for superior a  $\pm 20\%$ , considera-se que não houve efeito matriz significativo (OSHITA; JARDIM, 2015; ECONOMOU *et al.*, 2009).

Neste trabalho o efeito matriz foi avaliado pela variância equivalente dos coeficientes angulares das retas realizada conforme item 4.6.7. As retas são lineares com  $r > 0,99$  (Tabela 10), e a figura 9 demonstra o paralelismo das retas obtidas no teste de efeito matriz, indicando que não há interferência da matriz na análise. Na avaliação estatística foi utilizado o teste T com significância de 95% para a comparação dos coeficientes angulares (a) e lineares (b) das equações da reta médias obtida, sendo que o resultado não mostrou diferença significativa ( $p > 0,05$ ) (Tabela 10).

**Tabela 10:** Determinação do efeito matriz: r = coeficiente de regressão linear “r” da reta média das soluções SQR e da matriz suplementada com SQR; valor de p para a comparação dos coeficientes angulares (a) e lineares (b) das equações da reta médias obtidas para SQR e da matriz suplementada com SQR.

Substância	r (matriz)	r (SQR)	p (a)	p (b)	Equação da reta média SQR	Equação da reta média da Matriz
Amilorida	0,994	0,996	0,304	0,351	$Y=0,089x-0,1254$	$Y=0,0078X-0,1247$
Cloroditazida	0,996	0,996	0,446	0,099	$Y=0,028x+0,14$	$Y=0,00286+0,0961$
Hidroclorotiazida	0,996	0,997	0,465	0,093	$Y=0,0290+0,2669$	$Y=0,00289X+0,1188$
Clorotalidona	0,995	0,997	0,439	0,176	$Y=0,038+0,0388$	$Y=0,00037X+0,0027$
Furosemida	0,998	0,997	0,276	0,231	$Y=0,373x+0,1379$	$Y=0,0365+0,0983$

\* $p > 0,05$



**Figura 9:** Gráficos de cada analito referentes ao teste de efeito matriz: em azul as retas do produto de extração da matriz e em vermelho as retas da solução SQR. Eixo X representa a razão entre a área do analito e o PI, e o eixo Y a concentração do analito.

### 5.3.8 Estudo da estabilidade do extrato

A estabilidade é definida como o tempo durante o qual a especialidade farmacêutica, ou mesmo a matéria-prima isoladamente, mantém dentro dos limites especificados as mesmas condições e características que possuía quando da época de sua fabricação, durante todo o período de estocagem e uso (SILVA *et al.*, 2009). A estabilidade dos produtos farmacêuticos depende de fatores ambientais como temperatura, umidade, luz e de outros fatores relacionados ao próprio produto como propriedades físicas e químicas de substâncias ativas e excipientes farmacêuticos (ANVISA, 2005).

O teste de estabilidade do extraído da matriz foi realizado visando avaliar se houve diminuição da concentração das substâncias extraídas durante as análises.

Os testes foram realizados ao abrigo da luz, uma vez que o padrão interno, Bromazepam é uma substância fotossensível (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).

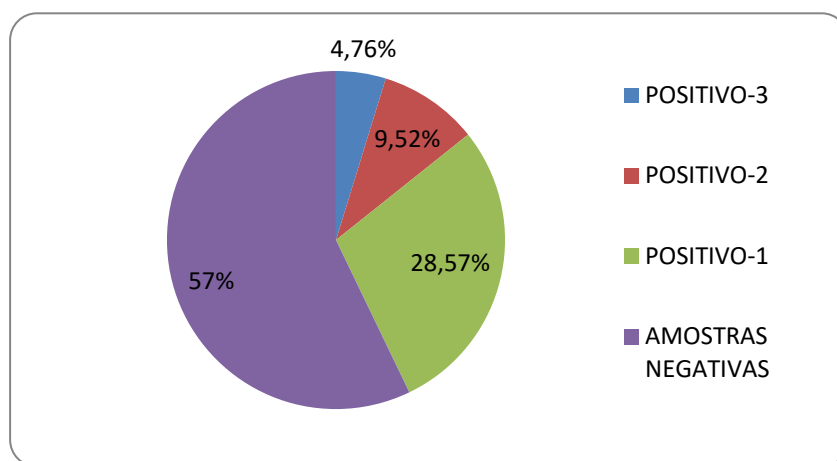
A estabilidade das amostras foi avaliada nas concentrações baixa (B1), média (M1) e alta (A1), conforme descrito no item 5.6.9, e os resultados são apresentados na Tabela 11. As substâncias de interesse se mantiveram inalteradas após trinta horas de permanência no equipamento, quarenta e oito horas em bancada ou até sete dias em geladeira, conforme se observa pelos valores percentuais de recuperação superiores a 94%. Os resultados quando comparados pelo teste ANOVA e não demonstraram diferenças significativas com intervalo de 95% de confiança e  $p > 0,05$ .

