

**MINISTÉRIO DA DEFESA  
EXÉRCITO BRASILEIRO  
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA  
INSTITUTO MILITAR DE ENGENHARIA  
CURSO DE MESTRADO EM QUÍMICA**

**RAFAELA ROCHA ROIFFÉ**

**ANÁLISE DE SUBSTÂNCIAS COM ATIVIDADES FARMACOLÓGICAS EM  
SUPLEMENTOS PROTEICOS DERIVADOS DO SORO DO LEITE POR CL-EMAR**

**Rio de Janeiro**

**2016**

**INSTITUTO MILITAR DE ENGENHARIA**

**RAFAELA ROCHA ROIFFÉ**

**ANÁLISE DE SUBSTÂNCIAS COM ATIVIDADES FARMACOLÓGICAS  
EM SUPLEMENTOS PROTEICOS DERIVADOS DO SORO DO LEITE  
POR CL-EMAR**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso de Mestrado em Química do Instituto Militar de Engenharia, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências em Química.

Orientadores: Prof. Antônio Luís dos Santos Lima - *D.Sc.*

Prof<sup>a</sup>. Márcia Nogueira da Silva de la Cruz - *D.Sc*

Rio de Janeiro

2016

c2016

INSTITUTO MILITAR DE ENGENHARIA

Praça General Tibúrcio, 80 – Praia Vermelha

Rio de Janeiro – RJ CEP: 22290-270

Este exemplar é de propriedade do Instituto Militar de Engenharia, que poderá incluí-lo em base de dados, armazenar em computador, microfilmар ou adotar qualquer forma de arquivamento.

É permitida a menção, reprodução parcial ou integral e a transmissão entre bibliotecas deste trabalho, sem modificação de seu texto, em qualquer meio que esteja ou venha a ser fixado, para pesquisa acadêmica, comentários e citações, desde que sem finalidade comercial e que seja feita a referência bibliográfica completa.

Os conceitos expressos neste trabalho são de responsabilidade do(s) autor(es) e do(s) orientador(es).

540 Roiffé, Rafaela Rocha

R741a Análise de substâncias com atividades farmacológicas em suplementos proteicos derivados do soro do leite por CL-EMAR / Rafaela Rocha Roiffé; orientada por Antonio Luis dos Santos Lima, Marcia Nogueira da Silva de La Cruz – Rio de Janeiro: Instituto Militar de Engenharia, 2016.

148p.: il.

Dissertação (Mestrado) – Instituto Militar de Engenharia, Rio de Janeiro, 2015.

1. Curso de Química – teses e dissertações. 2. Farmacologia. 3. Cromatografia. I. Lima, Antonio Luis dos Santos. II. De La Cruz, Marcia Nogueira da Silva. III. Título. IV. Instituto Militar de Engenharia.

INSTITUTO MILITAR DE ENGENHARIA

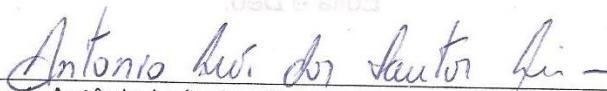
RAFAELA ROCHA ROIFFÉ

**ANÁLISE DE SUBSTÂNCIAS COM ATIVIDADES  
FARMACOLÓGICAS EM SUPLEMENTOS PROTEICOS DERIVADOS  
DO SORO DO LEITE POR CL-EMAR**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso de Mestrado em Química do Instituto Militar de Engenharia, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências em Química.

Orientadores: Prof. Antônio Luís dos Santos Lima - *D.Sc.*  
Prof<sup>a</sup>. Márcia Nogueira Silva de la Cruz - *D.Sc.*

Aprovada em 02 de fevereiro de 2016 pela seguinte Banca Examinadora:



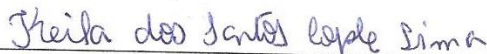
Prof. Antônio Luís dos Santos Lima - *D.Sc.* do IME - Presidente



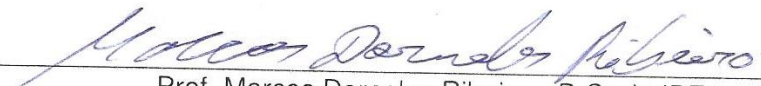
Prof<sup>a</sup>. Márcia Nogueira Silva de la Cruz - *D.Sc.* da UFRJ



Prof. Luiz Eduardo Pizarro Borges - *D.Sc.* do IME



Prof<sup>a</sup>. Keila dos Santos Cople Lima - *D.Sc.* do IBEx



Prof. Marcos Dornelas Ribeiro - *D.Sc.* do IBEx

Rio de Janeiro

2016

Esta dissertação é dedicada a Deus, à minha mãe Maria de Fátima e aos meus amados avós Edila e Déo.

## AGRADECIMENTOS

A Deus por me amparar nos momentos de desânimo e fraqueza, fazendo com que eu perseverasse nessa árdua caminhada.

À Maria Santíssima por sua proteção materna e por sua intercessão nos momentos de indecisão.

À minha família pelo investimento em minha educação, confiança depositada no meu futuro profissional e aconchego a cada volta para casa.

Ao orientador Antônio Luís dos Santos Lima que foi de fundamental importância. Agradeço pelo aprendizado e conselhos proporcionados.

À orientadora Márcia Nogueira, por todos os ensinamentos, incentivo, boa vontade, carinho e paciência. Obrigada por acreditar em meu potencial e por ter sido além de uma orientadora, uma grande amiga.

À amiga Andreia Aguiar por me introduzir no mundo acadêmico, por todo auxílio durante a preparação para o mestrado e no início do mesmo.

Ao amigo Vinícius Sardela pela grande contribuição intelectual na elaboração deste trabalho. Obrigada pelas ideias, disponibilidade e por todo o conhecimento proporcionado.

Ao professor Francisco Radler de Aquino Neto e ao Laboratório Brasileiro de Controle de Dopagem por terem cedido o espaço para que todas as etapas desse estudo pudessem ser realizadas. A triagem sete – em especial à Daniely Oliveira, Thamara Barra e Willian Ribeiro por todo suporte, receptividade e principalmente paciência, esse agradecimento é pouco perto do que fizeram por mim.

Ao capitão Marcelo Carneiro por todo incentivo, apoio, disponibilidade e principalmente amizade nesse tempo de mestrado.

Aos amigos do mestrado Luana Gonçalves, Mariana Tonelli, Raiane Lima, Ingrid Lima e Filipe Kayodè, que compartilharam dos mesmos sentimentos e experiências durante esse tempo, sendo apoio uns dos outros para que a caminhada se tornasse mais leve e feliz.

Aos amigos em especial à Livia Ignácio e Davi Almeida pelas palavras de incentivo, conversas confortantes e por toda ajuda nesses dois anos de mestrado.

A todos que de forma especial contribuíram para a conclusão deste trabalho e consequentemente para a minha formação profissional.

'Consagre ao Senhor tudo o que você faz, e os seus planos serão bem-sucedidos.'  
(Provérbios 16:3)



## SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....	11
LISTA DE TABELAS.....	15
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	16
LISTA DE SIGLAS.....	18
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....22</b>
1.1	SUPLEMENTOS ALIMENTARES.....23
1.1.1	DEFINIÇÃO.....23
1.1.1.1	SUPLEMENTO PROTEICO DERIVADO DO SORO DO LEITE.....24
1.1.2	REGULAMENTAÇÃO.....25
1.1.3	CONTROLE DE QUALIDADE DOS SUPLEMENTOS ALIMENTARES.....26
1.1.3.1	CLASSES DE CONTAMINANTES ENCONTRADOS NOS SUPLEMENTOS ALIMENTARES.....27
1.1.3.1.1	AGENTES ANABÓLICOS.....27
1.1.3.1.2	DIURÉTICOS.....28
1.1.3.1.3	GICOCORTICOIDES .....29
1.1.3.1.4	ESTIMULANTES.....30
1.2	PRÉ-TRATAMENTO DAS AMOSTRAS.....32
1.2.1	EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA (EFS OU SPE - SOLID PHASE EXTRACTION).....32
1.3	MÉTODOS DE ANÁLISE.....33
1.3.1	CROMATOGRAFIA LÍQUIDA (CL OU LC - LIQUID CHROMATOGRAPHY).....33
1.3.2	ESPECTROMETRIA DE MASSAS (EM OU MS - MASS SPECTROMETRY).....37

1.3.2.1	FONTE DE IONIZAÇÃO.....	38
1.3.2.2	ANALISADOR DE MASSAS.....	39
1.4	JUSTIFICATIVA.....	42
1.5	OBJETIVOS.....	43
1.5.1	OBJETIVOS GERAIS.....	43
1.5.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	43
<b>2</b>	<b>METODOLOGIA.....</b>	<b>44</b>
2.1	COLETA DAS AMOSTRAS.....	44
2.2	MATERIAIS E EQUIPAMENTOS.....	44
2.2.1	MATERIAIS.....	44
2.2.2	EQUIPAMENTOS.....	45
2.2.3	SOLVENTES E PADRÕES DE REFERÊNCIA.....	45
2.2.4	PREPARO DAS SOLUÇÕES.....	45
2.2.4.1	SOLUÇÃO DE TRABALHO.....	45
2.2.4.2	SOLUÇÃO DE ÁCIDO ACÉTICO 2%.....	46
2.2.4.3	SOLUÇÃO DE ÁCIDO FÓRMICO 5%.....	46
2.2.4.4	PADRÕES INTERNOS.....	46
2.2.4.5	FASE MÓVEL.....	48
2.3	ETAPAS DO TRABALHO.....	48
2.3.1	DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO ANALÍTICO.....	49
2.3.1.1	CONDIÇÕES INSTRUMENTAIS.....	52
2.3.1.1.1	PARÂMETROS CROMATOGRÁFICOS.....	52
2.3.1.1.2	PARÂMETROS DO ESPECTRÔMETRO DE MASSAS.....	53
2.3.2	VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA.....	53
2.3.2.1	SELETIVIDADE.....	53
2.3.2.2	LIMITE DE DETECÇÃO (LD).....	54
2.3.2.3	REPETITIVIDADE.....	54

2.3.2.4	RENDIMENTO DE EXTRAÇÃO.....	54
2.3.2.5	ARRASTE.....	55
2.3.2.6	INTERFERÊNCIA DA MATRIZ.....	55
2.3.3	APLICAÇÃO DO MÉTODO.....	55
<b>3</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>56</b>
3.1	PRÉ-TRATAMENTO DA AMOSTRA.....	56
3.2	INSTRUMENTAL.....	57
3.3	VALIDAÇÃO DO MÉTODO.....	57
3.3.1	SELETIVIDADE.....	79
3.3.2	LIMITE DE DETECÇÃO.....	82
3.3.3	REPETITIVIDADE.....	83
3.3.4	RENDIMENTO DE EXTRAÇÃO.....	86
3.3.5	ARRASTE.....	88
3.4	INTERFERÊNCIA DE MATRIZ.....	89
3.5	APLICAÇÃO DO MÉTODO.....	91
<b>4</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>109</b>
<b>5</b>	<b>PERSPECTIVASFUTURAS.....</b>	<b>110</b>
<b>6</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>111</b>
<b>7</b>	<b>ANEXOS.....</b>	<b>121</b>
7.1	ANEXO 1.....	122
7.2	ANEXO 2.....	139

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIG. 1.1	Estrutura química relacionada à testosterona.....	27
FIG. 1.2	Estruturas químicas referentes à androstenediona (2) e à nandrolona (3).....	28
FIG. 1.3	Estrutura química correspondente à hidroclorotiazida.....	29
FIG. 1.4	Estrutura química correspondente ao hormônio cortisol.....	29
FIG. 1.5	Estrutura química referente à dexametasona.....	30
FIG. 1.6	Estruturas químicas relacionadas à anfetamina (7) e efedrina (8) e femproporex (9).....	30
FIG. 1.7	Etapas envolvidas na extração em fase sólida: condicionamento do cartucho; aplicação da amostra; lavagem e eluição.....	33
FIG. 1.8	Aplicações da cromatografia.....	35
FIG. 1.9	Equipamento básico de CLAE. a) reservatório da fase móvel; b) bomba de alta pressão; c) válvula de injeção; d) coluna; e) detector e f) computador.....	36
FIG. 1.10	Diagrama de um espectrômetro de massas.....	37
FIG. 1.11	Mecanismo de ionização da amostra por <i>eletrospray</i> .....	38
FIG. 1.12	Esquema de um analisador de massas do tipo orbitrap.....	40
FIG. 1.13	Frequências convertidas em $m/z$ utilizando transformada de Fourier.....	41

FIG. 2.1	Fluxograma de preparo das amostras.....	51
FIG. 3.1	Avaliação da seletividade para a substância bumetanida, onde o primeiro cromatograma refere-se à uma amostra controle e os demais cromatogramas referem-se à cinco amostras diferentes do ensaio seletividade.....	79
FIG. 3.2	Cromatogramas referentes ao composto heptaminol, onde, o primeiro cromatograma se refere ao íon precursor do heptaminol e os demais se referem aos seus íons produto.....	80
FIG. 3.3	Cromatogramas referentes ao composto fulvestrant, onde, o primeiro cromatograma refere-se ao íon precursor desse analito e os demais cromatogramas referem-se aos íons produto do mesmo.....	81
FIG. 3.4	Cromatogramas de íons selecionados para o analito gestrinona, mostrando o aparecimento do pico em dez amostras diferentes na fortificação em 10%.....	82
FIG. 3.5	Confirmação da identidade da substância epitrembolona utilizando como parâmetro de identificação o tempo de retenção.....	84
FIG. 3.6	Cromatogramas que caracterizam a avaliação do arraste, utilizando como exemplo a substância meticlotiazida.....	89
FIG. 3.7	Verificação da substância em seu respectivo tempo de retenção, utilizando como exemplo o estimulante benfluorex em amostras diferentes.....	90
FIG. 3.8	Comparação entre uma amostra controle e amostra 1 em que foi encontrado o pico referente ao analito clorotiazida.....	93
FIG. 3.9	Comparação entre uma amostra controle e amostra 1 em que foi encontrado o pico referente ao analito conivaptan.....	93
FIG. 3.10	Comparação entre uma amostra controle e amostra 1, 2, 6 e 10 em que foi encontrado o pico referente ao analito politiazida.....	94

FIG. 3.11	Comparação entre uma amostra controle e amostra 2, 3, 5, 6 e 9 em que foi encontrado o pico referente ao analito benfluorex.....	95
FIG. 3.12	Cromatograma e o espectro de massas do íon precursor da amostra controle referente à substância clorotiazida apresentando $t_R$ 1,01975 e razão $m/z$ 293,94156.....	96
FIG. 3.13	Cromatograma e o espectro de massas do íon precursor da amostra 1 referente à substância clorotiazida apresentando $t_R$ 1,05828 e razão $m/z$ 293,94168.....	97
FIG. 3.14	Cromatograma e o espectro de massas do íon precursor da amostra controle referente à substância conivaptan apresentando $t_R$ 5,88827 e razão $m/z$ 499,21255.....	98
FIG. 3.15	Cromatograma e o espectro de massas do íon precursor da amostra 1 referente à substância conivaptan apresentando $t_R$ 5,86528 e razão $m/z$ 499,2131.....	98
FIG. 3.16	Cromatograma e o espectro de massas do íon precursor da amostra controle referente à substância politiazida apresentando $t_R$ 4,77636 e razão $m/z$ 437,96338.....	99
FIG. 3.17	Cromatograma e o espectro de massas do íon precursor da amostra 1 referente à substância politiazida apresentando $t_R$ 4,78099 e razão $m/z$ 437,96329.....	100
FIG. 3.18	Cromatograma e o espectro de massas do íon precursor da amostra 2 referente à substância politiazida apresentando $t_R$ 4,77907 e razão $m/z$ 437,96307.....	100
FIG. 3.19	Cromatograma e o espectro de massas do íon precursor da amostra 6 referente à substância politiazida apresentando $t_R$ 4,78451 e razão $m/z$ 437,96283.....	101
FIG. 3.20	Cromatograma e o espectro de massas do íon precursor da amostra 10 referente à substância politiazida apresentando $t_R$ 4,77907 e razão $m/z$ 437,96146.....	101

FIG. 3.21	Cromatograma e o espectro de massas do íon precursor da amostra controle referente à substância benfluorex apresentando $t_R$ 5,78551 e razão $m/z$ 352,15247.....	102
FIG. 3.22	Cromatograma e o espectro de massas do íon precursor da amostra 2 referente à substância benfluorex apresentando $t_R$ 5,79519 e razão $m/z$ 352,21155.....	103
FIG. 3.23	Cromatograma e o espectro de massas do íon precursor da amostra 3 referente à substância benfluorex apresentando $t_R$ 5,80731 e razão $m/z$ 352,15295.....	103
FIG. 3.24	Cromatograma e o espectro de massas do íon precursor da amostra 5 referente à substância benfluorex apresentando $t_R$ 5,80066 e razão $m/z$ 352,15277.....	104
FIG. 3.25	Cromatograma e o espectro de massas do íon precursor da amostra 6 referente à substância benfluorex apresentando $t_R$ 5,83650 e razão $m/z$ 352,15173.....	105
FIG. 3.26	Cromatograma e o espectro de massas do íon precursor da amostra 9 referente à substância benfluorex apresentando $t_R$ 5,78681 e razão $m/z$ 352,15231.....	105

## LISTA DE TABELAS

TAB. 1.1	Classes de substâncias descritas na lista da Agência Mundial de Antidopagem e seus principais efeitos.....	31
TAB. 2.1	Substâncias e seus respectivos volumes e concentrações no padrão interno neutro.....	47
TAB. 2.2	Substâncias e seus respectivos volumes e concentrações no padrão interno alcalino.....	47
TAB. 2.3	Gradiente de eluição.....	52
TAB. 3.1	Fórmula química, polaridade, tempo de retenção (tR) e razão massa/carga ( <i>m/z</i> ) das substâncias monitoradas.....	59
TAB. 3.2	Substância, concentração e resultados referentes aos parâmetros de desempenho repetitividade, rendimento de extração, limite de detecção (LD), interferência de matriz e <i>Minimum Required Performance Level</i> (MRPL) dos analitos monitorados.....	69
TAB. 3.3	Valores obtidos pela equação de <i>Horwitz</i> para os diferentes níveis de concentração dos analitos.....	85
TAB. 3.4	Identificação das amostras comerciais de suplemento proteico derivado do soro do leite.....	92
TAB. 3.5	Valores obtidos por meio do cálculo de exatidão mássica.....	107



## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

### ABREVIATURAS

ALA	Alfa-lactoalbumina
APPI	<i>Atmospheric Pressure Photoionization</i>
B	Setor magnético
BLG	Beta-lactoglobulina
E	Setor elétrico
ESI	Eletrospray
GMP	Glicomacropéptídeos
HCD <i>cell</i>	Célula de Colisão
HCl	Ácido Clorídrico
Ig's	Imunoglobulinas
MALDI	<i>Matrix-assisted Laser Dessorption/ionization</i>
N <sub>2</sub>	Gás nitrogênio
Rf	Radiofrequência
UV-VIS	Ultravioleta Visível

### SÍMBOLOS

%	Porcentagem
±	Mais ou menos
°C	Graus celsius
$\bar{y}$	Média
[M + H] <sup>+</sup>	Molécula protonada

[M - H] <sup>-</sup>	Molécula desprotonada
μL	Microlitro
Mm	Micrômetro
C	Concentração do analito
G	Gramas
kV	Quilovolt
Mg	Miligramas
Min	Minutos
mL	Mililitros
Mm	Milímetros
MS2	Fragmentação do íon
<i>m/z</i>	Razão massa/carga
Ng	Nanogramas
Rpm	Rotações por minuto
S	Segundo
S	Desvio padrão
T <sub>R</sub>	Tempo de retenção
V	Volt

## LISTA DE SIGLAS

AIF	<i>All Ion Fragmentation</i>
AMA	Agência Mundial de Antidopagem
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APCI	<i>Atmospheric Pressure Chemical Ionization</i>
BSA	<i>Bovine Serum Albumine</i>
CL	Cromatografia Líquida
CL-EMAR	Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas de Alta Resolução
CV%	Coeficiente de Variação
DPR	Desvio Padrão Relativo
EM	Espectrometria de massas
EFS	Extração em Fase Sólida
HPLC	<i>High Pressure Liquid Chromatography</i>
LAB CAL	Laboratório de Calibração
LADETEC	Laboratório de Apoio ao Desenvolvimento Tecnológico
LBCD	Laboratório Brasileiro de Controle de Dopagem
LC	<i>Liquid Chromatography</i>
LC-HRMS	<i>Liquid Chromatography- High Resolution Mass Spectrometry</i>
LD	Limite de Detecção
MRPL	<i>Minimal Required Performance Level</i>
MS	<i>Mass Spectrometry</i>
Ppm	Parte por milhão
RE	Rendimento de Extração
RDC	Resolução de Diretoria Colegiada

Rpm	Rotações por minuto
RSD	<i>Relative Standard Deviation</i>
SNC	Sistema Nervoso Central
SPE	<i>Solid Phase Extration</i>
TdV	Tempo de Vôo
UFRJ	Universidade Federal do Rio de Janeiro
WADA	<i>World Anti-Doping Agency</i>

## RESUMO

O aumento da prática esportiva, levou ao acréscimo significativo da utilização de formas que potencializam o desempenho. E um dos produtos que têm sido amplamente utilizado entre atletas e não-atletas está o suplemento proteico derivado do soro do leite. Entretanto, os testes que garantam a segurança deste tipo produto são poucos ou inexistentes.

Existem muitos estudos relacionados à adulteração de suplementos alimentares por substâncias com atividades farmacológicas, porém relatos a respeito da adulteração dos suplementos proteicos derivados do soro do leite não foram mencionados. Consequentemente houve a necessidade de desenvolver e validar um método de monitoramento para as classes: agentes anabólicos, beta-agonistas, hormônios e moduladores metabólicos, diuréticos, estimulantes, canabinoides, narcóticos, glicocorticoides e betabloqueadores em amostras comerciais do suplemento em questão.

As etapas do trabalho consistiram no desenvolvimento que utilizou a centrifugação associada a extração em fase sólida para extração das substâncias de interesse e a análise das mesmas ocorreu por Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massas de Alta Resolução (CL-EMAR); validação que seguiu o protocolo de validação do Laboratório Brasileiro de Controle de Dopagem onde foram avaliados diferentes parâmetros de desempenho e; aplicação do método que consistiu na análise de onze marcas comerciais diferentes de suplemento proteico derivado do soro do leite.

O método desenvolvido apresentou alta eficiência na recuperação dos analitos e a técnica utilizada (estabelecida pelo controle de dopagem) foi considerada sensível e adequada para o monitoramento das diferentes classes de substâncias. A validação apresentou resultados satisfatórios nos parâmetros seletividade (ausência de interferentes nos tempos de retenção dos analitos), limite de detecção (alta sensibilidade na detecção das substâncias), repetitividade (92,57%), rendimento de extração (82,67%), arraste (ausência de arraste) e interferência de matriz (94,55%). A aplicação do método em amostras comerciais de suplementos proteicos derivados do soro do leite constatou a presença das substâncias clorotiazida, conivaptan, politiazida e benfluorex confirmando a existência de adulterantes nas mesmas.

O método de extração e a técnica utilizada proporcionaram uma melhor separação, identificação e detecção das diferentes classes de substâncias monitoradas, fazendo com que o trabalho alcançasse o objetivo proposto. Através dessa análise constatou-se que 63,64% das marcas avaliadas não estão adequadas para o consumo.

## ABSTRACT

The increase of sports practice caused the raise in methods capable of enhance performance. One of the products that have been widely utilized by athletes and non-athletes is the whey protein food supplement. However, tests assuring its safety are few or inexistent.

There are many studies related to food supplements adulteration by substances with pharmacological properties, although, reports about the whey protein food supplement adulteration were not mentioned. Consequently, there was a necessity to develop and validate a screening method for the classes: anabolic agents, beta-agonists, hormone and metabolic modulators, diuretics and masking agents, stimulants, cannabinoids, narcotics, glucocorticoids and beta-blockers in commercial samples of whey protein food supplement.

The work steps consisted in the development analytical method that utilized centrifugation and solid phase extraction for the target analytes extraction, the samples analysis occurred by liquid chromatography coupled to high resolution mass spectrometry (LC-HRMS); the method validation followed the protocol validation, by Brazilian Laboratory for Doping Control, were evaluated different parameters and; the method application consisted in the analysis of the eleven commercial samples of whey protein food supplement.

The analytical method developed showed high efficiency in the recovery of the analytes and the technique utilized was considered sensible and adequate for screening of the different substances classes. The method validation showed satisfactory results in the parameters selectivity (absence of interferences in the retention times of the analytes), limit of detection (high sensibility in the substances detection), repeatability (92.57%), extraction yield (82.67%), carryover (absence of the carryover) and matrix interference (94.55%). The method application in commercial samples confirmed presence of the chlorothiazide, conivaptan, polythiazide, benfluorex substances, confirmed the existence of the adulterants in these samples.

The extraction method and the technique utilized were able to separate, identify and detect all classes of substances monitored. Reaching the proposed objective. Through these analysis it was verified that 63.64% of the commercial samples evaluated are inadequate for consumption.

## 1 INTRODUÇÃO

Com o decorrer dos anos, o progresso tecnológico e científico de diferentes áreas profissionais como a educação física, farmácia, nutrição e medicina, fez com que os relatos sobre a *performance* no que diz respeito a prática esportiva aumentasse no Brasil e no mundo (ARAÚJO & ARAÚJO, 2000; MAUGHAN *et al.*, 2004; ROSE *et al.*, 2004).

Muitos indivíduos (atletas e não atletas) acabam utilizando outras formas de potencialização para aumentar seu rendimento. E uma das maneiras de aumentar esse desempenho, é por meio da utilização dos denominados agentes ergogênicos. Os agentes ergogênicos são quaisquer recursos que de alguma forma vão melhorar a *performance* na prática esportiva (profissional ou recreativa) (BARROS NETO, 2001; FAYH *et al.*, 2013; GOMES *et al.*, 2008; JOHNSON *et al.*, 2007; MILLMAN & ROSS, 2003).

Dentre os recursos ergogênicos existentes encontram-se:

- I) Mecânicos ou biomecânicos – Estão relacionados à vantagem mecânica, fornecendo a otimização do desempenho. Os exemplos mais comuns são os tênis e roupas projetadas para as diferentes modalidades esportivas (BRUM, 2009; PEREZ, 2009).
- II) Psicológicos – O estado psicológico está relacionado ao rendimento físico do indivíduo. Onde a motivação mental tem papel fundamental no resultado de uma prova física. Um exemplo são as sessões de hipnose (impedem as limitações no desempenho, ocasionadas por barreiras mentais) e até mesmo música (BAUME *et al.*, 2006; BRUM, 2009; CARNEIRO *et al.*, 2010).
- III) Fisiológicos – Está relacionado à melhora de rendimento por meio do aumento na resposta fisiológica corporal durante a prática esportiva. Um exemplo dessa classificação é a chamada dopagem sanguínea (infusão de sangue que conseqüentemente aumenta o aporte de oxigênio) (BARROS NETO, 2001; HERNANDEZ & NAHAS, 2009).
- IV) Farmacológicos – Correspondem as substâncias que possuem atividade farmacológica. Elas são responsáveis por influenciar alguns processos do organismo relacionados ao sistema nervoso e ao sistema fisiológico, aumentando assim a

potência anabólica. O exemplo principal de recurso farmacológico utilizado é o uso dos agentes anabólicos (substâncias químicas derivadas da testosterona) (BARROS NETO, 2001; MILLMAN & ROSS, 2003; PEREZ, 2009; THEIN *et al.*, 1995).

V) Nutricionais – São agentes provenientes dos alimentos que, comumente não causam danos ao organismo. São responsáveis pelo aporte de energia e/ou aumento da massa muscular. Tendo como exemplo os suplementos alimentares (BARROS NETO, 2001; BRUM, 2009; GOSTON, 2011).

Entre as formas de pontencialização de desempenho citadas acima encontram-se os chamados suplementos alimentares, que correspondem aos agentes ergogênicos nutricionais. Tais suplementos têm sido abrangentemente utilizados com o intuito de aumentar a massa muscular, de ganhar velocidade nos esportes e fins estético e dietético (ALVES & LIMA, 2009; FAYH *et al.*, 2013).

## 1.1 SUPLEMENTOS ALIMENTARES

### 1.1.1 DEFINIÇÃO

Os suplementos alimentares são considerados um gênero alimentício direcionado para praticantes de atividades físicas, sem finalidade medicamentosa. São administrados por via oral com o propósito de contribuir para uma dieta normal. Os mesmos são oriundos de fontes concentradas de nutrientes ou substâncias que possuem algum efeito nutricional (ANVISA, 1998; MAUGHAN *et al.*, 2004; MILLMAN & ROSS, 2003; RODEK *et al.*, 2012; VAN THUYNE *et al.*, 2006).

De acordo com a Resolução de Diretoria Colegiada número 18, de 27 de abril de 2010, que dispõe sobre alimentos para atletas, os suplementos alimentares podem ser classificados como: hidroeletrolíticos, energéticos, proteicos, para substituição parcial de refeições, creatina e cafeína (ANVISA, 2010).

O suplemento alimentar a ser abordado neste trabalho é o suplemento proteico derivado do soro do leite, conhecido popularmente como *whey protein*, que está inserido nos alimentos de origem proteica para atletas.



### 1.1.1.1 SUPLEMENTO PROTEICO DERIVADO DO SORO DO LEITE

Entre as etapas envolvidas durante o processo de fabricação do queijo, está a precipitação da caseína (proteína do leite) e, como resíduo desta etapa, ocorre a formação de um sobrenadante, rico em proteínas solúveis, lipídeos e lactose. Esse sobrenadante é mais conhecido como soro do leite, que devido ao progresso relacionado à produção, foram descobertas diferentes finalidades para esse soro, e uma delas é a fabricação de suplementos alimentares (CHEN *et al.*, 2014; HARAGUCHI *et al.*, 2006; JERVIS *et al.*, 2012; YALÇIN, 2006).

O suplemento proteico derivado do soro do leite, é um suplemento alimentar fabricado a partir do soro do leite bovino e tem como principais componentes as proteínas beta-lactoglobulina (BLG), alfa-lactoalbumina (ALA), albumina do soro bovino (BSA), imunoglobulinas (Ig's), glicomacropéptídeos (GMP) e outras proteínas menores como a lactoperoxidase, lactoferrina, beta-microglobulina, lisozima, gama-globulinas, entre outras (HARAGUCHI *et al.*, 2006; YALÇIN, 2006).

O soro do leite pode passar por diferentes técnicas de produção até chegar a forma em que é comercializado. Entre essas técnicas estão, a troca iônica, filtração e hidrólise. Dependendo da técnica de produção utilizada, essa classe de suplemento pode ser classificada como, isolado, concentrado ou hidrolisado, respectivamente (INMETRO, 2014; PATTARIN *et al.*, 2010).

O suplemento proteico derivado do soro do leite isolado é considerada a forma mais pura desse suplemento, contendo a maior porcentagem de proteína (aproximadamente 90%) quando comparada às outras formas. Nessa classificação a porcentagem de lipídeos e lactose é muito baixa (podendo ser inferior à 1%) (CARRILHO, 2013; INMETRO, 2014; JERVIS *et al.*, 2012).

A forma concentrada é considerada a classe mais acessível desse suplemento, podendo ter sua concentração de proteína variada entre 35-89%, de modo a variar a concentração de gordura e lactose, que é inversamente proporcional à concentração proteica (INMETRO, 2014; JERVIS *et al.*, 2012).

O suplemento proteico derivado do soro do leite hidrolisado é a forma em que é empregado o processo mais complexo de preparo, a hidrólise, para obter peptídeos bioativos e certos fragmentos de proteínas. Essa forma exige uma maior quantidade

dos ingredientes contidos no soro (CARRILHO, 2013; INMETRO, 2014; PATTARIN *et al.*, 2010).

Esse suplemento, independente das diferentes classificações, tem sido considerado um dos produtos mais adequados para a prática esportiva. Entre as vantagens relacionadas à sua utilização estão: aumento do desempenho, hipertrofia muscular, diminuição da gordura corpórea, além de outros benefícios relacionados à saúde do indivíduo (CHEN *et al.*, 2014; HARAGUCHI *et al.*, 2006; YALÇIN, 2006).

Não existem muitos estudos a cerca dos efeitos adversos que a administração dessa classe de suplemento pode ocasionar, porém, entre eles estão os problemas renais e desequilíbrio da densidade mineral óssea devido a ausência de uma dieta equilibrada (ALVES & LIMA, 2009).

### 1.1.2 REGULAMENTAÇÃO

Esses suplementos são considerados um gênero alimentício e devido a isso, os mesmos podem ser comercializados legalmente. Por serem vendidos sem nenhuma restrição, garante-se que tais produtos são seguros e eficazes (DENHAM, 2011; FAYH *et al.*, 2013; VAN DER MERWE & GROBBELAAR, 2005).

Apesar de existirem leis que regulamentem tais produtos e suas rotulagens (que variam entre os diferentes países), ainda falta uma maior atenção quanto a avaliação relacionada a eficácia e segurança do produto. Essa problemática faz com que muitos suplementos não sejam fabricados da maneira correta, ou seja, é possível que os componentes contidos em um suplemento não correspondam ao que está descrito em seu rótulo (BURKE, 2000; MARTELLO *et al.*, 2007; VAN DER MERWE & GROBBELAAR, 2005).

No Brasil, o órgão regulamentador responsável por esses produtos é a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) que vem tentando aumentar a fiscalização dos mesmos ao longo dos anos, seja por meio do controle de qualidade ou, por meio da elaboração de resoluções e portarias que os regulamentem, um exemplo é a Resolução de Diretoria Colegiada 18, de 27 de abril de 2010 – que dispõe sobre alimentos para atletas – citada anteriormente. Mediante a esses recursos, a ANVISA

procura ter um maior controle no processo de fabricação e comercialização desses produtos em território brasileiro. Porém, a produção e consumo dos suplementos têm aumentado tanto que a fiscalização não tem sido suficiente (ANVISA, 2010; FONTENELE & LUNA, 2013; PINHEIRO & NAVARRO, 2008).

Em muitos países, ocorrem outros problemas relacionados à ausência de uma maior fiscalização relacionada a esses produtos, que são as divergências nas composições dos lotes e a possível presença de contaminantes e adulterantes (VAN DER MERWE & GROBBELAAR, 2005).

### 1.1.3 CONTROLE DE QUALIDADE DOS SUPLEMENTOS ALIMENTARES

Apesar de muitos suplementos possuírem compatibilidade quanto a relação componentes da formulação e rótulo, ainda existe um número significativo de suplementos que necessitam de um maior controle de qualidade ao longo do processo de fabricação, para que as informações contidas no rótulo sejam compatíveis com o conteúdo (FDA, 2006; VAN THUYNE *et al.*, 2006).

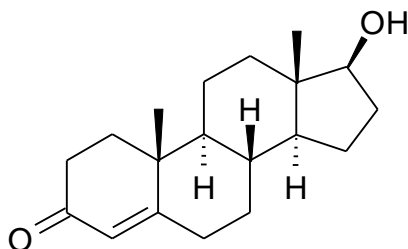
Tais incompatibilidades podem estar relacionadas à adulteração intencional do produto, por meio da inserção de substâncias que vão melhorar o desempenho na prática esportiva ou, à contaminação durante o preparo dos mesmos, devido à ausência de boas práticas de fabricação. Este tipo de ocorrência trata-se de um problema de saúde pública, pois a presença desses contaminantes e/ou adulterantes podem causar sérios riscos relacionados saúde do indivíduo e também, dependendo da substância encontrada, pode ser considerado *doping* (âmbito esportivo) (BURKE, 2000; COHEN, 2009; PIPE & AYOTTE, 2002; VAN THUYNE *et al.*, 2006).

### 1.1.3.1 CLASSES DE CONTAMINANTES ENCONTRADOS NOS SUPLEMENTOS ALIMENTARES

Existem inúmeros relatos à respeito da adulteração de suplementos alimentares. Esses relatos abrangem desde a contaminação por metais pesados como chumbo, arsênio e mercúrio à microorganismos como *Staphylococcus aureus* e *Salmonella*. Mesmo compreendendo que qualquer tipo de adulteração pode causar riscos, uma maior atenção tem sido voltada para os suplementos alimentares adulterados com substâncias que possuem propriedades farmacológicas como os agentes anabólicos, diuréticos, estimulantes, betabloqueadores, glicocorticoides etc (COHEN, 2009; LU *et al.*, 2010; MARTELLO *et al.*, 2007; MARTINS, 2012; REEUWIJK, 2014; SILVA *et al.*, 2002; WOO *et al.*, 2013).

#### 1.1.3.1.1 AGENTES ANABÓLICOS

Os esteroides anabolizantes se referem às substâncias produzidas em laboratório derivadas da testosterona (FIG. 1.1). Essas substâncias sintéticas possuem potencial efeito anabolizante, responsável pelo crescimento muscular e, mínimo efeito androgênico, o qual origina as características masculinas (MILLMAN & ROSS, 2003; SILVA *et al.*, 2002).

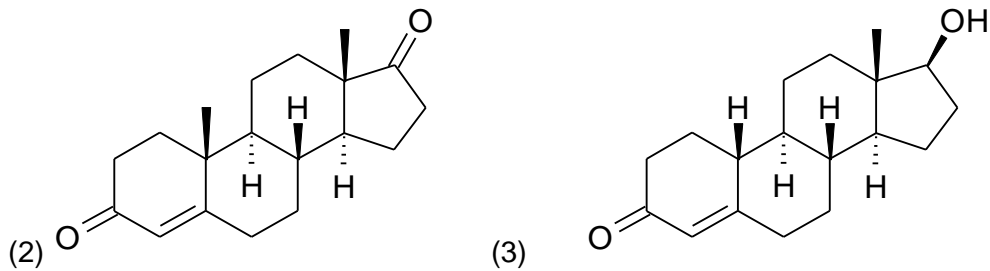


**FIG. 1.1** Estrutura química relacionada à testosterona.

Os suplementos alimentares são adulterados com agentes anabolizantes devido aos efeitos provenientes de sua utilização, que são aumento da massa muscular e

consequentemente aumento da *performance* esportiva, redução da gordura corpórea, maior aporte de oxigênio, entre outros (MILLMAN & ROSS, 2003; SILVA *et al.*, 2002; VAN THUYNE *et al.*, 2006)

As principais informações relacionadas à adulteração por essa classe de substâncias se deve aos agentes anabólicos androstenediona e nandrolona (FIG. 1.2) (PIPE & AYOTTE, 2002; SILVA *et al.*, 2002; VAN THUYNE *et al.*, 2006).



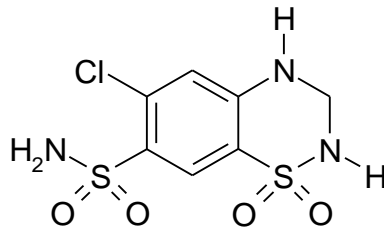
**FIG. 1.2** Estruturas químicas referentes à androstenediona (2) e à nandrolona (3).

#### 1.1.3.1.2 DIURÉTICOS

Os diuréticos referem-se a classe de fármacos anti-hipertensivos utilizada na redução da pressão devido ao seu principal efeito que é o aumento da diurese, impedindo a retenção de sal (NIGRO & FORTES, 2005).

A inserção dessa classe de fármacos nos suplementos alimentares está relacionada à perda de peso eficaz, além de mascarar a existência de outras classes de substâncias em uma amostra devido ao aumento da diurese (HERNANDEZ & NAHAS, 2009; WOO *et al.*, 2013).

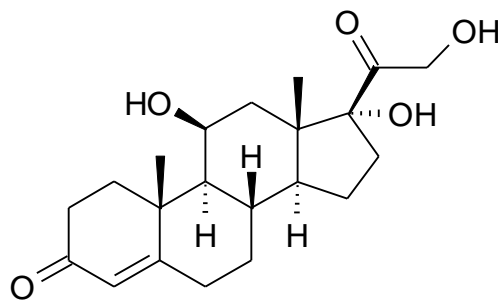
Entre os relatos de adulteração pela classe dos diuréticos, está a substância hidroclorotiazida (FIG. 1.3) (MARTINS, 2012).



