



VALIDAÇÃO DE MÉTODO PARA QUANTIFICAÇÃO DE METASTERONA EM SUPLEMENTOS NUTRICIONAIS

Felipe Rodrigues Costa Vicente^a; Gustavo Luis de Paiva Anciens Ramos^{a,b};
Monica Costa Padilha^a; Renata Santana Lorenzo Raices^a

a Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro (IFRJ), Rio de Janeiro, Brasil.

b Faculdade de Farmácia – Universidade Federal Fluminense (UFF), Niterói, RJ

RESUMO

Os produtos comercializados como suplementos, tais como proteínas, carboidratos, lipídios, vitaminas e aminoácidos, devem ser utilizados para suprir nutrientes em indivíduos com carência alimentar ou para repor perdas nutricionais devido à intensa atividade física realizada por atletas de alto desempenho ou praticantes de determinado esporte. Com o aumento do consumo de suplementos, observa-se que diversas marcas são vendidas livremente, principalmente pela internet, sem o controle de órgãos fiscalizadores sobre o conteúdo apresentado no rótulo ou sobre a presença de substâncias proibidas no meio esportivo. O objetivo deste trabalho foi identificar e quantificar esteroides anabolizantes em suplementos nutricionais adquiridos em sites especializados e no comércio da cidade do Rio de Janeiro. Foram analisadas 10 marcas de suplementos. As amostras foram previamente tratadas e analisadas por cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas (CG-EM/EM) seguindo o método de triagem utilizado no controle de dopagem do Laboratório Brasileiro de Controle de Dopagem (LBCD) para a identificação de 162 compostos entre anabolizantes e metabólitos em urina de atletas. A presença do anabolizante metasterona foi identificada em uma das marcas analisadas. A concentração da metasterona quantificada pelo método analítico desenvolvido neste trabalho foi de 1870 ng mL⁻¹. O procedimento foi validado de acordo com o documento orientativo do INMETRO (DOQ CGCRE 008).

Palavras-chave: Suplemento nutricional; Metasterona; Validação; Cromatografia a gás



1. INTRODUÇÃO

O uso dos chamados agentes ergogênicos, substâncias ou artifícios que visam melhorar o desempenho físico ou ocupacional e retardar a fadiga física e mental (Biesek et al., 2015), tem se tornado cada vez mais frequentes entre os praticantes de esportes de alto rendimento e até mesmo nas academias de ginástica e musculação (Carvalho, 2003; Abbate et al., 2015). Este fato é preocupante no que diz respeito ao uso indiscriminado de suplementos nutricionais com finalidades estéticas, como também ao combate à dopagem de atletas (Biesek et al., 2015).

Os suplementos nutricionais são denominados agentes ergogênicos nutricionais e são utilizados por atletas profissionais, amadores, frequentadores de academias de ginástica e de musculação e até mesmo por indivíduos que não praticam atividades físicas com frequência. A maioria das pessoas consome esses produtos por conta própria, sem a consulta de um médico ou nutricionista (Marchioro, 2015).

A indústria brasileira de suplementos nutricionais vem crescendo consideravelmente nos últimos sete anos, faturando um montante de aproximadamente 7,44 bilhões de reais. Diversos fatores estão relacionados a este crescimento, tais como: lançamento de novos produtos, inovação na fabricação, qualidade e segurança entre outros (Brasnutri, 2016).

Nem sempre os suplementos estão livres de substâncias não desejadas como: metais traço, micro-organismos, espécies botânicas e até mesmo esteroides anabolizantes, que é uma das classes de substâncias proibidas pelas organizações



esportivas (Van Poucke et al., 2007; Hans et al., 2008; Castanho et al., 2014; Neves e Caldas, 2015).

Segundo a Agência Mundial Antidopagem (AMA), configura-se doping o uso de substâncias proibidas, agentes ou métodos capazes de alterar o desempenho do atleta. Existem estudos que indicam que alguns suplementos não contêm o que está descrito em seus rótulos, mas eventualmente possuem em sua formulação hormônios como metasterona, metandienona, estanozolol, androstenodiona, boldenona, oxandrolona, dehidroclorometiltestosterona, etc. Substâncias estimulantes também foram encontradas, tais como cafeína, efedrina, pseudoefedrina, metilefedrina e sibutramina. Além de uma substância vasodilatadora presente em medicamento destinado à pacientes asmáticos, o clenbuterol. Um fato preocupante é que alguns desses suplementos eram comercializados como vitamínicos e minerais (Geyer et al., 2008).

A presença de esteroides anabolizantes em suplementos nutricionais é preocupante no ponto de vista da saúde dos usuários desses produtos, assim como na ética esportiva, uma vez que o uso de esteroides anabolizantes caracteriza o doping. Existem muitos esteroides que são comercializados livremente em países como nos Estados Unidos, na forma de “suplementos nutricionais”. A comercialização de esteroides anabolizantes na forma de “suplementos nutricionais” gera dúvida por parte dos consumidores, uma vez que esses produtos são vendidos como anabolizantes com baixos efeitos colaterais ou até mesmo como “esteroides naturais”. A propaganda desses suplementos na internet apresenta produtos que sugerem resultados fantásticos como a perda de peso, o ganho de massa muscular e baixo efeito colateral.



No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), proíbe o consumo e a comercialização de anabolizantes. O uso dessas substâncias só é permitido com a prescrição e acompanhamento médico.