**Tabela 11:** Resultados do teste de estabilidade realizados tendo como referência o produto analisado imediatamente após o processo de extração da matriz de trabalho (controle), mostrando a quantidade recuperada antes e após a exposição as diferentes condições de armazenamento.

Substância	% Recuperação no Controle	% Recuperação do Tempo de Geladeira	Valor de p	% Recuperação do Tempo de Bancada	Valor de p	% Recuperação do Tempo no Equipamento	Valor de p
<b>AMILORIDA</b>							
B1	99,46	100,03		100,20		100,02	
M1	96,67	95,70	0,243	97,08		96,07	
A1	99,44	101,03		101,0	0,375	102,03	0,218
<b>CLORTIAZIDA</b>							
B1	100,59	98,51		98,54		96,81	
M1	99,08	97,81	0,268	101,02		97,78	0,247
A1	100,50	98,81		98,51	0,256	99,71	
<b>HIDROCLORTIAZIDA</b>							
B1	98,53	95,39		100,08		99,81	
M1	97,58	98,96	0,135	98,56		95,03	
A1	96,61	100,01		97,51	0,355	94,95	0,106
<b>CLORTALIDONA</b>							
B1	94,81	95,30		97,52		94,02	
M1	101,02	98,40	0,300	99,02	0,168	100,3	0,499
A1	95,86	99,50		96,03		99,08	
<b>FUROSEMIDA</b>							
B1	105,02	100,1		99,05		101,02	
M1	102,03	101,30	0,195	98,72	0,189	99,75	0,429
A1	99,98	98,80		96,78		96,74	

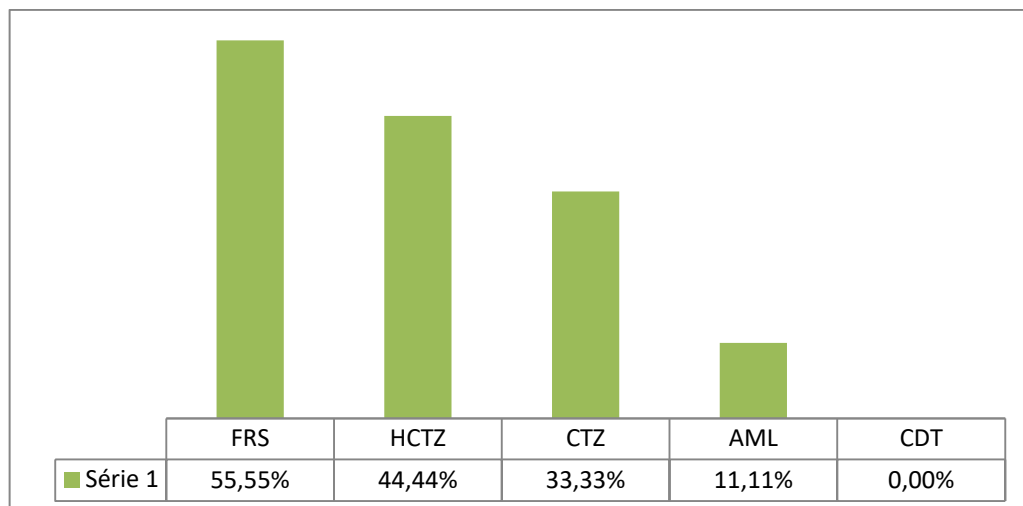
#### 5.4 ANÁLISE DE AMOSTRAS COMERCIAIS POR CLAE-UV

Na avaliação da aplicabilidade do método analítico desenvolvido e validado foram analisadas 21 amostras comerciais de PSM do tipo WP oriundas de consumidores de Porto Alegre, Rio Grande do Sul. Dentre as amostras analisadas, 57,14 %, sendo 12 amostras apresentaram resultado negativo e 42,85 %, sendo 9 amostras resultado positivo para pelo menos um dos diuréticos analisados (Figura 10). Das amostras positivas, 28,57 % apresentaram resultado positivo para 1 diurético, 9,52 % para 2 diuréticos e 4,76% para 3 dos diuréticos avaliados.