**FIG. 1.3** Estrutura química correspondente à hidroclorotiazida.

#### 1.1.3.1.3 GICOCORTICOIDES

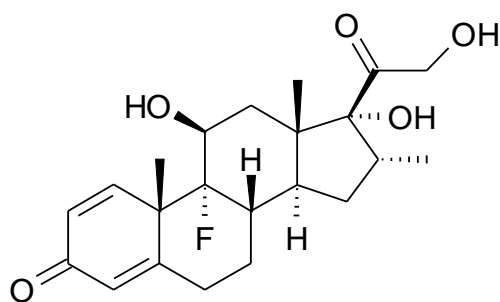
Os glicocorticoides ou anti-inflamatórios hormonais referem-se as substâncias sintetizadas em laboratório que são derivadas do hormônio cortisol (FIG. 1.4) utilizadas no tratamento da inflamação (ANTI *et al.*, 2008).



**FIG. 1.4** Estrutura química correspondente ao hormônio cortisol.

O motivo da adulteração por essa classe de fármacos se refere ao fato dos mesmos auxiliarem na cura das lesões musculares, reduzindo as reações inflamatórias celulares e diminuindo os efeitos colaterais no processo de cicatrização (BAVARESCO *et al.*, 2005).

Um exemplo de adulteração por glicocorticoides é por meio inserção da substância dexametasona (FIG. 1.5) (MARTINS, 2012).

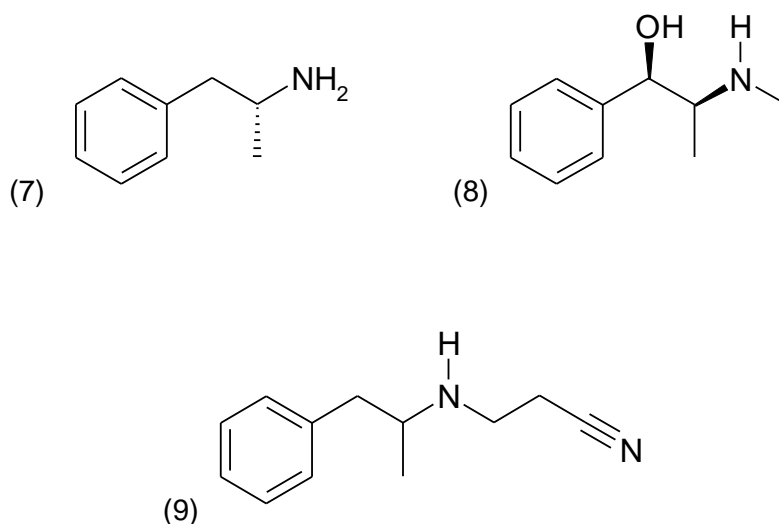


**FIG. 1.5** Estrutura química referente à dexametasona.

#### 1.1.3.1.4 ESTIMULANTES

Os estimulantes são fármacos que vão agir diretamente no Sistema Nervoso Central (SNC) aumentando sua atividade. O motivo pelo qual os suplementos são adulterados com essas substâncias é devido aos efeitos encontrados após sua administração, que são aumento do estado de alerta e diminuição da fadiga (DOCHERTY, 2008; THEVIS *et al.*, 2010).

Os principais casos de adulteração em suplementos alimentares com estimulantes estão relacionados as substâncias efedrina, anfetamina, femproporex (FIG. 1.6) entre outros (COHEN, 2007; MARTELLO *et al.*, 2007).



**FIG. 1.6** Estruturas químicas relacionadas à anfetamina (7) e efedrina (8) e femproporex (9).

De maneira resumida a TAB. 1.1 apresenta as classes de substâncias com ação terapêutica descritas na lista da WADA e os efeitos oriundos de sua administração.

**TAB. 1.1** Classes de substâncias descritas na lista da Agência Mundial de Antidopagem e seus principais efeitos.

<b>Classe</b>	<b>Efeitos desejados</b>
Agentes anabólicos	Aumento da massa muscular
Beta-agonistas	Efeitos estimulantes e anabolizantes (em doses elevadas)
Hormônios e moduladores metabólicos	À depender de cada substância
Diuréticos e agentes mascaradores	Perda de peso eficaz
Estimulantes	Aumento do estado de alerta e diminuição da fadiga
Canabinoides	Aumentar a vasodilatação e broncodilatação
Narcóticos	Redução nas dores moderadas e intensas
Glicocorticoides	Auxílio na cura das lesões
Beta-bloqueadores	Diminuição do débito cardíaco e da frequência cardíaca

Os casos de adulteração ou de contaminação dos suplementos alimentares são preocupantes, pois não é esperado que tal produto contenha compostos que possuam ação terapêutica em seu conteúdo.

Consta na RDC 18 de 2010 da ANVISA que os suplementos alimentares não podem conter substâncias com propriedades farmacológicas descritas na lista da Agência Mundial de Antidopagem (AMA ou WADA - *World Anti-Doping Agency*) ou em alguma legislação relacionada. A presença de fármacos caracteriza o produto como medicamento e não mais como um alimento para atletas (ANVISA, 2010).

Entretanto, além da alteração na classificação ou risco de *doping*, existe o risco mais importante, que são os efeitos adversos que a presença desses compostos podem causar à saúde do consumidor (DOCHERTY, 2008).

Nota-se que os riscos referentes à adulteração e/ou contaminação dos suplementos alimentares só diminuirão quando for implementado um controle de qualidade mais adequado para esses produtos (PIPE & AYOTTE, 2002). Mas para



isso, faz-se necessário a utilização de métodos eficientes para o monitoramento dessas substâncias adulterantes.

## 1.2 PRÉ-TRATAMENTO DAS AMOSTRAS

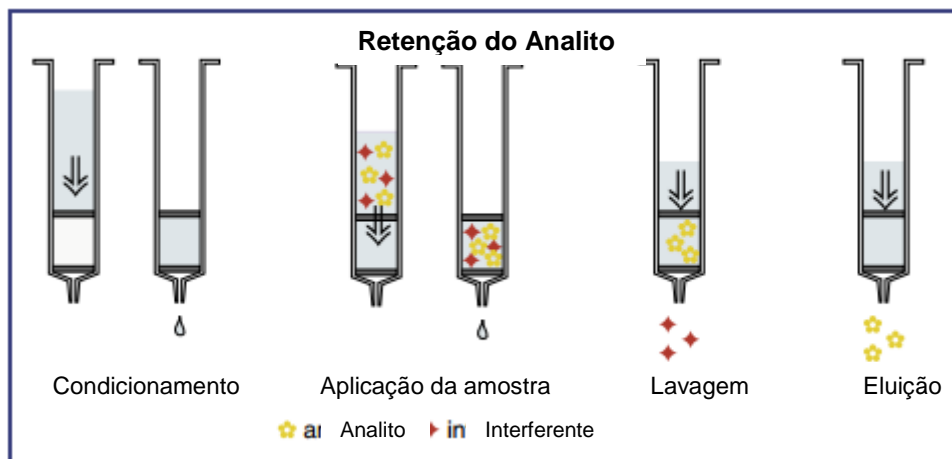
O pré-tratamento de amostras é fundamental para obter um bom resultado na análise. Esse pré-tratamento consiste na extração e/ou concentração das substâncias de interesse, e conseqüentemente, na diminuição dos interferentes contidos na amostra. Por meio dessa etapa, torna-se viável a detecção dos analitos alvo (JARDIM, 2010; QUEIROZ *et al.*, 2001).

A técnica de preparo de amostras considerada adequada e eficiente para a análise de suplementos proteicos derivados do soro do leite é a extração em fase sólida (EFS ou SPE).

### 1.2.1 EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA (EFS OU SPE - SOLID PHASE EXTRACTION)

A extração em fase sólida tem entre suas vantagens uma maior rapidez no processo, maior seletividade analítica e utilização mínima de solvente orgânico quando comparada à extração líquido-líquido (CALDAS *et al.*, 2011; SKOOG *et al.*, 2012).

A extração em fase sólida é baseada em um princípio de extração líquido-sólido e é constituída basicamente por quatro etapas: condicionamento, aplicação da amostra, lavagem e eluição (FIG. 1.7). A primeira etapa consiste na ativação do sítio ativo contido no cartucho de SPE, a segunda na retenção da amostra na fase sólida que constitui o cartucho, a terceira na retirada dos interferentes por meio da lavagem do cartucho e a quarta se refere à coleta dos componentes de interesse da amostra (CALDAS *et al.*, 2011; JARDIM, 2010; QUEIROZ *et al.*, 2001; SKOOG *et al.*, 2012).



**FIG. 1.7** Etapas envolvidas na extração em fase sólida: condicionamento do cartucho; aplicação da amostra; lavagem e eluição (Fonte: MACHEREY-NAGEL, 2015).

### 1.3 MÉTODOS DE ANÁLISE

A confirmação da presença dos adulterantes nos suplementos proteicos derivados do soro do leite, necessita de um método de análise que seja eficiente, sensível e reprodutível, que permita separar e identificar as substâncias presentes nas amostras. A técnica que possibilita tais análises é a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas de alta resolução (CL-EMAR ou LC-HRMS – *Liquid Chromatography coupled High Resolution Mass Spectrometry*).

O benefício da utilização desta técnica frente às outras é referente à facilidade e rapidez quanto à análise, reduzindo assim o tempo de processamento e possíveis fontes de erro (HO *et al.*, 2003; MARTELLO *et al.*, 2007).

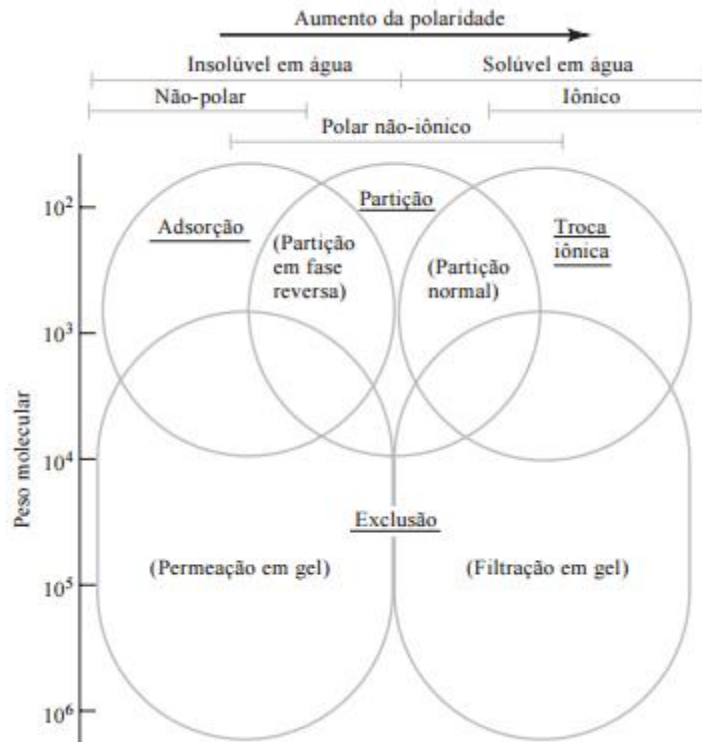
#### 1.3.1 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA (CL OU LC - LIQUID CHROMATOGRAPHY)

A cromatografia é um método de separação baseado nas diferentes interações dos componentes de uma determinada amostra entre uma fase estacionária e uma fase móvel (CIOLA, 2009; SKOOG *et al.*, 2012).

O método cromatográfico de separação pode ser classificado de acordo com a forma física do sistema, com a fase móvel e a fase estacionária empregada. A forma física pode ser dividida entre cromatografia em coluna e cromatografia planar, a fase móvel pode ser um líquido, um fluido super crítico ou um gás e, a fase estacionária pode ser um líquido, sólido ou uma fase quimicamente ligada. A variabilidade relacionada à essas classificações, resultam na existência de diferentes métodos cromatográficos (CIOLA, 2009; DEGANI *et al.*, 1998; SKOOG *et al.*, 2012).

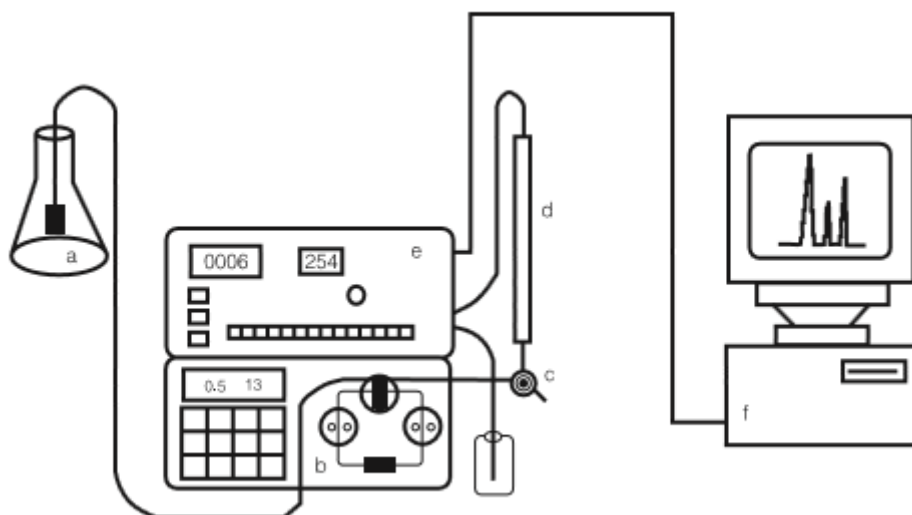
Entre os métodos cromatográficos existentes está a cromatografia em fase líquida, que foi considerada o método mais adequado para atender as necessidades do presente trabalho. Neste método a separação das substâncias acontecem em uma coluna, por meio do mecanismo de partição (líquido-líquido), onde a fase móvel utilizada é um líquido e a fase estacionária é um líquido adsorvido ou um líquido ligado a um suporte sólido (COLLINS *et al.*, 2006; SKOOG *et al.*, 2012).

A FIG. 1.8 mostra os diferentes mecanismos de separação na cromatografia em fase líquida e o mais apropriado para a natureza da molécula que se pretende analisar. A natureza da molécula, se refere neste caso, ao peso molecular e a polaridade das mesmas. Pode-se observar que o mecanismo de partição, mais especificamente a partição em fase reversa, é o mais favorável para moléculas de baixo peso molecular, moléculas polares não-iônicas, abrangendo parte da não polaridade (MAJORS, 2003; SKOOG *et al.*, 2012).



**FIG. 1.8** Aplicações da cromatografia líquida (Fonte: SKOOG *et al.*, 2012).

Um equipamento básico de cromatografia em fase líquida deve conter os seguintes componentes: reservatório da fase móvel; bomba de alta pressão; válvula de injeção (injetor); coluna; detector e computador (FIG. 1.9) (CIOLA, 2009).



**FIG. 1.9** Equipamento básico de CL. a) reservatório da fase móvel; b) bomba de alta pressão; c) válvula de injeção; d) coluna; e) detector e f) computador (Fonte: DEGANI *et al.*, 1998).

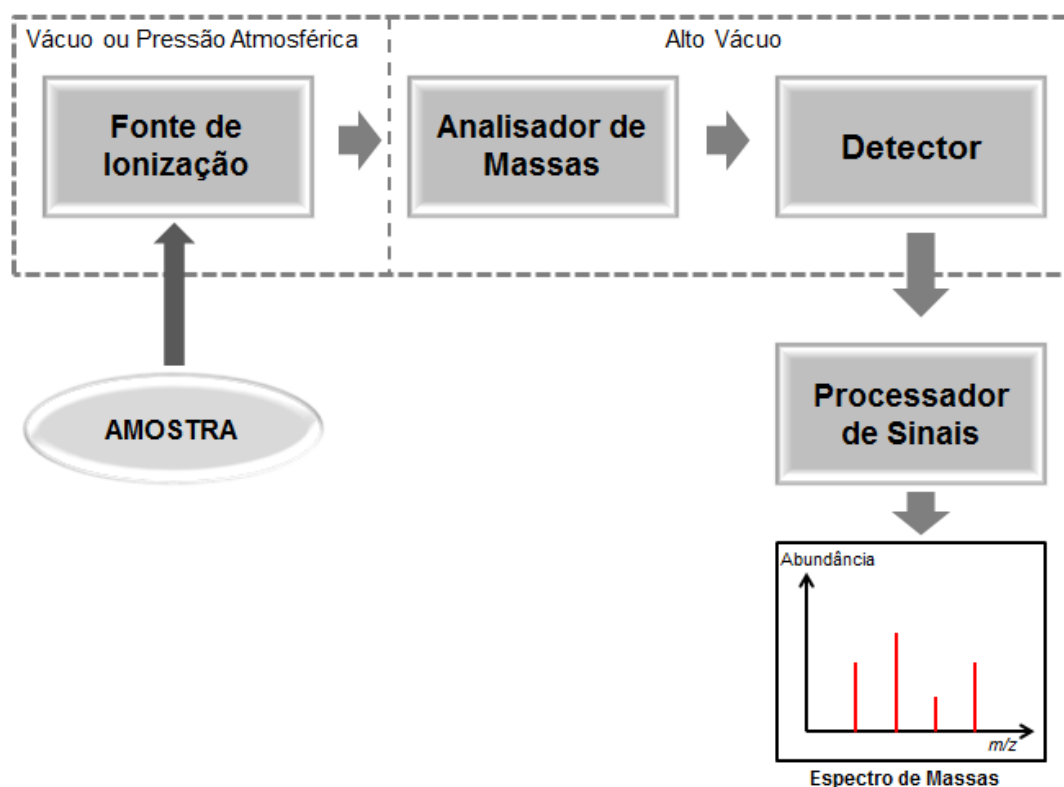
O mecanismo de separação dos componentes de uma amostra por meio desse método baseia-se na introdução da amostra em um fluxo contínuo de fase móvel (com o auxílio da bomba de alta pressão), onde a fase móvel vai carrear os componentes da mesma para a coluna cromatográfica (empacotada com a fase estacionária), onde esses componentes se separarão de acordo com suas características químicas. Após a separação na coluna, os sinais detectados são tratados e transformados em um cromatograma (DEGANI *et al.*, 1998; GUIOCHON, 1993; LANÇAS, 2009).

O método cromatográfico pode estar acoplado a diferentes sistemas de detecção, entre os mais utilizados para CL estão, o detector espectrofotométrico (UV-VIS), detector por índice de refração, detector por fluorescência, detector por espectrometria de massas. Este último quando acoplado a cromatografia em fase líquida possibilita uma melhor identificação da amostra. Isso ocorre devido à junção das vantagens de ambos os equipamentos, proporcionando uma maior seletividade, eficiência e separação (CHIARADIA *et al.*, 2008; FERREIRA *et al.*, 2009; PIVERT, 2008; SWARTZ, 2010).

### 1.3.2 ESPECTROMETRIA DE MASSAS (EM OU MS - MASS SPECTROMETRY)

A espectrometria de massas é uma técnica analítica que permite obter informações qualitativas e quantitativas relacionadas à amostra. Por meio dela consegue-se ter conhecimento referente à estrutura das moléculas contidas na amostra e sobre a massa molecular dos componentes da mesma (HO *et al.*, 2003; MILMAN, 2015).

O princípio de análise por espectrometria de massas baseia-se na separação dos analitos de acordo com suas diferentes razões massa/carga ( $m/z$ ), após a ionização da amostra em questão por meio de uma fonte de ionização. Este processo de separação ocorre no analisador de massas, posteriormente, esses íons são detectados com o auxílio de um detector e seus sinais elétricos são tratados por um processador de sinais, gerando assim, o espectro de massas (FIG. 1.10) (FERREIRA *et al.*, 2009; PIVERT, 2008; SILVERSTEIN *et al.*, 2005).



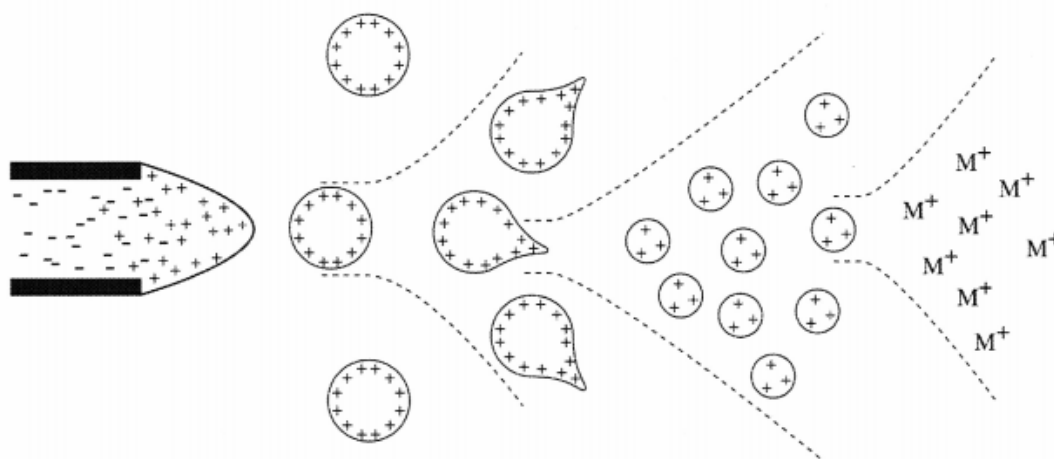
**FIG. 1.10** Diagrama de um espectrômetro de massas.

### 1.3.2.1 FONTE DE IONIZAÇÃO

As fontes de ionização mais comumente empregadas no acoplamento CL-EM são eletrospray (ESI), ionização por dessorção a laser assistida por matriz (MALDI), ionização química a pressão atmosférica (APCI), fotoionização a pressão atmosférica (APPI) (PIVERT, 2008; SILVERSTEIN *et al.*, 2005).

Entre as fontes de ionização existentes, o eletrospray apresentou-se uma das mais importantes, devido à sua abrangente aplicabilidade para análise de substâncias com diferentes graus de polaridade e de baixo peso molecular (CROTT *et al.*, 2006; HO *et al.*, 2003; MOULARD *et al.*, 2011).

A ionização por ESI possibilita a geração de íons sob pressão atmosférica. Consiste na aplicação de um forte campo elétrico sobre um capilar por onde passa a amostra em forma de solução. Esse campo elétrico gerado na extremidade do capilar faz com que gotículas carregadas sejam emitidas, formando um spray eletrolítico. Essas gotículas carregadas têm seu tamanho reduzido, ocasionando a dessolvatação do solvente devido à aplicação de um gás nebulizador resultando na liberação e isolamento dos íons presentes na amostra (FIG. 1.11) (CROTT *et al.*, 2006; FENN *et al.*; 1989; FENN, 2002; LANÇAS, 2009; PIVERT, 2008; SILVERSTEIN *et al.*, 2005).



**FIG. 1.11** Mecanismo de ionização da amostra por *eletrospray* (Fonte: HO *et al.*, 2003).

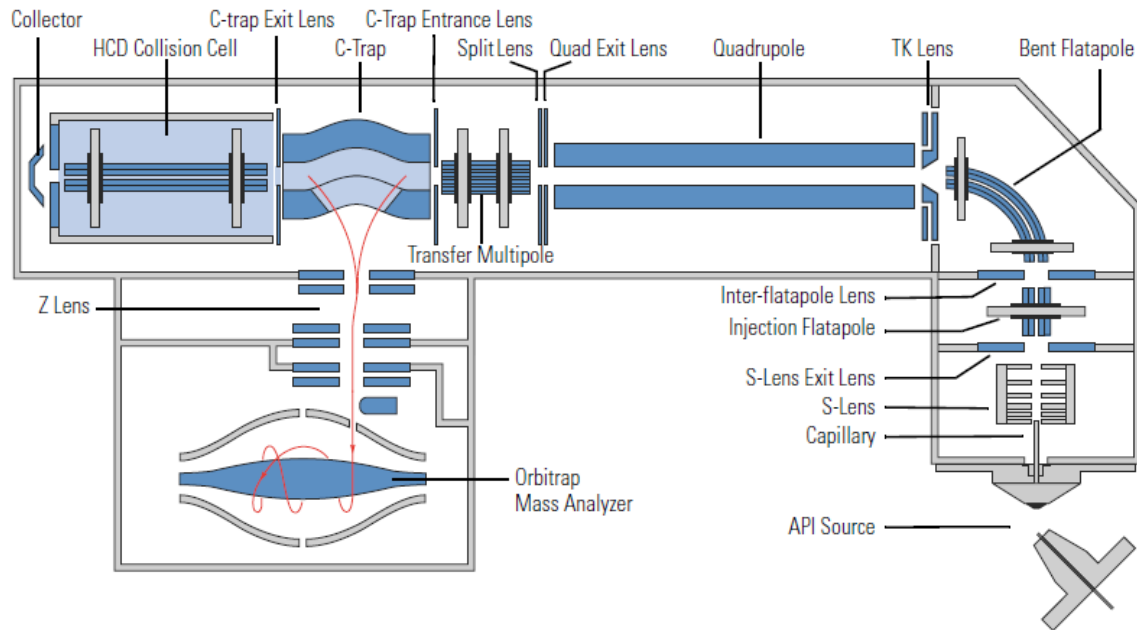
### 1.3.2.2 ANALISADOR DE MASSAS

Os analisadores de massas usualmente empregados são, armadilha de íons, tempo de voo (TdV), setor magnético (B), setor elétrico (E), ressonância ciclotrônica de íons com transformada de Fourier, quadrupolo e orbitrap (LANÇAS, 2009; MAKAROV & SCIGELOVA, 2010; SILVERSTEIN *et al.*, 2005). Entre os analisadores de massas descritos acima, o analisador utilizado no presente trabalho, foi o orbitrap.

O orbitrap é um analisador de massas que permite a identificação de moléculas de peso molecular variado (captando desde proteínas à moléculas orgânicas de massa molecular reduzida). Esse fato está relacionado ao giro orbitalar do analisador, que permite alta resolução e exatidão mássica nas respectivas análises (CHO *et al.*, 2012; GORSHKOV *et al.*, 2010; MAKAROV & SCIGELOVA, 2010; STRANO-ROSSI *et al.*, 2015).

O orbitrap como um todo, é composto inicialmente por lentes (*S-Lens*) que possibilitam o aumento da sensibilidade, promovendo a focalização dos íons; seguido das vigas guias que promovem a redução do ruído; quadrupolo (*Quadrupole*) que separa os íons de acordo com suas diferentes razões  $m/z$ ; multipolo (*Transfer Multipole*) que facilita análise paralela; armadilha de íons (*C-trap*) que concentra os íons e envia para o orbitrap; orbitrap, o qual é responsável pela alta resolução e; célula de colisão (*HCD cell*), que fragmenta os íons por meio da inserção de um gás de colisão, sendo opcional a passagem pela mesma (FIG. 1.12).

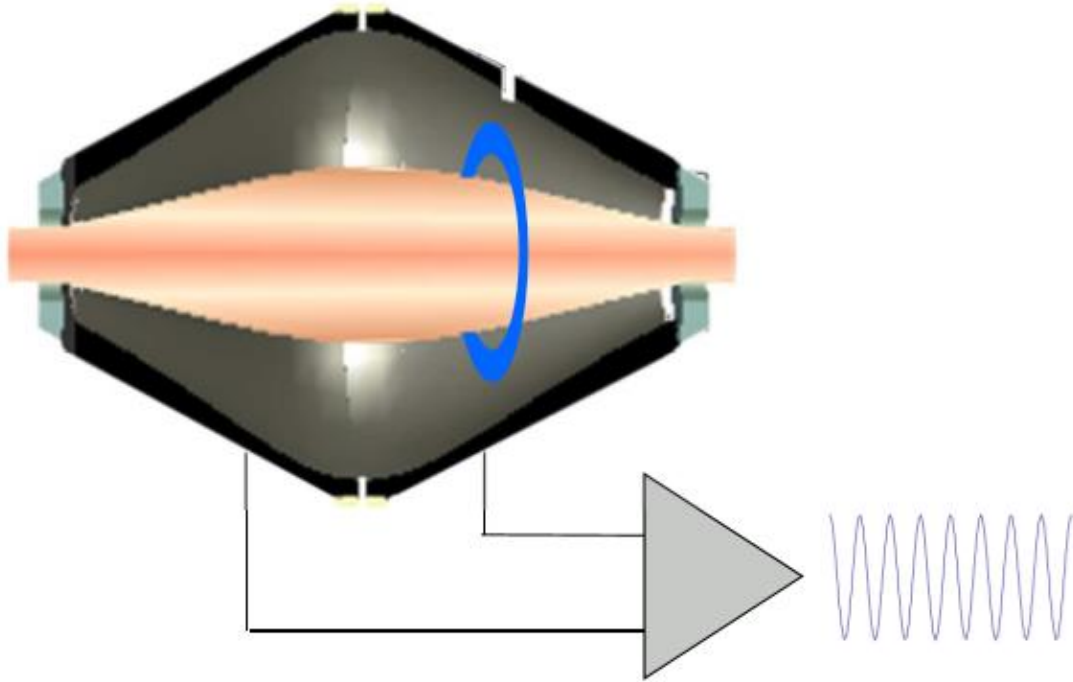




**FIG. 1.12** Esquema de um analisador de massas do tipo orbitrap (Fonte: Thermo Fisher Scientific, 2015).

A utilização de um analisador de massas do tipo orbitrap, que possui como sistema a transformada de Fourier, faz com que o espectrômetro de massas seja considerado de alta resolução (EMAR). O uso deste analisador dispensa a utilização dos detectores usualmente empregados como: chapas fotográficas, detector de *faraday* e multiplicadores de elétrons (HOFFMANN & STROOBANT, 2007; LANÇAS, 2009).

A técnica de transformada de Fourier faz com que, a frequência axial gerada devido ao giro em torno do eixo do orbitrap e a corrente de imagem detectada sejam convertidas em um espectro de massas (FIG. 1.13) (DENISOV *et al.*, 2012; LANGE *et al.*, 2014; MADEIRA *et al.*, 2012).



**FIG. 1.13.** Frequências convertidas em  $m/z$  utilizando transformada de Fourier  
(Fonte: LUGÃO, 2012).

## 1.4 JUSTIFICATIVA

Considerando o aumento dos casos de adulteração de suplementos alimentares por substâncias com propriedades farmacológicas, o qual se tornou um problema de saúde pública e devido aos poucos ou nenhum relatos existentes referentes à análise dessas substâncias nos suplementos proteicos derivados do soro do leite, faz-se necessário desenvolver um método analítico que possibilite detectar e identificar diferentes compostos com ação farmacológica, descritos no documento da AMA, para que se possa avaliar a segurança relacionada à esses produtos.

Os riscos relacionados à saúde dos consumidores ocasionados pela ingestão de suplementos proteicos derivados do soro do leite adulterados ainda são desconhecidos, mas sabe-se que eles dependerão dos efeitos que cada substância presente causará. Além disso também existe a questão relacionada ao *doping*. Essas circunstâncias fazem com que o rastreio dessas substâncias adulterantes seja de extrema importância para garantir a qualidade desses produtos.

Portanto, para atender a necessidade do presente trabalho houve a necessidade de desenvolver e validar um método de análise de substâncias com propriedades farmacológicas em amostras comerciais de suplementos proteicos derivados do soro do leite utilizando a técnica de Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas de Alta Resolução (CL-EMAR).

## 1.5 OBJETIVOS

### 1.5.1 OBJETIVOS GERAIS

O presente trabalho tem como objetivo principal desenvolver e validar uma metodologia de análise, que permita identificar adequadamente a presença de substâncias que possuem propriedades farmacológicas em matriz de suplementos proteicos derivados do soro do leite.

### 1.5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Desenvolver um método que permita analisar simultaneamente diferentes classes de substâncias orgânicas que possuem baixo peso molecular em uma matriz complexa;
2. Aplicar o método desenvolvido e validado em amostras comerciais de suplementos proteicos derivados do soro do leite a fim de realizar o controle de qualidade referente à essa classe de suplementos.

## 2 METODOLOGIA

### 2.1 COLETA DAS AMOSTRAS

As amostras da presente dissertação foram oriundas de suplementos proteicos derivados do soro do leite. As mesmas após serem obtidas (amostras compradas ou doadas por usuários - coletadas em frascos desinfectados), foram encaminhadas para o Laboratório de Apoio ao Desenvolvimento Tecnológico - LADETEC, mais especificamente para o Laboratório Brasileiro de Controle de Dopagem - LBCD (localizado na Avenida Horácio Macedo, 1281 - Bloco C, Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ) onde as análises foram realizadas.

### 2.2 MATERIAIS E EQUIPAMENTOS

Todos os equipamentos que necessitaram de calibração foram calibrados. Os orbitraps foram calibrados pelos responsáveis do LBCD e as balanças e pipetas automáticas foram calibradas pelos responsáveis do Laboratório de calibração (LAB CAL – pertencente ao LADETEC).

#### 2.2.1 MATERIAIS

Os materiais utilizados no preparo das amostras e das soluções de trabalho foram: provetas, balões volumétricos, pipetas automáticas, ponteiras, tubos de ensaio, tampas para tubo de ensaio, microtubos, pipetas *pasteur*, cartuchos Strata-X-CW (30 mg, 1mL) Phenomenex (São Paulo, Brasil), *vials* de 2mL, tampas de rosca para *vial* e *inserts*.

## 2.2.2 EQUIPAMENTOS

No preparo das amostras e das soluções foram utilizados os seguintes equipamentos: balança de precisão modelo Xp 205 da Mettler Toledo (São Paulo, Brasil), agitador de tubos (vortex) da Barnsted / Thermolyne (Dubuque, EUA), centrífuga Heraeus Multifuge X3 Centrifuge da Thermo Scientific (Bremen, Alemanha), cuba para extração em fase sólida e evaporador Turbovap IV da Biotage (Carolina do Norte, EUA).

## 2.2.3 SOLVENTES E PADRÕES DE REFERÊNCIA

Todos os solventes utilizados foram grau HPLC. Metanol, formiato de amônio, ácido fórmico e ácido acético foram adquiridos pela Tedia (Fairfield, United States). Também foi utilizada água MilliQ ( $18\mu\text{mcm}^{-1}$ ) (Massachusetts, EUA). Os padrões de referência e padrões internos foram obtidos principalmente por *National Measurement Institute* (Sydney, Austrália), Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA) e Logical (Luckenwalde - Alemanha) ou foram gentilmente doados por outros laboratórios anti-doping.

## 2.2.4 PREPARO DAS SOLUÇÕES

### 2.2.4.1 SOLUÇÃO DE TRABALHO

A solução referente aos padrões de referência consistiu na mistura das substâncias pertencentes as classes: agentes anabólicos, beta-agonistas, hormônios e moduladores anabólicos, diuréticos e agentes mascaradores,

estimulantes, canabinoides, narcóticos, glicocorticoides e betabloqueadores em diferentes concentrações, variando de 0,04 ng/μL à 8 ng/μL. O preparo foi realizado de acordo com o procedimento em sequência.

Em um balão volumétrico de 1 mL foi transferida uma pequena quantidade de metanol e em seguida foram adicionados os volumes referentes a cada substância. Após esse procedimento o volume foi completado com metanol. A solução resultante foi homogeneizada em vortex por 20 s, transferida para frasco de vidro e estocada à -15°C.

#### 2.2.4.2 SOLUÇÃO DE ÁCIDO ACÉTICO 2%

Em uma proveta de 10 mL transferiu-se uma pequena quantidade de água MilliQ, em sequência adicionou-se 0,2 mL de ácido acético e avolumou-se com água MilliQ até completar o volume de 10 mL. A solução homogeneizada em vortex foi posteriormente transferida para frasco de vidro.

#### 2.2.4.3 SOLUÇÃO DE ÁCIDO FÓRMICO 5%

Em uma proveta de 20 mL adicionou-se uma pequena quantidade de metanol e em seguida 1 mL de ácido fórmico. Completou-se o volume restante com metanol. Esta solução homogeneizada em vortex foi transferida para frasco de vidro.

#### 2.2.4.4 PADRÕES INTERNOS

- Padrão interno neutro

A TAB. 2.1 mostra as substâncias contidas no padrão interno neutro, o volume transferido e a respectiva concentração na solução.

**TAB. 2.1** Substâncias e seus respectivos volumes e concentrações no padrão interno neutro.

<b>Substância</b>	<b>Volume (<math>\mu\text{L}</math>)</b>	<b>Concentração na solução (<math>\text{ng}/\mu\text{L}</math>)</b>
Cloridrato de buspirona	10	10
Mefrusida	20	20
N-metilhexilamina 96%	100	10
Propilteofilina	10	10
Metiltestosterona	6	6

Em um balão volumétrico de 1 mL adicionou-se uma pequena quantidade de metanol e o volume especificado para cada substância de referência. Após a adição das mesmas, diluiu-se com metanol até completar o volume de 1 mL. Essa solução foi homogeneizada em vortex, transferida para frasco de vidro e estocada à  $-15^{\circ}\text{C}$ .

- Padrão interno alcalino

A TAB. 2.2 apresenta as substâncias contidas no padrão interno alcalino, o volume que foi alíquotado e a respectiva concentração na solução.

**TAB. 2.2** Substâncias e seus respectivos volumes e concentrações no padrão interno alcalino.

<b>Substância</b>	<b>Volume (<math>\mu\text{L}</math>)</b>	<b>Concentração na solução (<math>\text{ng}/\mu\text{L}</math>)</b>
4-Metilefedrina-D3,HCl	100	10
Mefrusida	20	20
N-metilhexilamina 96%	100	10
7-propilteofilina	10	10
Metiltestosterona	6	6



Foram transferidos para balão volumétrico de 1 mL uma pequena quantidade de metanol e os volumes descritos na TAB. 2.2 para cada padrão de referência. Após a adição de cada substância, a solução foi diluída com metanol até completar o volume de 1 mL. A mesma foi homogeneizada em vortex, transferida para frasco de vidro e acondicionada à -15°C.

#### 2.2.4.5 FASE MÓVEL

##### - Água com aditivos (A)

Em uma proveta de 500 mL foi adicionada uma pequena alíquota de água MilliQ e logo após foram adicionados 500 µL de solução de formiato de amônio e 500 µL de ácido fórmico, o volume restante foi completado com água MilliQ. A solução foi homogeneizada e transferida para frasco de fase móvel.

##### - Metanol com aditivo (B)

Em uma proveta de 500 mL foi adicionada uma pequena alíquota de metanol e em seguida adicionou-se 500 µL de ácido fórmico. O volume foi completado com metanol. A solução foi homogeneizada e transferida para frasco de fase móvel.

### 2.3 ETAPAS DO TRABALHO

As etapas da presente dissertação consistiram em:

- ✓ Desenvolvimento dos métodos de extração e análise;
- ✓ Validação da metodologia;

- ✓ Análise de amostras comerciais.

### 2.3.1 DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO ANALÍTICO

O método analítico foi realizado de acordo com o seguinte procedimento:

Pesou-se 20 mg de cada amostra de suplemento proteico derivado do soro do leite e diluiu-se em 2 mL de água. As mesmas foram homogeneizadas em vortex por 20 s e centrifugadas à 3.000 rpm por 20 min. Em seguida os sobrenadantes foram transferidos para novos tubos de ensaio onde houve a adição de 50 µL do MIX de fortificação, seguidos de homogeneização em vortex por 20 s.

Aliquotou-se em microtubos, 10 µL do conteúdo de cada tubo de ensaio e os mesmos foram diluídos com 50 µL de ácido acético 2%, essa etapa foi seguida da utilização de centrífuga por 5 min à 10.000 rpm. As alíquotas foram encaminhadas armazenadas em geladeira (com temperatura entre 2°C e 6°C) para posterior ressuspensão das amostras.

Após a separação das alíquotas, adicionou-se 10 µL do padrão interno neutro e 10 µL do padrão interno alcalino em cada tubo de ensaio e os mesmos foram homogeneizados em vortex.

Em sequência foi realizada a etapa de extração em fase sólida. As etapas da extração consistiram: na lavagem do cartucho com 1 mL de metanol e 1 mL de água MilliQ; aplicação das amostras; lavagem com 1 mL de água MilliQ e 1 mL de metanol 50% e; eluição dos analitos com 1 mL da solução metanol : ácido fórmico (95:5).