Entre os esteroides que são vendidos como suplementos nutricionais, comercializados principalmente pela internet, a metasterona (Figura 1) é classificada como um esteroide projetado, ou seja, substância sintética, tendo como base a testosterona, que sofre modificações estruturais com o objetivo de alterar a ação nos tecidos alvos (Parr et al., 2006; Geyer et al., 2008).

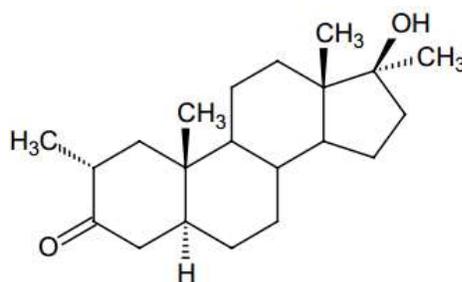


Figura 1 – Estrutura da metasterona

A partir de 2006, assim como outros esteroides, a metasterona passou a fazer parte da lista de substâncias proibidas pela Agência Mundial Antidopagem (AMA) (Padilha, 2007). Este esteroide já foi encontrado em muitos suplementos e a partir do estudo de excreção após sua administração. A determinação de esteroides anabolizantes em suplementos nutricionais por cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas (CG-EM) é de grande importância para o controle de



qualidade destes produtos. (Abbate et al., 2015; Castanho et al., 2014; Neves e Caldas, 2015).

Estima-se que 54% dos brasileiros tomam algum tipo de suplemento, o que chama atenção para o consumo desnecessário e exagerado destas substâncias. Avaliar a qualidade destes produtos é imprescindível para saúde da população consumidora dos ergogênicos nutricionais (Veja, 2015).

Este estudo tem como objetivo geral identificar e quantificar o esteroide anabolizante metasterona em diferentes suplementos nutricionais adquiridos em sites especializados e no comércio da cidade do Rio de Janeiro por cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas em série, desenvolvendo e validando o método de quantificação desta substância identificada no suplemento nutricional seguindo o documento de orientação sobre validação de métodos de ensaios químicos, DOQ-CGCRE-008, do INMETRO.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Preparo de soluções

A solução padrão estoque de metasterona foi preparada na concentração de 1,000 mg mL⁻¹ em metanol grau pesticida, a partir do padrão de referência. A solução foi armazenada em frasco de vidro âmbar com tampa e mantida sob refrigeração a – 20 °C, com validade de 3 anos. A partir desta, preparou-se uma solução padrão diluída 10 ng µL⁻¹. Para o preparo da solução de padrão interno, foi utilizado um padrão interno de metiltestosterona na concentração de 20 ng µL⁻¹.

Para o preparo da solução derivatizante, uma solução inicial foi executada em um frasco de vidro âmbar com tampa, com 20,00 mg de NH₄I, 1 mL de MSTFA e 60



μL de 2-mercaptoetanol. A solução de uso foi feita transferindo-se 1 mL da solução anterior e adicionados 9 mL de MSTFA. A solução derivatizante de uso possui validade de 7 dias.

Os brancos de amostra são suplementos nutricionais que foram produzidos em um laboratório de manipulação. Foram manipuladas 15 amostras contendo os mesmos excipientes presentes na cápsula dos suplementos analisados. As 15 amostras foram previamente analisadas e não apresentaram nenhuma substância anabolizante ou qualquer outra substância considerada interferente frente aos analitos monitorados no método de triagem de agentes dopantes em urina utilizada no LBCD.

O preparo dos brancos de amostras foi realizado da seguinte forma: uma cápsula de cada branco de amostra foi transferida quantitativamente para um tubo de ensaio de vidro com tampa, em seguida solubilizada em 5 mL de metanol grau de pureza pesticida e homogeneizado por 20 segundos. Logo após, os tubos contendo as amostras foram levados ao agitador por 5 minutos e centrifugados por 5 minutos a uma força gravitacional de 1512 g. A fração metanólica foi transferida para um novo tubo de ensaio e uma alíquota de 1 mL de cada branco de amostra foi retirada e transferida para um outro tubo de ensaio para serem utilizadas no processo de validação.

Método de análise de agentes dopantes em urina por CG-EM/EM

As amostras dos suplementos nutricionais foram analisadas através do método de análise de agentes dopantes em urina humana, denominado método de triagem utilizado na rotina do LBCD. Este método é validado de acordo com as normas do INMETRO e da AMA.



Em urina, o preparo da amostra consiste na fortificação com padrão interno, hidrólise enzimática com β -glicuronidase de *Escherichia coli*, extração líquido-líquido (ELL) dos compostos livres com o solvente terc-butil metil éter em meio alcalino, (pH 9-10) e evaporação do extrato etéreo até a secura. O resíduo final é derivatizado e analisado por CG-EM/EM utilizando o modo de detecção de monitoramento de reações múltiplas.

A solução de padrão interno utilizada no método de triagem (em urina humana) é uma mistura de padrões deuterados denominada de ISTD2. Essa solução é constituída dos seguintes padrões: epitestosterona-D3 ($0,75 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$), testosterona-D3 ($3,0 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$), etiocolanolona-D5 ($25 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$), androsterona glicuronídeo-D4 ($25 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$), 5 alfa-androstanodiol ($4 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$) e 5 beta-androstanodiol ($9 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$).