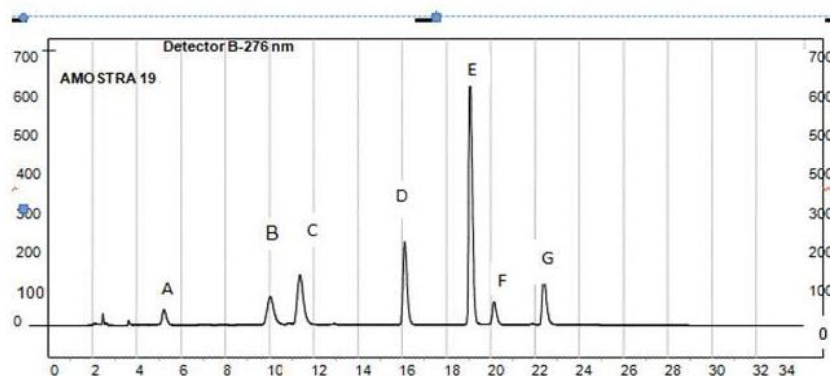
**Figura 10:** Resultado das análises realizadas em 21 amostras comerciais de PW

O diurético mais frequentemente detectado nas amostras foi a FRS (55,00%) 5 amostra, seguida da HCTZ (44,44%) 5 amostra e CTZ (33,33%) 3 amostra. A AML apresentou o menor percentual entre as amostras (11,11%) 1 amostra, enquanto a CTD não foi detectada em nenhuma das amostras (Figura 11).



**Figura 11:** Percentual das análises positivas para cada diurético em relação ao total de amostras positivas avaliadas.

Chama a atenção o resultado da análise de uma amostra (AM19), na qual foi possível detectar a presença de três diuréticos, FRS, HCTZ e CTZ (Figura 12).



**Figura 122:** Cromatograma da amostra AM19 com resultado positivo para três diuréticos: B= clorotiazida ,C= hincolorotiazida, E= furosemida, sendo A, D e F picos referentes a matriz, e G= PI.

Conforme relatos na literatura é comum a detecção de contaminantes em suplementos alimentares, entre eles os diuréticos (Maughan R.J. *et al.*, 2018; NEVES; CALDAS, 2017a; NEVES; CALDAS, 2017b). A FRS, encontrada em maior percentual nas análises, pode estar relacionada ao fato dessa ser excretada rapidamente do organismo, podendo dificultar a identificação em exames antidoping

(OGA, 2014). Além disso, a FRS apresenta maior ação diurética entre os diuréticos analisados, possuindo potência superior a HCTZ (OGA, 2014; RANG *et al.*, 2012). Já o segundo diurético mais encontrado foi a HCTZ, que é um diurético amplamente utilizado no Brasil, além de ser de baixo custo e de fácil acesso (GONTIJO *et al.*, 2012).

Outro diurético detectado nas amostras foi a CTZ, a qual possui uma ação diurética menor entre os tiazídicos (RANG *et al.*, 2012) e não possui registro ativo na ANVISA, não podendo, portanto, ser comercializado para uso humano no Brasil (ANVISA, 2021). Porém, esse princípio ativo tem registro e é comercializado no Canadá e nos Estados Unidos da América (DRUGBANK, 2021). Desta forma, a presença desse diurético nas amostras em percentual significativo pode estar relacionada ao fato de que a maioria dos WP não são produzidos no Brasil, sendo muitas vezes importados ou adquiridos via internet, e possuindo qualidade questionável (AQUINO NETO, 2001; SÁNCHEZ-OLIVER *et al.*, 2020). Outra hipótese para a presença da CTZ é que a mesma provém de impurezas da síntese ou degradação da HCTZ. No entanto, essa hipótese parece ser menos provável, uma vez que a CTZ foi encontrada em amostras juntamente com a HCTZ, mas também de forma isodada e em quantidades superiores as que normalmente decorrem de contaminação ou degradação do produto original. O diurético CTD não foi detectado em nenhuma amostra analisada, e a AML foi encontrada em apenas uma amostra de PSM.

A concentração detectada dos diuréticos das amostras positivas teve grande variação entre os produtos, porém todas ficaram na faixa da linearidade do método desenvolvido, conforme demonstrado na Tabela 12.

**Tabela 12:** Resultado das análises das amostras positivas de PSM para os diuréticos de interesse. Os resultados são expressos como mg do analito/g de PSM e em relação a dose recomendada do PSM pelo fabricante

<b>Diurético</b>	<b>Quantidade do analito (mg/g)</b>	<b>Quantidade do analito em relação a Dose de PSM (mg/35g)</b>
<b>FUROSEMIDA</b>		
AM9	0,20	7,00
AM13	1,82	63,7
AM14	0,52	18,20
AM19	0,62	21,7
AM20	0,28	9,80
<b>HIDROCLORTIAZIDA</b>		
AM4	1,40	49,00
AM6	0,66	23,1
AM13	0,33	11,55
AM19	0,25	8,75
<b>CLORTIAZIDA</b>		
AM6	1,87	64,75
AM15	0,22	7,70
AM19	0,23	8,05
<b>AMILORIDA</b>		
AM16	0,23	8,05