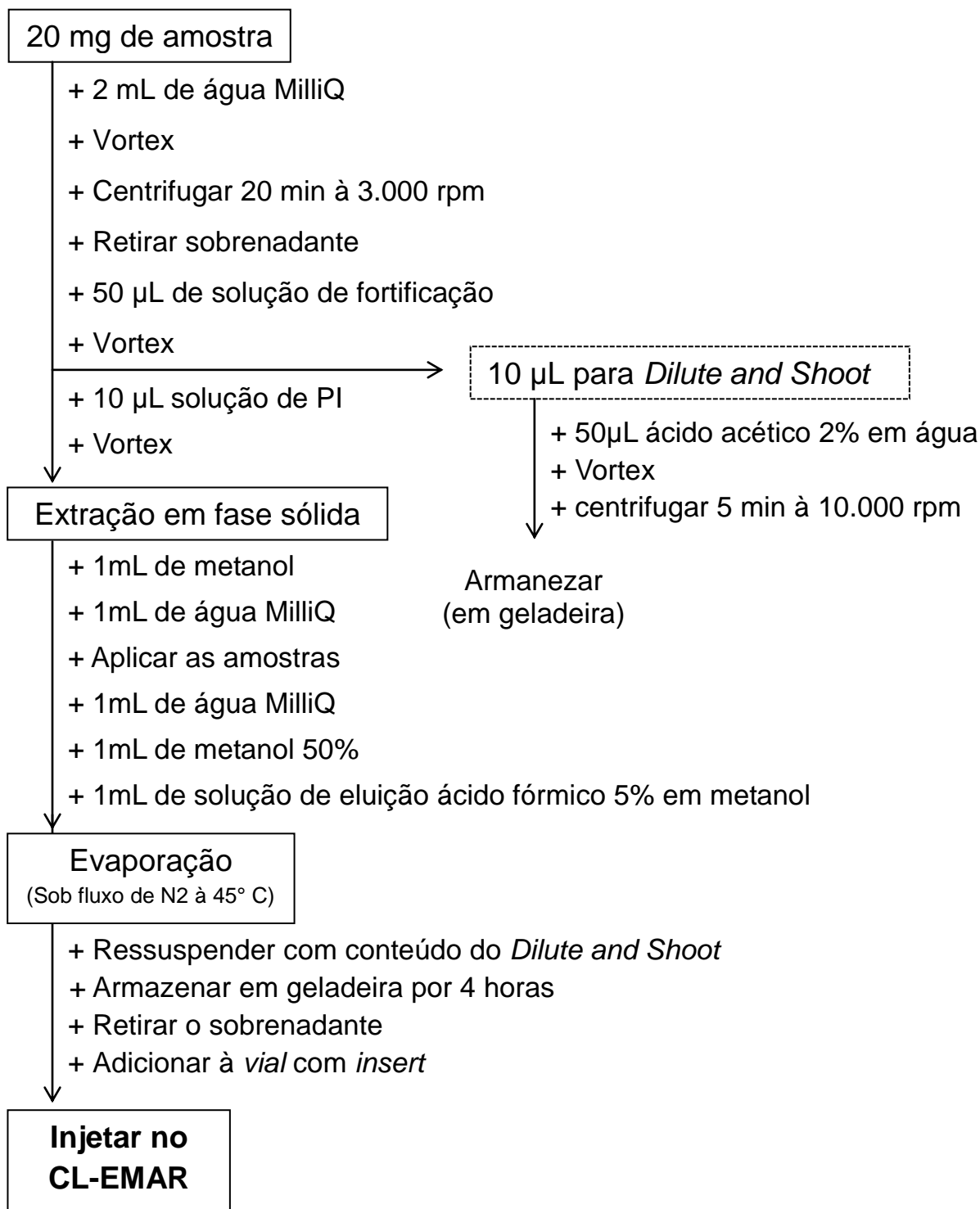
As amostras foram levadas para evaporador de amostras, com aplicação de fluxo contínuo de nitrogênio ultra puro (N<sub>2</sub>) à temperatura de 45° C, no interior de câmara de exaustão de gases. As mesmas permaneceram no evaporador até completa evaporação do solvente de cada tubo de ensaio.

Foi adicionado a cada tubo de ensaio evaporado, os 60 µL da alíquota anteriormente guardada em geladeira com intuito de ressuspender os analitos de interesse. Após essa etapa, as mesmas foram homogeneizadas em vortex por 20 s e transferidas para *vials* com *inserts*.

Essas amostras foram armazenadas em geladeira (com temperatura entre 2°C e 6°C) onde permaneceram por 4 horas (até haver formação de precipitado). Após esse tempo cada sobrenadante foi retirado e transferido para outro *vial* com *insert*.

Ao fim do procedimento as amostras foram injetadas em cromatógrafo líquido acoplado à espectrômetro de massas de alta resolução (CL-EMAR).

A FIG. 2.1 mostra o fluxograma que representa as etapas de preparo das amostras segundo o método de extração citado acima.



**FIG. 2.1** Fluxograma de preparo das amostras.

### 2.3.1.1 CONDIÇÕES INSTRUMENTAIS

O procedimento de análise das amostras utilizou os seguintes equipamentos: cromatógrafo líquido Accela LC (Thermo Scientific, Bremen, Alemanha) acoplado à espectrômetro de massas de alta resolução Q Exactive (Thermo Scientific, Bremen Alemanha) com ionização eletrospray (ESI). As condições para as análises instrumentais (parâmetros cromatográficos e do espectrômetro de massas) estão descritas e seguir.

#### 2.3.1.1.1 PARÂMETROS CROMATOGRÁFICOS

O sistema cromatográfico utilizado foi um Accela 1250 pump, com degaseificador, auto-injetor termostatizado à 10°C. A coluna utilizada foi uma Zorbax SB-C18, 3,0 mm x 50 mm e 1,8 µm de tamanho de partícula da Agilent Technologies (Böblingen, Alemanha). As fases móveis empregadas foram 0,1% de formiato de amônio / 0,1% de ácido fórmico em água (A) e 0,1% de ácido fórmico em metanol (B), o volume de injeção foi de 5 µL com fluxo de 600 µL/min. A TAB. 2.3 mostra o gradiente de eluição e o fluxo utilizado nas análises.

**TAB. 2.3** Gradiente de eluição

<b>Tempo (min)</b>	<b>% A</b>	<b>%B</b>
0,00	95	5
0,30	95	5
0,50	90	10
10,00	0	100
11,00	0	100
11,10	95	5
14,00	95	5

### 2.3.1.1.2 PARÂMETROS DO ESPECTRÔMETRO DE MASSAS

O espectrômetro de massas utilizado foi um orbitrap de bancada, operado na polaridade positiva e negativa, equipado com a fonte de ionização eletrospray (ESI). O fluxo de gás nitrogênio e gás auxiliar foram fixados em 60 e 20 (unidades arbitrárias) respectivamente. A temperatura do capilar foi de 380° C ou -380° C, a voltagem do spray -2900 kV e a voltagem do capilar de 3.9 V ou -2.9 V, em modo positivo ou negativo, respectivamente. O instrumento foi operado em modo de varredura completa de  $m/z$  100-620 e 70-630 nos modos positivo e negativo, respectivamente. O poder de resolução utilizado foi de 70.000.

Foram utilizados os modos de análise *Full Scan* (varredura de todas as massas) e *All Ion Fragmentation* (AIF - fragmenta os íons por meio da passagem pela célula de colisão), utilizando para o último gás nitrogênio como gás de colisão e energia de colisão de 40.

### 2.3.2 VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA

A validação do método avaliou os parâmetros de desempenho descritos no Protocolo de Validação de Métodos de Análise Qualitativa de Triagem por Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massas, de outubro de 2014, do Laboratório Brasileiro de Controle de Dopagem.

Seguem abaixo os parâmetros de desempenho avaliados e os experimentos referentes a cada parâmetro.

#### 2.3.2.1 SELETIVIDADE

O ensaio relacionado à seletividade necessitou do preparo de dez amostras diferentes de suplementos proteicos derivados do soro do leite, isentas das

substâncias de interesse. Nesse ensaio não houve adição de padrão interno tampouco fortificação com os analitos.

#### 2.3.2.2 LIMITE DE DETECÇÃO (LD)

Foram analisadas dez amostras diferentes de suplementos proteicos derivados do soro do leite, fortificadas à 10% da quantidade normalmente utilizada para fortificar (100%) e dez amostras fortificadas à 50% da quantidade normalmente utilizada.

#### 2.3.2.3 REPETITIVIDADE

O ensaio de repetitividade processou sete replicatas de uma mesma amostra de suplemento proteico derivado do soro do leite (isentas das substâncias de interesse) onde foi seguido o procedimento de extração do método desenvolvido.

#### 2.3.2.4 RENDIMENTO DE EXTRAÇÃO

O estudo referente ao rendimento da extração comparou as amostras contidas no item repetitividade e comparou com sete replicatas de uma mesma amostra de suplemento proteico derivado do soro do leite, isentas das substâncias de interesse que foram fortificadas com os analitos após a extração dos mesmos.

### 2.3.2.5 ARRASTE

O teste referente ao arraste analisou uma amostra de suplemento proteico derivado do soro do leite, isenta das substâncias de interesse, porém a mesma foi fortificada com o dobro da concentração normalmente utilizada na fortificação (especificamente 100µL). Foi preparado um branco (água mais padrão interno) e o mesmo foi injetado antes e depois da respectiva amostra para que pudesse ser avaliado o arraste.

### 2.3.2.6 INTERFERÊNCIA DA MATRIZ

O efeito de matriz foi avaliado utilizando dez amostras diferentes de suplementos proteicos derivados do soro do leite, isentas das substâncias de interesse, com as quais foi realizado o procedimento de extração do método desenvolvido.

### 2.3.3 APLICAÇÃO DO MÉTODO

Posterior ao processo de validação do método analítico, ocorreu a etapa de aplicação. Nesta etapa foram realizadas as análises de onze marcas diferentes de suplementos proteicos derivados do soro do leite e a partir da análise ocorreu a interpretação dos resultados.



### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 PRÉ-TRATAMENTO DA AMOSTRA

Amostras de suplementos proteicos derivados do soro do leite contém em sua matriz uma elevada concentração de proteínas. Essas proteínas devem ser removidas antes da injeção no sistema cromatográfico pois sua presença pode ocasionar o entupimento da coluna analítica, devido a precipitação, reduzindo o tempo de vida útil da coluna, e/ou competição por cargas no processo de ionização por ESI, impossibilitando a detecção das substâncias de interesse (JARDIM, 2010; QUEIROZ *et al.*, 2001). Devido a esses fatores, torna-se imprescindível o pré-tratamento da amostra com procedimentos que eliminem as proteínas, sem que ocorra a perda dos analitos alvo.

Uma alternativa encontrada para reduzir a quantidade de proteínas contidas na matriz foi realizar a precipitação por centrifugação antes da etapa de extração das substâncias de interesse. Foram testados diferentes solventes para diluição das amostras como, acetonitrila, acetonitrila/água e água porém o solvente que apresentou melhor resultado foi a água. A utilização da água como solvente de diluição fez com que não houvesse perda dos analitos durante a etapa de extração. O teste utilizando acetonitrila e acetonitrila/água resultou na remoção antecipada dos analitos.

A etapa de extração foi realizada por meio da extração fase sólida (SPE), como citado anteriormente, esse método de extração é constituído basicamente por 4 etapas. Devido a complexidade da matriz, todas as etapas da SPE foram indispensáveis, fazendo com que houvesse uma melhor recuperação dos analitos ao final do procedimento.

A utilização dessas duas etapas básicas foram relevantes para a remoção de grande parte das proteínas e outros componentes da matriz, possibilitando uma extração mais eficiente, conseqüentemente permitindo uma análise mais adequada por CL-EMAR.

## 3.2 INSTRUMENTAL

As condições instrumentais para análise das substâncias monitoradas foram estabelecidas pelo controle de dopagem (GIRÓN *et al.*, 2012; MUSENGA & COWAN, 2013), o qual desenvolveu um método instrumental considerado apropriado e eficiente para o monitoramento dos compostos com propriedades farmacológicas em amostras de suplementos proteicos derivados do soro do leite.

Utilizou-se neste método um analisador de massas do tipo orbitrap, com o intuito de distinguir uma abrangente variedade de compostos com massas exatas próximas. O orbitrap realiza essa diferenciação por meio do cálculo da exatidão mássica (EQ. 3.1), em que utiliza a massa teórica (razão massa/carga calculada) e a massa experimental (razão massa/carga obtida no experimento), estabelecendo um limite de 5 ppm (partes por milhão) para diferenciação das fórmulas elementares dos analitos.

### EQ. 3.1

$$\text{ppm} = \frac{m_{\text{experimental}} - m_{\text{calculada}}}{m_{\text{experimental}}} 10^6$$

Onde, ppm refere-se ao resultado em partes por milhão,  $m_{\text{experimental}}$  é a massa obtida no experimento e  $m_{\text{calculada}}$  é a massa teórica.

## 3.3 VALIDAÇÃO DO MÉTODO

Após a etapa de desenvolvimento do método houve a necessidade de validá-lo, a fim de verificar se o mesmo estava adequado para a finalidade proposta. Tal método foi validado de acordo com as exigências do protocolo de validação qualitativa elaborado pelo Laboratório Brasileiro de Controle de Dopagem.

O método de extração foi validado para as classes de compostos descritos no documento da AMA: agentes anabólicos, beta-agonistas, hormônios e moduladores metabólicos, diuréticos e agentes mascaradores, estimulantes, narcóticos, canabinoides, glicocorticoides e betabloqueadores (WADA, 2015). A TAB. 3.1 apresenta algumas informações a respeito das classes de substâncias descritas acima.

**TAB. 3.1** Fórmula química, polaridade, tempo de retenção ( $t_R$ ) e razão massa/carga ( $m/z$ ) das substâncias monitoradas.

<b>Substância</b>	<b>Fórmula química</b>	<b>Polaridade</b>	<b><math>t_R</math></b>	<b><math>m/z</math></b>
<i>Agentes anabólicos</i>				
16beta-hidroxiprostanazol	$C_{20}H_{28}N_2O_2$	$[M + H]^+$	5,95	329,2229
Andarina	$C_{19}H_{18}F_3N_3O_6$	$[M - H]^-$	6,07	440,1075
Epioxandrolona	$C_{19}H_{30}O_3$	$[M + H]^+$	7,35	307,2268
Epioxandrolona*	$C_{17}H_{25}$	$[M + H]^+$	5,50	229,1951
Formebolona-M1	$C_{21}H_{28}O_4$	$[M + H]^+$	5,49	347,2217
Gestrinona	$C_{21}H_{24}O_2$	$[M + H]^+$	7,00	309,1849
Metildienolona	$C_{19}H_{26}O_2$	$[M + H]^+$	6,96	287,2006
Metildienolona*	$C_{11}H_{11}O$	$[M + H]^+$	6,96	159,0810
Metiltrienolona	$C_{19}H_{24}O_2$	$[M + H]^+$	6,90	285,1849
Metiltrienolona*	$C_{16}H_{19}O$	$[M + H]^+$	6,90	227,1430
Ostarina	$C_{19}H_{14}F_3N_3O_3$	$[M - H]^-$	6,46	388,0915
Oxandrolona	$C_{19}H_{30}O_3$	$[M + H]^+$	6,60	307,2268
Oxandrolona*	$C_{17}H_{25}$	$[M + H]^+$	6,60	229,1951
Tetrahydrogestrinona	$C_{21}H_{28}O_2$	$[M + H]^+$	7,87	313,2162
<i>Beta-agonistas</i>				
Bametano	$C_{12}H_{19}NO_2$	$[M + H]^+$	1,80	210,1489
Formoterol	$C_{19}H_{24}N_2O_4$	$[M + H]^+$	3,29	345,1809
Isoxsuprine	$C_{18}H_{23}NO_3$	$[M + H]^+$	3,71	302,1751
Metaproterenol	$C_{11}H_{17}NO_3$	$[M + H]^+$	0,49	212,1281
Procaterol	$C_{16}H_{22}N_2O_3$	$[M + H]^+$	1,96	291,1703
Ritodrina	$C_{17}H_{21}NO_3$	$[M + H]^+$	2,02	288,1594

Salmeterol	C <sub>25</sub> H <sub>37</sub> NO <sub>4</sub>	[M + H] <sup>+</sup>	6,33	416,2795
<i>Hormônios e moduladores metabólicos</i>				
1,2,4,5-tetrahidrotestolactona	C <sub>19</sub> H <sub>28</sub> O <sub>3</sub>	[M + H] <sup>+</sup>	6,24	305,2111
1,2,4,5-tetrahidrotestolactona*	C <sub>12</sub> H <sub>17</sub> O	[M + H] <sup>+</sup>	6,24	177,1274
1,2,4,5-tetrahidrotestolactona*	C <sub>19</sub> H <sub>28</sub> O <sub>2</sub>	[M + H] <sup>+</sup>	6,24	287,2006
17beta-hidroxi exemestano	C <sub>20</sub> H <sub>26</sub> O <sub>2</sub>	[M + H] <sup>+</sup>	7,16	299,2006
3-hidroxi-4-metoxi-tamoxifeno	C <sub>27</sub> H <sub>31</sub> NO <sub>3</sub>	[M + H] <sup>+</sup>	6,98	418,2377
4-hidroxi-tamoxifeno	C <sub>26</sub> H <sub>29</sub> NO <sub>2</sub>	[M + H] <sup>+</sup>	6,61	388,2271
6alfa-hidroxiandrostenediona	C <sub>19</sub> H <sub>22</sub> O <sub>2</sub>	[M + H] <sup>+</sup>	5,14	303,1955
Aminoglutetimida*	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> N	[M + H] <sup>+</sup>	2,31	146,0964
Anastrozol	C <sub>17</sub> H <sub>19</sub> N <sub>5</sub>	[M + H] <sup>+</sup>	4,80	294,1713
Androstatrienediona	C <sub>19</sub> H <sub>24</sub> O <sub>2</sub>	[M + H] <sup>+</sup>	6,20	283,1693
Desetilclomifeno	C <sub>24</sub> H <sub>24</sub> ClNO	[M + H] <sup>+</sup>	7,10	378,1619
Exemestano	C <sub>20</sub> H <sub>24</sub> O <sub>2</sub>	[M + H] <sup>+</sup>	6,77	297,1849
Flutamida	C <sub>11</sub> H <sub>11</sub> F <sub>3</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	[M - H] <sup>-</sup>	6,39	275,0638
Fulvestrant	C <sub>32</sub> H <sub>47</sub> F <sub>5</sub> O <sub>3</sub> S	[M + H] <sup>+</sup>	8,79	607,3239
Fulvestrant*	C <sub>23</sub> H <sub>32</sub> F <sub>5</sub> O <sub>2</sub> S	[M + H] <sup>+</sup>	8,79	467,2038
Fulvestrant*	C <sub>11</sub> H <sub>11</sub> O	[M + H] <sup>+</sup>	8,79	159,0804
Gw501516	C <sub>21</sub> H <sub>18</sub> F <sub>3</sub> NO <sub>3</sub> S <sub>2</sub>	[M + H] <sup>+</sup>	8,70	454,0753
Gw501516*	C <sub>12</sub> H <sub>10</sub> F <sub>3</sub> NS	[M + H] <sup>+</sup>	8,70	257,0481
Raloxifeno	C <sub>28</sub> H <sub>27</sub> NO <sub>4</sub> S	[M + H] <sup>+</sup>	5,00	474,1734
<i>Diuréticos e agentes mascaradores</i>				
Acetazolamida	C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub> S <sub>2</sub>	[M - H] <sup>-</sup>	1,26	220,9809
Ácido etacrínico	C <sub>13</sub> H <sub>12</sub> Cl <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	[M - H] <sup>-</sup>	6,47	301,0040

Altiazida	$C_4H_6N_4O_3S_2$	$[M - H]^-$	3,99	381,9762
Amilorida	$C_6H_8ClN_7O$	$[M + H]^+$	1,72	230,0552
Bendroflumetiazida	$C_{15}H_{14}F_3N_3O_4S_2$	$[M - H]^-$	4,85	420,0305
Benzbromarone	$C_{17}H_{12}Br_2O_3$	$[M + H]^+$	8,48	422,9226
Benziazida	$C_{15}H_{14}ClN_3O_4S_3$	$[M - H]^-$	4,75	429,9762
Bumetanida	$C_{17}H_{20}N_2O_5S$	$[M - H]^-$	6,26	363,1020
Ciclopentiazida	$C_{13}H_{18}ClN_3O_4S_2$	$[M - H]^-$	5,30	378,0355
Ciclotiazida	$C_{14}H_{16}ClN_3O_4S_2$	$[M - H]^-$	4,88	388,0198
Cloпамida	$C_{14}H_{20}ClN_3O_3S$	$[M - H]^-$	4,10	344,0841
Clorotiazida	$C_7H_8ClN_3O_4S_2$	$[M - H]^-$	0,95	293,9416
Clortalidona	$C_{14}H_{11}ClN_2O_4S$	$[M - H]^-$	3,61	337,0055
Conivaptan	$C_{32}H_{26}N_4O_2$	$[M + H]^+$	5,84	499,2129
Diclorfenamida	$C_6H_6Cl_2N_2O_4S_2$	$[M - H]^-$	2,52	302,9073
Espironolactona	$C_{24}H_{32}O_4S$	$[M + H]^+$	6,80	341,2111
Hidroclorotiazida	$C_7H_8ClN_3O_4S_2$	$[M - H]^-$	1,18	295,9572
Hidroflumetiazida	$C_8H_8F_3N_3O_4S_2$	$[M - H]^-$	1,75	329,9836
Lixivaptan	$C_{27}H_{21}ClF_3N_3O_2$	$[M + H]^+$	7,52	474,1379
Metazolamida	$C_5H_8N_4O_3S_2$	$[M - H]^-$	2,12	234,9965
Meticotiazida	$C_9H_{11}Cl_2N_3O_4S_2$	$[M + H]^+$	3,37	359,9641
Piretanida	$C_{17}H_{18}N_2O_5S$	$[M - H]^-$	5,84	361,0864
Polítiazida	$C_{11}H_{13}ClF_3N_3O_4S_3$	$[M - H]^-$	4,81	437,9636
Probenecida	$C_{13}H_{19}NO_4S$	$[M - H]^-$	6,24	284,0962
Torasemida	$C_{16}H_{20}N_4O_3S$	$[M - H]^-$	4,77	347,1183
Triantereno	$C_{12}H_{11}N_7$	$[M + H]^+$	2,96	254,1149

Triclormetiazida	$C_8H_8Cl_3N_3O_4S_2$	$[M - H]^-$	3,06	377,8949
Xipamida	$C_{15}H_{15}ClN_2O_4S$	$[M - H]^-$	5,61	353,0368
<i>Estimulantes</i>				
(S)-2-aminooctano	$C_8H_{19}N$	$[M + H]^+$	3,90	130,1590
3,3-difenilpropilamina	$C_{15}H_{17}N$	$[M + H]^+$	4,68	212,1434
4-fluoroanfetamina	$C_9H_{12}FN$	$[M + H]^+$	2,00	154,1027
6-hidroxibromantano (OH)	$C_{16}H_{20}BrNO$	$[M + H]^+$	7,30	322,0801
Ácido ritalínico	$C_{13}H_{17}NO_2$	$[M + H]^+$	2,76	220,1332
Amifenazol	$C_9H_9N_3S$	$[M + H]^+$	1,59	192,0590
Benfluorex	$C_{19}H_{20}F_3NO_2$	$[M + H]^+$	5,80	352,1519
Benzfetamina	$C_{17}H_{21}N$	$[M + H]^+$	4,18	240,1747
Benzilpiperazina	$C_{11}H_{16}N_2$	$[M + H]^+$	0,90	177,1386
Benzoilecgonina tetrahidratada	$C_{16}H_{19}NO_4$	$[M + H]^+$	2,82	290,1387
Carfedon	$C_{12}H_{14}N_2O_2$	$[M + H]^+$	3,18	219,1128
Catina	$C_9H_{13}NO$	$[M + H]^+$	1,36	134,0964
Ciclazadona	$C_{12}H_{12}N_2O_2$	$[M + H]^+$	4,04	217,0972
Clobenzorex	$C_{16}H_{18}ClN$	$[M + H]^+$	4,93	260,1201
Clorfentermina	$C_{10}H_{14}ClN$	$[M + H]^+$	3,62	184,0888
Cocaína	$C_{17}H_{21}NO_4$	$[M + H]^+$	3,24	304,1543
Cropropamida	$C_{13}H_{24}N_2O_2$	$[M + H]^+$	5,10	241,1911
Crotetamida	$C_{12}H_{22}N_2O_2$	$[M + H]^+$	4,25	227,1754
Dobutamina	$C_{18}H_{23}NO_3$	$[M + H]^+$	2,73	302,1751
Ecgonina metilester	$C_{10}H_{17}NO_3$	$[M + H]^+$	0,21	200,1281
Estricnina	$C_{21}H_{22}N_2O_2$	$[M + H]^+$	2,53	335,1754

Etamivan	$C_{12}H_{17}NO_3$	$[M + H]^+$	4,16	224,1281
Etilefrina	$C_{10}H_{15}NO_2$	$[M + H]^+$	0,55	182,1176
Famprofazona	$C_{24}H_{31}N_3O$	$[M + H]^+$	6,40	378,2540
Fembutrazato	$C_{23}H_{29}NO_3$	$[M + H]^+$	6,30	368,2220
Femproporex	$C_{12}H_{16}N_2$	$[M + H]^+$	1,92	189,1386
Fencamina	$C_{20}H_{28}N_6O_2$	$[M + H]^+$	3,26	385,2347
Fendimetrazina	$C_{12}H_{17}NO$	$[M + H]^+$	1,88	192,1383
Fenetilina	$C_{18}H_{23}N_5O_2$	$[M + H]^+$	3,53	342,1925
Fenfluramina	$C_{12}H_{16}F_3N$	$[M + H]^+$	3,93	232,1308
Fenmetrazina	$C_{11}H_{16}ClNO$	$[M + H]^+$	1,92	178,1226
Flefedrona	$C_{10}H_{12}FNO$	$[M + H]^+$	4,33	182,0976
Foledrina	$C_{10}H_{15}NO$	$[M + H]^+$	0,89	166,1226
Furfenorex	$C_{15}H_{19}NO$	$[M + H]^+$	3,46	230,1539
Heptaminol	$C_8H_{19}NO$	$[M + H]^+$	1,30	146,1539
Heptaminol*	$C_8H_{15}$	$[M + H]^+$	1,30	111,1168
Heptaminol*	$C_8H_{18}N$	$[M + H]^+$	1,30	128,1434
Isometepteno	$C_{24}H_{48}N_2O_8$	$[M + H]^+$	3,02	142,1590
Isometepteno M1	$C_9H_{19}N$	$[M + H]^+$	1,39	160,1696
Mefedrona	$C_{11}H_{15}NO$	$[M + H]^+$	2,50	178,1226
Mefenorex	$C_{12}H_{18}ClN$	$[M + H]^+$	3,37	212,1201
Mesocarb	$C_{18}H_{18}N_4O_2$	$[M + H]^+$	6,20	323,1503
Metilefedrina	$C_{11}H_{17}NO$	$[M + H]^+$	1,61	180,1383
Metilenedioxianfetamina	$C_{10}H_{13}NO_2$	$[M + H]^+$	2,09	163,0754
Metilenedioximetanfetamina	$C_{11}H_{15}NO_2$	$[M + H]^+$	2,14	194,1176



Metilendioxi-n-etilanfetamina	$C_{12}H_{17}NO_2$	$[M + H]^+$	2,46	208,1332
Metilfenidato	$C_{14}H_{19}NO_2$	$[M + H]^+$	3,28	234,1489
Metoxifenamina	$C_{11}H_{17}NO$	$[M + H]^+$	2,77	180,1383
Mitraginina	$C_{23}H_{30}N_2O_4$	$[M + H]^+$	4,75	399,2278
Modafinil	$C_{15}H_{15}NO_2S$	$[M + H]^+$	4,85	296,0716
N-desmetilselegilina	$C_{12}H_{15}N$	$[M + H]^+$	2,54	174,1277
Niquetamida	$C_{10}H_{14}N_2O$	$[M + H]^+$	2,84	179,1179
Norfenfluramina	$C_{10}H_{12}F_3N$	$[M + H]^+$	3,60	204,0995
Octilamina	$C_8H_{19}N$	$[M + H]^+$	4,35	130,1590
Oxilofrina	$C_{10}H_{15}NO_2$	$[M + H]^+$	0,39	133,0648
Pemolina	$C_9H_8N_2O$	$[M + H]^+$	2,09	177,0659
Pentetrazol	$C_6H_{10}N_4$	$[M + H]^+$	2,03	139,0978
<i>p</i> -hidroxianfetamina	$C_9H_{13}NO$	$[M + H]^+$	0,85	135,0804
<i>p</i> -hidroximesocarb	$C_{18}H_{20}N_4O_3$	$[M + H]^+$	5,08	339,1452
Pipradol	$C_{18}H_{21}NO$	$[M + H]^+$	4,07	268,1696
Prenilamina	$C_{24}H_{27}N$	$[M + H]^+$	6,52	330,2216
Prolintano	$C_{15}H_{23}N$	$[M + H]^+$	3,82	218,1903
Propilexedrina	$C_{10}H_{21}N$	$[M + H]^+$	3,79	156,1747
s(+)-metanfetamina	$C_{10}H_{15}N$	$[M + H]^+$	2,05	150,1277
Selegilina	$C_{13}H_{17}N$	$[M + H]^+$	2,54	188,1434
Sibutramina	$C_{17}H_{26}ClN$	$[M + H]^+$	6,06	280,1827
Trimetazidina	$C_{14}H_{22}N_2O_3$	$[M + H]^+$	1,86	267,1703
<i>Narcóticos</i>				
6-acetilmorfina	$C_{19}H_{21}NO_4$	$[M + H]^+$	2,10	328,1543

Dextromoramida	$C_{25}H_{32}N_2O_2$	$[M + H]^+$	5,79	393,2537
Fentanil	$C_{22}H_{28}N_2O$	$[M + H]^+$	4,56	337,2274
Meperidina	$C_{15}H_{21}NO_2$	$[M + H]^+$	3,53	248,1645
Metadona (+/-)	$C_{21}H_{27}NO$	$[M + H]^+$	5,87	310,2165
Norfentanil	$C_{14}H_{20}N_2O$	$[M + H]^+$	2,95	233,1648
Normeperidina	$C_{14}H_{19}NO_2$	$[M + H]^+$	3,66	234,1489
Oxicodona	$C_{18}H_{21}NO_4$	$[M + H]^+$	1,85	316,1543
Pentazocina	$C_{19}H_{27}NO$	$[M + H]^+$	4,13	286,2165
Sulfetanil	$C_{22}H_{30}N_2O_2S$	$[M + H]^+$	5,33	387,2101
Tramadol	$C_{16}H_{25}NO_2$	$[M + H]^+$	3,21	264,1958
<i>Canabinoides</i>				
AM-2233	$C_{22}H_{23}IN_2O$	$[M + H]^+$	5,09	459,0928
JWH-073 ácido n-butanóico metabolito	$C_{23}H_{19}NO_3$	$[M + H]^+$	6,88	358,1438
JWH-081	$C_{25}H_{25}NO_2$	$[M + H]^+$	8,90	372,1958
JWH-098	$C_{26}H_{27}NO_2$	$[M + H]^+$	9,01	386,2115
JWH-147	$C_{27}H_{27}NO$	$[M + H]^+$	9,38	382,2165
JWH-200	$C_{25}H_{24}N_2O_2$	$[M + H]^+$	5,85	385,1911
JWH-203	$C_{21}H_{22}ClNO$	$[M + H]^+$	8,54	340,1463
JWH-251	$C_{22}H_{25}NO$	$[M + H]^+$	8,56	320,2009
JWH-30	$C_{20}H_{21}NO$	$[M + H]^+$	8,08	292,1696
JWH-307	$C_{26}H_{24}FNO$	$[M + H]^+$	9,01	386,1915
JWH-398	$C_{24}H_{22}ClNO$	$[M + H]^+$	9,29	376,1463
Rcs-4-metanona	$C_{21}H_{23}NO_2$	$[M + H]^+$	8,33	322,1802
Rcs-8	$C_{25}H_{29}NO_2$	$[M + H]^+$	9,14	376,2271

Win48.098	$C_{23}H_{26}N_2O_3$	[M + H] <sup>+</sup>	5,35	379,2016
Win55.212-2 mesilato	$C_{27}H_{26}N_2O_3$	[M + H] <sup>+</sup>	7,59	427,2016
<i>Glicocorticoides</i>				
20beta-dihidroxiprednisolona	$C_{21}H_{30}O_5$	[M + H] <sup>+</sup>	5,67	363,2166
6alfa-metilprednisolona	$C_{22}H_{30}O_5$	[M + H] <sup>+</sup>	6,20	375,2166
Ancinonida	$C_{28}H_{35}FO_7$	[M + H] <sup>+</sup>	7,91	503,2440
Beclometasona	$C_{22}H_{29}ClO_5$	[M + H] <sup>+</sup>	6,35	409,1776
Budesonida	$C_{25}H_{34}O_6$	[M + H] <sup>+</sup>	7,56	431,2428
Ciclesonida	$C_{32}H_{44}O_7$	[M + H] <sup>+</sup>	8,57	471,2741
Deflazacort	$C_{25}H_{31}NO_6$	[M + H] <sup>+</sup>	6,76	442,2224
Desacetil flazacort	$C_{23}H_{29}NO_5$	[M + H] <sup>+</sup>	5,96	400,2119
Desonida	$C_{24}H_{32}O_6$	[M + H] <sup>+</sup>	6,77	417,2272
Fludrocortisona	$C_{21}H_{29}FO_5$	[M + H] <sup>+</sup>	5,61	381,2072
Flumetasona	$C_{22}H_{28}F_2O_5$	[M + H] <sup>+</sup>	5,96	411,1978
Fluocinolona acetona	$C_{24}H_{30}F_2O_6$	[M + H] <sup>+</sup>	6,33	453,2083
Fluocortolona	$C_{22}H_{29}FO_4$	[M + H] <sup>+</sup>	6,50	377,2126
Fluocortolona	$C_{22}H_{29}FO_4$	[M + H] <sup>+</sup>	8,24	461,2698
Fluprednisolona	$C_{21}H_{27}FO_5$	[M + H] <sup>+</sup>	5,47	379,1915
Hidroxiprednisolona-16alfa	$C_{21}H_{28}O_6$	[M + H] <sup>+</sup>	5,04	377,1959
Mometasona furoato	$C_{27}H_{30}Cl_2O_6$	[M + H] <sup>+</sup>	7,68	521,1492
Prednisolona	$C_{21}H_{28}O_5$	[M + H] <sup>+</sup>	5,71	361,2010
Prednisona	$C_{21}H_{26}O_3$	[M + H] <sup>+</sup>	5,47	359,1853
Triancinolona	$C_{21}H_{27}FO_6$	[M + H] <sup>+</sup>	4,83	395,1864
<i>Betabloqueadores</i>				

(+)-des-o-isopropil bisoprolol	C <sub>15</sub> H <sub>25</sub> NO <sub>4</sub>	[M + H] <sup>+</sup>	2,39	284,1856
Acebutolol	C <sub>18</sub> H <sub>28</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	[M + H] <sup>+</sup>	3,29	337,2122
Alprenolol	C <sub>15</sub> H <sub>23</sub> NO <sub>2</sub>	[M + H] <sup>+</sup>	4,67	250,1802
Atenolol	C <sub>14</sub> H <sub>22</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	[M + H] <sup>+</sup>	1,55	267,1703
Betaxolol	C <sub>18</sub> H <sub>29</sub> NO <sub>3</sub>	[M + H] <sup>+</sup>	4,87	308,2220
Bisoprolol	C <sub>18</sub> H <sub>31</sub> NO <sub>4</sub>	[M + H] <sup>+</sup>	4,40	326,2326
Bunolol	C <sub>17</sub> H <sub>25</sub> NO <sub>3</sub>	[M + H] <sup>+</sup>	3,54	292,1907
Bupranolol	C <sub>14</sub> H <sub>22</sub> ClNO <sub>2</sub>	[M + H] <sup>+</sup>	4,95	272,1412
Carteolol	C <sub>16</sub> H <sub>24</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	[M + H] <sup>+</sup>	2,51	293,1860
Carvedilol	C <sub>24</sub> H <sub>26</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	[M + H] <sup>+</sup>	5,27	407,1965
Celiprolol	C <sub>20</sub> H <sub>33</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	[M + H] <sup>+</sup>	4,02	380,2544
Esmolol	C <sub>16</sub> H <sub>25</sub> NO <sub>4</sub>	[M + H] <sup>+</sup>	3,70	296,1856
Labetalol	C <sub>19</sub> H <sub>24</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	[M + H] <sup>+</sup>	4,20	329,1860
Maleato de timolol	C <sub>13</sub> H <sub>24</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub> S	[M + H] <sup>+</sup>	3,28	317,1642
Metipranolol	C <sub>17</sub> H <sub>27</sub> NO <sub>4</sub>	[M + H] <sup>+</sup>	4,58	310,2013
Metoprolol	C <sub>15</sub> H <sub>25</sub> NO <sub>3</sub>	[M + H] <sup>+</sup>	3,34	268,1907
Nadolol	C <sub>17</sub> H <sub>27</sub> NO <sub>4</sub>	[M + H] <sup>+</sup>	2,66	310,2013
Oxiprenolol	C <sub>15</sub> H <sub>23</sub> NO <sub>3</sub>	[M + H] <sup>+</sup>	3,95	266,1751
Pindolol	C <sub>14</sub> H <sub>20</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	[M + H] <sup>+</sup>	2,14	249,1598
Propranolol	C <sub>16</sub> H <sub>21</sub> NO <sub>2</sub>	[M + H] <sup>+</sup>	4,53	260,1645
Sotalol	C <sub>12</sub> H <sub>20</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> S	[M + H] <sup>+</sup>	1,25	273,1267

\*Íons produto.

Os parâmetros de desempenho avaliados foram seletividade, limite de detecção (LD), repetitividade, rendimento de extração, arraste e interferência da matriz. A TAB. 3.2 exibe os resultados referentes aos parâmetros de desempenho repetitividade, rendimento de extração, limite de detecção e interferência de matriz.

**TAB. 3.2** Substância, concentração e resultados referentes aos parâmetros de desempenho repetitividade, rendimento de extração, limite de detecção (LD), interferência de matriz e *Minimum Required Performance Level* (MRPL) dos analitos monitorados.