Controles de qualidade são utilizados no método de detecção de anabolizantes em urina humana. O controle de qualidade de alta concentração (CQA) dos esteróides endógenos é o controle positivo de substâncias exógenas. O controle de qualidade negativo (CQN) para as substâncias exógenas é preparado a partir de um branco de urina masculina. Antes de ser utilizado na rotina, o CQN é avaliado quanto à presença de substâncias proibidas monitoradas pelo método de triagem. Um calibrante de esteróides endógenos denominado CALEndo também é utilizado no método (LBCD, 2017). O método de análise de agentes dopantes por CG-EM/EM em urina humana monitora 162 substâncias.

Preparo das amostras de suplementos nutricionais

Na Figura 2 está apresentado o fluxograma com as etapas do processo de preparação das amostras.

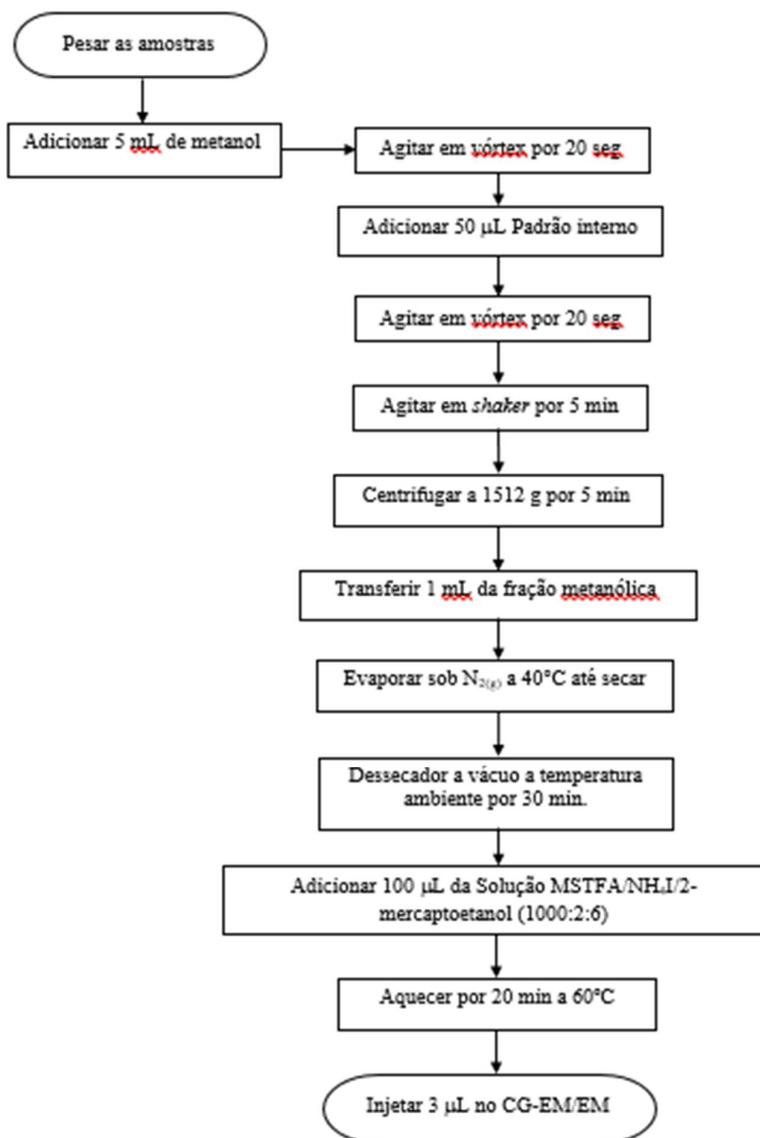


Figura 2 - Fluxograma das etapas do preparo das amostras

Protocolo de validação para análise quantitativa

O protocolo de validação de métodos para análise quantitativa envolve uma série de experimentos. Os procedimentos foram realizados em dois dias consecutivos onde foram avaliados os seguintes parâmetros: especificidade, efeito de matriz,



linearidade, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), exatidão, repetitividade, precisão intermediária e robustez.

Foram preparadas quatro curvas analíticas. A curva analítica 1 foi preparada em solvente (metanol) e as curvas analíticas 2, 3 e 4 foram preparadas em branco de amostra. No preparo da curva analítica 1, os tubos foram submetidos a evaporação sob fluxo de $N_2(g)$ a 40 °C por 10 minutos até a secura. Em seguida, foram para o dessecador e mantidos por 30 minutos. A derivatização se deu com a adição de 100 μL de solução derivatizante composta de MSTFA/ NH_4I /2-mercaptoetanol (1000:2:6, v:p:v) e submetidas ao aquecimento a 60 °C por 20 minutos por meio de um banho seco. A análise foi realizada no CG-EM/EM no modo MRM. As curvas analíticas 2, 3 e 4 foram preparadas a partir dos brancos de amostra, com base no mesmo processo descrito no parágrafo anterior, ou seja, evaporação, derivatização e análise no CG-EM/EM no modo MRM.

A avaliação da especificidade foi realizada a partir da comparação do branco de amostra sem a presença do analito (metasterona) e do padrão interno (metiltestosterona), com um branco de amostra contendo o analito e o padrão interno. Para isso, foram analisados cinco brancos de amostra sem a adição do analito e do padrão interno e um branco de amostra contendo o analito na concentração de 750 $ng\ mL^{-1}$ e o padrão interno a 250 $ng\ mL^{-1}$. A fortificação com a solução padrão de metasterona foi realizada com a adição de 75 μL da solução de uso e 25 μL de metiltestosterona em 1000 μL de BA, prosseguindo-se com o mesmo procedimento empregado nas curvas analíticas.