A quantidade de PSM recomendada pelos fabricantes é de cerca de 35 g pré ou pós-treino. Tomando como base essa dosagem, a quantidade de diuréticos encontrada na maioria das amostras são sub-terapêuticas, pois as dosagens recomendadas para uso oral adulto são de 20-80 mg/dia com dose máxima de 600 mg para FRS; 12,5-100 mg/dia com dose máxima de 200 mg para HCTZ (MINISTERIO DA SAÚDE, 2010); 0,5 – 1,0 g/dia para CTZ; e 5-10 mg/dia para AML (DURGBANK ,2021). Apesar da maioria dos resultados refletirem uma dosagem inferior à recomendável, essa dosagem pode gerar ação diurética, podendo ser

identificada em caso de exames antidoping, uma vez que as técnicas usadas nos laboratórios antidopagem tem se tornado cada vez mais sensíveis (WADA, 2021).

No entanto, algumas amostras apresentaram mais de um diurético, o que vem a corroborar com a literatura que relata contaminação em suplementos alimentares e o risco desta para a saúde dos consumidores (WALPURGIS *et al.*, 2020; CHRISTOU *et al.*, 2019; JUSTA NEVES; CALDAS, 2015). Conforme já mencionado, a Figura 12 mostra o perfil cromatográfico de uma amostra onde foram detectados a presença de três diuréticos, o que pode potencializar os efeitos colaterais desses fármacos e o risco a saúde.

Atualmente, a legislação não preconiza a análise de compostos com ação diurética em suplementos alimentares do tipo P. No entanto, torna-se imprescindível para segurança dos atletas que os produtos consumidos não estejam contaminados por substâncias proibidas no esporte, uma vez que o uso de suplementos alimentares vem crescendo entre praticantes de esportes e já existem relatos na literatura de atletas testando positivo em exame antidoping após o uso de diferentes suplementos alimentares. Desta forma, a avaliação da presença e quantificação destes compostos é fundamental para que os atletas não sejam prejudicados por uso não intencional destas substâncias.

Em vista disso, o presente estudo contribuiu com o desenvolvimento de metodologia analítica inédita de extração, identificação e quantificação dos diuréticos AML, CTZ, HCTZ, CTD e FRS presentes nos PSM do tipo WP usando a técnica de CLAE-UV. O método se mostrou seletivo, linear, exato, preciso e robusto, sendo uma técnica rápida e de baixo custo operacional para a identificação e quantificação de substâncias comumente utilizadas na adulteração desses produtos.



## 6 CONCLUSÕES

Nesse estudo foi possível desenvolver e validar uma metodologia analítica por CLAE-UV para determinação simultânea de cinco diuréticos adulterantes de suplementos alimentares do tipo PSM. O MeOH foi selecionado como solvente para extração dos diuréticos da matriz de PW, pois extraiu menos componentes da matriz que a ACN, e o processo de centrifugação foi eficiente na separação das fases sólida e líquida, resultando em um sobrenadante límpido, que após a filtração pode ser injetado no equipamento sem provocar danos à coluna cromatográfica e o equipamento.

Para a adequada separação dos picos das substâncias de interesse utilizou-se uma coluna de fase reversa C8, com um sistema gradiente de eluição da fase móvel, o qual foi necessário principalmente pela dificuldade de separação dos diuréticos CTZ e HCTZ. O método CLAE-UV desenvolvido pode ser utilizado para pesquisa de diuréticos em suplementos alimentares do tipo PSM, pois mostrou ser robusto, seletivo, linear, exato e preciso, possuindo a vantagem de ser mais acessível economicamente e operacionalmente quando comparado ao LC-EM, podendo ser facilmente implementado na rotina de laboratórios de controle de qualidade.



## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUILAR-NAVARRO, M. *et al.* Sport-Specific Use of Doping Substances: Analysis of World Anti-Doping Agency Doping Control Tests between 2014 and 2017.

**Substance Use and Misuse**, [s. l.], v. 55, n. 8, p. 1361–1369, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/10826084.2020.1741640>. Acesso em: 15 maio 2021.

AKAMATSU, S.; MITSUHASHI, T. Simultaneous determination of pharmaceutical components in dietary supplements for weight loss by capillary electrophoresis tandem mass spectrometry. **Drug Testing and Analysis**, [s. l.], v. 6, n. 5, p. 426–433, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/dta.1524>. Acesso em: 18 jun. 2021.

ALMEIDA, M. L. *et al.* DIURETICS: a review article. **Revista Científica Fagoc Saúde**, v. 2. p. 78-83. 2017.

ANTONIO, J. High-protein diets in trained individuals. **Sports Medicine**. p. 195-203. Disponível em: <http://www.tandfonline.com/loi/gspm20.2018>. Acesso em: 28 abr. 2021.