Substância	Concentração (ng/mL)	Repetitividade (%)	Rendimento de extração (%)	LD (ng/mL)	Interferência de matriz (%)	MRPL (ng/mL)
<i>Agentes anabólicos</i>						
16beta-hidroxioprostanazol	5	7,15	97,6	0,5	0,25	5
Andarina	5	14,34	99,0	0,5	0,30	5
Epioxandrolona	5	11,60	89,2	0,5	0,28	5
Epioxandrolona*	5	10,45	96,7	2,5	0,28	5
Formebolona-M1	5	14,35	33,1	2,5	0,14	5
Gestrinona	5	18,00	96,8	0,5	0,15	5
Metildienolona	5	10,06	95,8	0,5	0,11	5
Metildienolona*	5	10,47	98,5	0,5	0,15	5
Metiltrienolona	5	6,87	95,1	0,5	0,14	5
Metiltrienolona*	5	13,31	100,6	2,5	0,12	5
Ostarina	5	21,58	96,2	0,5	0,12	5
Oxandrolona	5	8,26	95,7	2,5	0,13	5
Oxandrolona*	5	9,03	97,9	2,5	0,12	5
Tetrahydrogestrinona	5	18,49	96,3	0,5	0,14	5
<i>Beta-agonistas</i>						
Bametano	20	1,94	91,6	2,0	1,17	20
Formoterol	40	5,38	92,0	4,0	1,12	20

Isoxsuprine	20	5,69	94,1	2,0	0,90	20
Metaproterenol	20	15,86	96,7	2,0	2,63	20
Procaterol	20	8,86	95,2	2,0	1,17	20
Ritodrina	20	5,53	97,8	2,0	1,24	20
Salmeterol	20	10,16	90,0	2,0	0,12	20
<i>Hormônios e moduladores metabólicos</i>						
1,2,4,5-tetrahidrotestolactona	20	8,16	91,7	2,0	0,13	20
1,2,4,5-tetrahidrotestolactona*	20	8,16	94,5	2,0	0,13	20
1,2,4,5-tetrahidrotestolactona*	20	8,84	96,8	2,0	0,13	20
17beta-hidroxi exemestano	20	14,43	97,8	2,0	0,17	20
3-hidroxi-4-metoxi-tamoxifeno	20	27,29	85,6	2,0	0,20	20
4-hidroxi-tamoxifeno	20	25,82	85,0	2,0	0,12	20
6alfa-hidroxiandrostenediona	10	9,38	93,6	2,0	0,32	20
Aminoglutetimida*	20	10,80	76,6	2,0	0,94	20
Anastrozol	20	7,44	92,8	2,0	0,14	20
Androstatrienediona	20	9,49	95,7	2,0	0,13	20
Desetilclomifeno	20	27,71	83,3	2,0	0,95	20
Exemestano	20	13,45	98,5	2,0	0,12	20
Flutamida	20	13,42	97,4	2,0	0,29	20
Fulvestrant	20	32,86	75,4	2,0	0,08	20
Fulvestrant*	20	32,18	77,2	10,0	0,10	20
Fulvestrant*	20	33,17	75,9	10,0	0,10	20
Gw501516	20	37,94	75,3	2,0	0,10	20

Gw501516*	20	36,37	80,1	2,0	0,20	20
Raloxifeno	20	17,68	89,6	2,0	0,43	20
<i>Diuréticos e agentes mascaradores</i>						
Acetazolamida	50	24,44	2,4	5,0	1,24	200
Ácido etacrínico	50	35,81	15,3	5,0	0,38	200
Altiazida	50	7,18	86,8	5,0	0,21	200
Amilorida	25	6,63	88,6	2,5	1,20	200
Bendroflumetiazida	50	10,21	92,7	5,0	0,26	200
Benzbromarone	50	25,83	77,4	25,0	0,14	200
Benztiiazida	25	10,73	94,9	2,5	0,11	200
Bumetanida	50	34,93	29,5	25,0	0,13	200
Ciclopentiazida	50	11,98	97,1	5,0	0,13	200
Ciclotiazida	50	11,34	95,4	5,0	0,25	200
Cloпамida	25	12,04	40,8	2,5	0,10	200
Clorotiazida	50	22,76	5,6	5,0	1,21	200
Clortalidona	50	13,94	9,8	25,0	0,34	200
Conivaptan	50	12,49	88,7	5,0	0,21	200
Diclorfenamida	50	16,94	6,8	5,0	0,51	200
Espironolactona	25	13,94	99,3	2,5	0,17	200
Hidroclorotiazida	100	26,58	5,3	10,0	0,00	200
Hidroflumetiazida	25	24,89	4,1	2,5	0,24	200
Lixivaptan	50	38,07	81,4	25,0	0,11	200
Metazolamida	50	31,49	4,4	5,0	0,24	200



Meticlozida	200	5,36	117,7	100,0	0,38	200
Piretanida	50	30,09	12,4	25,0	0,31	200
Polítiazida	25	8,62	95,9	2,5	0,14	200
Probenecida	25	23,93	27,1	2,5	0,13	200
Torasemida	25	8,25	89,4	2,5	0,23	200
Triantereno	25	5,24	94,2	2,5	1,49	200
Triclormetiazida	50	16,54	21,5	5,0	0,44	200
Xipamida	25	19,16	24,6	2,5	0,15	200
<i>Estimulantes</i>						
(S)-2-aminooctano	50	2,94	91,5	5,0	1,19	100
3,3-difenilpropilamina	50	3,53	90,1	5,0	0,69	100
4-fluoroanfetamina	50	4,50	89,1	5,0	1,10	100
6-hidroxibromantano (OH)	50	26,40	125,0	5,0	0,20	100
Ácido ritalínico	100	15,37	13,3	10,0	0,85	100
Amifenazol	50	14,42	101,8	25,0	1,37	100
Benfluorex	50	9,96	86,5	5,0	0,12	100
Benzfetamina	50	4,24	91,2	5,0	0,83	100
Benzilpiperazina	12,5	11,67	87,9	1,25	5,66	100
Benzoilecgonina tetrahidratada	100	17,36	10,0	10,0	0,46	100
Carfedon	50	12,71	36,1	5,0	0,13	100
Catina	100	5,69	88,3	10,0	1,70	100
Ciclazadona	50	7,37	87,3	5,0	0,25	100
Clobenzorex	25	4,55	92,1	2,5	0,57	100

Clorfentermina	50	3,76	91,3	5,0	1,45	100
Cocaína	50	4,45	96,2	5,0	1,26	100
Cropropamida	50	5,10	78,0	5,0	0,13	100
Crotetamida	50	15,34	70,6	5,0	2,00	100
Dobutamina	50	7,38	95,6	5,0	1,56	100
Ecgonina metilester	50	2,55	100,1	5,0	5,18	100
Estricnina	50	3,97	90,4	5,0	1,29	100
Etamivan	25	11,03	52,6	12,5	0,20	100
Etilefrina	50	7,64	96,6	5,0	3,12	100
Famprofazona	25	6,85	88,5	2,5	0,28	100
Fembutrazato	25	8,59	87,8	2,5	0,24	100
Femproporex	25	1,72	89,8	2,5	1,13	100
Fencamina	25	7,79	92,9	2,5	0,89	100
Fendimetrazina	50	2,68	91,3	5,0	3,65	100
Fenetilina	50	3,43	95,3	5,0	0,82	100
Fenfluramina	50	3,25	90,4	5,0	1,19	100
Fenmetrazina	50	3,20	91,4	5,0	1,73	100
Flefedrona	50	23,19	108,7	25,0	1,58	100
Foledrina	50	9,77	94,6	5,0	4,30	100
Furfenorex	50	4,24	88,8	5,0	1,17	100
Heptaminol	100	6,18	87,6	10,0	2,00	100
Heptaminol*	100	6,97	88,8	10,0	2,20	100
Heptaminol*	100	7,37	89,0	10,0	2,20	100

Isometepteno	50	2,95	90,4	5,0	1,55	100
Isometepteno M1	50	3,13	89,9	5,0	1,72	100
Mefedrona	50	3,24	92,9	5,0	1,46	100
Mefenorex	25	2,62	90,3	2,5	1,40	100
Mesocarb	50	14,89	93,0	5,0	0,13	100
Metilefedrina	50	3,68	94,4	5,0	1,30	100
Metilenedioxianfetamina	50	5,92	38,8	5,0	1,23	100
Metilenedioximetanfetamina	25	4,69	91,1	2,5	1,62	100
Metilenodioxi-n-etilanfetamina	50	2,87	92,9	5,0	1,47	100
Metilfenidato	50	3,62	92,7	5,0	1,12	100
Metoxifenamina	25	3,15	92,6	2,5	1,48	100
Mitraginina	50	6,59	91,7	5,0	0,41	100
Modafinil	50	4,87	92,9	5,0	0,14	100
N-desmetilselegilina	50	3,21	89,5	5,0	1,62	100
Niquetamida	25	15,14	8,3	2,5	0,00	100
Norfenfluramina	50	3,05	91,5	5,0	1,47	100
Octilamina	50	2,91	88,8	5,0	0,98	100
Oxilofrina	50	7,63	94,8	5,0	3,80	100
Pemolina	50	32,90	4,7	25,0	0,25	100
Pentetrazol	50	23,38	6,2	5,0	0,25	100
<i>p</i> -hidroxianfetamina	50	8,73	99,4	5,0	4,30	100
<i>p</i> -hidroximesocarb	50	8,13	96,3	5,0	0,21	100
Pipradol	50	3,06	93,5	5,0	1,08	100

Prenilamina	50	11,48	90,2	5,0	0,12	100
Prolintano	50	2,18	91,5	5,0	0,98	100
Propilexedrina	50	2,69	93,0	5,0	1,21	100
s(+)-metanfetamina	25	3,90	91,5	2,5	1,42	100
Selegilina	50	5,28	88,2	5,0	1,24	100
Sibutramina	50	7,17	86,4	5,0	0,13	100
Trimetazidina	50	7,17	82,2	5,0	1,20	100
<i>Narcóticos</i>						
6-acetilmorfina	50	6,41	93,7	5,0	1,32	50
Dextromoramida	50	6,29	89,9	5,0	0,12	50
Fentanil	2	7,75	91,9	0,2	0,64	2
Meperidina	50	3,07	94,8	5,0	1,06	50
Metadona (+/-)	25	7,92	89,3	2,5	0,23	50
Norfentanil	2	5,01	105,4	0,2	1,61	2
Normeperidina	50	2,84	94,5	5,0	1,01	50
Oxicodona	50	2,17	93,4	5,0	1,13	50
Pentazocina	50	5,74	92,6	5,0	0,84	50
Sulfetanil	2	7,43	89,3	0,2	0,25	2
Tramadol	2	3,64	96,5	5,0	1,37	50
<i>Canabinoides</i>						
AM-2233	1	12,02	85,8	0,1	0,37	1
JWH-073 ácido n-butanóico metabólito	1	28,64	93,5	0,1	0,16	1
JWH-081	1	32,72	46,5	0,1	0,09	1

JWH-098	1	31,81	48,0	0,1	0,09	1
JWH-147	1	32,01	20,9	0,5	0,08	1
JWH-200	1	11,44	85,1	0,1	0,19	1
JWH-203	1	17,31	77,3	0,1	0,10	1
JWH-251	1	26,67	79,2	0,1	0,10	1
JWH-30	1	19,09	77,9	0,1	0,10	1
JWH-307	1	33,12	39,2	0,1	0,05	1
JWH-398	1	31,84	24,8	0,5	0,05	1
Rcs-4-metanona	1	24,70	75,0	0,1	0,05	1
Rcs-8	1	29,68	58,2	0,1	0,05	1
Win48.098	1	8,48	86,4	0,5	0,14	1
Win 55.212-2 mesilato	1	21,18	85,5	0,1	0,10	1
<i>Glicocorticoides</i>						
20beta-dihidroxiprednisolona	30	12,70	72,3	3,0	0,12	30
6alfa-metilpredinisolona	30	10,74	90,9	3,0	0,32	30
Ancinonida	30	19,18	97,8	3,0	0,11	30
Beclometasona	30	7,87	94,3	3,0	0,12	30
Budesonida	30	12,70	95,1	3,0	0,11	30
Ciclesonida	30	23,16	96,1	3,0	0,05	30
Deflazacort	30	10,55	92,8	3,0	0,16	30
Desacetil flazacort	30	12,60	87,4	3,0	0,25	30
Desonida	30	7,34	93,5	3,0	0,16	30
Fludrocortisona	30	9,91	89,8	3,0	0,12	30

Flumetasona	30	10,68	90,6	3,0	0,25	30
Fluocinolona acetona	30	7,18	92,8	3,0	0,31	30
Fluocortolona	30	5,61	93,0	3,0	0,31	30
Fluocortolona	30	16,77	95,8	3,0	0,10	30
Fluprednisolona	30	9,69	87,0	3,0	0,15	30
Hidroxiprednisolona-16alfa	30	8,36	73,2	3,0	0,17	30
Mometasona furoato	30	30,52	89,7	3,0	0,10	30
Prednisolona	30	10,80	86,6	3,0	0,14	30
Prednisona	30	9,96	90,8	3,0	0,15	30
Triancinolona	30	11,69	62,2	3,0	0,26	30
<i>Betabloqueadores</i>						
(+)-des-o-isopropil bisoprolol	50	7,20	93,8	5,0	1,40	100
Acebutolol	50	6,29	91,8	5,0	0,86	100
Alprenolol	50	3,66	92,2	5,0	0,88	100
Atenolol	50	6,15	89,7	5,0	1,37	100
Betaxolol	50	4,90	91,8	5,0	0,46	100
Bisoprolol	50	4,58	91,7	5,0	0,86	100
Bunolol	50	4,73	93,9	5,0	1,04	100
Bupranolol	50	3,87	93,0	5,0	0,65	100
Carteolol	50	1,49	90,7	5,0	1,15	100
Carvedilol	50	10,29	87,9	5,0	0,16	100
Celiprolol	50	6,46	87,9	5,0	0,72	100
Esmolol	50	3,71	93,5	5,0	1,00	100

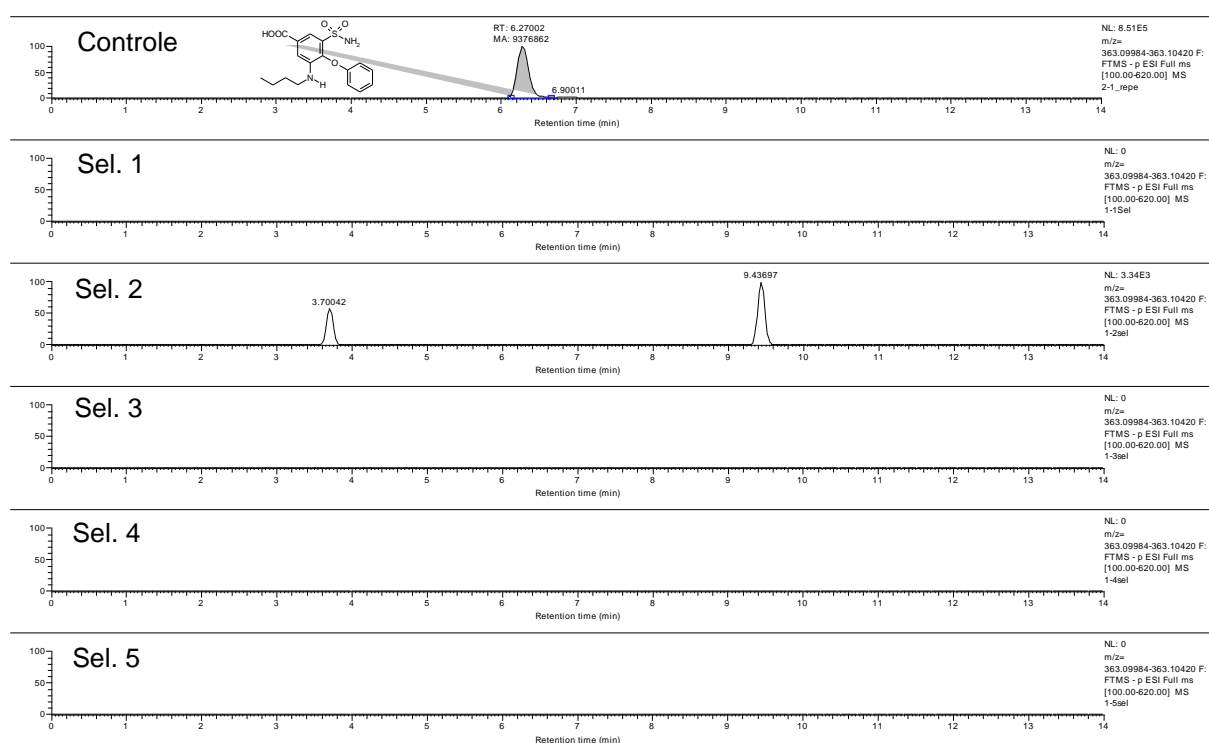
Labetalol	50	6,17	97,4	5,0	0,61	100
Maleato de timolol	50	3,76	93,8	5,0	1,19	100
Metipranolol	50	4,87	94,5	5,0	0,43	100
Metoprolol	50	2,62	91,9	5,0	1,11	100
Nadolol	50	5,80	91,5	5,0	1,35	100
Oxiprenolol	50	4,25	94,1	5,0	0,98	100
Pindolol	50	9,50	96,2	5,0	1,25	100
Propranolol	50	3,71	91,6	5,0	0,73	100
Sotalol	50	4,40	88,5	5,0	2,05	100

\*Íons produto.

### 3.3.1 SELETIVIDADE

A seletividade é caracterizada pela capacidade de um método detectar a presença de analitos em uma matriz sem que os interferentes presentes na mesma afetem essa detecção (INMETRO, 2011; RIBANI *et al.*, 2004).

Uma das maneiras de avaliar esse ensaio é por meio da comparação entre as amostras do mesmo e uma matriz fortificada com os analitos e padrões internos. Essa comparação verifica a ausência de interferentes nos tempos de retenção referentes às substâncias monitoradas (RIBANI *et al.*, 2004). A FIG. 3.1 exemplifica essa comparação onde o primeiro cromatograma se refere à uma amostra fortificada e os demais cromatogramas se referem à cinco amostras do ensaio seletividade.



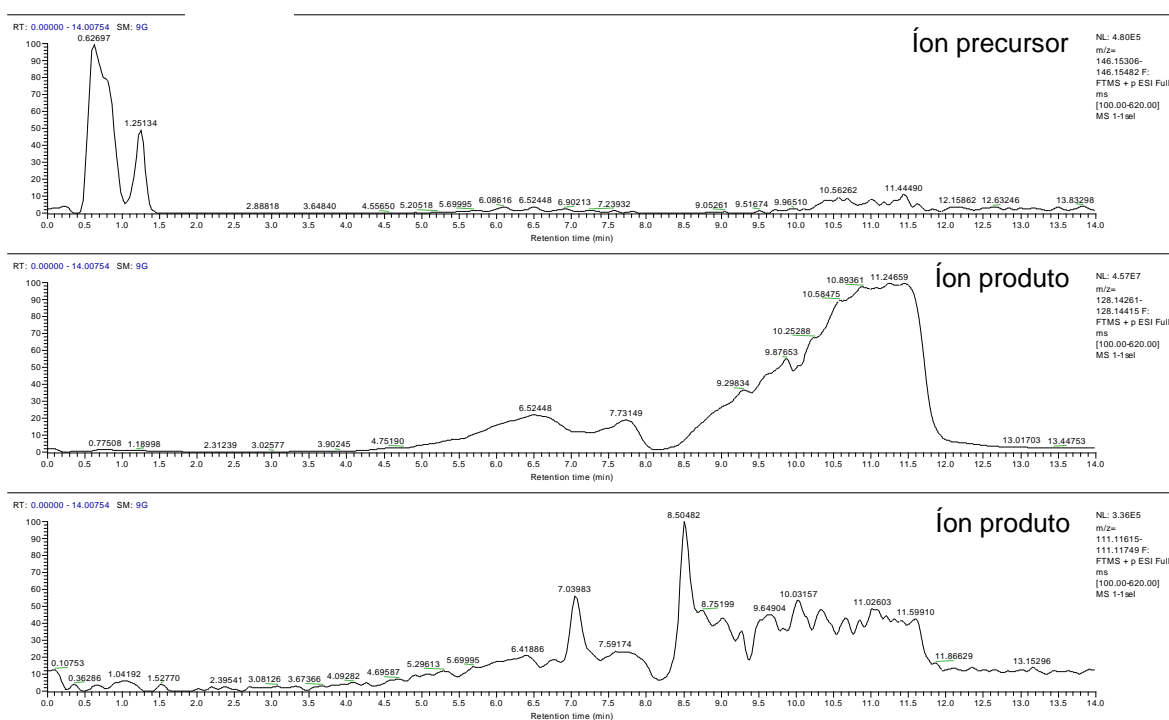
**FIG. 3.1** Avaliação da seletividade para a substância bumetanida, onde o primeiro cromatograma refere-se à uma amostra controle e os demais cromatogramas referem-se à cinco amostras diferentes do ensaio seletividade.

Esta comparação foi feita para todas as amostras e pode-se observar que os cromatogramas não apresentaram picos interferentes nos tempos de retenção

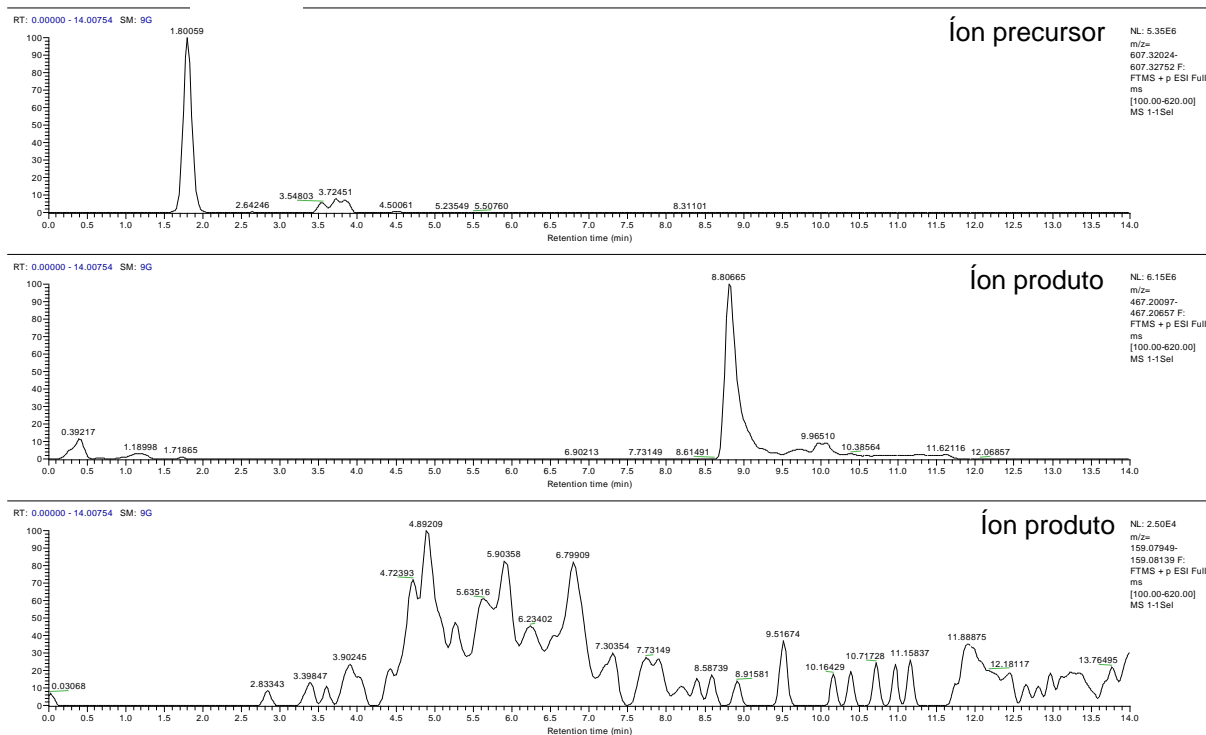


referente aos analitos e padrões internos que por consequência pudessem interferir na análise qualitativa.

Também foi observado no ensaio seletividade que os compostos fragmentados em íons produto apresentaram uma menor seletividade quando comparados aos seus íons precursores, os exemplos referem-se aos compostos heptaminol (FIG. 3.2) e fulvestrant (FIG. 3.3) nos quais foi observado que as razões  $m/z$  totais correspondentes a essas substâncias possuem uma seletividade maior do que suas fragmentações.



**FIG. 3.2** Cromatogramas referentes ao composto heptaminol, onde, o primeiro cromatograma se refere ao íon precursor do heptaminol e os demais se referem aos seus íons produto.



**FIG. 3.3** Cromatogramas referentes ao composto fulvestrant, onde, o primeiro cromatograma refere-se ao íon precursor desse analito e os demais cromatogramas referem-se aos íons produto do mesmo.

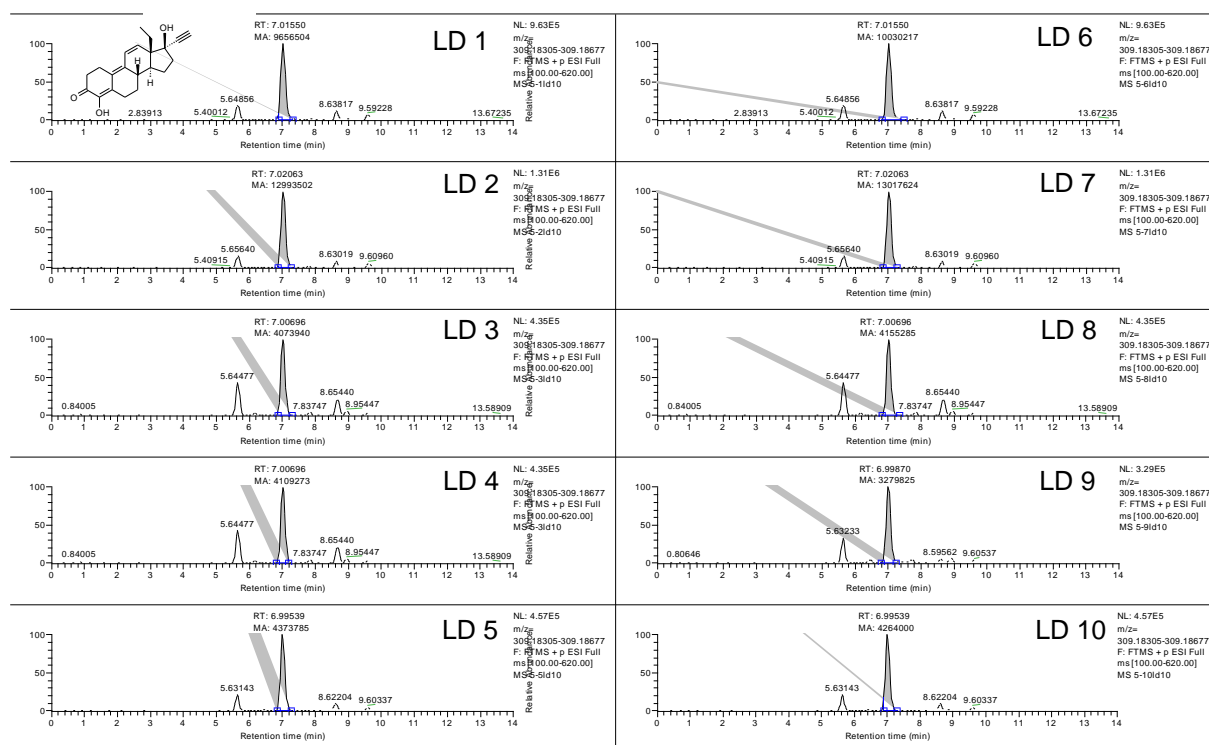
Pode-se notar que os cromatogramas referentes aos íons precursores do heptaminol (FIG. 3.2) e do fulvestrant (FIG. 3.3) possuem menos interferentes que os cromatogramas correspondentes às fragmentações desses compostos, isso está associado à probabilidade de encontrar interferentes com massa molecular menor (fragmentos) ser maior que encontrar interferentes com massas moleculares maiores ( $[M + H]^+$ ), ocasionando uma diminuição na seletividade dos íons produto. Também foi notada uma menor seletividade em outras substâncias que possuem íons produto, porém não tão notável quanto o heptaminol e fulvestrant.

### 3.3.2 LIMITE DE DETECÇÃO

O limite de detecção refere-se a mínima concentração do analito que pode ser percebida em uma amostra, respaldando os resultados em um ensaio qualitativo (INMETRO, 2011; LEITE, 2002).

Depois de realizado o procedimento experimental (item 2.3.2.2), injetou-se as amostras no CL-EMAR e analisou-se os picos dos cromatogramas referentes a cada analito. Foram verificadas em quais concentrações os analitos conseguiram ser detectados e, seus resultados foram confrontados com o MRPL (*minimum required performance level*) permitido para cada substância, a fim de averiguar se as mesmas cumpriram os critérios estabelecidos.

Conforme apresentado na TAB. 3.2 todas as substâncias apresentaram o limite de detecção inferior ao limite do MRPL, conseguindo ser observadas em sua grande maioria na fortificação à 10% da concentração usualmente utilizada. A FIG. 3.4 apresenta o exemplo da substância gestriona, que conseguiu ser detectada na concentração em 10%.



**FIG. 3.4** Cromatogramas de íons selecionados para o analito gestrinona, mostrando o aparecimento do pico em dez amostras diferentes na fortificação em 10%.

As baixas concentrações detectadas neste ensaio estão correlacionadas à alta sensibilidade do método utilizado. De modo geral as concentrações para o LD ficaram estabelecidas em 0,5 e 2,5 ng/mL para os agentes anabólicos, 2 e 4 ng/mL para os beta-agonistas, 2 e 10 ng/mL para os hormônios e moduladores metabólicos, 5 e 10 ng/mL para os diuréticos e agentes mascaradores, 1,25 e 12,5 ng/mL para os estimulantes, 0,2 e 5 ng/mL para os narcóticos, 0,1 e 0,5 ng/mL para os canabinoides, 3 ng/mL para os glicocorticoides e, 5 ng/mL para os beta-bloqueadores.

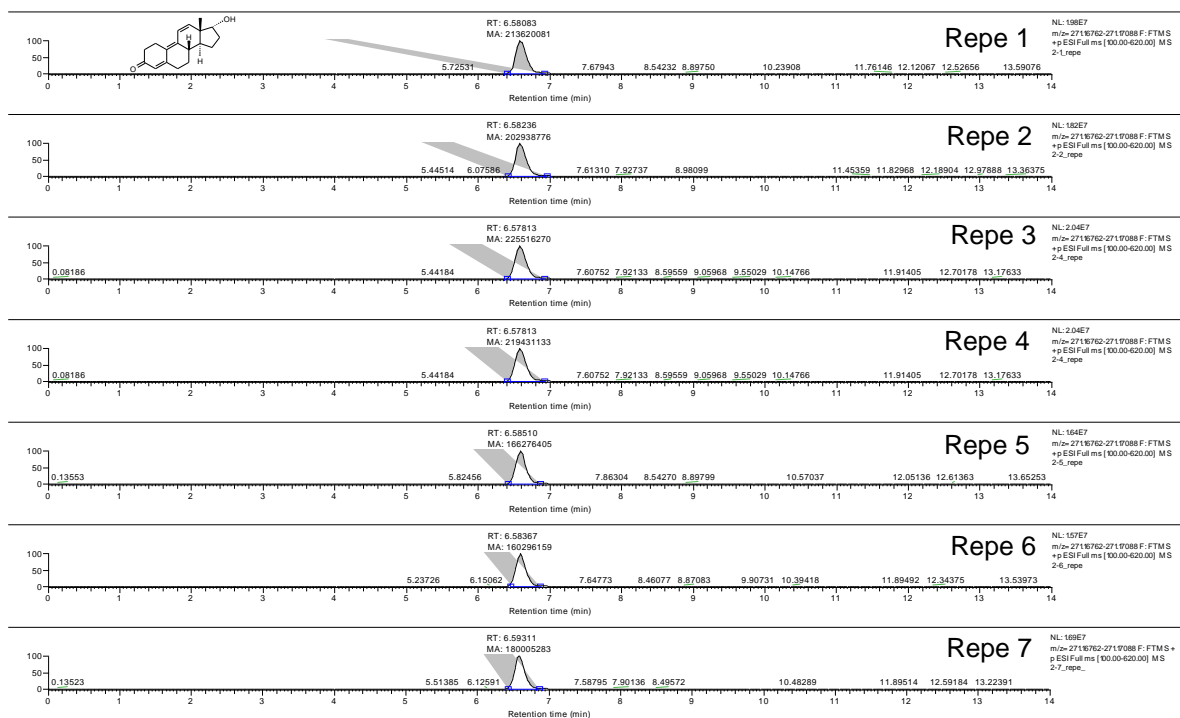
De acordo com o apresentado, pode-se afirmar que foram encontrados valores que determinaram o LD para todos os analitos, resultando em picos bem resolvidos mesmo em concentrações reduzidas, confirmando que o método em questão é adequado para análise das amostras objeto deste estudo.

### 3.3.3 REPETITIVIDADE

A repetitividade é definida como a avaliação do desvio entre as análises de uma mesma amostra, sendo ideal obter a menor dispersão possível. Esse estudo é feito utilizando um intervalo de tempo reduzido, o mesmo método, as mesmas condições de análise, o mesmo laboratório e o mesmo analista (INMETRO, 2011; RIBANI *et al.*, 2004).

A avaliação do desvio relacionado aos experimentos do ensaio repetitividade (item 2.3.2.3) foram verificadas utilizando os tempos de retenção e as áreas dos picos das replicatas de cada substância obtidos na análise cromatográfica.

A verificação no tempo de retenção dos analitos é importante para confirmar a identidade dos compostos. A FIG. 3.5 apresenta o exemplo desta avaliação para a substância epitrembolona.



**FIG. 3.5** Confirmação da identidade da substância epitrebolona utilizando como parâmetro de identificação o tempo de retenção.

A confirmação da identidade foi investigada para todos os compostos, onde foi confirmada a presença dos mesmos em seus respectivos tempos de retenção nas diferentes replicatas comparando com os padrões.

A verificação utilizando a área do pico é relevante para o cálculo da dispersão referente à cada analito. Essa variação foi determinada por meio do coeficiente variação (CV%) ou desvio padrão relativo (DPR ou RSD - *Relative Standard Deviation*) (EQ. 3.2).

### EQ. 3.2

$$RSD = \frac{S_{y1j}}{\bar{y}_1} \times 100$$

Onde, RSD é o desvio padrão relativo, S é o desvio padrão para um determinado nível de concentração y e  $\bar{y}$  é a média das replicatas.

Por meio do coeficiente de variação pode-se obter a variação entre as medições sucessivas para cada composto que o método foi validado. Os valores do RSD obtidos para cada substância e suas respectivas concentrações na amostra foram apresentados na TAB. 3.2.

Os valores de RSD obtidos foram comparados com o limite estabelecido pela equação de *Horwitz* (EQ. 3.3), que determina o coeficiente de variação máximo recomendado para cada nível de concentração dos compostos, a fim de verificar se os valores obtidos no ensaio estão de acordo com o preconizado.

### EQ. 3.3

$$RSD = 2 C^{-0.15}$$

Onde, RSD é o desvio padrão relativo e C é a concentração do analito.

A TAB. 3.3 apresenta os valores obtidos através da equação de *Horwitz* para cada concentração dos compostos.

**TAB. 3.3** Valores obtidos pela equação de *Horwitz* para os diferentes níveis de concentração dos analitos.

Concentração (ng/mL)	CV% máximo
1,0	44,77
2,0	40,35
5,0	35,17
12,5	30,65
20,0	28,58
25,0	27,63
30,0	26,88
40,0	25,75
50,0	24,90
100,0	22,44
200,0	20,22

Através da comparação entre os valores de CV% obtidos para cada analito e os valores de CV% aceitáveis para cada nível de concentração pode-se perceber que 92,57% dos compostos encontraram-se abaixo do limite máximo preconizado, apresentando mínima dispersão entre as medições sucessivas. E 7,43% das substâncias (6-hidroxibromantano (OH), ácido etacrínico, benzbromarone, bumetanida, fulvestrant, fulvestrant\*, fulvestrant\*, GW501516, GW501516\*, hidroclorotiazida, lixivaptan, metazolamida, mometasona furoato, piretanida e pemolina) apresentaram o coeficiente de variação acima do limite recomendado e pode-se observar que as mesmas estavam relacionadas às concentrações 20, 30, 50 e 100 ng/mL. Essa associação entre as concentrações citadas e o CV% acima do preconizado está relacionada ao fato de quanto maior a concentração de um composto, menor o CV% permitido para o mesmo, o que resulta em uma maior probabilidade desse composto encontrar-se acima do limite aceitável. Também foi observado que algumas das substâncias que tiveram seu CV% acima do recomendado apresentaram a mesma alteração para seus respectivos íons produto, tais variações podem estar relacionadas à uma maior dispersão entre as medições sucessivas correlacionadas a essas substâncias, fazendo com que o método seja menos repetitivo.

Por mais que 7,43% substâncias tenham apresentado alterações em seus coeficientes de variação, pode-se afirmar que os resultados referentes ao parâmetro repetitividade foram satisfatórios. As alterações observadas não afetam o método analítico validado.

### 3.3.4 RENDIMENTO DE EXTRAÇÃO

O rendimento de extração avalia o rendimento do método de extração. Essa avaliação verifica se as fortificações ocorridas em etapas diferentes podem influenciar no rendimento.

A comparação entre o procedimento de extração completo e o procedimento em que a fortificação ocorreu após a etapa de extração da matriz foi realizada pela EQ. 3.4, onde, RE é o rendimento de extração, M são os controles submetidos ao

processo normal de extração e S são os controles em que a adição dos padrões foi realizada após a extração da matriz. Por meio desse cálculo pode-se obter o percentual referente ao rendimento de extração de cada substância.

#### EQ. 3.4

$$RE\% = \frac{\sum_j RE_{ij}}{n_1}$$

Onde:

$$RE_{ij} = \frac{y_{M1j}}{\bar{y}_{S1}} \times 100 \quad \text{e} \quad \bar{y}_{S1} = \frac{\sum_j y_{S1j}}{n_1}$$

$n_1$  é o número de replicatas no nível de concentração avaliado,  $y_{M1j}$  é a resposta obtida para cada replicata da concentração avaliada, submetida ao processo normal de extração e  $y_{S1j}$  é a resposta obtida para cada replicata da concentração avaliada, com extração da matriz antes da adição dos padrões.

Os valores do rendimento de extração obtidos por meio dos cálculos acima constam na TAB. 3.2. Rendimentos de extração considerados ideais são os valores mais próximos de 100%, porém são aceitáveis valores acima de 50%. De acordo com a TAB. 3.2, pode-se observar que, houveram rendimentos de extração superiores à 100% bem como, rendimentos inferiores à 50%.

Os valores acima de 100% (3,46% - 6-hidroxi-bromantano (OH), amifenazol, ecgonina metilester, flefedrona, metiltrienolona\*, meticlotiazida e norfentanil) estão relacionados à uma extrapolação referente ao coeficiente de variação do ensaio de repetitividade, fazendo com que o rendimento seja superior ao limite quando o rendimento real está muito próximo de 100%, mas esses valores são considerados aceitáveis.

Já os valores inferiores à 50% (13,86% - acetazolamida, ácido etacrínico, ácido ritalínico, benzoilecgonina tetrahidratada, bumetanida, clopamida, clorotiazida,



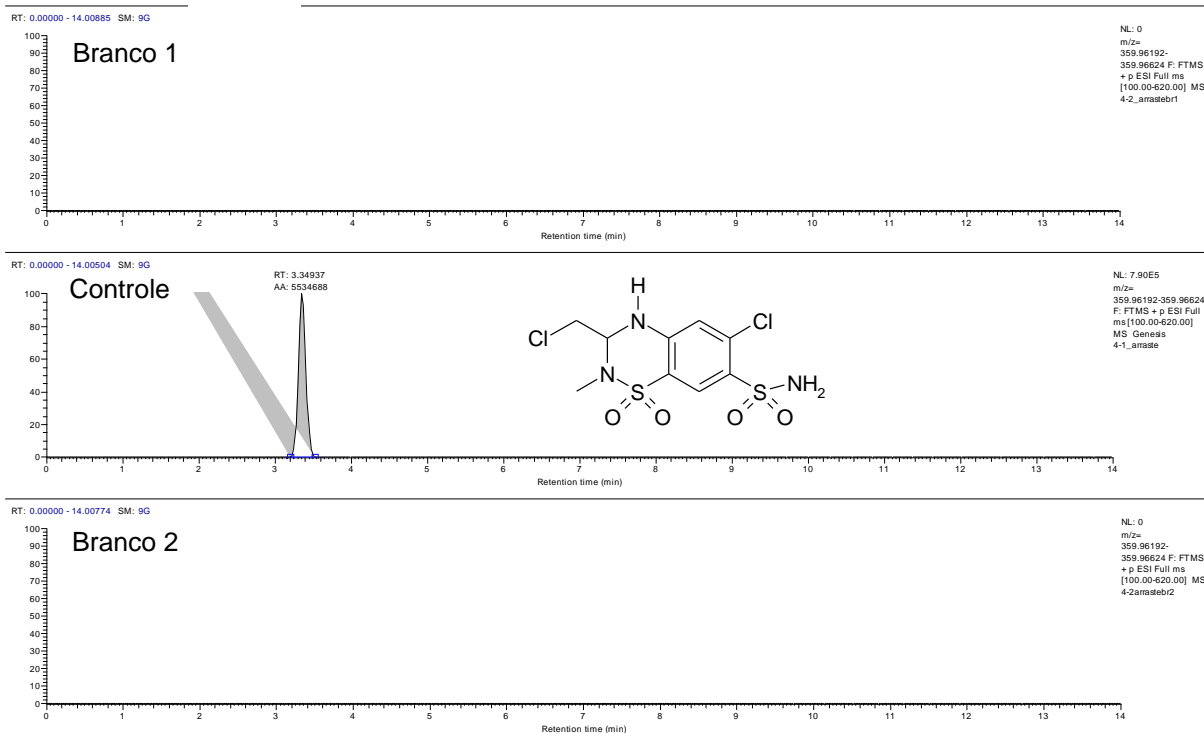
clortalidona, diclorfenamida, formebolona-M1, hidroclorotiazida, hidroflumetiazida, JWH-081, JWH-098, JWH-147, JWH-307, JWH-398, metazolamida, piretanida, probenecida, carfedon, metilenedioxianfetamina, niquetamida, pemolina, pentetrazol, triclorometiazida e xipamida) estão associados à um rendimento de extração insuficiente, porém quando um método é validado para um número elevado de substâncias torna-se inevitável que alguns rendimentos de extração encontrem-se abaixo do ideal. Entretanto, quando o limite de detecção se mostra adequado à proposta de aplicação do método, esses valores inferiores à 50% tornam-se aceitáveis.