O estudo de efeito de matriz foi realizado a partir da preparação de duas curvas analíticas. Uma curva em triplicata com cinco níveis de concentração preparada em



metanol (curva analítica 1) e outra com seis níveis de concentração preparada em branco de amostra (matriz). As leituras das curvas analíticas foram comparadas a fim de verificar se a matriz causaria interferência, aumentando ou diminuindo o sinal do analito. Para a verificação da existência de valores aberrantes (*outliers*) foi empregado o teste de Grubbs, considerando-se a média e o desvio padrão de cada nível da curva de calibração. O teste F (Snedecor) de homogeneidade das variâncias por nível de concentração foi realizado para a avaliação do efeito de matriz.

A linearidade não pode ser avaliada apenas pela análise da curva de calibração. Antes da regressão linear, foi verificada a ausência de valores aberrantes e a homocedasticidade dos dados. As curvas analíticas foram construídas utilizando o método dos mínimos quadrados ordinários, obtendo a faixa de trabalho, as equações da reta e os coeficientes de correlação (r) e determinação (R^2). Foi realizado o teste de Cochran para verificar a homocedasticidade das curvas analíticas.

Para determinar os limites de quantificação (LQ) e de detecção (LD), os cálculos foram realizados a partir da média dos coeficientes angulares das três curvas analíticas preparadas em matriz (curvas 1, 3 e 4).

A avaliação da exatidão foi realizada pelo estudo da recuperação, repetitividade e precisão intermediária. No ensaio de recuperação e repetitividade do analito, foram analisados dez brancos de amostra fortificados com o padrão de metasterona (concentração final de 1000 ng mL^{-1}) e metiltestosterona na concentração de 250 ng mL^{-1} . Para a avaliação da repetitividade, o critério de aceitação adotado foi o coeficiente de variação (CV) inferior a 11 % (AOAC, 2016).

No estudo da precisão intermediária, foram analisados dez brancos de amostra fortificados com metasterona a 1000 ng mL^{-1} e metiltestosterona a 250 ng mL^{-1} em



um dia subsequente ao estudo de recuperação e repetitividade e executado por um analista diferente.

A avaliação da robustez foi realizada através da análise de três brancos de amostra fortificados com o analito a 1000 ng mL^{-1} e padrão interno a 250 ng mL^{-1} , seguindo-se o mesmo procedimento executado nas curvas analíticas. Outro conjunto de três brancos de amostra foi fortificado com o analito e padrão interno e preparado de acordo com a descrição acima, com uma modificação analítica: o tempo de derivatização. Na referida etapa, as amostras foram submetidas ao aquecimento a $60 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 40 minutos por meio do banho seco. As amostras foram transferidas com pipeta Pasteur para um tubo vial e o volume de $1 \text{ } \mu\text{L}$ foi injetado no CG-EM/EM no modo MRM.

As condições cromatográficas do método de quantificação de metasterona em suplemento nutricional estão descritas na Tabela 1.

Tabela 1 – Condições cromatográficas do método de quantificação de metasterona em suplemento nutricional

Instrumento: CG-EM/EM – Método de quantificação de metasterona em suplemento	
Coluna analítica	
Tipo	Capilar, 100% polimetilsiloxano (Ultra-1®), 17 m x 0.2 mm x 0.11 μm ; <i>J&WScientific, Agilent Technologies Inc.</i>
Gás carreador	Hélio (ultrapuro 99,9999%)
Pressão	9,453 psi
Modo de pressão	Fluxo constante
Fluxo nominal	0,6 mL/min.



<i>Liner</i>	Com divisão de fluxo, 4 mm D.I. c/ lâ de vidro silanizada.
Modo de injeção	Pulsado com divisor de fluxo (<i>"Pulsed Split"</i>)
Divisor de fluxo	10:1
Pressão de pulso	50 psi
Tempo de pulso	0,3 min.
Septo	Septo de sangramento baixo
Temperatura do injetor	280 °C
Volume de injeção	1 µL
Programa de temperatura	
Temperatura inicial	140 °C
Tempo	0 min
Razão 1	40 °C/min
Temperatura	180 °C
Razão 2	3 °C/min
Temperatura	230 °C
Razão 3	40 °C/min
Temperatura final	300 °C
Tempo final	2 min
Tempo total de corrida	21,42 min
Tamanho da seringa	10 µL
Solvente A	Acetona
Solvente B	Acetato de etila
Parâmetros EM:	
Tipo de ionização	Ionização eletrônica 70 eV

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Análise dos suplementos nutricionais

A avaliação do resultado foi feita a partir da comparação dos cromatogramas de íons da janela de aquisição do analito na amostra com o controle de qualidade negativo (CQN) e o controle de qualidade positivo (CQA). O tempo de retenção do padrão interno utilizado no método de triagem (testosterona-D3) não diferiu em +/- 0,3 minutos do valor esperado, assim como a sua abundância. Os cromatogramas do CQA, do "suplemento B" e do padrão interno (testosterona-D3) encontram-se nas Figuras 3 e 4, respectivamente.