ANVISA - AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Consulta a documentação. *In: Documentos da ANVISA*. Brasília, 31 ago. 2021. Disponível em: <https://consultas.anvisa.gov.br/#/>. Acesso em: 10 ago. 2021.

AQUINO NETO, F. R. de. O papel do atleta na sociedade e o controle de dopagem no esporte. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, [s. l.], v. 7, n. 4, p. 138–148, 2001. Disponível em <https://doi.org/10.1590/s1517-86922001000400005>. Acesso em: 20 jun. 2021.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **RESOLUÇÃO - RE Nº 1, DE 29 DE JULHO DE 2005**. Dispõe sobre o Guia de Estudos de Estabilidade de 29 de julho de 2005.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Farmacopeia Brasileira**. 5. ed. , Brasília: Anvisa, 5 ed. Brasília, 2010. v. 2, 904p.

BRASIL. **Formulário Terapêutico Nacional 2010**. 2. ed. Brasília, 2010. Disponível em: [https://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/formulario\\_terapeutico\\_nacional\\_2010.pdf](https://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/formulario_terapeutico_nacional_2010.pdf). Acesso em: 28 jun. 2021.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **INSTRUÇÃO NORMATIVA - IN Nº 28, DE 26 DE JULHO DE 2018**. DOU nº 144, de 27 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 União de 27 de julho de 2018d.

BRASIL. MINISTERIO DA SAUDE, ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada - **RDC Nº 166, 24/07/2017** Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. Guia para validação de métodos analíticos - Julho, 2017a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **RDC Nº 240 DE 26 DE JULHO DE 2018, de 27/07/2018**. 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 União, Brasília 27 de julho de 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **RDC Nº 241, DE 26 DE JULHO DE 2018**. DOU nº 144, de 27 de julho de 2018. Dispõe sobre os requisitos para comprovação da segurança e dos benefícios à saúde dos probióticos para uso em alimentos. Diário Oficial da União. Brasília, 27 de julho, 2018c

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **RDC Nº 243, DE 26 DE JULHO DE 2018, de 27 de julho de 2018**. Dispõe sobre os requisitos sanitários dos suplementos alimentares. Diário Oficial da União, Brasília 26 de julho de 2018b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **RESOLUÇÃO DA DIRETORIA COLEGIADA - RDC Nº 239, DE 26 DE JULHO DE 2018**. Publicada no DOU nº 144, de 27 de julho de 2018. Estabelece os aditivos alimentares e coadjuvantes de tecnologia autorizados para uso em suplementos alimentares. Diário Oficial da União. Diário Oficial da União de 27 de julho de 2018f.

BRASIL. Ministério da Saúde. ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **GUIA nº 10. GUIA PARA TRATAMENTO ESTATÍSTICO DA VALIDAÇÃO ANALÍTICA**. de 30 de agosto de 2017b

BRASIL. Ministério da Saúde. **Código Brasileiro Antidopagem**. Brasília. 2015.

BRUNTON, L. L. *et al.* **As Bases Farmacológicas da Terapêutica de Goodman & Gilman**, 12. ed. Porto Alegre: Artmed. 2012.

CADWALLADER, A. B. *et al.* The abuse of diuretics as performance-enhancing drugs and masking agents in sport doping: Pharmacology, toxicology and analysis. **British Journal of Pharmacology**, [s. l.], v. 161, n. 1, p. 1–16, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2010.00789.x>. Acesso em: 23 jul. 2021.

CADWALLADER, A. B.; MURRAY, B. Performance-enhancing drugs I: Understanding the basics of testing for banned substances. **International Journal of Sport Nutrition and Exercise Metabolism**, [s. l.], v. 25, n. 4, p. 396–404, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1123/ijsnem.2014-0185>. Acesso em: 16 jun. 2021.

CAVALCANTI, G. D. A. *et al.* Detection of designer steroid methylstenbolone in “nutritional supplement” using gas chromatography and tandem mass spectrometry: Elucidation of its urinary metabolites. **Steroids**, [s. l.], v. 78, n. 2, p. 228–233, 2013.

Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2012.11.009>. Acesso em: 28 jul. 2021.

CHO, S. *al.* H. *et* Monitoring of 35 illegally added steroid compounds in foods and dietary supplements. **Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment**, [s. l.], v. 31, n. 9, p. 1470–1475, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/19440049.2014.946100>. Acesso em: 10 ago. 2021.

CHRISTOU, G. A. *et al.* Indirect clinical markers for the detection of anabolic steroid abuse 1587522beyond the conventional doping control in athletes. **European Journal of Sport Science**, [s. l.], v. 19, n. 9, p. 1276–1286, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/17461391.2019>. Acesso em: 20 jun. 2021.