De acordo com o observado na TAB. 3.2 quantidade considerável das substâncias apresentaram rendimento de extração entre 50% e 100%, mostrando que a fortificação em momentos diferentes não influenciou 82,67% dos compostos.

### 3.3.5 ARRASTE

O arraste é considerado um parâmetro importante, pois a presença do mesmo pode influenciar diretamente em uma análise. A relevância desse estudo está associada a um possível aumento na concentração do analito ou ao aparecimento de um pico referente ao analito em uma outra corrida cromatográfica, isso ocorre devido ao carreamento de uma ou mais substâncias para a amostra seguinte.

Os experimentos referentes ao arraste foram realizados conforme descrito no item 2.3.2.5 e a avaliação deste ensaio foi feita por meio da comparação entre as áreas do branco injetado antes com as áreas do branco injetado após a injeção da amostra, para que assim fosse verificada a existência de alterações significativas no segundo branco injetado. A FIG. 3.6 apresenta como resultado a avaliação do arraste para uma das substâncias.



**FIG. 3.6** Cromatogramas que caracterizam a avaliação do arraste, utilizando como exemplo a substância meticlotiazida.

De acordo com o cromatograma apresentado não foram observados picos referente à substância meticlotiazida no branco injetado posterior a injeção da amostra, não caracterizando arraste. Essa verificação foi feita para todas as substâncias, e não foram encontradas variações que caracterizassem arraste, comprovando que os resultados para este parâmetro foram considerados adequados.

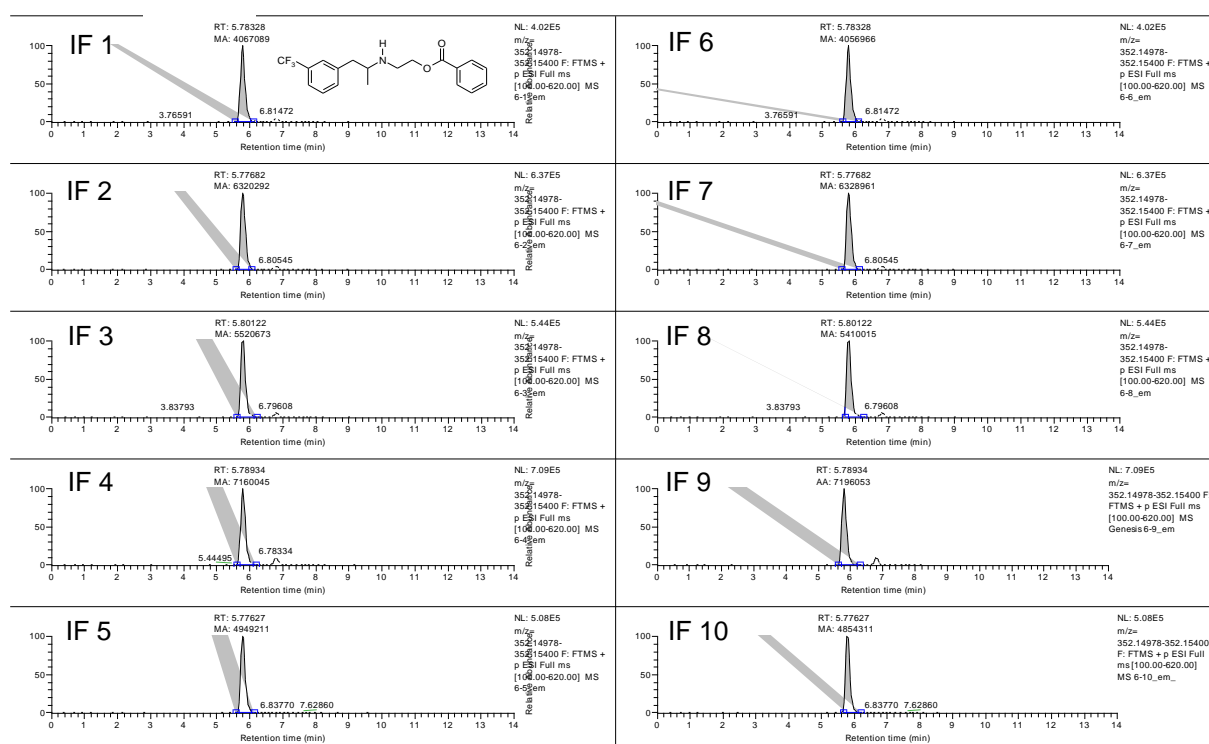
### 3.4 INTERFERÊNCIA DE MATRIZ

A interferência de matriz objetiva averiguar a presença de possíveis interferências nas amostras. Essas interferências são causadas pelos componentes da matriz e podem alterar significativamente a resposta instrumental.

O procedimento experimental foi realizado (item 2.3.2.6) e após a injeção das amostras foi feita a avaliação referente a este parâmetro. A avaliação pode ser

realizada verificando dois sistemas: o cromatográfico, observando desvios nos tempos de retenção das moléculas e o espectrômetro de massas observando a existência de possíveis supressões e/ou amplificações nos sinais durante o processo de ionização.

A avaliação por meio da cromatografia verificou a presença dos analitos alvo em seus respectivos tempos de retenção. Os picos cromatográficos devem ser observados em 90% das amostras para que esse ensaio seja considerado conforme. A FIG. 3.7 exemplifica como foi realizada essa avaliação.



**FIG. 3.7** Verificação da substância em seu respectivo tempo de retenção, utilizando como exemplo o estimulante benfluorex em amostras diferentes.

Foi observado na FIG. 3.7 o pico cromatográfico referente ao benfluorex em todas as amostras e em seu respectivo tempo de retenção. Assim como essa verificação foi feita para o benfluorex, também foi realizada para os demais compostos. E conforme o observado, os picos referentes aos analitos foram notados em todas as amostras em seus devidos tempos de retenção, fazendo com que a avaliação relacionada ao sistema cromatográfico fosse considerada conforme.

A avaliação relacionada a espectrometria de massas foi expressa por meio do cálculo do desvio padrão relativo (RSD) (EQ. 3.2) para os diferentes compostos. O valor recomendado para o RSD neste estudo é que o mesmo seja inferior à 2%.

Os valores do RSD% obtidos para cada analito constam na TAB. 3.2. Conforme apresentado na TAB. 3.2 pode-se observar que 5,45% dos compostos (benzilpiperazina, ecgonina metilester, etilefrina, fendimetrazina, foledrina, heptaminol\*, heptaminol\*, metaproterenol, oxilofrina, *p*-hidroxianfetamina e sotalol) apresentaram variação no desvio padrão relativo. Essa alteração no RSD indica que a matriz ou algum componente da mesma exerceu alguma interferência sobre esses compostos.

Variações significativas no RSD podem estar relacionadas à janela de monitoramento cromatográfico, que nesta análise variou  $\pm 0,5$  do tempo de retenção de cada substância. Utiliza-se uma pequena variação na janela de monitoramento para reduzir o número de interferentes na mesma. Foi observado que essa variação não foi suficiente para algumas substâncias, entretanto, parte considerável (94,55%) dos compostos mostrou desvios satisfatórios, comprovando a confiabilidade do método.

### 3.5 APLICAÇÃO DO MÉTODO

Após o processo de validação houve a etapa de aplicação do método, onde foram realizadas as análises das amostras comerciais de suplementos proteicos derivados do soro do leite a fim de averiguar a segurança das mesmas.

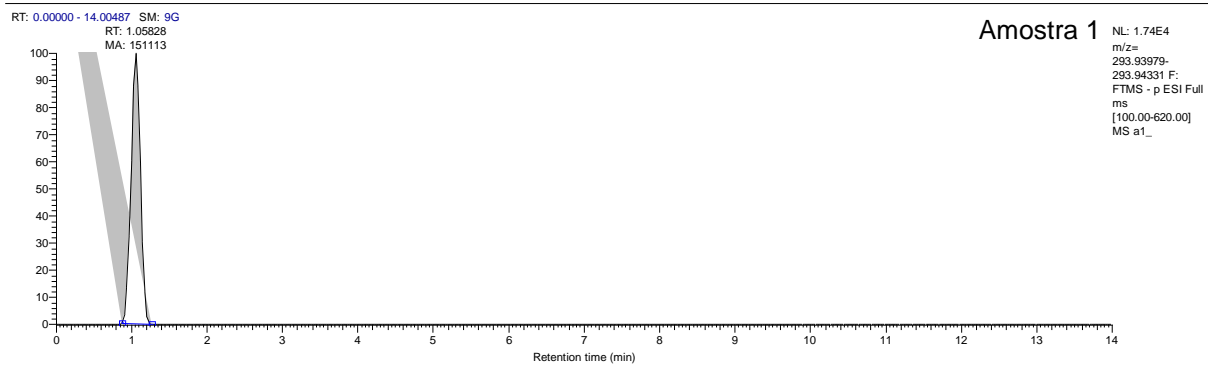
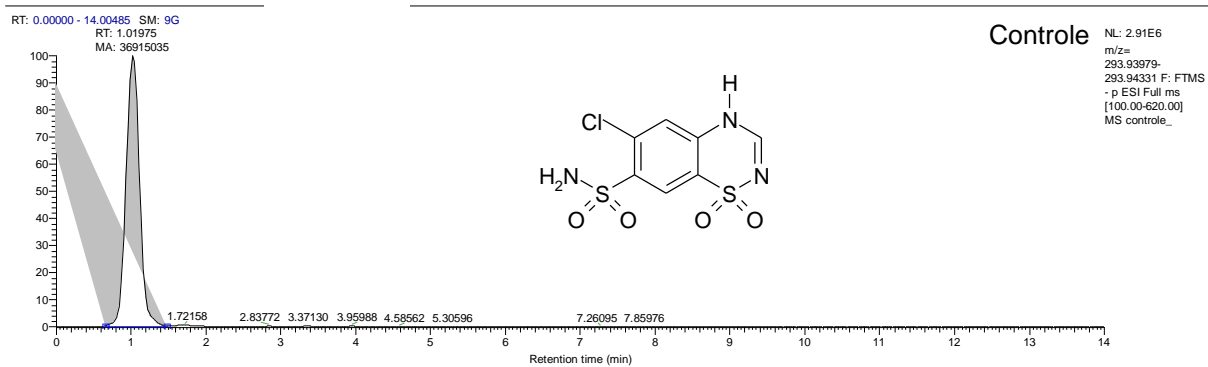
Como as marcas referentes as amostras não podem ser divulgadas, as mesmas foram identificadas de acordo com a TAB. 3.4.

**TAB. 3.4** Identificação das amostras comerciais de suplementos proteicos derivados do soro do leite.

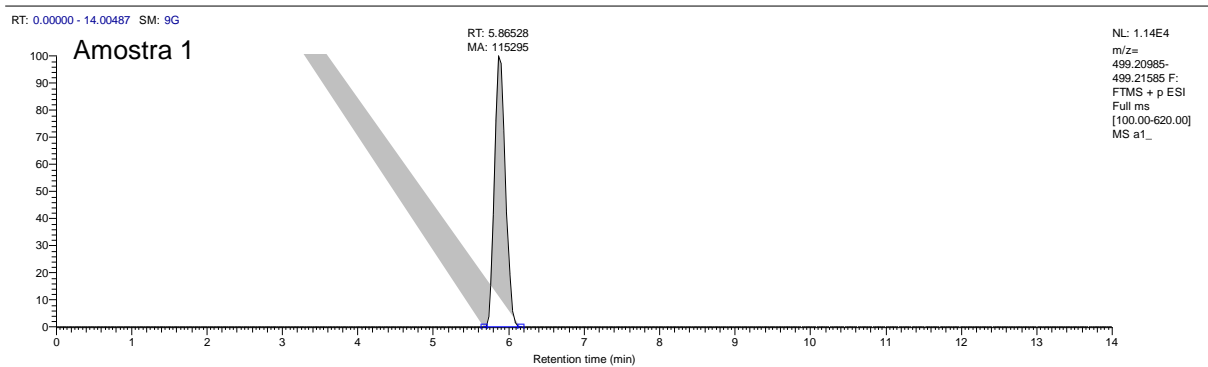
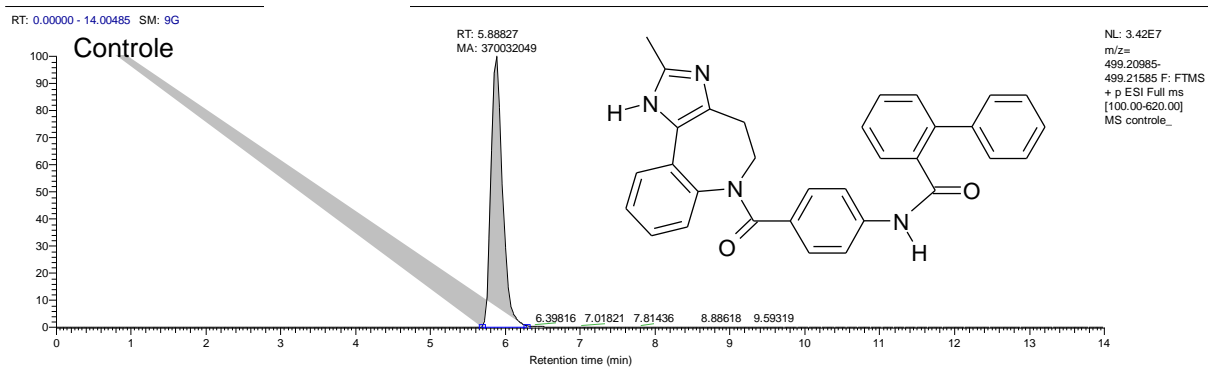
<b>Amostras</b>
Amostra 1
Amostra 2
Amostra 3
Amostra 4
Amostra 5
Amostra 6
Amostra 7
Amostra 8
Amostra 9
Amostra 10
Amostra 11

As análises seguiram o procedimento de extração desenvolvido (item 2.3.1 - com adição de padrões internos) e após a injeção das amostras, foi realizada a avaliação das amostras comparando-as com uma amostra controle (amostra com adição de analitos e padrões internos).

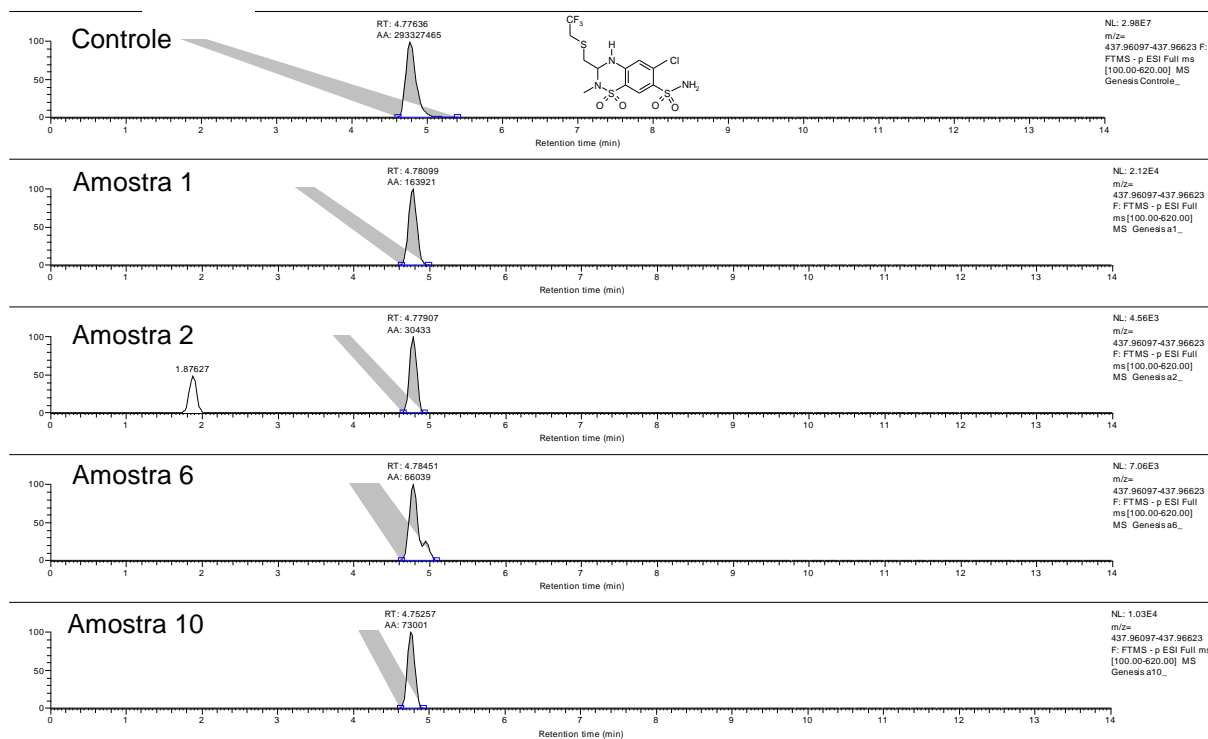
Essa comparação foi feita para todos os analitos e de acordo com a mesma foram encontrados alguns picos nas amostras relacionados aos analitos clorotiazida, conivaptan, politiazida e benfluorex. As figuras FIG. 3.8, FIG. 3.9, FIG. 3.10 e FIG. 3.11 mostram a comparação e o aparecimento dos picos referentes a essas substâncias nas amostras comerciais.



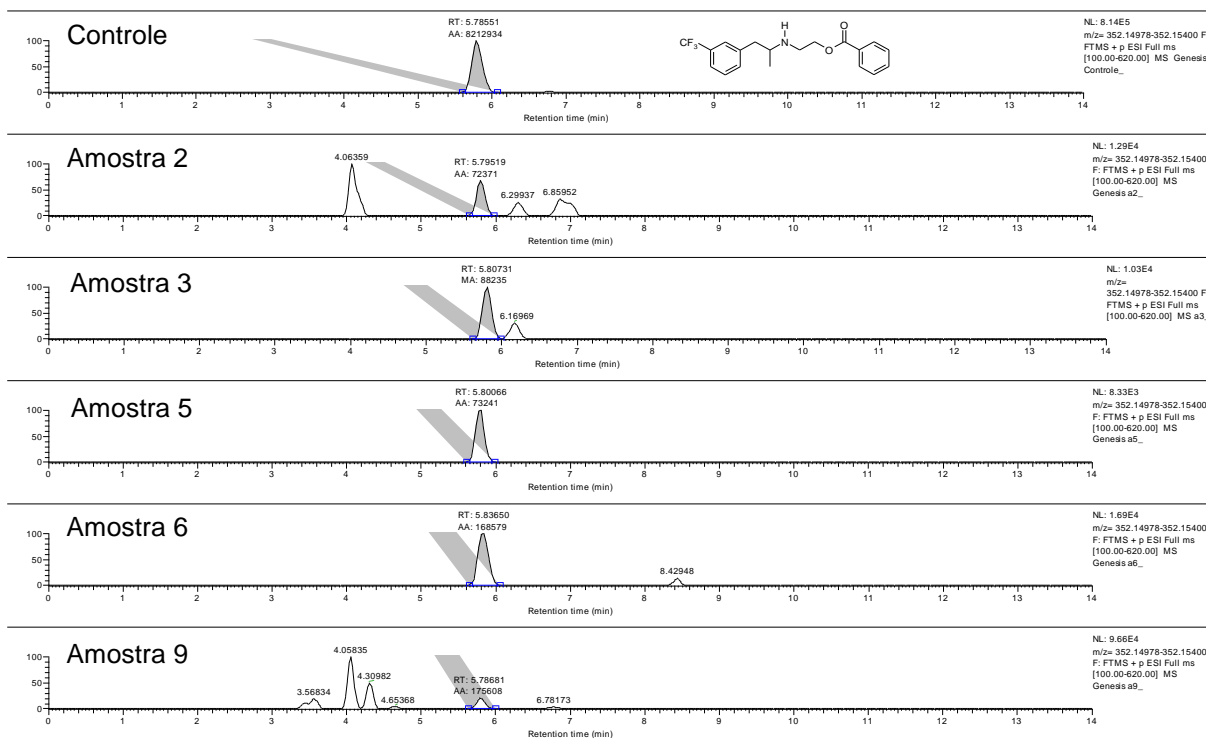
**FIG. 3.8** Comparação entre uma amostra controle e amostra 1 em que foi encontrado o pico referente ao analito clorotiazida.



**FIG. 3.9** Comparação entre uma amostra controle e amostra 1 em que foi encontrado o pico referente ao analito conivaptan.



**FIG. 3.10** Comparação entre uma amostra controle e amostra 1, 2, 6 e 10 em que foi encontrado o pico referente ao analito politiazida.



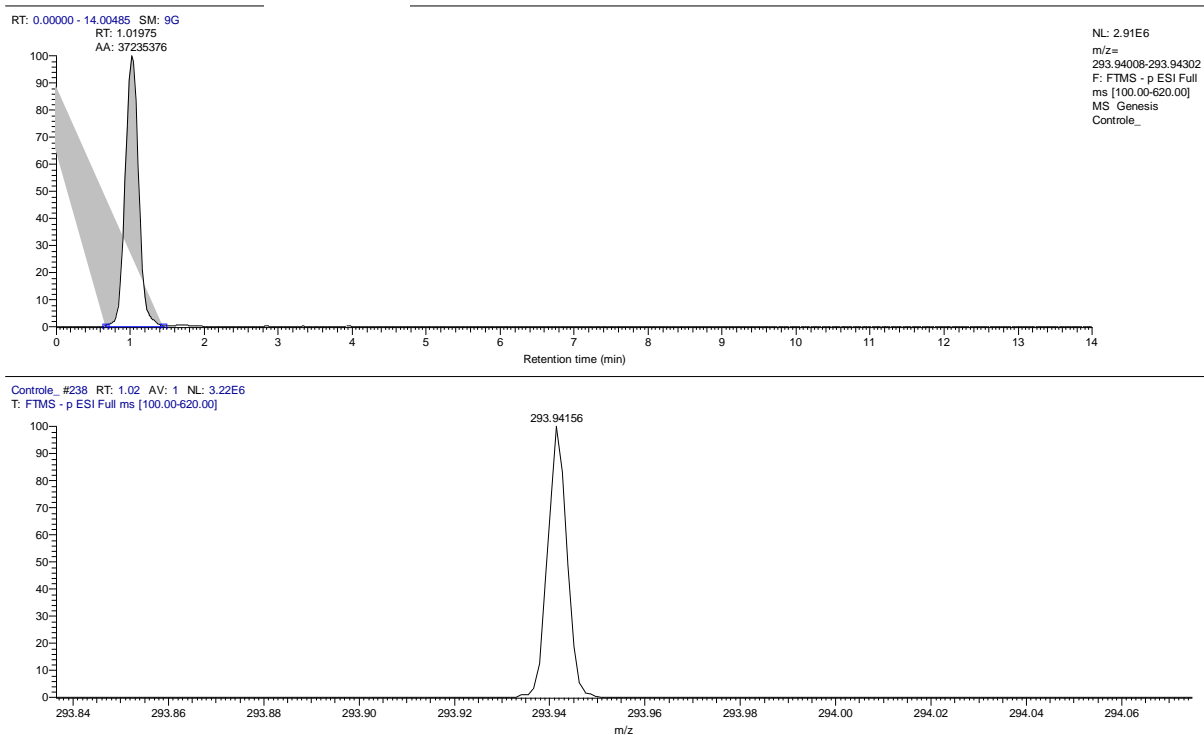
**FIG. 3.11** Comparação entre uma amostra controle e amostra 2, 3, 5, 6 e 9 em que foi encontrado o pico referente ao analito benfluorex.

A comparação entre os tempos de retenção do pico da amostra controle e o pico da amostra comercial não são suficientes para comprovar que os picos se referem exatamente à mesma substância, pois pode existir algum componente da matriz que esteja eluindo no mesmo tempo de retenção que o analito. Portanto, houve a necessidade de confirmar esses resultados utilizando o espectro de massas de alta resolução.

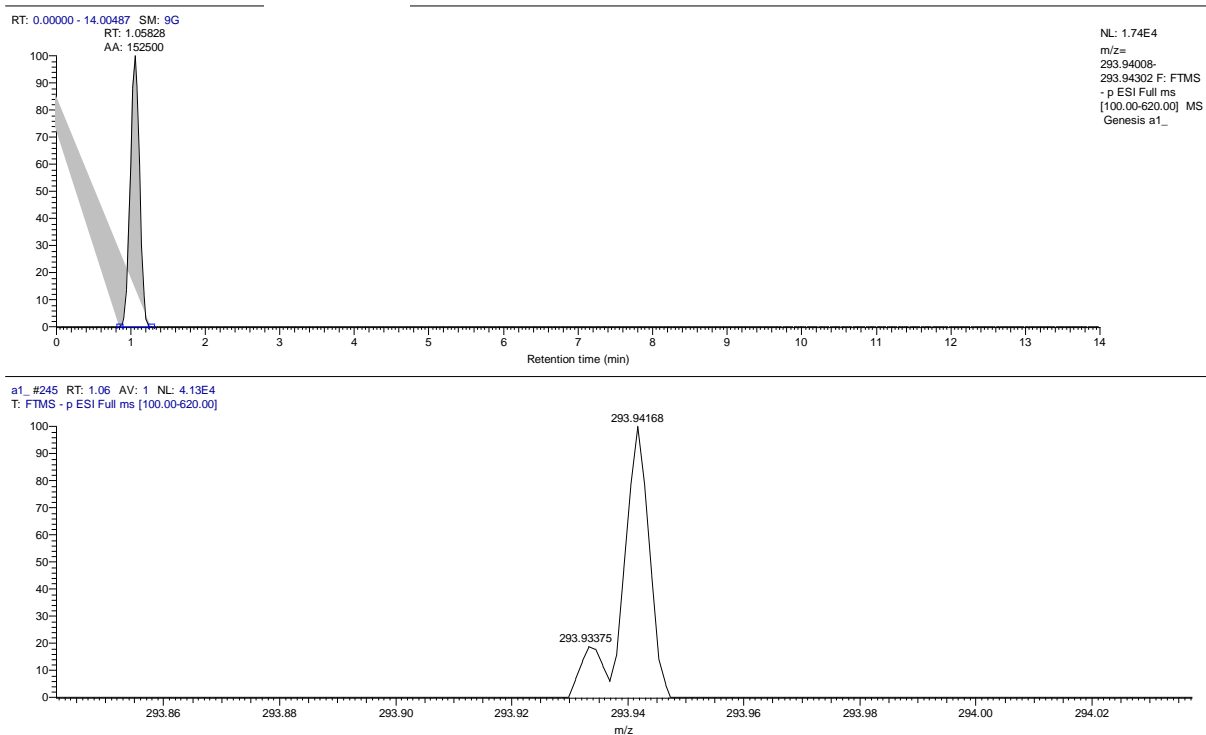
A análise utilizando a espectrometria de massas de alta resolução pode ser realizada primeiramente comparando os íons precursores referentes aos compostos clorotiazida, conivaptan, politiazida e benfluorex na amostra controle e nas amostras comerciais que apresentaram suspeita de adulteração. E posteriormente realizando o cálculo de exatidão mássica (EQ. 3.1).

As figuras em sequência apresentam a comparação entre a amostra controle e as amostras comerciais que apresentaram picos suspeitos em tempos de retenção iguais ou próximos para algumas substâncias contidas no controle.



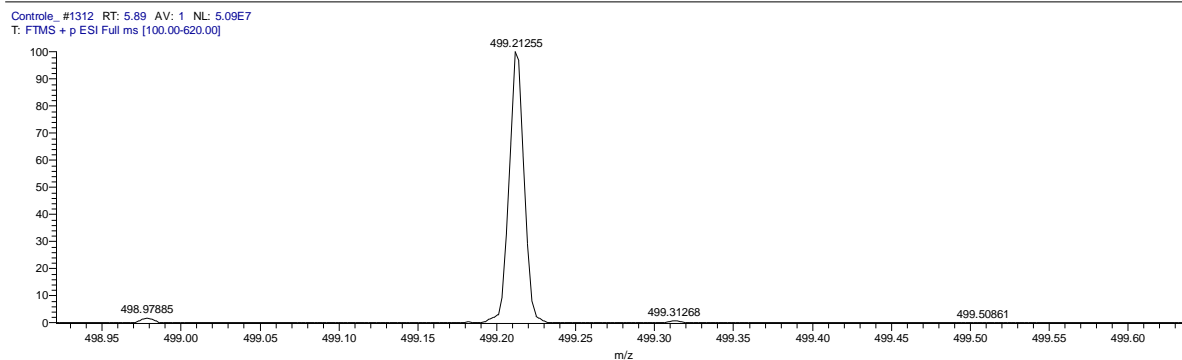
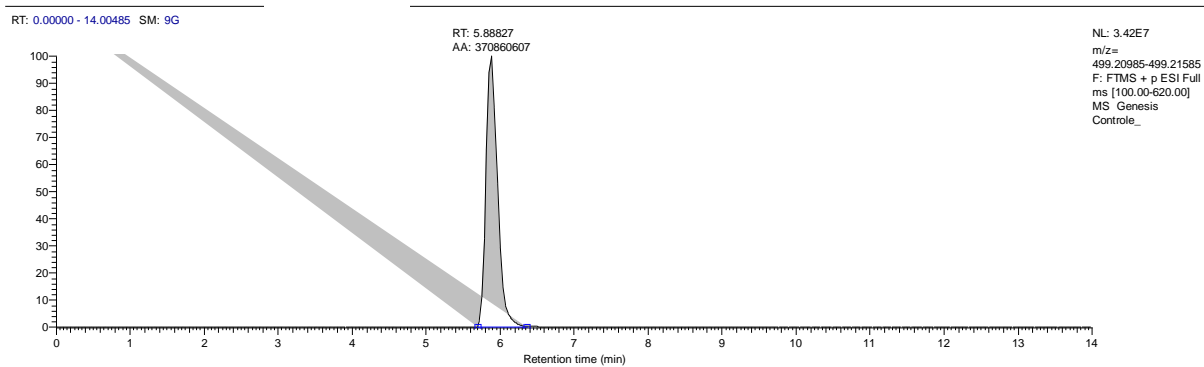


**FIG. 3.12** Cromatograma e o espectro de massas do íon precursor da amostra controle referente à substância clorotiazida apresentando  $t_R$  1,01975 e razão  $m/z$  293,94156.

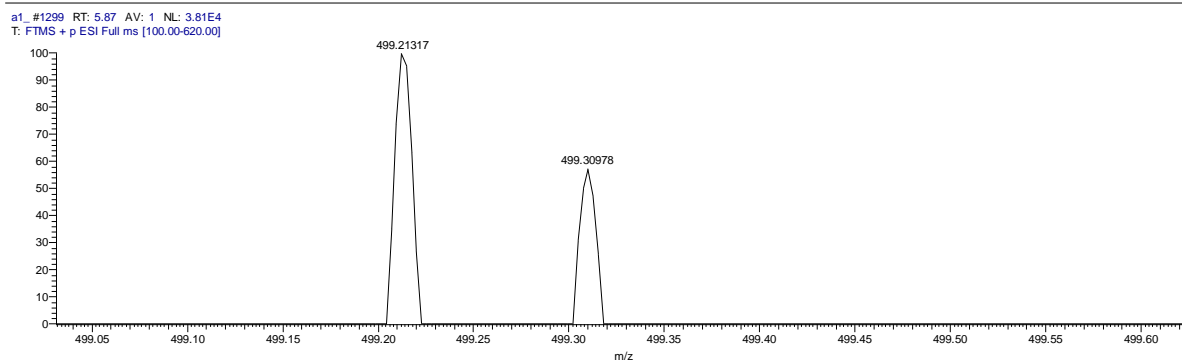
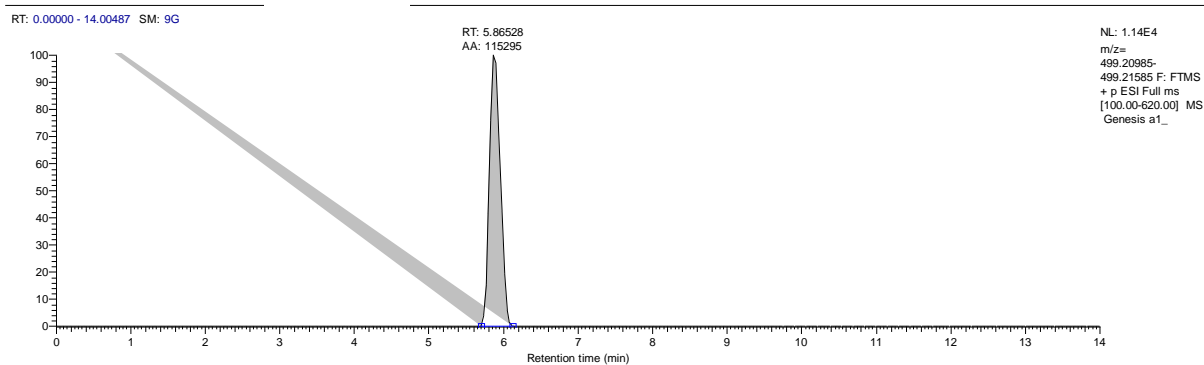


**FIG. 3.13** Cromatograma e o espectro de massas do íon precursor da amostra 1 referente à substância clorotiazida apresentando  $t_R$  1,05828 e razão  $m/z$  293,94168.

Pode-se observar na FIG. 3.12 e FIG. 3.13 que os íons precursores da amostra controle e da amostra 1 são parecidos, diferindo apenas pelas duas últimas casas decimais após a vírgula.

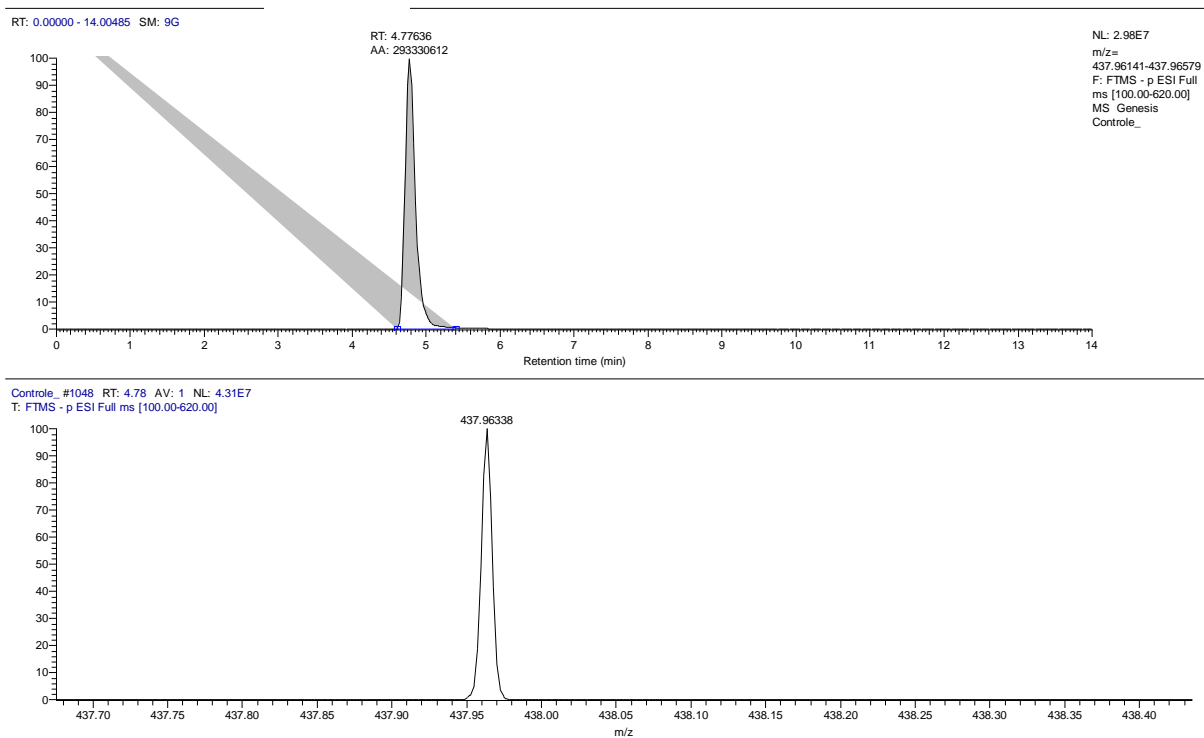


**FIG. 3.14** Cromatograma e o espectro de massas do íon precursor da amostra controle referente à substância conivaptan apresentando  $t_R$  5,88827 e razão  $m/z$  499,21255.

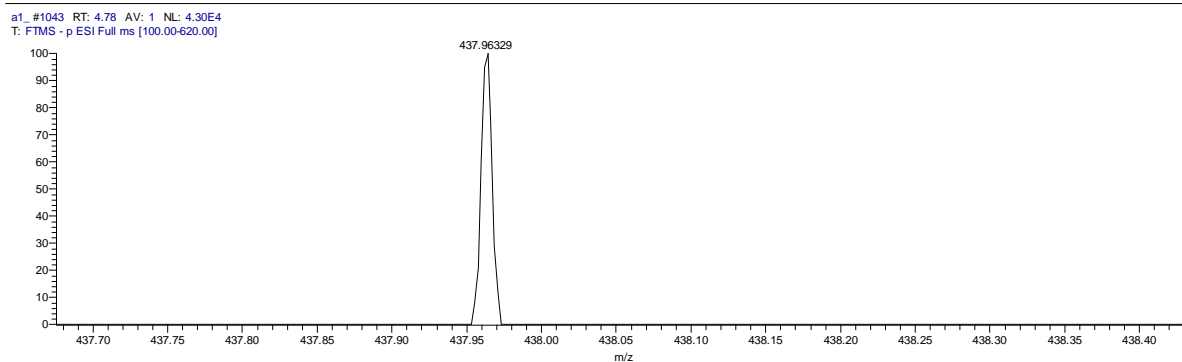
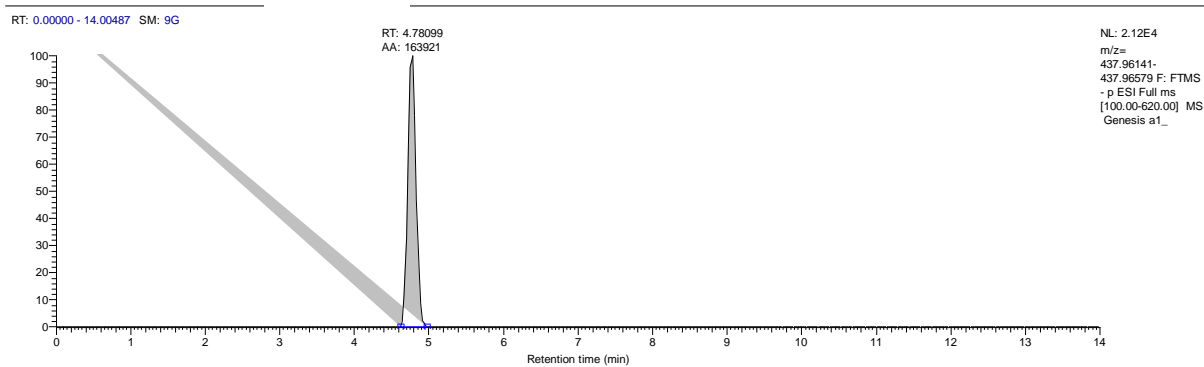


**FIG. 3.15** Cromatograma e o espectro de massas do íon precursor da amostra 1 referente à substância conivaptan apresentando  $t_R$  5,86528 e razão  $m/z$  499,21317.