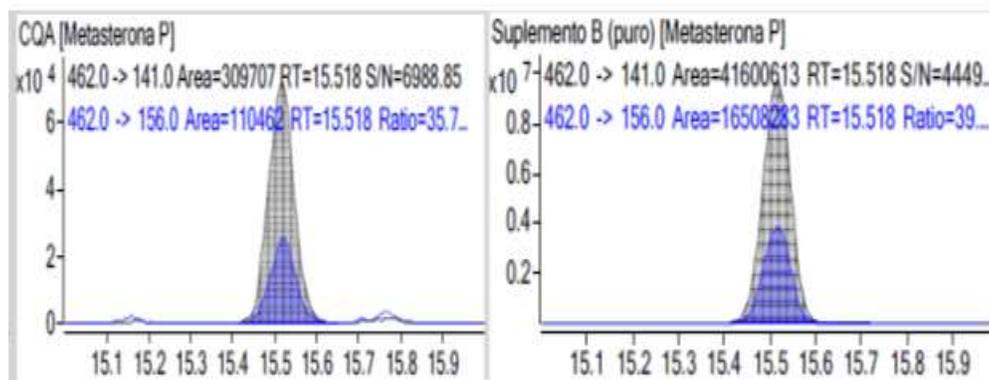


Figura 3 – Cromatogramas do CQA e do "suplemento B"

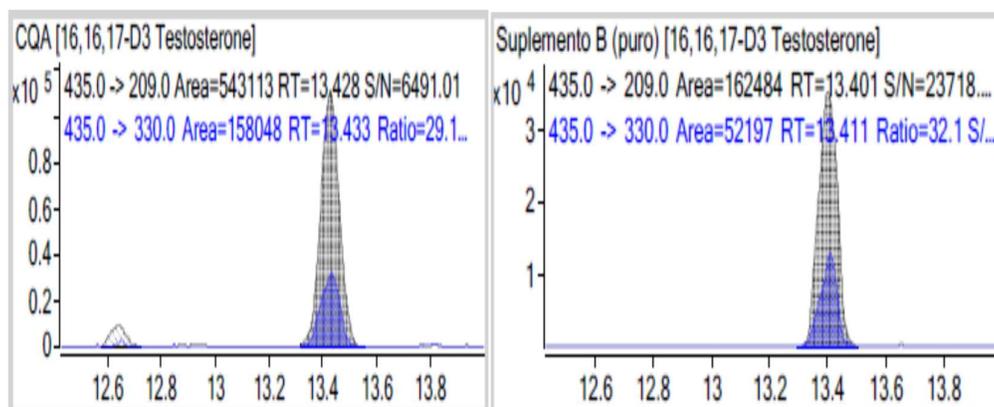


Figura 4 – Cromatogramas do CQA e do suplemento B" com padrão interno

Das dez amostras analisadas por CG-EM/EM utilizando o método de monitoramento de análise de agentes dopantes, apenas uma amostra (“suplemento B”) foi detectada a presença do anabolizante metasterona. No rótulo do “suplemento B” está descrito que cada cápsula contém 10 mg de metasterona. O espectro de massa do derivado trimetilsilila (OTMS) da metasterona detectado na cápsula do “suplemento B” está apresentado na Figura 5.

O íon molecular em m/z 462 está de acordo com a massa esperada para o derivado OTMS da metasterona e a fragmentação do anel D leva à formação do íon m/z 143 o que é característico da fragmentação de esteroides 17-metil,17-hidroxilados (Fragkaki et al., 2009) além do íon m/z 332 o qual também é proveniente da fragmentação do anel D. O íon m/z 73 é um fragmento presente em derivados TMS.

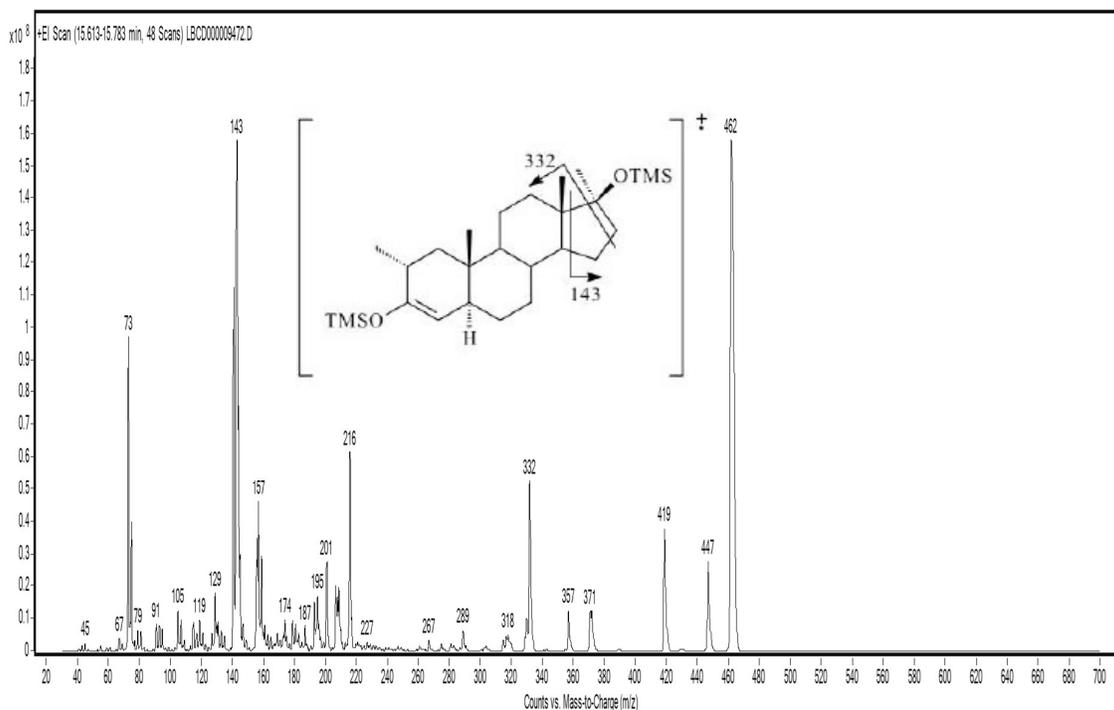


Figura 5 – Espectro de massas da metasterona presente no “suplemento B”