CORRÊA, D. B.; NAVARROA, A. C. Distribuição de respostas dos praticantes de atividade física com relação à utilização de suplementos alimentares e o acompanhamento nutricional numa academia de natal/RN. **Revista Brasileira de Nutrição Esportiva**, São Paulo, v. 8, n. 43, p.35-51, 2014. Acesso em: 12 jul. 2021.

COSTA, D.; ROCHA, N.; QUINTAO, D. Prevalência do uso de suplementos alimentares entre praticantes de atividade física em academias de duas cidades do Vale do Aço/MG: fatores associados. **Revista Brasileira de Nutrição Esportiva**, São Paulo, v. 7, n. 41, p. 5, 2013.

DE ROSE, Eduardo H. Doping in Athletes - An Update. **Clinics in Sports Medicine**, [s. l.], v. 27, n. 1, p. 107–130, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.csm.2007.10.001>. Acesso em: 10 jul. 2021.

DE WILDE, L. *et al.* Identification and confirmation of diuretics and masking agents in urine by turbulent flow online solid-phase extraction coupled with liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry for doping control. **Journal of Chromatography A**, [s. l.], v. 1579, p. 31–40, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2018.10.032>. Acesso em: 06 ago. 2021.

DECONINCK, E. *et al.* Comparison of three development approaches for Stationary Phase Optimised Selectivity Liquid Chromatography based screening methods Part I: A heterogeneous group of molecules (slimming agents in food supplements). **Talanta**, [s. l.], v. 148, p. 518–528, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2015.10.066>. Acesso em: 20 jul. 2021.

DRUGBANK. Chlorothiazide. *In*: **Drugbank Online**. Online, 2005. Disponível em: <https://go.drugbank.com/drugs>. Acesso em: 10 ago. 2021.

DURAL, E. Investigation of the presence of sildenafil in herbal dietary supplements by validated HPLC method. **Turkish Journal of Pharmace Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences**, [s. l.], v. 17, n. 1, p. 56–62, 2020

ECONOMOU, A. *et al.* Determination of multi-class pesticides in wines by solid-

phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, [s. l.], v. 1216, n. 31, p. 5856–5867, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.06.031>. Acesso em: 28 jul. 2021.

FAYH, T A. P. Consumo de suplementos nutricionais por frequentadores de academias da cidade de porto alegre. **Revista Brasileira de Ciências do Esporte**, [s. l.], v. 35, n. 1, p. 27–37, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0101-32892013000100004>. Acesso em: 05 ago. 2021.

FDA - FOOD AND DRUGS ADMINISTRATION (USA). Dietary Supplements. In: **Dietary Supplements**. USA, 2019. Disponível em: <https://www.fda.gov/food/dietary-supplements>. Acesso em: 10 maio 2021.

HEUBERGER, J. A. A. C.; VAN DIJKMAN, S. C.; COHEN, A. F. Futility of current urine salbutamol doping control. **British Journal of Clinical Pharmacology**, [s. l.], v. 84, n. 8, p. 1830–1838, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/bcp.13619>. Acesso em: 20 jul. 2021.

JUSTA NEVES, D. B.; CALDAS, E. D. Dietary supplements: International legal framework and adulteration profiles, and characteristics of products on the Brazilian clandestine market **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, [s. l.], v. 73, n. 1, p. 93–104, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2015.06.013>. Acesso em: 29 jul. 2021.

KAUTZNER, N. Breve história sobre o doping. Jan. 2015. Disponível em: <http://www.efdeportes.com>. Acesso em: 16 jun. 2021.

KI, N. Y. *et al.* Rapid screening of sulfonamides in dietary supplements based on extracted common ion chromatogram and neutral loss scan by LC-Q/TOF-mass spectrometry. **Journal of Food and Drug Analysis**, [s. l.], v. 27, n. 1, p. 164–174, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2018.08.006>. Acesso em: 20 jun. 2021.

LJUNGQVIST, A. Brief History of Anti-Doping. **Medicine and Sport Science**, [s. l.], v. 62, p. 1–10, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1159/000460680>. Acesso em: 23 jul. 2021.

MARTELLI, A.; LONGO, M. A. T.; SERIANI, C. Aspectos Clínicos E Mecanismo De Ação Das Principais Classes Farmacológicas Usadas No Tratamento Da Hipertensão Arterial Sistêmica. **Estudos de Biologia**, [s. l.], v. 30, n. 70/72, p. 149–156, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.7213/reb.v30i70/72.22820>. Acesso em: 14 jul. 2021.

MARTÍNEZ-SANZ, J. M. *et al.* Intended or unintended doping? A review of the presence of doping substances in dietary supplements used in sports. **Nutrients**, [s. l.], v. 9, n. 10, p. 1–22, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/nu9101093>. Acesso em: 20 jul. 2021.