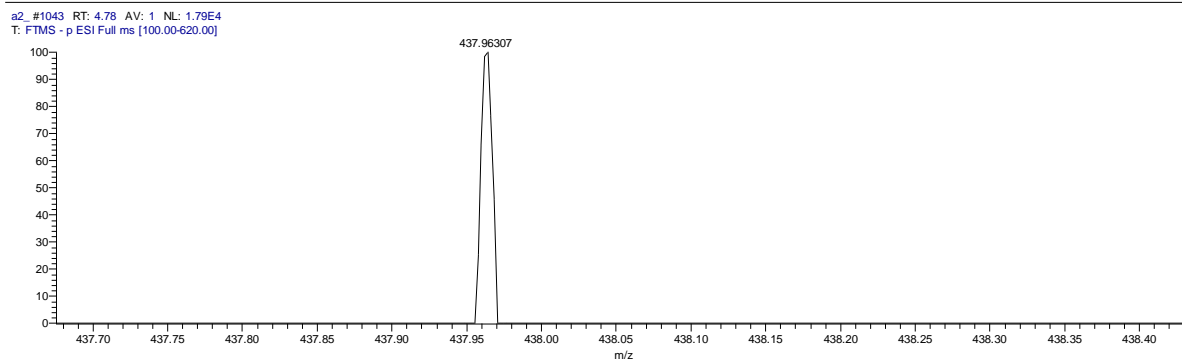
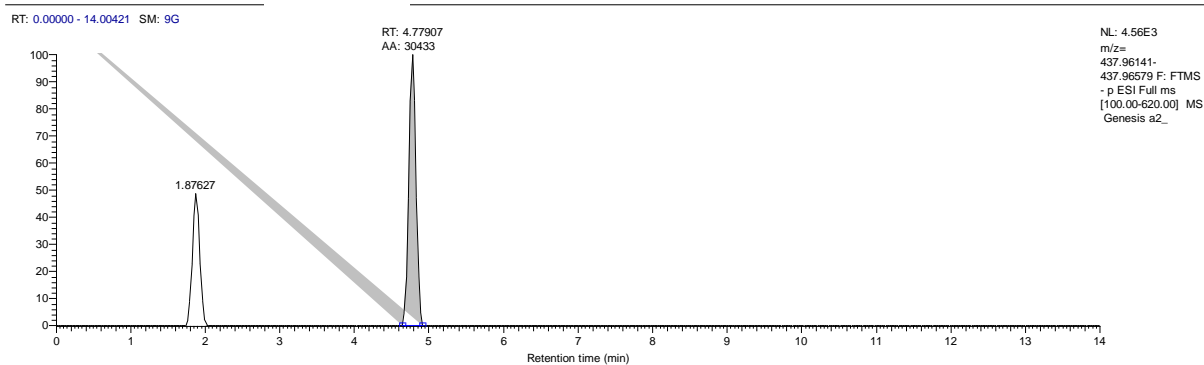
Conforme verificado na FIG. 3.14 e na FIG. 3.15 os íons precursores da amostra controle e da amostra 1 são próximos para a substância conivaptan, diferindo pelas três últimas casas decimais após a vírgula.



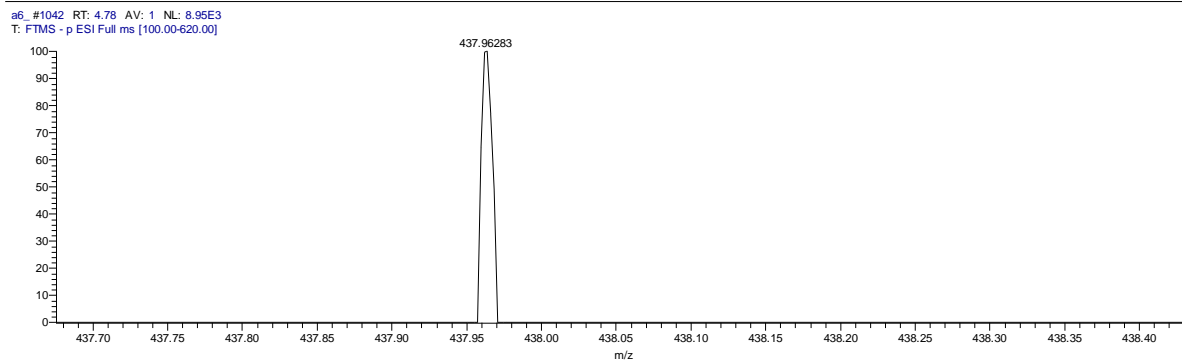
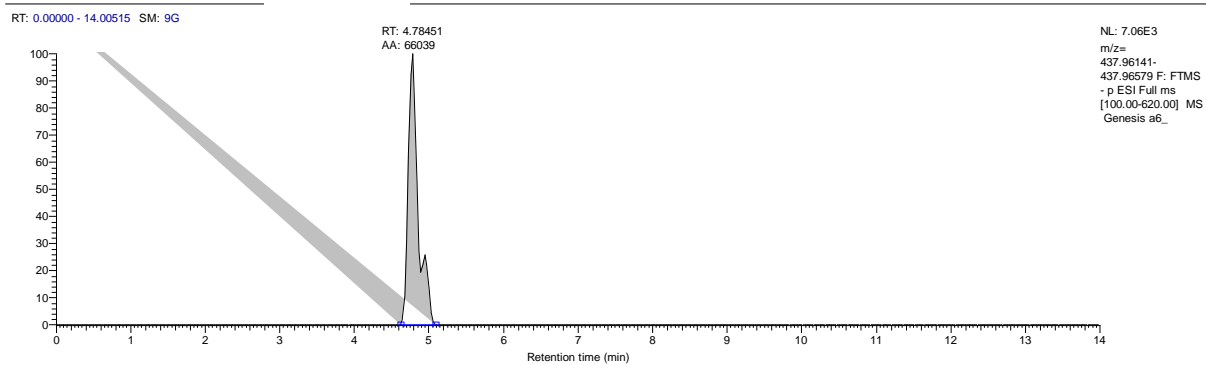
**FIG. 3.16** Cromatograma e o espectro de massas do íon precursor da amostra controle referente à substância politiazida apresentando  $t_R$  4,77636 e razão  $m/z$  437,96338.



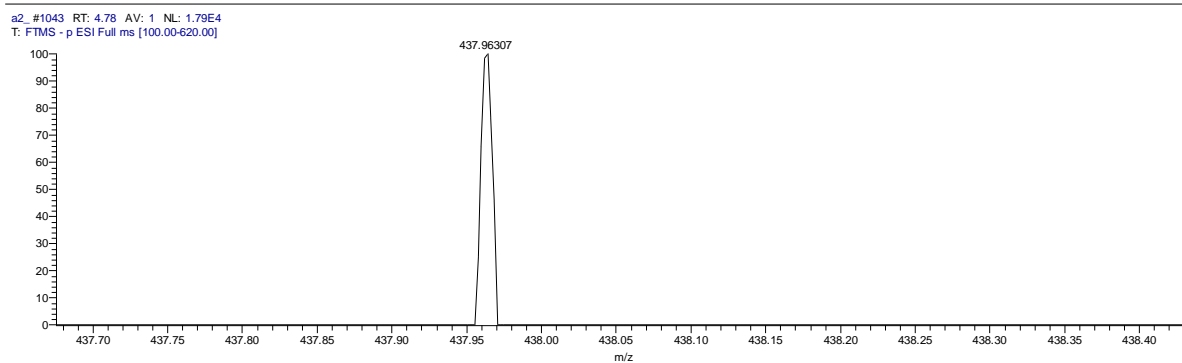
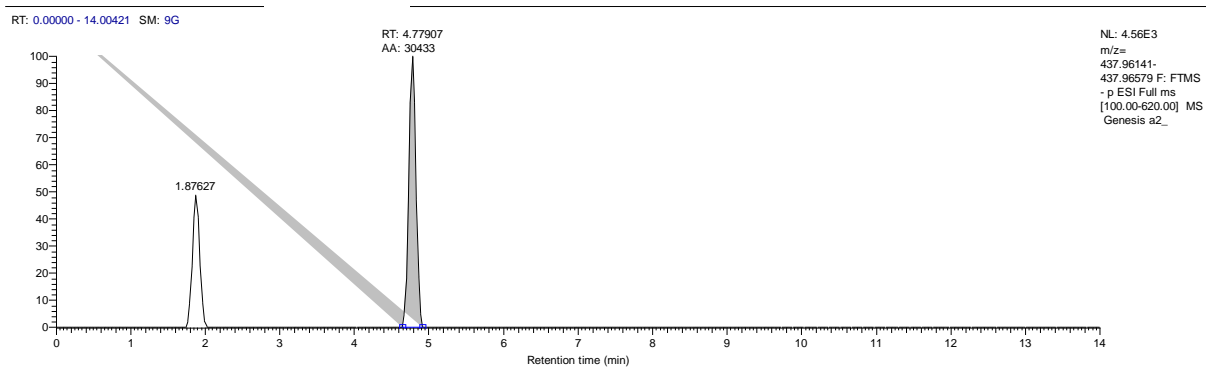
**FIG. 3.17** Cromatograma e o espectro de massas do íon precursor da amostra 1 referente à substância politiazida apresentando  $t_R$  4,78099 e razão  $m/z$  437,96329.



**FIG. 3.18** Cromatograma e o espectro de massas do íon precursor da amostra 2 referente à substância politiazida apresentando  $t_R$  4,77907 e razão  $m/z$  437,96307.

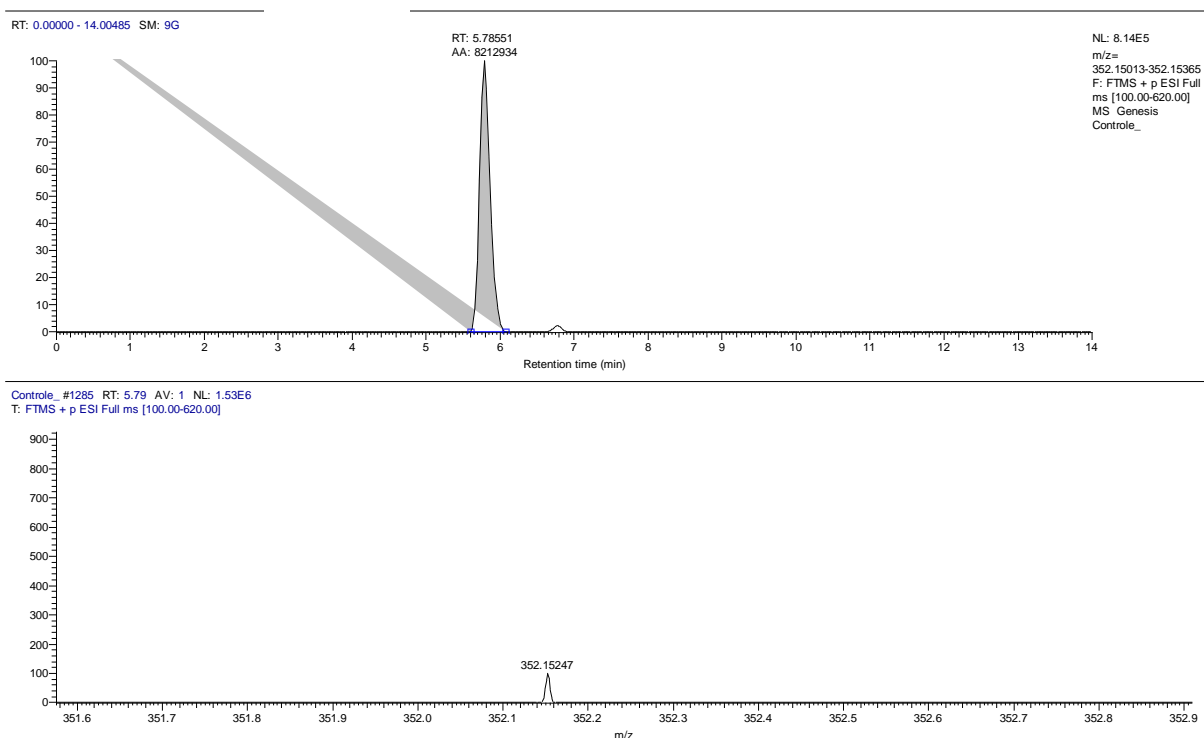


**FIG. 3.19** Cromatograma e o espectro de massas do íon precursor da amostra 6 referente à substância politiazida apresentando  $t_R$  4,78451 e razão  $m/z$  437,96283.

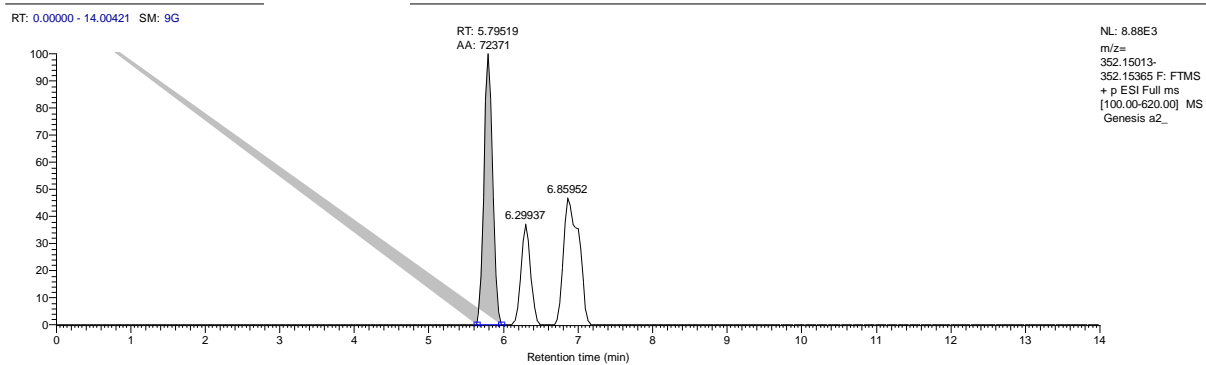


**FIG. 3.20** Cromatograma e o espectro de massas do íon precursor da amostra 10 referente à substância politiazida apresentando  $t_R$  4,77907 e razão  $m/z$  437,96146.

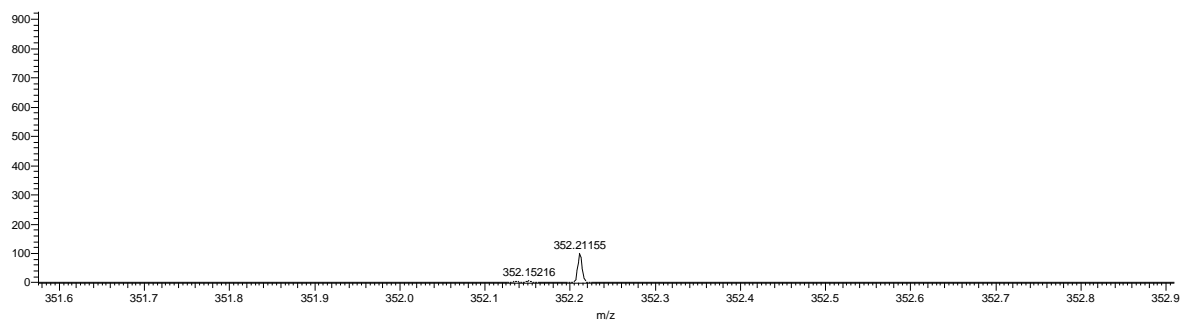
De acordo com o apresentado na FIG. 3.16 (amostra controle), FIG. 3.17 (amostra 1), FIG. 3.18 (amostra 2), FIG. 3.19 (amostra 6) e FIG. 3.20 (amostra 10) pode-se notar que íons precursores possuem razões  $m/z$  próximas, diferindo do controle nas três ou duas últimas casas decimais após a vírgula.



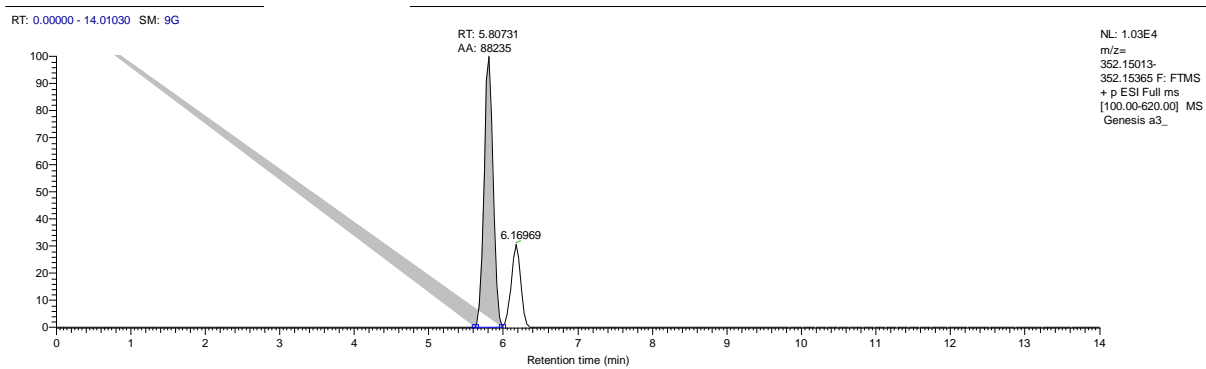
**FIG. 3.21** Cromatograma e o espectro de massas do íon precursor da amostra controle referente à substância benfluorex apresentando  $t_R$  5,78551 e razão  $m/z$  352,15247.



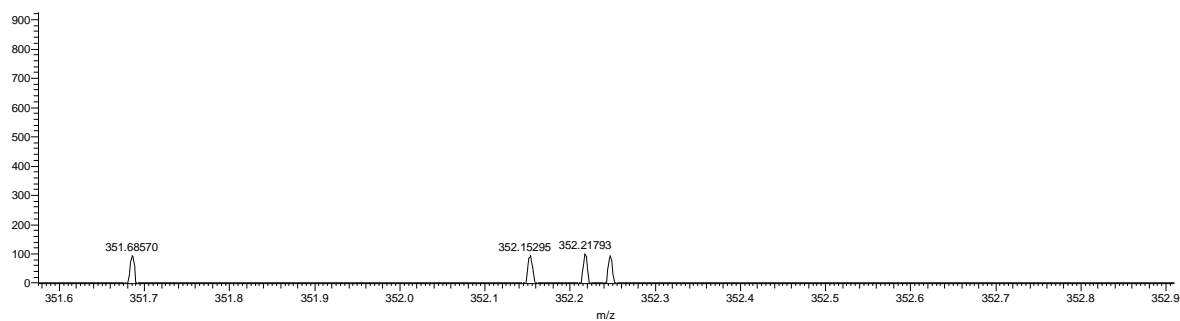
a2\_#1281 RT: 5.80 AV: 1 NL: 5.83E5  
T: FTMS + p ESI Full ms [100.00-620.00]



**FIG. 3.22** Cromatograma e o espectro de massas do íon precursor da amostra 2 referente à substância benfluorex apresentando  $t_R$  5,79519 e razão  $m/z$  352,21155.

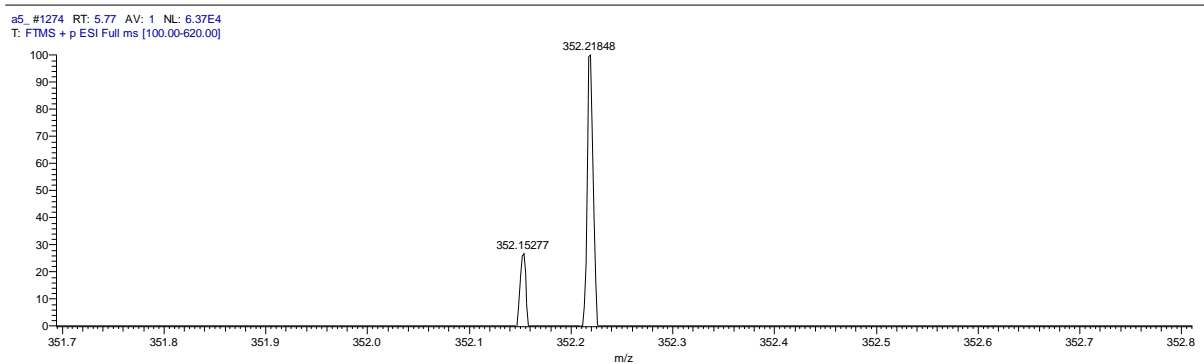
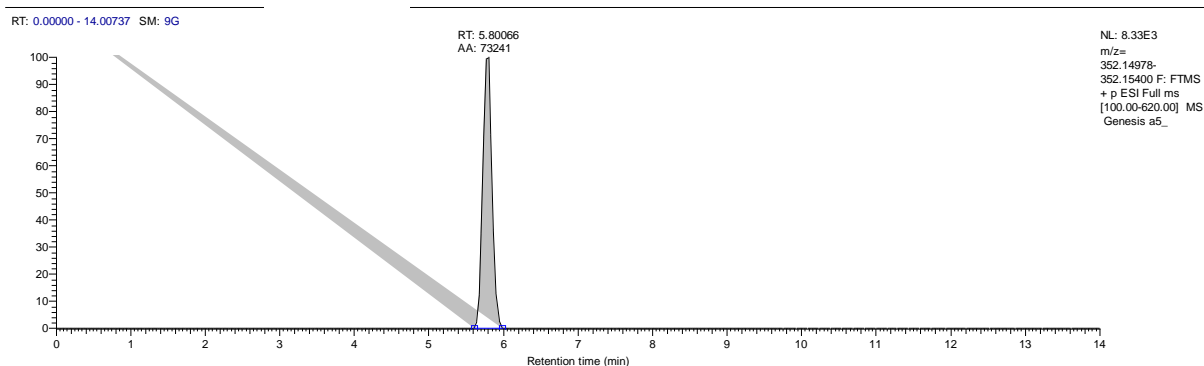


a3\_#1275 RT: 5.78 AV: 1 NL: 1.16E4  
T: FTMS + p ESI Full ms [100.00-620.00]

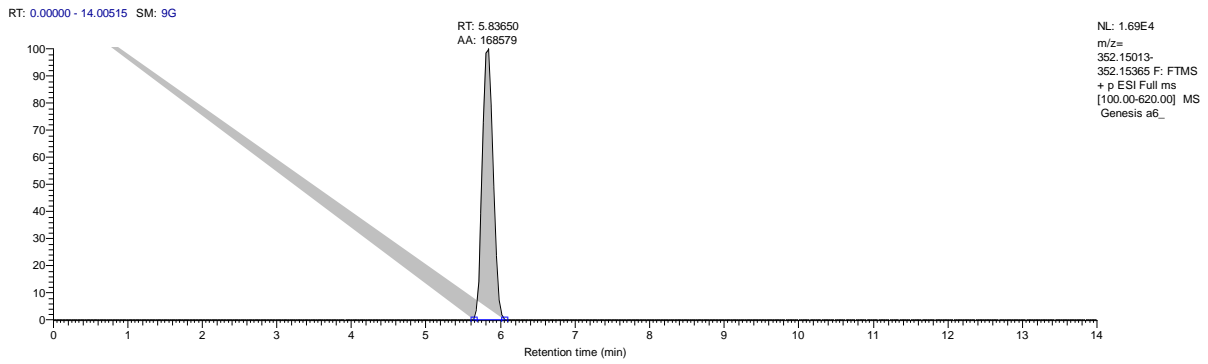




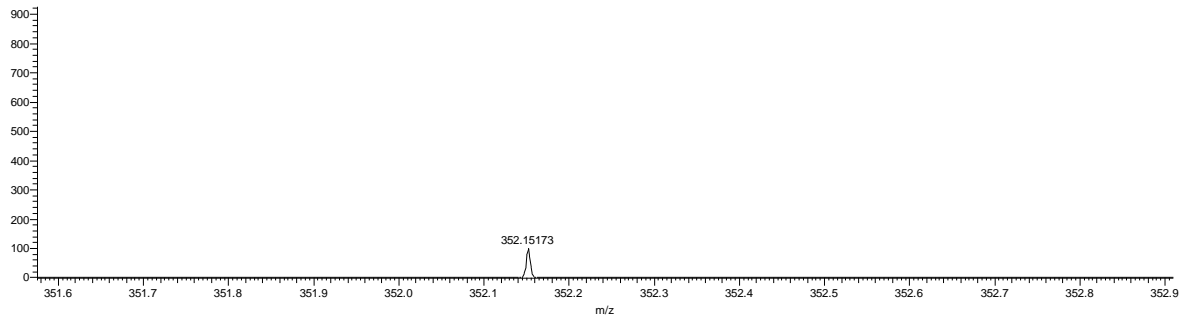
**FIG. 3.23** Cromatograma e o espectro de massas do íon precursor da amostra 3 referente à substância benfluorex apresentando  $t_R$  5,80731 e razão  $m/z$  352,15295.



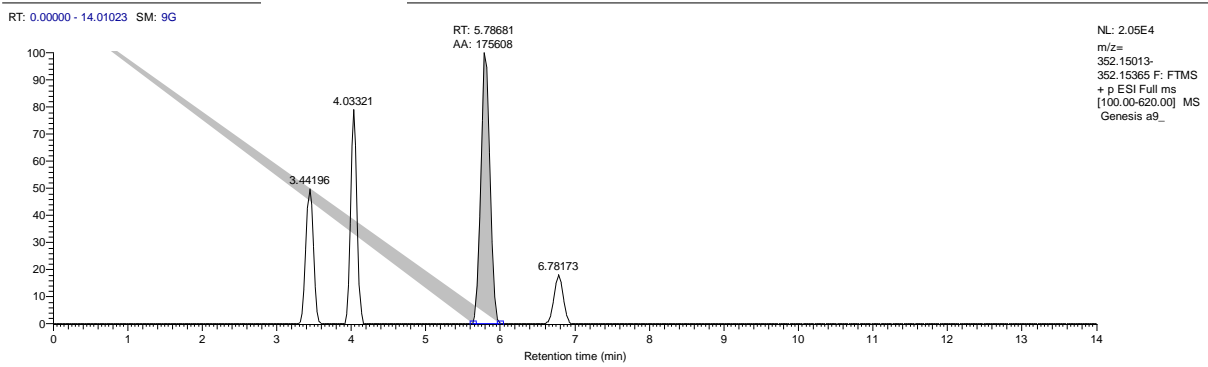
**FIG. 3.24** Cromatograma e o espectro de massas do íon precursor da amostra 5 referente à substância benfluorex apresentando  $t_R$  5,80066 e razão  $m/z$  352,15277.



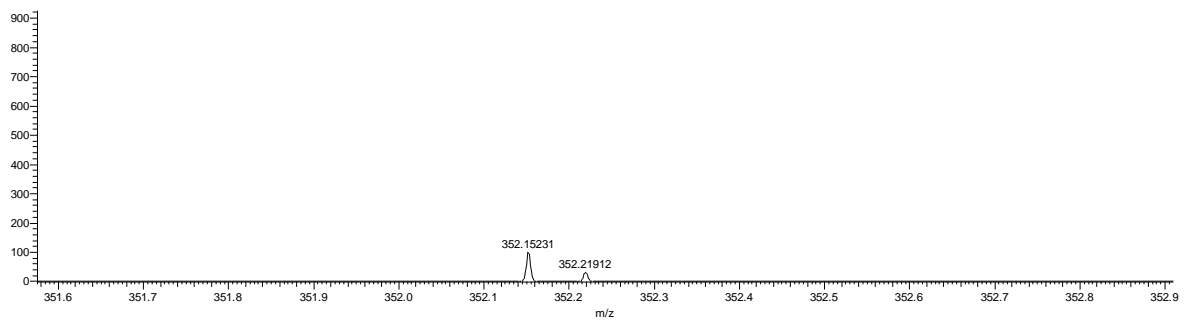
a6\_ #1281 RT: 5.80 AV: 1 NL: 5.40E4  
T: FTMS + p ESI Full ms [100.00-620.00]



**FIG. 3.25** Cromatograma e o espectro de massas do íon precursor da amostra 6 referente à substância benfluorex apresentando  $t_R$  5,83650 e razão  $m/z$  352,15173.



a9\_ #1276 RT: 5.79 AV: 1 NL: 5.60E4  
T: FTMS + p ESI Full ms [100.00-620.00]



**FIG. 3.26** Cromatograma e o espectro de massas do íon precursor da amostra 9 referente à substância benfluorex apresentando  $t_R$  5,78681 e razão  $m/z$  352,15231.

Observou-se na FIG. 3.21 (amostra controle), FIG. 3.22 (amostra 2), FIG. 3.23 (amostra 3), FIG. 3.24 (amostra 5), FIG. 3.25 (amostra 6) e FIG. 3.26 (amostra 9) que as razões massa/carga dos íons precursores são próximas para a maioria das amostras comerciais. Por meio dessa comparação pode-se perceber que houve pouca variação entre as razões  $m/z$  do controle e das amostras comerciais que apresentaram picos referentes às substâncias clorotiazida, conivaptan, politiazida e benfluorex.

Após a comparação entre as razões  $m/z$  dos íons precursores nas amostras foi realizado o cálculo da exatidão mássica (EQ. 3.1) como parâmetro para a identificação das substâncias. Foi estabelecido um limite máximo de 5 ppm para confirmar a identidade do composto, onde valores iguais ou inferiores à 5 ppm caracterizam substâncias iguais (fórmulas elementares iguais) e valores superiores à 5 ppm caracterizam substâncias diferentes (fórmulas elementares distintas).

Em espectrometria de massas de alta resolução a confirmação por meio do cálculo de diferenciação das razões  $m/z$  dos íons precursores dispensa a análise dos fragmentos, sendo, a análise dos mesmos necessária caso exista dificuldade na detecção de alguns compostos.

Os resultados obtidos por meio do cálculo de exatidão mássica para as substâncias clorotiazida, conivaptan, politiazida e benfluorex para o controle e para as amostras comerciais constam na TAB. 3.5.

**TAB. 3.5** Valores obtidos por meio do cálculo de exatidão mássica.

<b>Substância</b>	<b>Exatidão mássica (ppm)</b>
<i>Clorotiazida</i>	
Controle	0,034
Amostra 1	0,442
<i>Conivaptan</i>	
Controle	-0,601
Amostra 1	0,641
<i>Polítiazida</i>	
Controle	-0,502
Amostra 1	-0,708
Amostra 2	-1,210
Amostra 6	-1,758
Amostra 10	-4,886
<i>Benfluorex</i>	
Controle	1,647
Amostra 2	169,387
Amostra 3	3,010
Amostra 5	2,499
Amostra 6	-0,454
Amostra 9	1,192

De acordo com os valores apresentados na TAB. 3.5 pode-se perceber que apenas uma amostra apresentou resultado superior à 5 ppm (amostra 2 para a substância benfluorex), mostrando que não se trata da mesma substância.

As demais amostras apresentaram resultados inferiores à 5 ppm, comprovando ser a mesma substância que o controle. Foi confirmada a identidade das substâncias clorotiazida para a amostra 1, conivaptan para a amostra 1, politiazida para as amostras 1, 2, 6 e 10, e benfluorex para as amostras 3, 5, 6 e 9.

Através dos valores exibidos na TAB. 3.5 pode-se constatar que sete das onze marcas analisadas (63,64%) apresentaram adulteração por pelo menos uma substância com ação farmacológica, exceto a amostra 1 que apresentou positividade para três compostos com efeito diurético (clorotiazida, conivaptan e politiazida).

Pode-se notar que a maioria das substâncias adulterantes encontradas referem-se a classe farmacológica dos diuréticos. Também foi encontrada adulteração por uma substância com efeito estimulante (benfluorex - em quatro das onze marcas analisadas). A adulteração por essas classes de substâncias estão associadas aos efeitos que a presença das mesmas podem ocasionar, que são o efeito mascarador

e a perda de peso eficaz nos diuréticos e aumento do estado de alerta e diminuição da fadiga nos estimulantes.

Os resultados obtidos são preocupantes, pois indicam que existe uma deficiência no controle de qualidade desses produtos no que diz respeito à análise de substâncias com ação terapêutica. Mostrando que essas amostras não estão apropriadas para o consumo.

## 4 CONCLUSÃO

O método desenvolvido para o preparo das amostras associado à técnica de CL-EMAR mostraram-se apropriados para o rastreamento das diferentes classes de compostos permitindo uma melhor separação, identificação e detecção das mesmas. Isso está relacionado a boa recuperação dos analitos ocasionada pelo pré-tratamento das amostras e à alta sensibilidade e resolução do analisador de massas utilizado.

O método analítico validado conforme o protocolo do Laboratório Brasileiro de Controle de Dopagem apresentou resultados satisfatórios nos parâmetros de desempenho avaliados, como a seletividade, onde não foi verificada a presença de interferentes nos tempos retenção dos analitos; limite de detecção, que foi capaz de perceber quantidades reduzidas das substâncias; repetitividade que mostrou resultados adequados para 92,57% dos compostos; rendimento de extração, que apresentou 82,67% de rendimentos aceitáveis; arraste em que não foi observado carreamento das substâncias na corrida seguinte e interferência de matriz que demonstrou que 94,55% dos compostos não sofreram influência da matriz.

A aplicação do método alcançou o objetivo proposto que foi a análise de suplementos proteicos derivados do soro do leite para compostos com atividades farmacológicas. Por meio dessa análise foram detectadas as substâncias clorotiazida, conivaptan, politiazida e benfluorex em algumas amostras, comprovando que 63,64% das marcas comerciais avaliadas não estão adequadas para o consumo.

As análises realizadas confirmaram a deficiência existente no controle de qualidade de algumas marcas de suplementos proteicos derivados do soro do leite, atentando para a necessidade de um controle mais rigoroso no processo de fabricação dos mesmos.

## **5 PERSPECTIVAS FUTURAS**

1. Análises dos fragmentos referentes às substâncias clorotiazida, conivaptan, politizida e benfluorex são necessárias para enriquecimento do trabalho;
2. Publicação dos resultados obtidos em periódicos indexados internacionais;
3. Apresentação desses resultados em congressos nacionais e/ou internacionais.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, C.; LIMA, R. V. B. Uso de suplementos alimentares por adolescentes. **Jornal de Pediatria**. v. 85, n. 4, 2009.

ANTI, S. M. A.; GIORGI, R. D. N.; CHAHADE, W. H. **Antiinflamatórios hormonais: Glicocorticóides**. Einstein, v. 6, n. 1, p. 159-165, 2008. Disponível em <<http://www.saudedireta.com.br/docsupload/1339893212923Einstein%20Suplemento%20v6n1%20pS159-165.pdf>> Acesso em 03 jan 2016.

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Portaria Nº 222, de 24 de Março de 1998**. Legislação em Vigilância Sanitária, Ministério da Saúde. Disponível em <<http://portal.anvisa.gov.br>> Acesso em 19 out 2014.

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução - Rdc Nº- 18, De 27 de Abril de 2010**. Legislação em Vigilância Sanitária, Ministério da Saúde. Disponível em <[http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/eb12e1804cc1568a88de9fc8a8d1b925/RDC+18\\_2010.pdf?MOD=AJPERES](http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/eb12e1804cc1568a88de9fc8a8d1b925/RDC+18_2010.pdf?MOD=AJPERES)> Acesso em 24 set 2014.

AQUINO NETO, F. R. O papel do atleta na sociedade e o controle de dopagem no esporte. **Revista Brasileira de Medicina no Esporte**, v. 7, n. 4, p. 138-148, 2001.

ARAÚJO, D. S. M. S.; ARAÚJO, C. G. S. Aptidão física, saúde e qualidade de vida relacionada à saúde em adultos. **Revista Brasileira de Medicina no Esporte**. v. 6, n. 5, p. 194-203, 2000.

BARROS NETO, T. L. A controvérsia dos agentes ergogênicos: estamos subestimando os efeitos naturais da atividade física? **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, São Paulo, v. 45, n. 2, p. 121-122, 2001.

BAVARESCO, L.; BERNARDI, A.; BATTASTINI, A. M. O.Glicocorticóides: Usos Clássicos e Emprego no Tratamento do Câncer. **Infarma**, v.17, n. 7, p. 58-60, 2005.



- BAUME, N.; MAHLER, N.; KAMBER, M.; MANGIN, P.; SAUGY, M. Research of Stimulants and Anabolic Steroids in Dietary Supplements. **Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports**, v. 16, p. 41-48, 2006.
- BORTOLOTTO, L. A.; CONSOLIM-COLOMBO, F. M. Betabloqueadores adrenérgicos. **Revista Brasileira de Hipertensão**, v.16, n. 4, p. 215-220, 2009.
- BRUM, A. L. S. **A Química dos Suplementos Alimentares**. Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, Rio de Janeiro, 2009. Disponível em <<http://marcoarelio.iq.ufrj.br/monografias/a%20quimica%20dos%20suplementos%20alimentares.pdf>> Acesso 23 set 2014.
- BURKE, L. M. **Positive Drug Tests from Supplements**. *Sportscience*, v. 4, n. 3, p. 1-5, 2000. Disponível em <<http://www.sportsci.org/jour/0003/lmb.pdf>> Acesso em 15 out 2014.
- CALDAS, S. S.; GONÇALVES, F. F.; PRIMEL, E. G.; PRESTES, O. D.; MARTINS, M. L.; ZANELLA, R. Principais Técnicas de Preparo de Amostra para a Determinação de Resíduos de Agrotóxicos em Água por Cromatografia Líquida com Detecção por Arranjo de Diodos e por Espectrometria de Massas. **Revista Química Nova**, v. 34, n. 9, p. 1604-1617, 2011.
- CARNEIRO, J. G.; BIGLIASSI, M.; DANTAS, J. L.; SOUZA, S. R.; ALTIMARI, L. R. Música: recurso ergogênico psicológico durante o exercício físico? **Revista Brasileira de Psicologia do Esporte**, São Paulo, v.3, n. 2, p. 61-70, 2010.
- CARRILHO, L. H. **Benefícios da Utilização da Proteína do Soro de Leite Whey Protein**. *Revista Brasileira de Nutrição Esportiva*, v. 7, n. 40, p.195-203, 2013. Disponível em <[www.ibpfe.com.br/www.rbne.com.br](http://www.ibpfe.com.br/www.rbne.com.br)> Acesso em 28 Set 2015.
- CHEN, W.; HUANG, W.; CHIU, C.; CHANG, W.; HUANG, C. **Whey Protein Improves Exercise Performance and Biochemical Profiles in Trained Mice**. *Official Journal of the American College of Sports Medicine*, p. 1517-1524, 2014. Disponível em <<http://www.acsm-msse.org>> Acesso em 13 set 2015.
- CHIARADIA, M. C.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. O Estado da Arte da Cromatografia Associada à Espectrometria de Massas Acoplada à Espectrometria de Massas na Análise de Compostos Tóxicos em Alimentos. **Revista Química Nova**, v. 31, n. 3, p. 623-636, 2008.

CHO, R.; HUANG, Y.; SCHWARTZ, J. C.; CHEN, Y.; CARLSON, T. J.; MA, J. MSM, an Efficient Workflow for Metabolite Identification Using Hybrid Linear Ion Trap Orbitrap Mass Spectrometer. **American Society for Mass Spectrometry**, n. 23. p. 880-888, 2012.

CIOLA, R. **Fundamentos da Cromatografia a líquido de Alto Desempenho HPLC**. Editora Edgard Blücher LTDA, ed 1ª, reimpressão 4ª, 2009.

COHEN, P. A. American Roulette - Contaminated Dietary Supplements. **The New England Journal of Medicine**, v. 361, n. 16, p. 1523-1525, 2009.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de Cromatografia**. Editora da Unicamp, Campinas, São Paulo, 2006.

CROTTI, A. E. M.; VESSECCHI, R.; LOPES, J. L. C.; LOPES, N. P. Espectrometria de Massas com Ionização por "Electrospray": Processos Químicos Envolvidos na Formação de Íons de Substâncias Orgânicas de Baixo Peso Molecular. **Revista Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 287-292, 2006.

DEGANI, A. L. G.; CASS, Q. B.; VIEIRA, P. C. Cromatografia, um Breve Ensaio. **Química Nova na Escola**, n. 7, 1998.