Validação quantitativa do método analítico

Especificidade / Efeito de matriz

Após a análise dos cromatogramas não foram detectados sinais interferentes no tempo de retenção da metasterona (tR 15,62 minutos). Através do teste de Grubbs foi verificado que não houve valor discrepante nas leituras das duas curvas analíticas.

O teste F (Snedecor) de homogeneidade das variâncias por nível de concentração foi realizado para a avaliação do efeito de matriz, indicando que as variâncias residuais das curvas analíticas preparadas em solvente e matriz são estatisticamente diferentes.

Linearidade

Após o cálculo de verificação de outliers, foi realizado o teste de Cochran para verificar a homocedasticidade das curvas analíticas, verificando-se que os valores do $C_{\text{calculado}}$ são menores que o C_{tabelado} . Sendo assim, pode-se dizer que tanto a curva preparada em matriz quanto a curva em solvente apresentam comportamento homocedástico.

As Figuras 6 e 7 mostram as curvas 1 e 2, seus coeficientes de correlação e as respectivas equações da reta.

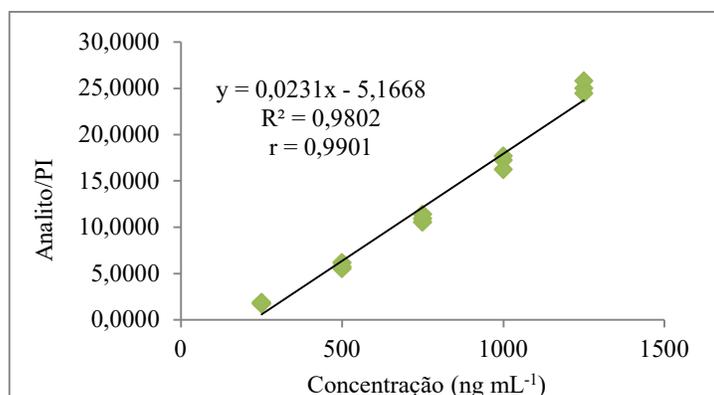


Figura 6 – Curva analítica 1 (em solvente)

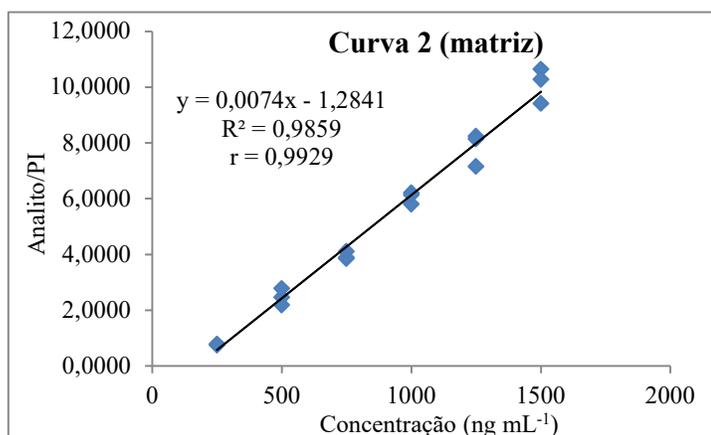


Figura 7 – Curva analítica 1 (em matriz)

Os coeficientes de correlação linear (r) para as duas curvas foram maiores que 0,99. Conforme os dados adquiridos das curvas analíticas, equações da reta, r e R^2 , concluiu-se que o modelo de regressão linear utilizado no método foi satisfatório.

Os resíduos (diferença entre o valor observado e o valor calculado pela equação da reta para cada valor de x) estão ilustrados na Figura 8, observando-se um comportamento aleatório, não havendo nenhum tipo de tendência, demonstrando que o modelo linear é adequado.

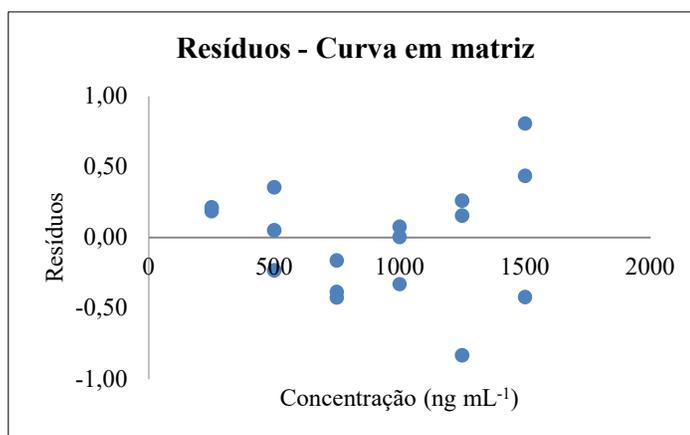


Figura 8 – Gráfico de resíduos da curva em matriz



Limites de detecção e quantificação

Os valores de LD e LQ estimados encontram-se na Tabela 2. Para a quantificação de metasterona em suplemento nutricional, o LD e LQ estão dentro da faixa de trabalho do método.