MATHEWS, N. M. Prohibited Contaminants in Dietary Supplements. **Sports Health**,

[s. l.], v. 10, n. 1, p. 19–30, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1177/1941738117727736>. Acesso em: 10 ago. 2021.

MAUGHAN, R.J. *et al.* IOC consensus statement: dietary supplements and the high-performance athlete. **Br Med J Sport**.v.52 p.439–455, 2018.

MICHAELIS. **Dicionário Brasileiro de Língua Portuguesa**. Melhoramentos, 2021. Disponível em: [https:// doping/michaelis.uol.com.br/moderno-portugues/busca/portugues-brasileiro/](https://doping/michaelis.uol.com.br/moderno-portugues/busca/portugues-brasileiro/). Acesso em: 20 abr. 2021.

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. **Journal of Chromatographic Science**, [s. l.], v. 57, n. 6, p. 528–540, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/chromsci/bmz025>. Acesso em: 16 jul. 2021.

MÜLLER, R. K. History of Doping and Doping Control. *In*: [S. l.: s. n.], 2009. p. 1–23. Disponível em: [https://doi.org/10.1007/978-3-540-79088-4\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-540-79088-4_1). Acesso em: 16 jul. 2021.

NEVES, D. B. da J.; CALDAS, E. D. Determination of caffeine and identification of undeclared substances in dietary supplements and caffeine dietary exposure assessment. **Food and Chemical Toxicology**, [s. l.], v. 105, p. 194–202, 2017a. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.03.063>. Acesso em: 06 ago. 2021.

NEVES, D. B. da J.; CALDAS, E. D. GC–MS quantitative analysis of black market pharmaceutical products containing anabolic androgenic steroids seized by the Brazilian Federal Police. **Forensic Science International**, [s. l.], v. 275, p. 272–281, 2017b. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2017.03.016>. Acesso em: 24 jul. 2021.

OGA, S. **Fundamentos de Toxicologia**. 4. ed. São Paulo: Ateneu Editora: 2014, p. 33-373.

OSHITA, D.; JARDIM, I. C. S. F. Comparison of Methods By Liquid Chromatography for the Determination of Pesticide Multiresidues in Strawberries. **Química Nova**, . **Química Nova**, [s. l.], v. 38, n. 10, p. 1273–1281, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.5935/0100-4042.20150145>. Acesso em: 28 jul. 2021.

PARR, M. K. *et al.* Detection of  $\Delta 6$ -methyltestosterone in a “dietary supplement” and GC-MS/MS investigations on its urinary metabolism. **Toxicology Letters**, [s. l.], v. 201, n. 2, p. 101–104, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2010.11.018>. Acesso em: 26 jul. 2021.

PARR, M. K. *et al.* Identification of steroid isoxazole isomers marketed as . **Steroids**, [s. l.], v. 74, n. 3, p. 322–328, 2009.

PARR, M. K. *et al.* Ingestion of designer supplements produced positive doping

cases unexpected by the athletes. **Biology of Sport**, [s. l.], v. 28, n. 3, p. 153–157, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.5604/959289>. Acesso em: 14 jul. 2021.

PARR, M. K.; POKYWKO, A.; Kwiatkowska, D., 2011. Ingestion of designer supplements produced positive doping cases unexpected by the athletes. **Biology of Sport**, v. 28, n. 3, p. 153-157, 2011.

PEREIRA, H. M. G; PADILHA, M C; AQUINO NETO, F. R **A Química e o Controle de Dopagem no Esporte**. São Paulo: SBQ, 2010. v. 3. Coleção Química no Cotidiano, vol. 3.

POLSON, C. *et al.* Optimization of protein precipitation based upon effectiveness of protein removal and ionization effect in liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, [s. l.], v. 785, n. 2, p. 263–275, 2003. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S1570-0232\(02\)00914-5](https://doi.org/10.1016/S1570-0232(02)00914-5). Acesso em: 26 jun. 2021.

RANG, H. P., *et al.* **Farmacologia**. 7<sup>a</sup>. ed. Rio de Janeiro: Elsevier. 2012.

REIS, G.G; MAGALHÃES, I. R. S.; SANTOS LUCAS, A. C. S. Ocorrência de doping entre atletas da Federação Internacional de Natação. **Ciências da Saúde**, v. 8, n.2, P. CS1-CS10, 2019

ROCHA T, R. da R.; FONTES, F. B. A Química presente nos avanços históricos, científicos e tecnológicos dos esportes The chemistry in historical, scientific and technological advances of sports. **Ciência e Natura**, [s. l.], v. 38, n. 2179-460X, p. 8307, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.5902/2179-460X22144n>. Acesso em: 20 jul. 2021.