DENHAM, B. E. Dietary Supplements - Regulatory Issues and Implications for Public Health. **The Journal of the American Medical Association**, v. 306, n. 4, p. 328-329, 2011.

DENISOV, E.; DAMOC, E.; LANGE, O.; MAKAROV, A. Orbitrap mass spectrometry with resolving powers above 1,000,000. **International Journal of Mass Spectrometry**, v. 325-327, p. 80-85, 2012.

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

FAYH, A. P. T.; SILVA, C. V.; JESUS, F. R. D.; COSTA, G. K. Consumo de Suplementos Nutricionais por Frequentadores de Academias da Cidade de Porto Alegre. **Revista Brasileira de Ciências no Esporte**, Florianópolis, v. 35, n. 1, p. 27-37, 2013.

FDA, Food and Drug Administration. **Dietary Supplements**. 2006. Disponível em <[www.fda.gov/Food/DietarySupplements/default.htm](http://www.fda.gov/Food/DietarySupplements/default.htm)> Acesso em 26 set 2014.

FENN, J. B.; MANN, M.; MENG, C. K.; WONG, S. F.; WHITEHOUSE, C. M. **Electrospray Ionization for Mass Spectrometry of Large Biomolecules**. *Science*, v. 246, p. 64-71, 1989. Disponível em < <http://www.sciencemag.org/>> Acesso em 8 jan 2015.

FENN, J. B. Electrospray Ionization Mass Spectrometry: How It All Began. **Journal of Biomolecular Techniques**, v. 13, n. 3, p. 101-118, 2002.

FERREIRA, C. R.; SARAIVA, S. A.; GARCIA, J. S.; SANVIDO, G. B.; PERECIN, F.; CATHARINO, R. R.; SIMAS, R. C.; GOZZO, F. C.; SANTOS, L. F. A.; JUNIOR, H. M.; BASSO, A. C.; PONTES, J. H. F.; MEIRELLES, F. V.; COELHO, M. B.; D'ANGELOS, M.; EBERLIN, M. N. **Princípios e Aplicações da Espectrometria de Massas em Produção Animal**. Anais do II Simpósio de Biologia Molecular Aplicada à Produção Animal, Embrapa. São Carlos, SP. p. 109-136, 2009.

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

GIRÓN, A. J.; DEVENTER, K.; ROELS, K.; VAN EENOO, P. Development and validation of an open screening method for diuretics, stimulants and selected compounds in human urine by UHPLC–HRMS for doping control. **Analytica Chimica Acta**, v.721, p. 137-146, 2012.

GOMES, G. S.; DEGIOVANNI, G. C.; GARLIPP, M. R.; CHIARELLO, P. G.; JORDÃO, A. A. Caracterização do Consumo de Suplementos Nutricionais em Praticantes de Atividade Física em Academias. **Revista da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto**, USP, São Paulo. v. 41, n. 3, p. 327-331, 2008.

GORSHKOV, M. V.; GOOD, D. M.; LYUTVINSKIY, Y.; YANG, H.; ZUBAREV, R. A. Calibration Function for the Orbitrap FTMS Accounting for the Space Charge Effect. **Journal American Society for Mass Spectrometry**, n. 21, p. 1846–1851, 2010.

GOSTON, J. L. Recursos Ergogênicos Nutricionais: Atualização sobre a Cafeína no Esporte. **Revista Nutrição em Pauta**, p. 1-6, 2011.

- GUIOCHON, G. A. Chromatography, today and tomorrow. **Analytica Chimica Acta**, v. 283, p. 309-319, 1993.
- HARAGUCHI, F. K.; ABREU, W. C.; DE PAULA, H. Proteínas do soro do leite: composição, propriedades nutricionais, aplicações no esporte e benefícios para a saúde humana. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 19, n. 4, p. 479-488, 2006.
- HERNANDEZ, A. J.; NAHAS, R. M. Modificações dietéticas, reposição hídrica, suplementos alimentares e drogas: comprovação de ação ergogênica e potenciais riscos para a saúde. **Revista Brasileira de Medicina no Esporte**, v. 15, n. 3, p. 03-12, 2009.
- HO, C.S.; LAM, C. W. K.; CHAN, M. H.M.; CHEUNG, R.C.K.; LAW, L.K.; LIT, L. C. W.; NG, K.F.; SUEN, M. W. M.; TAI, H. L. Electrospray Ionisation Mass Spectrometry: Principles and Clinical Applications. **The Clinical Biochemist Reviews**, v. 24, n. 1, p. 03-12, 2003.
- HOFFMANN, E.; STROOBANT, V. **Mass Spectrometry, Principles and Applications**. John Wiley & Sons Ltd, ed. 3ª, 2007. Disponível em <<http://www.usp.br/massa/2014/qfl2144/pdf/MassSpectrometry.pdf>> Acesso em 12 nov 2014.
- INMETRO, Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia. **Orientação Sobre Validação de Métodos Analíticos, DOQ-CGCRE-008**. Duque de Caxias, RJ, rev. 04, p. 01-19, 2011. Disponível em <[http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/Cgcre/DOQ/DOQ-Cgcre-8\\_04.pdf](http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/Cgcre/DOQ/DOQ-Cgcre-8_04.pdf)> Acesso em 14 ago 2015.
- INMETRO, Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia. **Programa de Análise de Produtos: Relatório Final Sobre a Análise em Suplementos Proteicos para Atletas – Whey Protein**, 2014. Disponível em <[http://www.inmetro.gov.br/consumidor/produtos/Relatorio\\_Whey\\_Final.pdf](http://www.inmetro.gov.br/consumidor/produtos/Relatorio_Whey_Final.pdf)> Acesso em 12 dez 2014.
- JARDIM, I. C. S. F. Extração em Fase Sólida: Fundamentos Teóricos e Novas Estratégias para Preparação de Fases Sólidas. **Scientia Chromatographica**, v. 2, n. 1, p. 13-25, 2010.
- JERVIS, S.; CAMPBELL, R.; WOJCIECHOWSKI, K. L.; FOEGEDING, E. A.; DRAKE, M. A.; BARBANO, D. M. Effect of Bleaching Whey on Sensory and

- Functional Properties of 80% Whey Protein Concentrate. **Journal of Dairy Science**, v. 95, n. 6, p. 2848–2862, 2012.
- JOHNSON, A. E.; HALEY, C. A.; WARD, J. A. Hazards of Dietary Supplement Use. **Journal of Special Operations Medicine**, ed. 1, v. 7, p. 30-38, 2007.
- LANÇAS, F. M. A Cromatografia Líquida Moderna e a Espectrometria de Massas: finalmente “compatíveis”? **Scientia Chromatographica**, v. 1, n. 2, p. 35-61, 2009.
- LANGE, O.; DAMOC, E.; WIEGHAUS, A.; MAKAROV, A. Enhanced Fourier transform for Orbitrap mass spectrometry. **International Journal of Mass Spectrometry**, v. 369, p. 16-22, 2014.
- LEITE, F. **Validação em análise química**. Editora átomo, ed. 4<sup>a</sup>, Campinas, São Paulo, 2002.
- LU, Y. L.; ZHOU, N. L.; LIAO, S. Y.; SU, N.; HE, D. X.; TIAN, Q. Q.; CHEN, B.; YAO, S. Z. Detection of adulteration of anti-hypertension dietary supplements and traditional Chinese medicines with synthetic drugs using LC/MS. **Food Additives and Contaminants**, v. 27, n. 7, p. 893-902, 2010.
- LUGÃO, J. F. **Fundamentos da tecnologia do analisador de massas Orbitrap e suas aplicações**. Thermo Fisher Scientific, Colacro XIV, 2012. Disponível em <[http://www.analiticaweb.com.br/newsletter/18/colacro/apresentacao\\_fundamentos\\_orbitrap.pdf](http://www.analiticaweb.com.br/newsletter/18/colacro/apresentacao_fundamentos_orbitrap.pdf)> Acesso em 23 Set 2015.
- MACHEREY-NAGEL. **Solid Phase Extraction Application Guide**. Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Alemanha. Disponível em <<http://www.mn-net.com/>> Acesso em 03 set 2015.
- MADEIRA, P. J. A.; ALVES, P. A.; BORGES, C. M. **High Resolution Mass Spectrometry Using FTICR and Orbitrap Instruments**. Fourier Transform - Materials Analysis, 2012. Disponível em < [www.intechopen.com](http://www.intechopen.com) > Acesso em 22 Set 2015.
- MAJORS, R. E. **The Cleaning and Regeneration of Reversed-Phase HPLC Columns**. LC GC Europe July 2003. Disponível em <[www.lcgceurope.com](http://www.lcgceurope.com)> Acesso em 10 Dez 2014.

- MAKAROV, A.; SCIGELOVA, M. Coupling liquid chromatography to Orbitrap mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, n. 1217, p. 3938-3945, 2010.
- MARTELLO, S.; FELLI, M.; CHIAROTTI, M. Survey of Nutritional Supplements for Selected Illegal Anabolic Steroids and Ephedrine Using LC-MS/MS and GC-MS Methods, Respectively. **Food Additives and Contaminants**, v. 24, n. 3, p. 258-265, 2007.
- MARTINS, A. P. **Suplementos alimentares adulterados com medicamentos Um problema de saúde pública**. Riscos e Alimentos, Autoridade de Segurança Alimentar e Económica, n. 3, p. 19-22, 2012. Disponível em <<http://dspace.uevora.pt/rdpc/bitstream/10174/5222/1/Riscos%20e%20Alimentos%20n%C2%BA%203.pdf#page=19>> Acesso em 02 out 2015.
- MAUGHAN, R. J.; KING, D. S.; LEA, T. Dietary supplements. **Journal of Sports Sciences**, v. 22, p. 95-113, 2004.
- MILLMAN, R. B.; ROSS, E. J. Steroid and Nutritional Supplement Use in Professional Athletes. **The American Journal on Addictions**, p. 48-54, 2003.
- MILMAN, B. L. General principles of identification by mass spectrometry. **Trends in Analytical Chemistry**, n. 69, p. 24-33, 2015.
- MOULARD, Y.; BAILLY-CHOURIBERRY, L.; BOYER, S.; GARCIA, P.; POPOT, M.; BONNAIRE, Y. Use of benchtop exactive high resolution and high mass accuracy orbitrap mass spectrometer for screening in horse doping control. **Analytica Chimica Acta**, n. 700 p.126-136, 2011.
- MUSENGA, A.; COWAN, D. A. Use of ultra-high pressure liquid chromatography coupled to high resolution mass spectrometry for fast screening in high throughput doping control. **Journal of Chromatography A**, v. 1288, p. 82-95, 2013.
- NIGRO, D.; FORTES, Z. B. Efeitos farmacológicos dos diuréticos e dos bloqueadores dos canais de cálcio. **Revista Brasileira de Hipertensão**, v. 12, n. 2, p. 103-107, 2005.
- PATTARIN P.; LEKSRI SOMPOONG, R.; MIRACLE, E.; MARYANNE DRAKE, M. Characterization of Flavor of Whey Protein Hydrolysates. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 10, p. 6318-6327, 2010.

- PEREZ, R. Z. **Efectos de Ayudas Ergogenicas Sobre el Organismo en Relacion con el Rendimiento Deportivo.** Revista Digital, Innovación y Experiencias Educativas, n. 19, 2009. Disponível em < [http://www.csi-csif.es/andalucia/modules/mod\\_ense/revista/pdf/Numero\\_19/REBECA\\_ZURITA\\_PEREZ02.pdf](http://www.csi-csif.es/andalucia/modules/mod_ense/revista/pdf/Numero_19/REBECA_ZURITA_PEREZ02.pdf)> Acesso em 13 out 2014.
- PINHEIRO, M. C.; NAVARRO, A. C. Adequação da Rotulagem Nutricional de Repositores Energéticos Comercializados no Distrito Federal. **Revista Brasileira de Nutrição Esportiva**, São Paulo, v. 2, n. 9, p. 106-118, 2008.
- PIPE, A.; AYOTTE, C. Nutritional Supplements and Doping. **Clinical Journal of Sport Medicine**, v. 12, n. 4, p. 245-249, 2002.
- PIVERT, G. Spectrométrie de Masse Associée à la Chromatographie Liquide : Technologie, Applications. **IRBM News**, v. 29, n. 3-4, p. 32-35, 2008.
- QUEIROZ, S. C. N.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. Métodos de Extração e/ou Concentração de Compostos Encontrados em Fluidos Biológicos para Posterior Determinação Cromatográfica. **Revista Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 68-76, 2001.
- REEUWIJK, N. M. **Contaminants in food supplements and associated health risks.** Wageningen University, Wageningen, 2014. Disponível em <<http://edepot.wur.nl/302611>> Acesso em 15 out 2014.
- RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em Métodos Cromatográficos e Eletroforéticos. **Revista Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.
- RODEK, J. SEKULIC, D. KONDRIC, M. **Dietary Supplementation and Doping-related Factors in High-level Sailing.** Journal of the International Society of Sports Nutrition, 2012. Disponível em <<http://www.jissn.com/content/9/1/5>> Acesso em 13 set 2014.
- ROSE, E. H.; AQUINO NETO, F. H.; MOREAU, R. L. M.; CASTRO, R. T. Controle *antidoping* no Brasil: resultados do ano de 2003 e atividades de prevenção. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 10, n. 4, 2004.

- SILVA, P. R. P.; DANIELSKI, R.; CZEPIELEWSKI, M. A. Esteróides Anabolizantes no Esporte. **Revista Brasileira de Medicina no Esporte**, v. 8, n. 6, p. 235-243, 2002.
- SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Spectrometric Identification of Organic Compounds**. Editora John Wiley & Sons, ed. 7ª, 2005.
- SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R. **Fundamentos de Química Analítica**. Editora Cengage Learning, tradução da 8ª edição norte-americana, 2012.
- STRANO-ROSSI, S.; ODOARDI, S.; CASTRIGNANÒ, E.; SERPELLONI, G.; CHIAROTTI, M. Liquid chromatography–high resolution mass spectrometry(LC–HRMS) determination of stimulants, anorectic drugs and phosphodiesterase 5 inhibitors (PDE5I) in food supplements. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, n. 106, p. 144-152, 2015.
- SWARTZ, M. **Seeing is Believing: Detectors for HPLC**. LC CG chromatographyonline.com, 2010. Disponível em <<http://www.chromatographyonline.com/lcgc/Column%3A+Innovations+in+HPLC/Seeing-is-Believing-Detectors-for-HPLC/ArticleStandard/Article/detail/691672>> Acesso 13 nov 2014.
- THEIN, L. A.; THEIN, J. M.; LANDRY, G. L. Ergogenic Aids. *Journal of the American Physical Therapy Association*. **Physical Therapy**, v. 75, n. 5, 1995.
- THERMO FISHER SCIENTIFIC. **Cromatografia, Espectrometria de Massas, Análise Elementar e Preparo de Amostras**. Guia de Soluções Thermo Scientific, 2015. Disponível em < <http://www.dionex.com/en-us/index.html>> Acesso 23 de Set 2015.
- THEVIS, M.; SIGMUND, G.; GEYER, H.; SCHANZER, W. Stimulants and Doping in Sport. **Endocrinology and Metabolism Clinics of North America**, v. 39, p. 89-105, 2010.
- VAN THUYNE, W.; EENOO, P. V.; DELBEKE, F. T. Nutritional Supplements: Prevalence of Use and Contamination with Doping Agents. **Nutrition Research Reviews**, v. 19, 147-158, 2006.



VAN DER MERWE, P. J.; GROBBELAAR. E. Unintentional doping through the use of contaminated nutritional supplements. **S Afr Med J**, v. 95, n. 7, 2005.

VANZELLI, A. S.; BARTHOLOMEU, J. B.; MATTOS, L. N. J.; BRUM, P. C. Prescrição de Exercício Físico para Portadores de Doenças Cardiovasculares que Fazem Uso de Betabloqueadores. **Revista da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo**, v. 15, n. 2, (supl A), p. 10-16, 2005.

WADA, World Anti-Doping Agency. **The 2015 Prohibited List, World Anti-Doping Code**. Montreal, Canada, p. 01-10, 2014. Disponível em < <https://www.wada-ama.org/en/media/news/2014-09/wada-publishes-2015-prohibited-list> > Acesso em 20 set 2015.

WOO, H.; KIM, J. W.; HAN, K. M.; LEE, J. H.; HWANG, I. S.; LEE, J. H.; KIM, J.; KWEON, S. J.; CHO, S.; CHAE, K. R.; HAN, S. Y.; KIM, J. Simultaneous analysis of 17 diuretics in dietary supplements by HPLC and LC-MS/MS. **Food Additives & Contaminants: Part A**, v. 30, n. 2, p. 209–217, 2013.

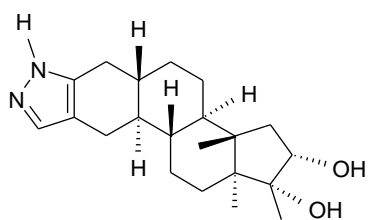
YALÇIN, S. A. Emerging Therapeutic Potential of Whey Proteins and Peptides. **Current Pharmaceutical Design**, v. 12, n. 13, p. 1637-1643, 2006.