Tabela 2 – Resultados do LD e LQ estimados para metasterona (ng mL^{-1}).

Faixa de trabalho (ng mL^{-1}) 1)	LD (ng mL^{-1})	LQ (ng mL^{-1})
250 - 1500	53,75	162,88

Exatidão

A avaliação da exatidão foi realizada pelo estudo da recuperação, repetitividade e precisão intermediária. O valor de recuperação calculado foi de 103 %, valor dentro da faixa de aceitação estabelecido pela AOAC. Para a avaliação da repetitividade, o critério de aceitação adotado foi o coeficiente de variação (CV) inferior a 11 % (AOAC, 2016). Pelo teste de Grubbs, observa-se que não há valores *outliers*.

No estudo da precisão intermediária, foram analisados dez brancos de amostra fortificados com metasterona a 1000 ng mL^{-1} e metiltestosterona a 250 ng mL^{-1} em um dia subsequente ao estudo de recuperação e repetitividade e executado por um analista diferente. Para a avaliação deste parâmetro, foi preparada uma curva analítica em matriz (curva analítica 3) com seis níveis de concentração em simplicata. Os coeficientes de determinação e correlação linear foram considerados satisfatórios, ou seja, foram superiores a 0,99. Também foi possível observar que há um comportamento aleatório no gráfico de resíduos, não havendo nenhum tipo de tendência dos valores. Com relação ao teste de Grubbs aplicado ao estudo de precisão



intermediária, não houve a presença de *outliers* na avaliação deste parâmetro de validação.

A concentração de metasterona foi lida na curva analítica 3 e o valor do coeficiente de variação (CV) foi inferior a 10 % o que foi considerado satisfatório. Não foram observadas diferenças relevantes nos dois dias da análise da exatidão. Os resultados podem ser visualizados na Tabela 3.

Tabela 3 – Resultados do estudo de precisão intermediária

Concentração (ng mL⁻¹)	Analito	PI	Analito/PI	Conc. Calculada (ng mL⁻¹)
1000	30845596	6198664	4,9762	995,35
1000	31640968	6883947	4,5963	931,43
1000	27498685	6057154	4,5399	921,93
1000	30063837	6920758	4,3440	888,97
1000	30047674	6670320	4,5047	916,01
1000	32437543	8353138	3,8833	811,43
1000	32611670	8148355	4,0022	831,45
1000	31462673	7663080	4,1057	848,87
1000	31179602	7511149	4,1511	856,51
1000	30528567	7129225	4,2822	878,56
Média Conc. Calculada (ng/mL)				888,05
Desvio Padrão				54,79
CV (%)				6,17

Robustez

O desvio padrão dos dois grupos de amostras não apresentou diferenças significativas. Os coeficientes de variação calculados ficaram abaixo de 10%, indicando que o método foi considerado robusto, como mostra a Tabela 4.



Tabela 4 – Resultados da avaliação da robustez

Controle de robustez	Média da concentração calculada	DP	CV
Condições normais	884,19 ng mL ⁻¹	22,06	2,50 %
Condições modificadas	861,33 ng mL ⁻¹	19,93	2,31 %

Quantificação da metasterona no suplemento

A quantificação do anabolizante metasterona presente no “suplemento B” foi realizada a partir da curva analítica 4 preparada em branco de amostra. A curva analítica preparada em triplicata apresentou comportamento homocedástico, coeficiente de correlação maior que 0,99 e o gráfico de resíduos indicou um comportamento aleatório, demonstrando que o modelo linear foi satisfatório (Figura 9). O teste de Grubbs por nível de concentração foi aplicado e nenhum valor aberrante foi detectado.

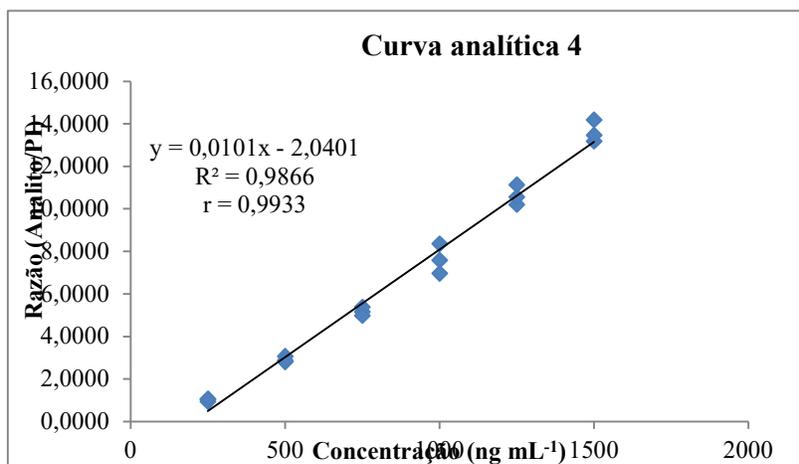


Figura 9 – Curva analítica 4

A partir da equação dos dados obtidos da equação da reta ($y = ax+b$), foi determinada a concentração de metasterona presente na cápsula do “suplemento B”.