RODRÍGUEZ, M.; DÍAZ RODRÍGUEZ, P; DÍAZ, A. Una mirada histórica al fenómeno del doping. **PODIUM: Revista de Ciencia y Tecnología en la Cultura Física**, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 89–105, 2015.

ROIFFÉ, R. R. *et al.* Determination of adulterants in whey protein food supplements by liquid chromatography coupled to Orbitrap high resolution mass spectrometry. **Brazilian Journal of Food Technology**, [s. l.], v. 22, p. 1–13, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1981-6723.20618>. Acesso em: 25 jul. 2021.

SÁNCHEZ-OLIVER, A. J. *et al.* A Survey on Dietary Supplement Consumption in Amateur and Professional Rugby Players. **Foods**, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 7, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/foods10010007>. Acesso em: 06 ago. 2021.

SILVA, K. E. R. *et al.* Modelos de avaliação da estabilidade de fármacos e medicamentos para a indústria farmacêutica. **Revista de Ciências Farmacéuticas Básica e Aplicada**, [s. l.], v. 30, n. 2, p. 129–135, 2009.

TAVARES, R. S. A. História do Doping. [s. l.], n. April, p. 6–10, 2008. Disponível em <https://www.researchgate.net/publication/301298596>. Acesso em: 10 jul. 2021.

UNIÃO EUROPEIA. **DIRECTIVA 2002/46/CE DO PARLAMENTO EUROPEU E DO CONSELHO de 10 de Junho de 2002** relativa à aproximação das legislações dos Estados-Membros respeitantes aos suplementos alimentares Disponível em <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/PDF/?uri=CELEX:32002L0046&from=DA>. Acesso em: 20 maio 2021.

USA, Academy Standards Board. **Standard Practices for Method Validation in Forensic Toxicology**. 1st ed. 2019. Disponível em: [www.asbstandardsboard.org](http://www.asbstandardsboard.org). Acesso em: 20 jun. 2021.

VIANA, C. *et al.* Detection and determination of undeclared synthetic caffeine in weight loss formulations using HPLC-DAD and UHPLC-MS/MS. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, [s. l.], v. 8, n. 6, p. 366–372, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2017.12.004>. Acesso em: 26 jun. 2021.

WADA. **The world anti-doping code international Standard Prohibited List**. 2018. Disponível em: <[https://www.wada-ama.org/sites/default/files/prohibited\\_list\\_2018\\_en.pdf](https://www.wada-ama.org/sites/default/files/prohibited_list_2018_en.pdf)>. Acesso em: 20 abr. 2021.

WADA.WORLD ANTI-DOPING AGENCY wada-publishes-2019-testing-figures-report. Disponível em: <https://www.wada-ama.org/en/media/news/2020-12/wada-publishes-2019-testing-figures-report>. Acesso em: 21 jun. 2021b.

WALPURGIS, K. *et al.* Dietary supplement and food contaminations and their implications for doping controls. **Foods**, [s. l.], v. 9, n. 8, p. 1–21, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/foods9081012>. Acesso em: 17 jun. 2021.

WILLICK, Stuart E.; MILLER, G. D.; EICHNER, D The Anti-Doping Movement, **Advanced Sports Medicine Concepts and Controversie**. V8 p 125-132, 2016

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

WORLD ANTI-DOPING AGENCY. Disponível em: <https://www.wada-ama.org>> Acesso em: 10 maio 2021.

YESALIS, C.; BAHRKE, M. History of doping in sport. **International sports studies**, [s. l.], v. 24, n. 1, p. 42–76, 2002.



## 8 APÊNDICE

Tabela S1: Análise de variância do teste de regressão linear para cada analito.

Substância	gl	SQ	MQ	F	F de significância
<b>Amilorida</b>					
Regressão	1	5,150417	5,150417	1422,942	4,61E <sup>-17</sup>
Resíduo	16	0,057913	0,00362		
Total	17	5,20833			
<b>Clorotiazida</b>					
Regressão	1	68,83683	68,83683	2485,992	5,51E <sup>-19</sup>
Resíduo	16	0,443038	0,02769		
Total	17	69,27987			
<b>Hidroclorotiazida</b>					
Regressão	1	83550,6	83550,6	2974,635	1,32E <sup>-19</sup>
Resíduo	16	449,4029	28,08768		
Total	17	84000			
<b>Clorotalidona</b>					
Regressão	1	1,156422	1,156422	1894,982	4,76E <sup>-18</sup>
Resíduo	16	0,009764	0,00061		
Total	17	1,166186			
<b>Furosemida</b>					
Regressão	1	83684,95	83684,95	4250,045	7,7E <sup>-21</sup>
Resíduo	16	315,0459	19,69037		
Total	17	84000			