## **7 ANEXOS**

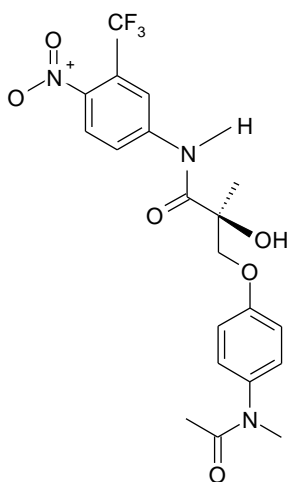
## 7.1 ANEXO 1

### Lista de estruturas

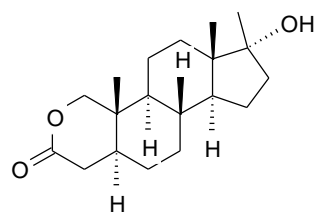
#### Agentes anabólicos



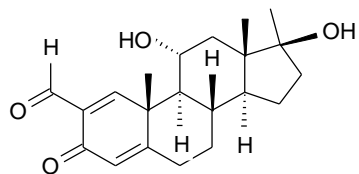
16b-hiroxiprostanozol



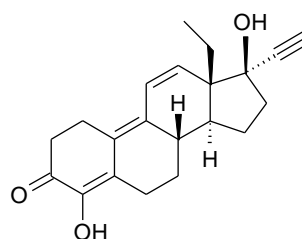
Andarina



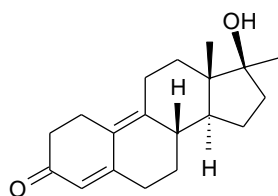
Epioxandrolona



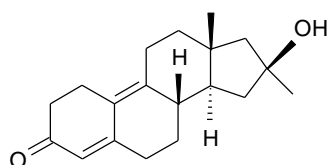
Formebolona



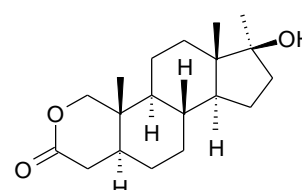
Gestrinona



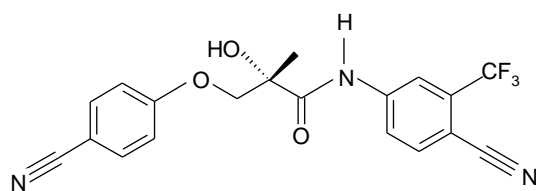
Metildienolona



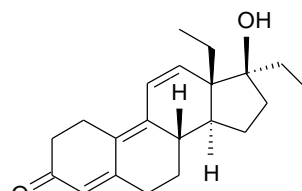
Metiltrienolona



Oxandrolona

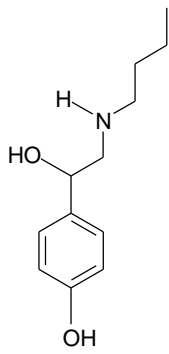


Ostarina

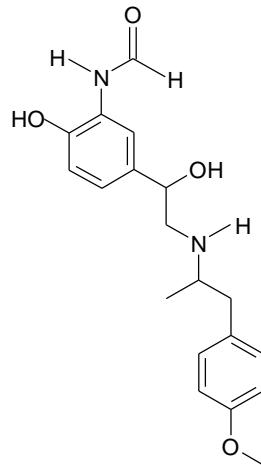


Tetrahydrogestrinona

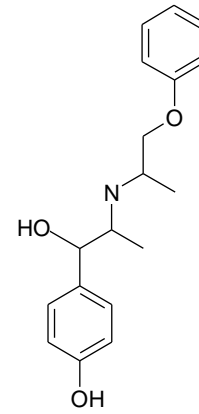
#### Beta-agonistas



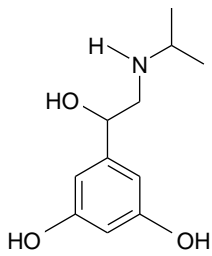
Bametano



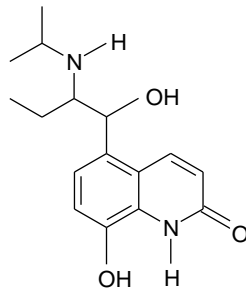
Formoterol



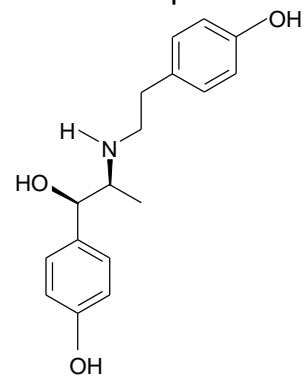
Isoxsuprine



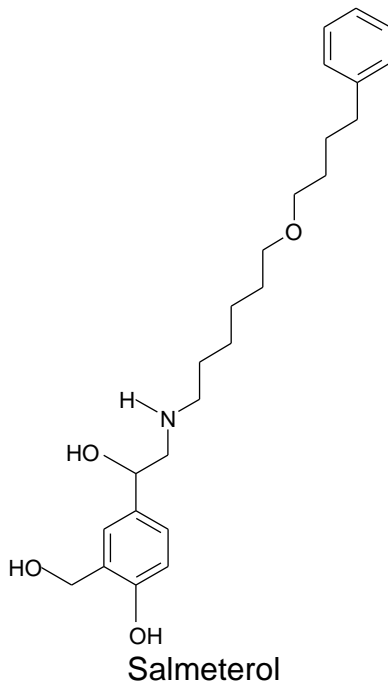
Metaproterenol



Procaterol

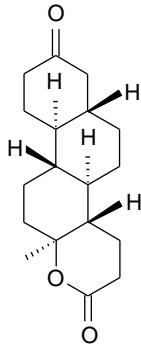


Ritodrina

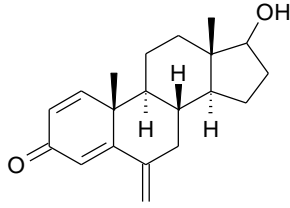


Salmeterol

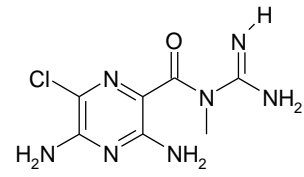
*Hormônios e moduladores metabólicos*



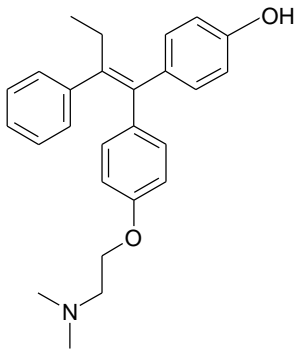
1,2,4,5-tetrahidrotetolactona



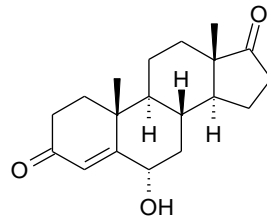
17-hidroxi exemestano



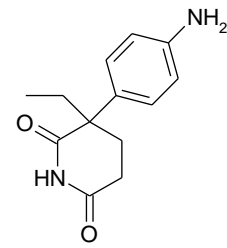
3-hidroxi-4-metoxi-tamoxifeno



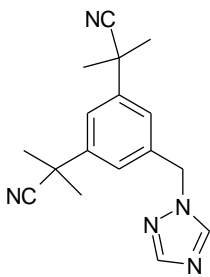
4-hidroxi-tamoxifeno



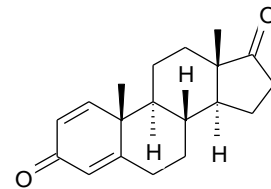
6α-hidroxiandrostenediona



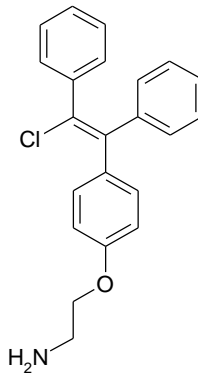
Aminoglutetimida



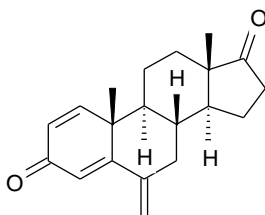
Anastrozol



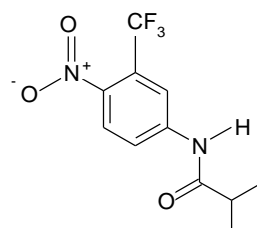
Androstatrienediona



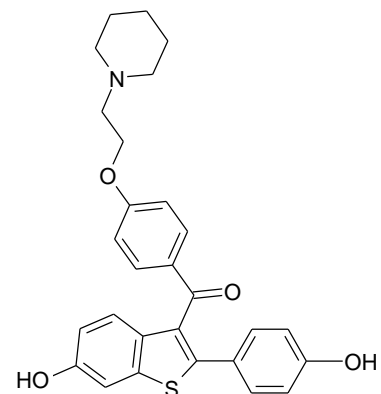
Desetilclomifeno



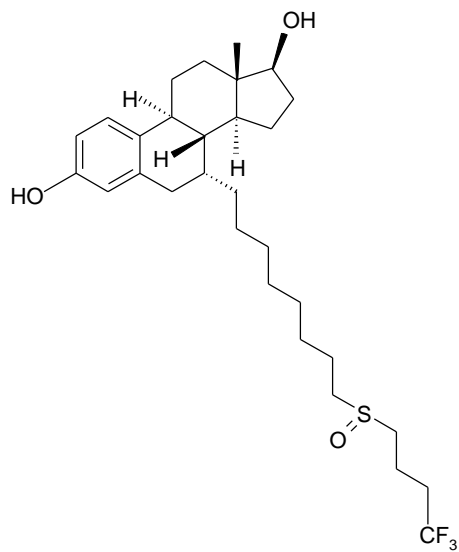
Exesmetano



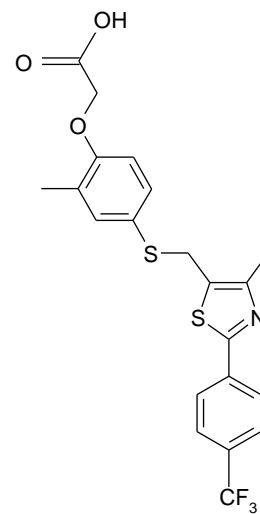
Flutamida



Raloxifeno

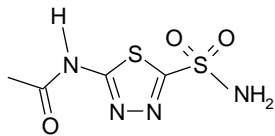


Fulvestrant

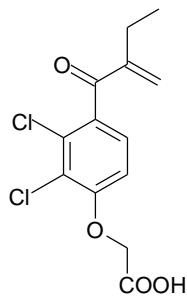


GW501516

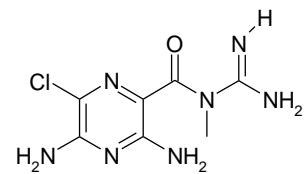
*Diuréticos e agentes mascarantes*



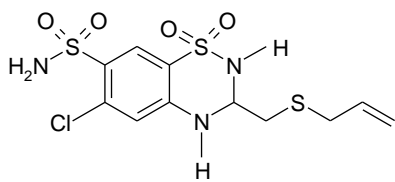
Acetazolamida



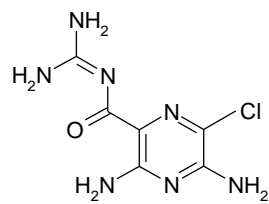
Ácido etacrínico



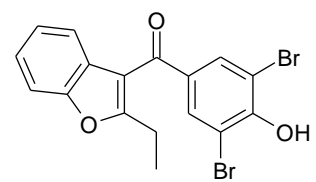
Amilorida



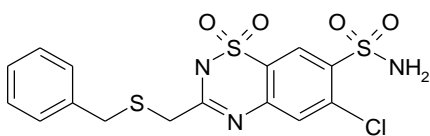
Altiazida



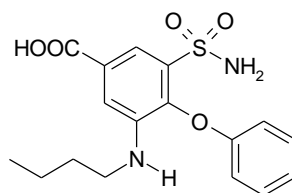
Bendroflumetiazida



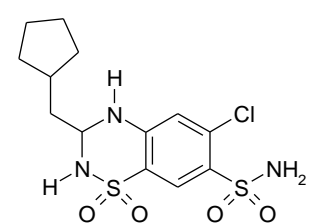
Benzbromarone



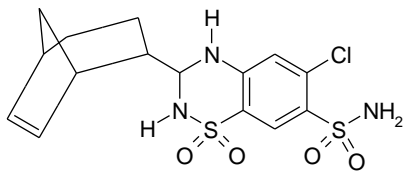
Benztiazida



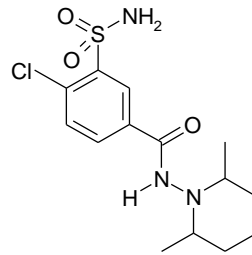
Bumetanida



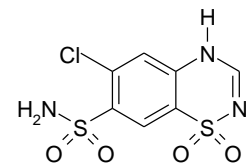
Ciclopentiazida



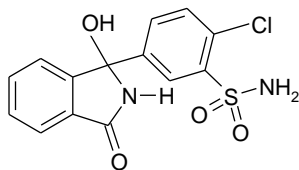
Cicletizida



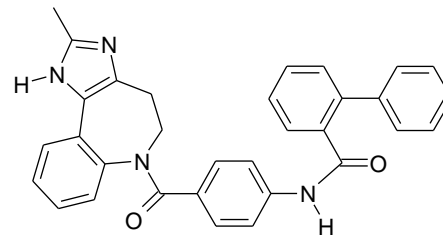
Clopamida



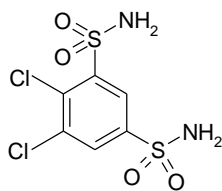
Clorotiazida



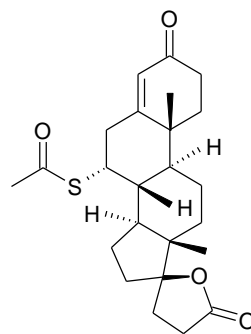
Clortalidona



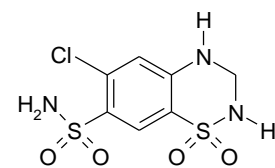
Conivaptan



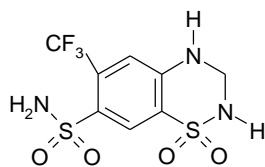
Diclorfenamida



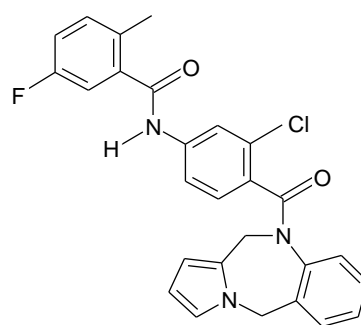
Espironolactona



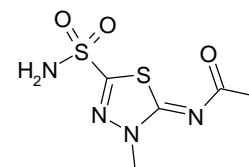
Hidroclorotiazida



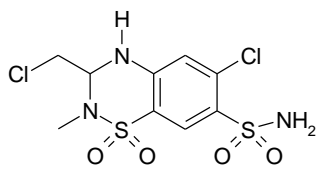
Hidroflumetiazida



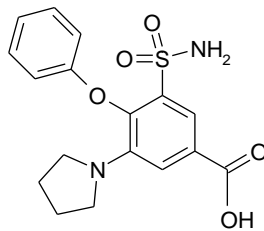
Lixivaptan



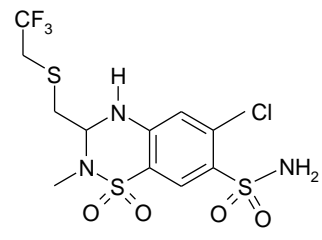
Metazolamida



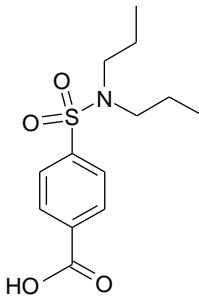
Meticlotiazida



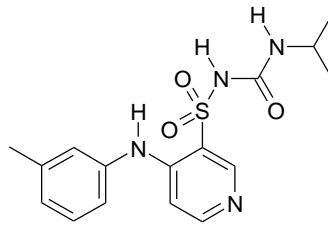
Piretanida



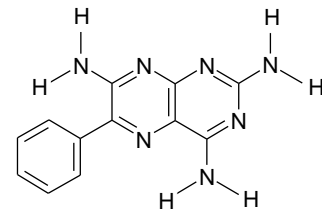
Politiazida



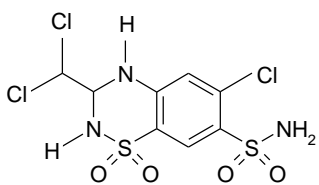
Probenecida



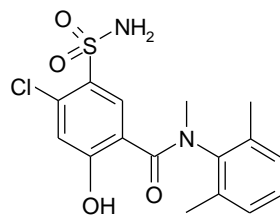
Torasemida



Triantereno

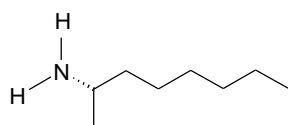


Triclormetiazida

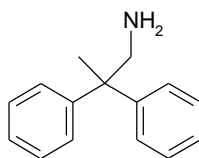


Xipamida

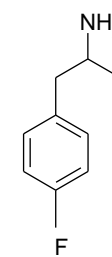
### Estimulantes



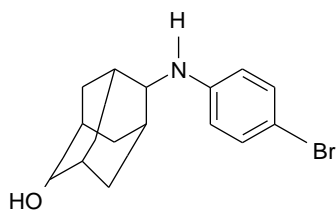
(s)-2-aminooctano



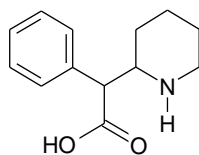
3,3-difenilpropilamina



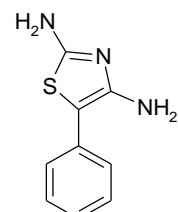
4-fluoroanfetamina



6-hidroxibromantano

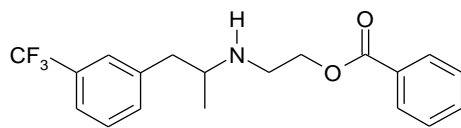


Ácido ritalínico

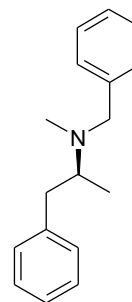


Amifenazol

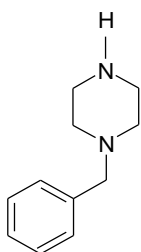




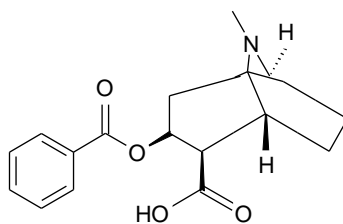
Benfluorex



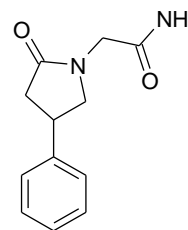
Benzfetamina



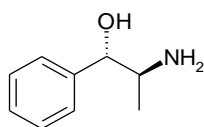
Benzilpiperazina



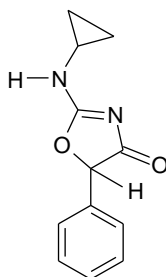
Benzoilecgonina



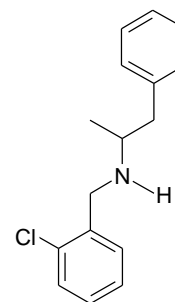
Carfedon



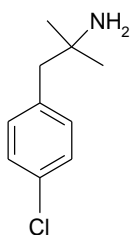
Catina



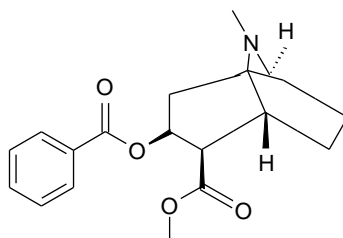
Ciclazadona



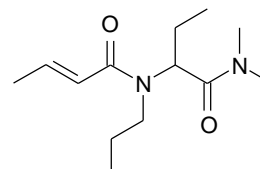
Clobenzorex



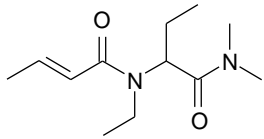
Clorfentermina



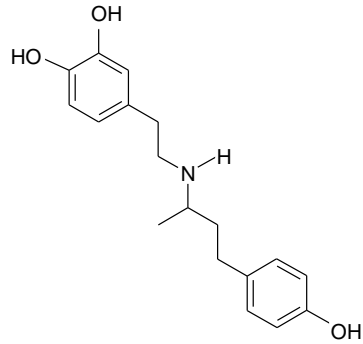
Cocaína



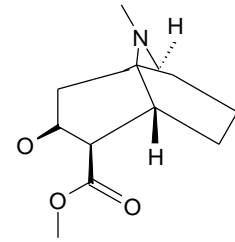
Cropropamida



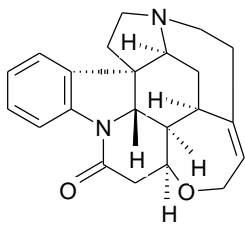
Crotetamida



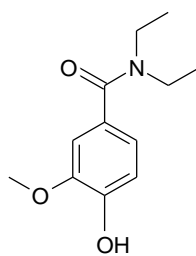
Dobutamina



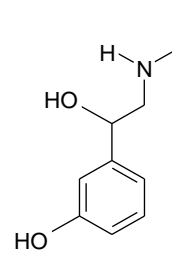
Ecgonina metilester



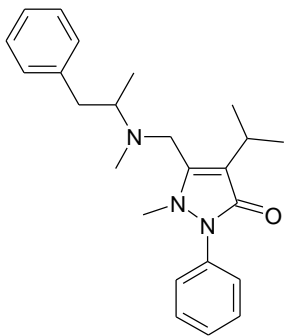
Estricina



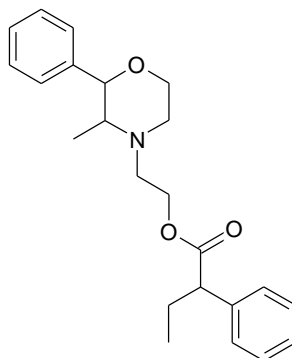
Etamivan



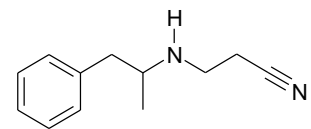
Etilefrina



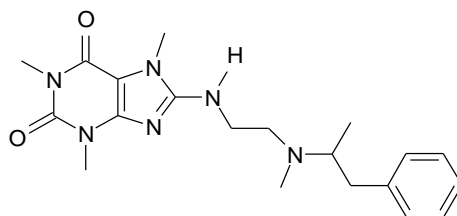
Famprofazona



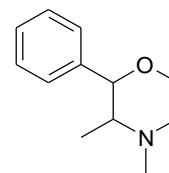
Febutrazato



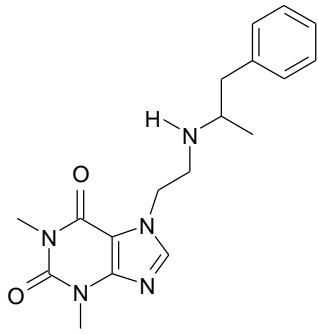
Femproporex



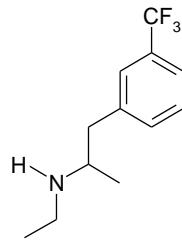
Fencamina



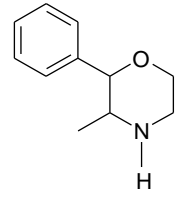
Fendimetrazina



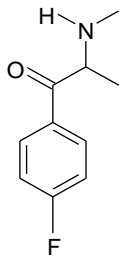
Fenetilina



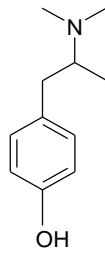
Fenfluramina



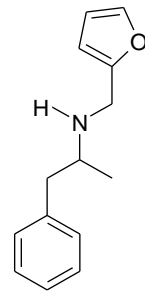
Fenmetrazina



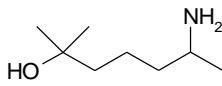
Flefedrona



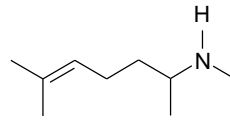
Foledrina



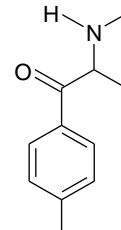
Furfenorex



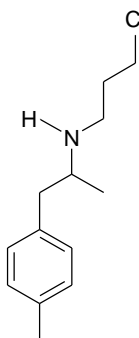
Heptaminol



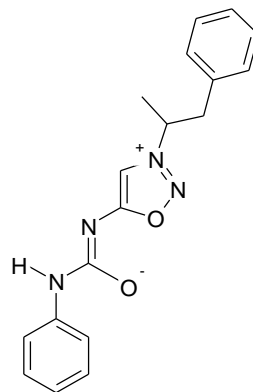
Isometepteno M1



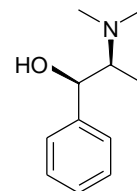
Mefedrona



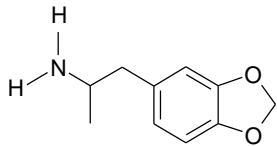
Mefenorex



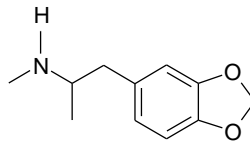
Mesocarb



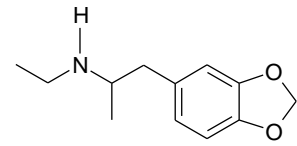
Metilefedrina



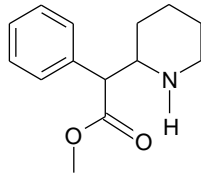
Metilenedioxianfetamina



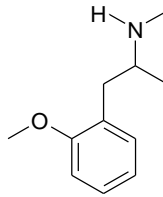
Metilenedioximetanfetamina



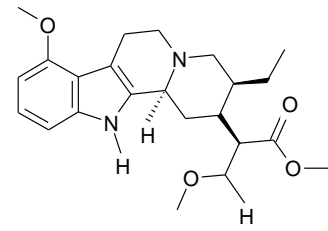
Metilenedioxi-n-etilanfetamina



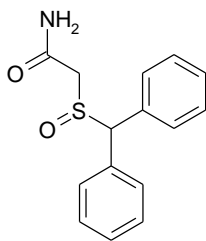
Metilfenidato



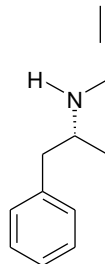
Metoxifenamina



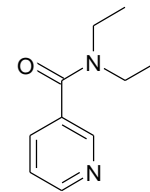
Mitraginina



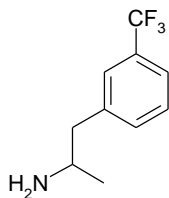
Modafinil



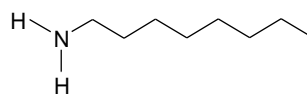
N-desmetilselegilina



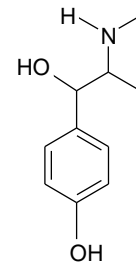
Niquetamida



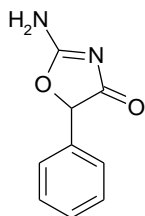
Norfenfluramina



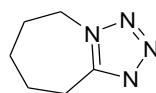
Octilamina



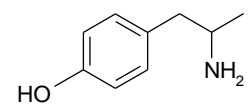
Oxilofrina



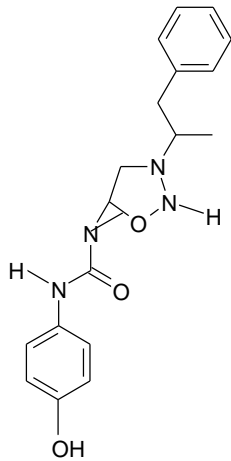
Pemolina



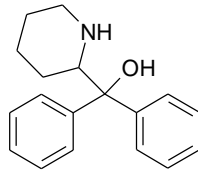
Pentetrazol



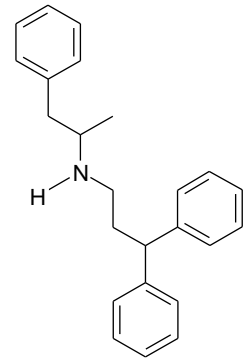
p-hidroxianfetamina



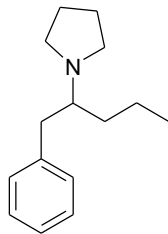
*p*-hidroximesocarb



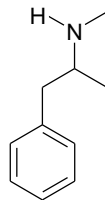
Pipradol



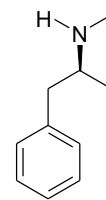
Prenilamina



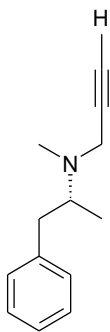
Prolintano



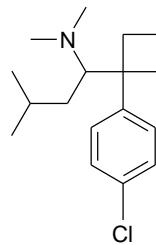
Propilexedrina



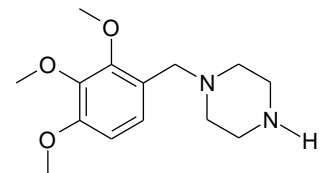
s(+)-metanfetamina



Selegilina

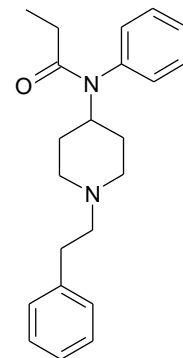
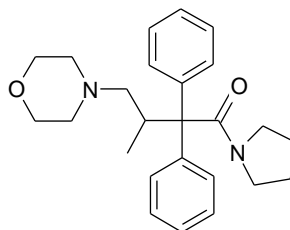
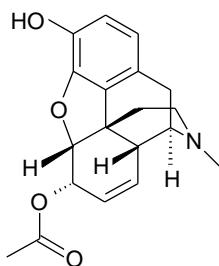


Sibutramina

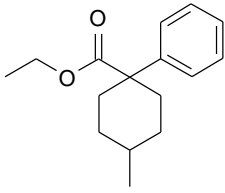


Trimetazidina

*Narcóticos*

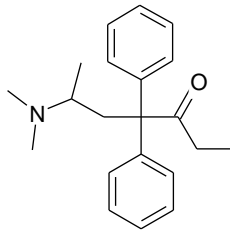


6-acetilmorfina



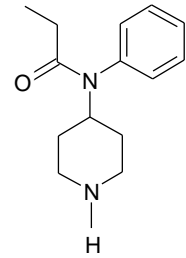
Meperidina

Dextromoramida

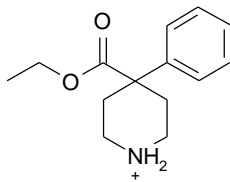


Metadona (+/-)

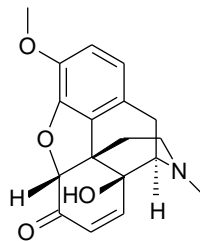
Fentanil



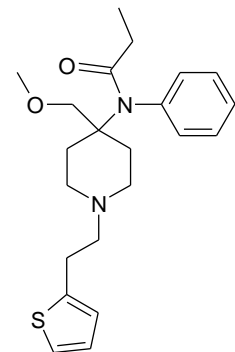
Norfentanil



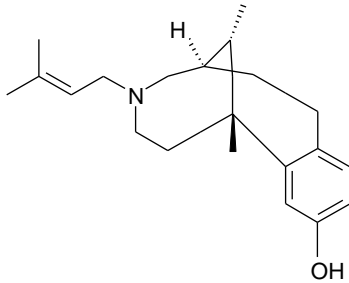
Normeperidina



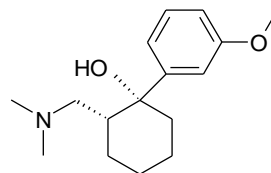
Oxicodona



Sulfetanil

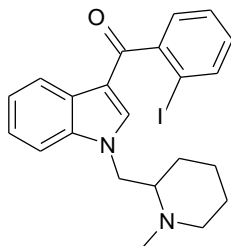


Pentazocina

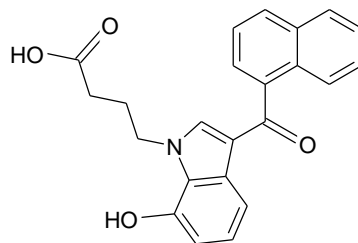


Tramadol

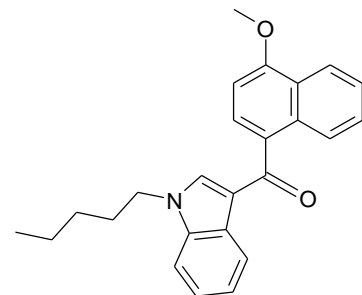
*Canabinoides*



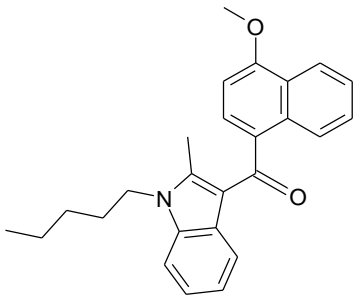
AM-2233



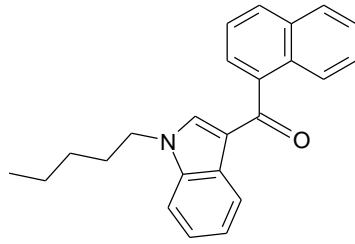
JWH-073 ácido n-butanóico



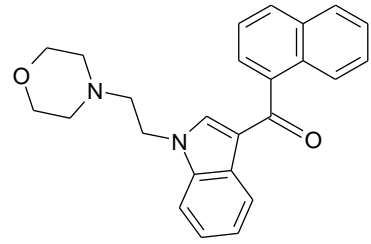
JWH-081



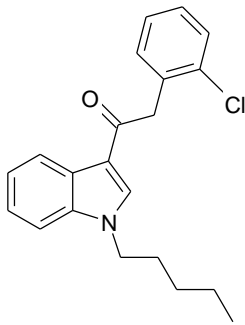
JWH-098



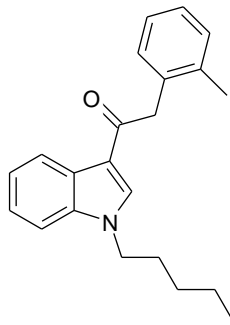
JWH-147



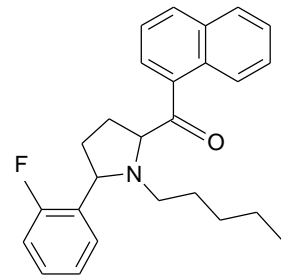
JWH-200



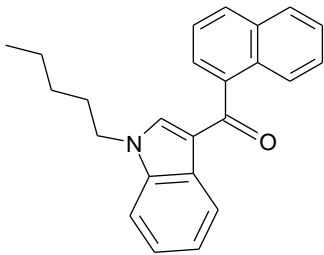
JWH-203



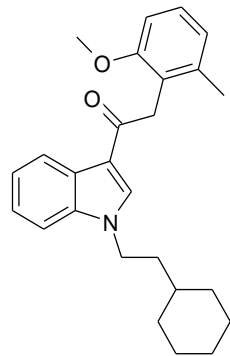
JWH-251



JWH-307

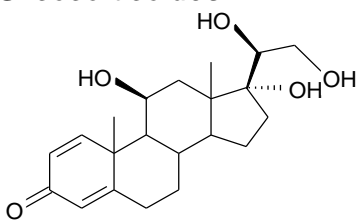


JWH-398

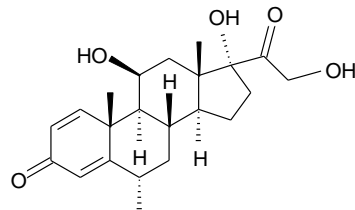


Rcs-8

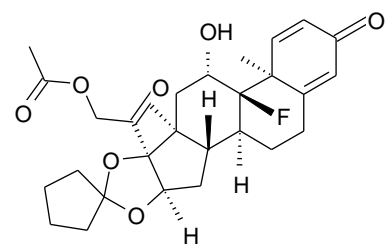
*Glicocorticoides*



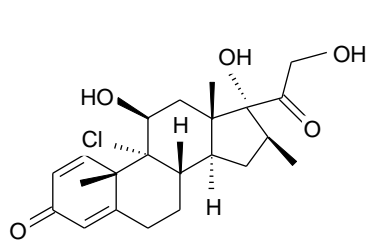
20b-dihidroprednisolona



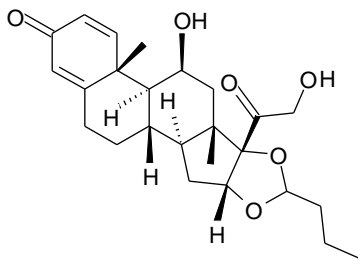
6-alfa-metilprednisolona



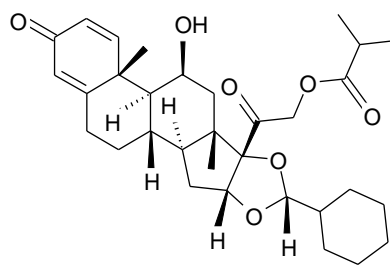
Ancinonida



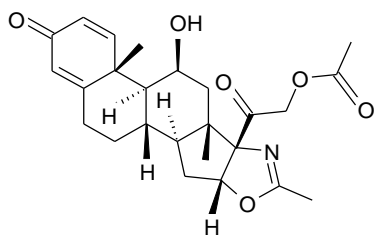
Beclometasona



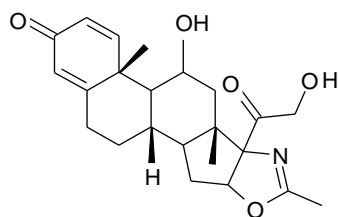
Budesonida



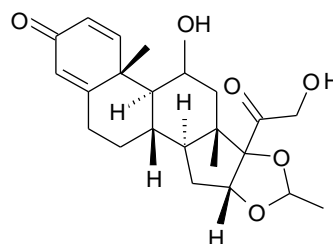
Ciclesonida



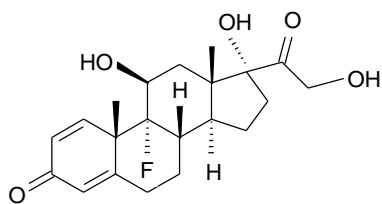
Deflazacort



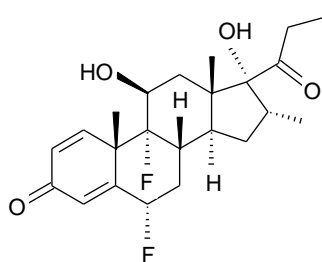
Desacetil flazacort



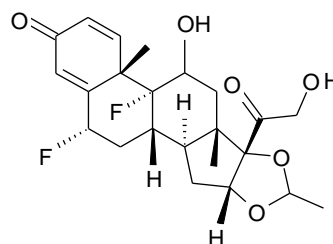
Desonida



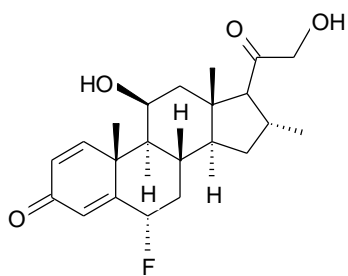
Fludrocortisona



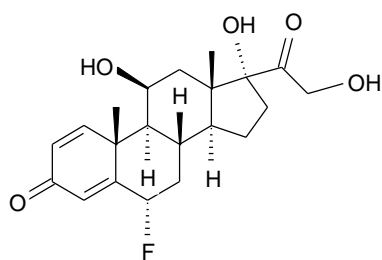
Flumetasona



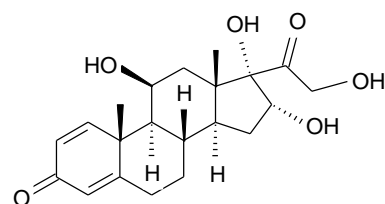
Fluocinolona acetona



Fluocortolona

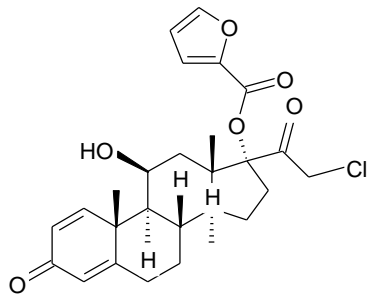


Fluprednisolona

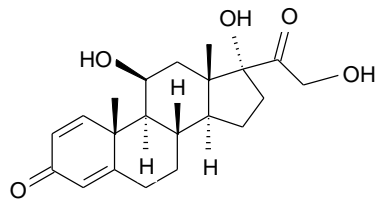


Hidroxiprednisolona-16alfa

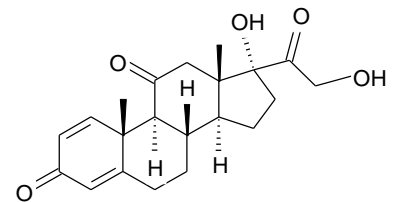




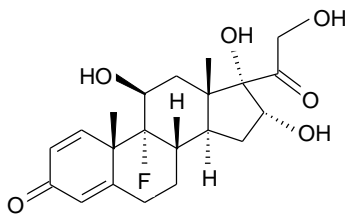
Mometasona furoato



Prednisolona

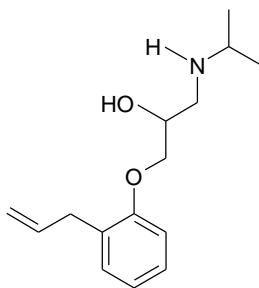


Prednisona

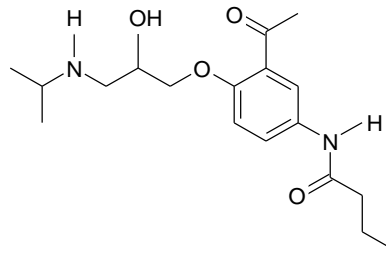


Triancinolona

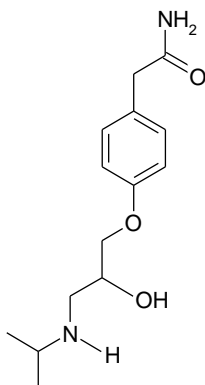
*Betabloqueadores*



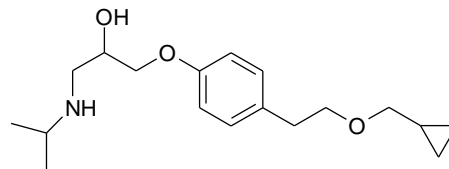
Alprenolol



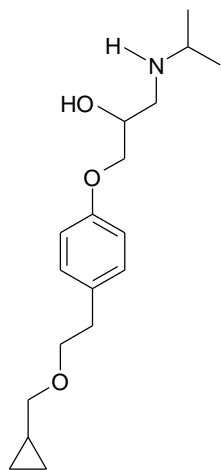
Acebutolol



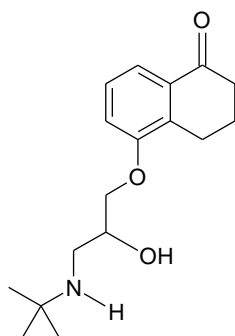
Atenolol



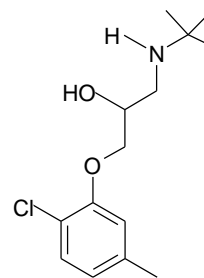
Betaxolol



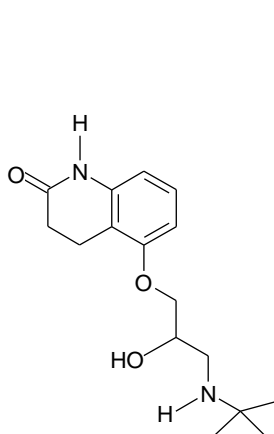
Bisoprolol



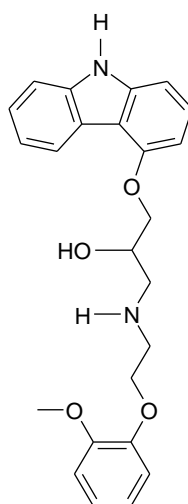
Bunolol



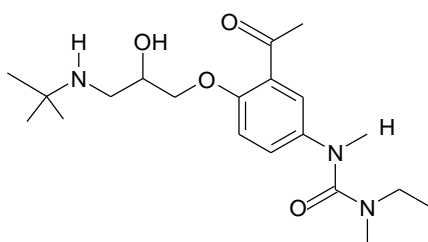
Bupranolol



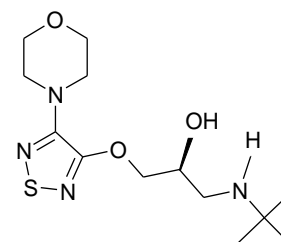
Carteolol



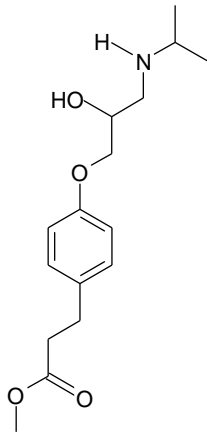
Carvedilol



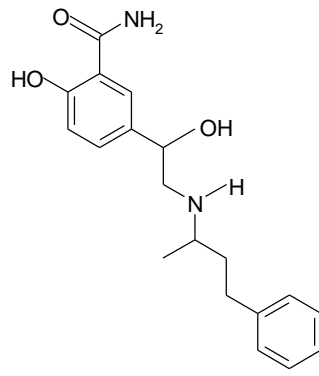
Celiprolol



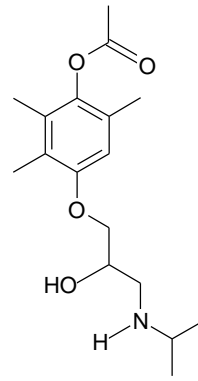
Maleato de timolol



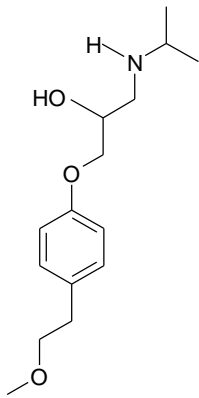
Esmolol



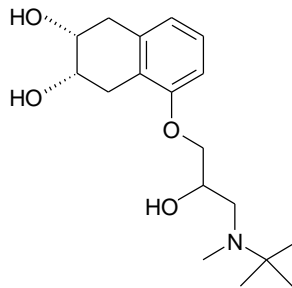
Labetalol



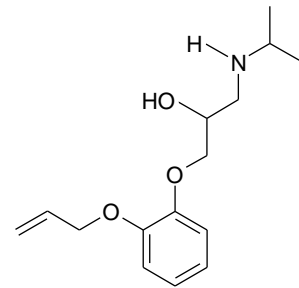
Metipranolol



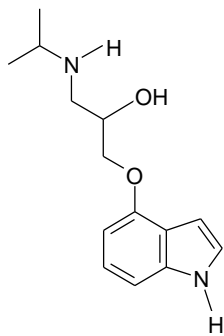
Metoprolol



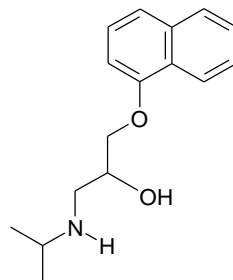
Nadolol



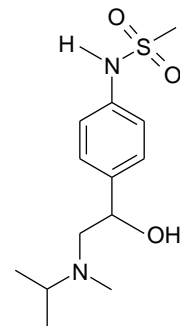
Oxiprenolol



Pindolol



Propranolol



Sotalol

## 7.2 ANEXO 2

### **RESOLUÇÃO DA DIRETORIA COLEGIADA – RDC Nº.**

Dispõe sobre alimentos para atletas.

**A Diretoria Colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária**, no uso da atribuição que lhe confere o inciso IV do art. 11 do Regulamento aprovado pelo Decreto n. 3.029, de 16 de abril de 1999, e tendo em vista o disposto no inciso II e nos §§ 1º e 3º do art. 54 do Regimento Interno aprovado nos termos do Anexo I da Portaria n. 354 da Anvisa, de 11 de agosto de 2006, republicada no DOU de 21 de agosto de 2006, em reunião realizada em \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2009 e, considerando a competência da Anvisa para regulamentar os produtos e serviços que envolvam risco à saúde pública, estabelecida na Lei n. 9.782, de 26 de janeiro de 1999, e especialmente no inciso II do § 1º de seu art. 8º, que inclui os alimentos, inclusive bebidas, águas envasadas, seus insumos, suas embalagens, aditivos alimentares, limites de contaminantes orgânicos, resíduos de agrotóxicos e de medicamentos veterinários entre os bens e produtos submetidos ao controle e à fiscalização sanitária pela Agência, adota a seguinte Resolução de Diretoria Colegiada e eu, Diretor-Presidente, determino a sua publicação:

Art. 1º Fica aprovado o Regulamento Técnico sobre Alimentos para Atletas, nos termos desta Resolução.

### **CAPÍTULO I DAS DISPOSIÇÕES INICIAIS**

#### **Seção I Objetivo**

Art. 2º Este regulamento tem o objetivo de estabelecer a classificação, a designação, os requisitos de composição e de rotulagem dos alimentos para atletas.

## **Seção II**

### **Abrangência**

Art. 3º Este regulamento se aplica aos alimentos especialmente formulados para auxiliar os atletas a atender suas necessidades nutricionais específicas e auxiliar no desempenho do exercício.

Parágrafo único. Este regulamento não abrange:

- I - substâncias estimulantes, hormônios ou outras consideradas como “doping” contidas na lista de substâncias proibidas pela Agência Mundial Antidoping (WADA) e ou legislação pertinente;
- II - substâncias com ação ou finalidade terapêutica ou medicamentosa, incluindo produtos fitoterápicos, bem como suas associações com nutrientes ou não nutrientes.

## **Seção III**

### **Definições**

Art. 4º Para efeito deste regulamento são adotadas as seguintes definições:

- I - atletas: praticantes de exercício físico com especialização e desempenho máximos com o objetivo de participação em esporte com esforço muscular intenso;
- II - suplemento hidroeletrólítico para atletas: produto destinado a auxiliar a hidratação;
- III - suplemento energético para atletas: produto destinado a complementar as necessidades energéticas;
- IV - suplemento protéico para atletas: produto destinado a complementar as necessidades protéicas;
- V - suplemento para substituição parcial de refeições de atletas: produto destinado a complementar as refeições de atletas em situações nas quais o acesso a alimentos que compõem a alimentação habitual seja restrito;
- VI - suplemento de creatina para atletas: produto destinado a complementar os estoques endógenos de creatina;
- VII - suplemento de cafeína para atletas: produto destinado a aumentar a resistência aeróbia em exercícios físicos de longa duração;

VIII - PDCAAS (Protein Digestibility Corrected Amino Acid Score): escore aminoacídico corrigido pela digestibilidade da proteína para a determinação de sua qualidade biológica.

## **CAPÍTULO II DA CLASSIFICAÇÃO E DESIGNAÇÃO**

Art. 5º É adotada a seguinte classificação para os produtos abrangidos por este regulamento:

- I - suplemento hidroeletrólítico para atletas;
- II - suplemento energético para atletas;
- III - suplemento protéico para atletas;
- IV - suplemento para substituição parcial de refeições de atletas;
- V - suplemento de creatina para atletas;
- VI - suplemento de cafeína para atletas.

Parágrafo único. Os produtos devem ser designados conforme classificação definida neste artigo.

## **CAPÍTULO III DOS REQUISITOS ESPECÍFICOS**

Art. 6º Os suplementos hidroeletrólíticos para atletas devem atender aos seguintes requisitos:

- I - a concentração de sódio no produto pronto para consumo deve estar entre 460 e 1150 mg/l, devendo ser utilizados sais inorgânicos para fins alimentícios como fonte de sódio;
- II - a osmolalidade do produto pronto para consumo deve ser inferior a 330 mOsm/kg água;
- III - os carboidratos podem constituir até 8% (m/v) do produto pronto para consumo;
- IV - o produto pode ser adicionado de vitaminas e minerais, conforme Regulamento Técnico específico sobre adição de nutrientes essenciais;
- V - o produto pode ser adicionado de potássio em até 700 mg/l;
- VI - o produto não pode ser adicionado de outros nutrientes e não nutrientes;

VII - o produto não pode ser adicionado de fibras alimentares.

§1º. Quanto ao tipo de carboidratos, referente ao inciso III, este produto não pode ser adicionado de amidos e polióis.

§2º. Com relação ao teor de carboidratos, constante do inciso III, o teor de frutose, quando adicionada, não pode ser superior a 3% (m/v) do produto pronto para o consumo.

Art. 7º Os suplementos energéticos para atletas devem atender aos seguintes requisitos:

I - o produto pronto para consumo deve conter, no mínimo, 75% do valor energético total proveniente dos carboidratos;

II - a quantidade de carboidratos deve ser de, no mínimo, 15 g na porção do produto pronto para consumo;

III - este produto pode ser adicionado de vitaminas e minerais, conforme Regulamento Técnico específico sobre adição de nutrientes essenciais;

IV - este produto pode conter lipídios, proteínas intactas e ou parcialmente hidrolisadas;

V - este produto não pode ser adicionado de fibras alimentares e de não nutrientes.

Art. 8º Os suplementos protéicos para atletas devem atender aos seguintes requisitos:

I - o produto pronto para consumo deve conter, no mínimo, 10 g de proteína na porção;

II - o produto pronto para consumo deve conter, no mínimo, 50% do valor energético total proveniente das proteínas;

III - este produto pode ser adicionado de vitaminas e minerais, conforme Regulamento Técnico específico sobre adição de nutrientes essenciais;

IV - este produto não pode ser adicionado de fibras alimentares e de não nutrientes.

§1º. Quanto ao requisito de proteínas, referente ao inciso II, a composição protéica do produto deve apresentar PDCAAS acima de 0,9.

§2º. A determinação do PDCAAS deve estar de acordo com a metodologia de avaliação recomendada pela Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação/Organização Mundial da Saúde (FAO/WHO).

Art. 9º Os suplementos para substituição parcial de refeições de atletas devem conter concentrações variadas de macronutrientes, obedecendo aos seguintes requisitos:

I - a quantidade de carboidratos deve corresponder a 50-70% do valor energético total do produto pronto para consumo;

II - a quantidade de proteínas deve corresponder a 13-20% do valor energético total do produto pronto para consumo;

III - a quantidade de lipídios deve corresponder, no máximo, a 30% do valor energético total do produto pronto para consumo;

IV - os teores de gorduras saturadas e gorduras trans não podem ultrapassar 10% e 1% do valor energético total, respectivamente;

V - este produto deve fornecer, no mínimo, 300 kcal por porção; VI - este produto pode ser adicionado de vitaminas e minerais, conforme Regulamento Técnico específico sobre adição de nutrientes essenciais;

VII - este produto pode ser adicionado de fibras alimentares.

§1º. Quanto ao requisito de proteínas, referente ao inciso II, a composição protéica do produto deve apresentar PDCAAS acima de 0,9.

§2º. A determinação do PDCAAS deve estar de acordo com a metodologia de avaliação recomendada pela Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação/Organização Mundial da Saúde (FAO/WHO).

Art. 10. Os suplementos de creatina para atletas devem atender aos seguintes requisitos:

I - o produto pronto para consumo deve conter de 1,5 a 3 g de creatina na porção;

II - deve ser utilizada na formulação do produto creatina monoidratada com grau de pureza mínima de 99,9%.

III - este produto pode ser adicionado de carboidratos;

IV - este produto não pode ser adicionado de fibras alimentares.

Art. 11. Os suplementos de cafeína para atletas devem atender aos seguintes requisitos:

I - o produto deve fornecer entre 210 e 420 mg de cafeína na porção;



II - deve ser utilizada na formulação do produto cafeína com teor mínimo de 98,5% de 1,3,7- trimetilxantina, calculada sobre a base anidra;

III - o produto não pode ser adicionado de nutrientes e de outros não nutrientes.

Art. 12. Outras substâncias podem ser autorizadas pela Anvisa desde que a segurança de uso, conforme Regulamento Técnico específico, e a eficácia da finalidade de uso para atendimento das necessidades nutricionais específicas e de desempenho no exercício sejam cientificamente comprovadas.

#### **CAPÍTULO IV DOS REQUISITOS GERAIS**

Art. 13. Os produtos devem atender aos Regulamentos Técnicos, e outras normas pertinentes:

I - de aditivos alimentares e coadjuvantes de tecnologia de fabricação;

II - de contaminantes;

III - de características macroscópicas, microscópicas e microbiológicas;

IV - de rotulagem geral de alimentos embalados;

V - de rotulagem nutricional de alimentos embalados;

VI - de embalagens e equipamentos;

VII - de informação nutricional complementar, quando houver.

Parágrafo único. É permitido o uso dos aditivos alimentares e coadjuvantes de tecnologia previstos para os alimentos similares quanto à composição e forma de apresentação, desde que atendam às restrições e exigências constantes nos Regulamentos Técnicos pertinentes e não alterem a finalidade do produto.

Art. 14. Os ingredientes utilizados devem ser seguros para o consumo humano. A adição de ingredientes que não são utilizados tradicionalmente como alimento pode ser autorizada desde que seja comprovada a segurança de uso em atendimento a Regulamento Técnico específico.

Art. 15. Os produtos previstos no art. 5º podem ser comercializados em conjunto, desde que atendam aos requisitos de designação, específicos, gerais e de rotulagem constantes deste regulamento.

Art. 16. Os produtos abrangidos por este regulamento somente podem ser vendidos em unidades pré- embaladas na ausência do cliente e prontos para oferta ao consumidor.

Art.17. Para atendimento aos requisitos específicos previstos nos arts. 6º ao 12, devem ser considerados os ingredientes provenientes do produto exposto à venda, sem considerar os nutrientes contidos nos ingredientes utilizados na preparação, quando for o caso. Parágrafo único. Este artigo não se aplica ao disposto no inciso II do art. 6º.

Art. 18. Os produtos previstos no art. 5º podem ser comercializados em diferentes formas de apresentação, como tablete, comprimido, pó, gel, líquido, cápsula, barra, dentre outras, desde que atendam aos requisitos específicos estabelecidos nos arts. 6º ao 12.

Art. 19. A empresa deve dispor da documentação referente ao atendimento dos requisitos previstos neste regulamento para consulta da autoridade competente.

## **CAPÍTULO V DA ROTULAGEM**

Art. 20. O tamanho da fonte utilizada para designação do produto deve ser no mínimo 1/3 do tamanho da fonte utilizada na marca.

Art. 21. Nos rótulos de todos os produtos previstos neste regulamento deve constar a seguinte frase em destaque e negrito: “Este produto não substitui uma alimentação equilibrada e seu consumo deve ser orientado por nutricionista ou médico”.

Art. 22. Adicionalmente ao disposto no art. 21, nos rótulos de suplementos hidroeletrólíticos para atletas, pode constar a expressão:

I - “isotônico” para os produtos prontos para o consumo com osmolalidade entre 270 e 330 mOsm/kg água;

II - “hipotônico” para os produtos prontos para o consumo com osmolalidade abaixo de 270 mOsm/kg água.

Art. 23. Adicionalmente ao disposto no art. 21, nos rótulos de suplementos de creatina para atletas devem constar as seguintes advertências em destaque e negrito:

I - “O consumo de creatina acima de 3g ao dia pode ser prejudicial à saúde”;

II - “Este produto não deve ser consumido por crianças, gestantes, idosos e portadores de enfermidades”.

Parágrafo único. A quantidade de creatina na porção deve ser declarada no rótulo do produto.

Art. 24. Adicionalmente ao disposto no art. 21, nos rótulos de suplementos de cafeína para atletas deve constar a advertência em destaque e negrito: “Este produto não deve ser consumido por crianças, gestantes, idosos e portadores de enfermidades”.

Parágrafo único. A quantidade de cafeína na porção deve ser declarada no rótulo do produto.

Art. 25. A rotulagem nutricional deve atender ao disposto em Regulamento Técnico específico com base na porção definida pelo fabricante.

Art. 26. Na rotulagem dos produtos comercializados em conjunto conforme previsto no art. 15 devem constar:

I - a designação de cada produto, conforme as classificações individuais previstas no art. 4º, de acordo com os produtos que os compõem;

II - a lista de ingredientes de cada produto;

III - o número de registro de cada produto;

IV - o prazo de validade correspondente ao do produto com menor prazo;

V - a informação nutricional de cada produto.

Art. 27. Nos rótulos dos produtos não podem constar:

I - imagens e ou expressões que induzam o consumidor a engano quanto a propriedades e ou efeitos que não possuam ou não possam ser demonstrados referentes a perda de peso, ganho ou definição de massa muscular e similares;

II - imagens e ou expressões que façam referências a hormônios e outras substâncias farmacológicas e ou do metabolismo;

III - as expressões: "anabolizantes", "hipertrofia muscular", "massa muscular", "queima de gorduras", "fat burners", "aumento da capacidade sexual", "anticatabólico", "anabólico", equivalentes ou similares.

## **CAPÍTULO VI DAS DISPOSIÇÕES FINAIS E TRANSITÓRIAS**

Art. 28. As empresas abrangidas por esta Resolução terão o prazo de 18 (dezoito) meses contados a partir da data de sua publicação para promover as adequações necessárias de seus produtos ao presente Regulamento Técnico, ficando proibida a comercialização dos produtos não adequados após o término do prazo.

§1º. A partir da publicação desta Resolução, os novos produtos devem atender na íntegra às exigências contidas neste regulamento.

§2º. Os processos de pedido de registro, além de suas petições secundárias, que se encontram na Anvisa ou nos órgãos de vigilância sanitária estaduais, distrital e municipais devem passar por exigência técnica para adequação a norma vigente.

Art. 29. Os aminoácidos de cadeia ramificada ficam temporariamente dispensados da obrigatoriedade de registro, e podem ser comercializados, enquanto não contemplados em regulamentação específica, obedecidos os seguintes requisitos:

I - cumprir os procedimentos previstos na Resolução n. 23 de 15 de março de 2000 e suas atualizações para produtos dispensados de registro;

II - não ser indicados para atletas e não conter indicação de uso para atletas na designação, rotulagem e qualquer que seja o material promocional do produto;

III - utilizar a designação Aminoácidos de Cadeia Ramificada;

IV - cumprir as exigências estabelecidas nos itens 4.3.5; 9.1.2.2; 5; 6; 7; e, Anexo B da Portaria SVS/MS n. 222/1998.

Parágrafo único. Os produtos com registros atualmente vigentes terão o prazo de 18 (dezoito) meses para se adequarem aos requisitos acima.

Art. 30. O descumprimento das disposições contidas nesta Resolução e no regulamento por ela aprovado constitui infração sanitária, nos termos da Lei nº 6.437, de 20 de agosto de 1977, sem prejuízo das responsabilidades civil, administrativa e penal cabíveis.

Art. 31. Fica revogada a Portaria SVS/MS n. 222, de 24 de março de 1998, à exceção dos itens 4.3.5; 9.1.2.2; 5; 6; 7; e Anexo B no que se refere aos aminoácidos de cadeia ramificada.

Art. 32. Nos itens 2.2.2 e 4.2.2 do Anexo da Portaria n. 29, de 13 de janeiro de 1998 e no Anexo II da Resolução RDC n. 278, de 22 de setembro de 2005, onde se lê “alimentos para praticantes de atividade física” leia-se “alimentos para atletas”.

Art. 33. Esta Resolução entra em vigor na data de sua publicação.

**DIRCEU RAPOSO DE MELLO**