A concentração calculada é de aproximadamente 1870 ng mL^{-1} . No rótulo do “suplemento B” está descrito que há uma quantidade de 10 mg de metasterona presente na cápsula. Considerando a concentração calculada a partir da curva analítica 4, é possível evidenciar que a quantidade em massa de metasterona é inferior a descrita no rótulo. De acordo com o método de quantificação, há 0,00935 mg de metasterona na cápsula analisada.

A metasterona não deveria estar presente no suplemento e tão pouco poderia ser comercializado no Brasil, uma vez que esta classe de substância é controlada pela ANVISA. Porém, esse tipo de suplemento é comercializado de forma livre, principalmente através de sites especializados em suplementos nutricionais e fitness. Esta é uma questão alarmante, pois expõe a falta de uma gestão governamental que controle a entrada dos suplementos nutricionais no Brasil.

4. CONCLUSÕES

Foi realizada uma análise qualitativa por CG-EM/EM utilizando um método de triagem já empregado na rotina de determinação de agentes dopantes do LBCD. Dentre os dez suplementos nutricionais adquiridos na cidade do Rio de Janeiro em apenas um foi identificado o anabolizante metasterona. O método de quantificação da metasterona na matriz de suplemento nutricional foi desenvolvido e validado tendo como base o documento de orientação sobre validação de métodos de ensaios químicos DOQ-CGCRE-008, do INMETRO. O procedimento analítico se mostrou simples, rápido, específico, com linearidade satisfatória, boa recuperação e preciso. A quantidade de metasterona presente na amostra analisada foi inferior à quantidade informada no rótulo do suplemento.



Conclui-se que o método proposto neste trabalho se mostrou satisfatório para a detecção e quantificação de metasterona em suplemento nutricional e que o mesmo pode ser desenvolvido para a quantificação de outros esteroides anabolizantes possivelmente presentes em suplementos nutricionais.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbate, V., Kicman, A. T., Evans-Brown, M., Mcveigh, J., Cowan, D. A., Wilson, C., Colesand, S. J., Walker, C. J. (2015). Anabolic steroids detected in bodybuilding dietary supplements—a significant risk to public health. *Drug Testing and Analysis*, 7(7): 609-618.

AOAC International. (2016). Official methods of analysis of AOAC International, in Guidelines for Standard Method Performance Requirements (Appendix F). Gaithersburg.

Biesek, S., Alves, L. A., Guerra, I. (2015). Estratégias de nutrição e suplementação no esporte. 3ª ed, Barueri, SP: Manole.

Brasnutri. (2016). Dados da Indústria de Suplementação – Panorama do Setor. Disponível em http://www.brasnutri.org.br/arquivos/numeros_setor/2017_atualizado.pdf

Carvalho, T. (2003). Modificações dietéticas, reposição hídrica, suplementos alimentares e drogas: comprovação de ação ergogênica e potenciais riscos para a saúde. *Revista Brasileira de Medicina do Esporte*, 9(2).

Castanho, G. K. F., Fontes, E. B., Fernandes, P. T. (2014). O perigo da contaminação de suplementos alimentares com substâncias ilícitas para os praticantes de exercício físico e esporte. *Revista da Faculdade de Educação Física da UNICAMP*, 12(1): 161-180.

Fragkaki, A. G., Angelis, Y. S., Tsantili-Kakoulidou, A., Koupparis, M., Georgakopoulos, C. (2009). Statistical analysis of fragmentation patterns of electron ionization mass



spectra of enolized trimethylsilylated anabolic androgenic steroids. *International Journal of Mass Spectrometry*, 285(1-2): 58-69.

Hans, G., Parr, M. K., Koehler, K., Mareck, U., Schanzer, W., Thevis, M. (2008). Nutritional supplements cross-contaminated and faked with doping substances. *Journal of Mass Spectrometry*, 43: 892–902.

INMETRO (2016). Orientação sobre validação de métodos de ensaios químicos DOQ-CGCRE-008, ver. 05. Rio de Janeiro.

LBCD. (2011). Protocolo de Validação de Métodos de Análise Qualitativa - Laboratório Brasileiro de Controle de Dopagem.

LBCD. (2017). Método de análise de agentes dopantes por CG-QqQ – Laboratório Brasileiro de Controle de Dopagem.

Marchioro, E. M., Benetti, F. (2015). Consumo de suplementos nutricionais por praticantes de musculação em academias do município de Tenente Portela-RS. *Revista Brasileira de Nutrição Esportiva*, 9(49): 40-52.

Neves, D. B. J., Caldas, E. D. (2015). Dietary supplements: International legal framework and adulteration profiles, and characteristics of products on the Brazilian clandestine market. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 73: 93-104.

Padilha, M. C. (2007). Cromatografia gasosa de alta resolução acoplada a espectrometria de massas aplicada ao estudo de agentes anabólicos e candidatos a fármacos moduladores de receptores dopaminérgicos em fluidos biológicos. Tese (Doutorado em Ciências) - Centro de Ciências Matemáticas e da Natureza, Instituto de Química, Departamento de Química Orgânica, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Parr, M. K., Opfermann, G., Schänzer, W. (2006). Detection of new 17-alkylated anabolic steroids on WADA 2006 list. Institute of Biochemistry, German Sport University, Cologne, Germany.



Van Poucke, C., Detavernier, C., Van Cauwenberghe, R., Van Peteghem, C. (2007). Determination of anabolic steroids in dietary supplements by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 586: 35-42.

Veja. (2015). Suplementos: os brasileiros adoram. Disponível em <http://veja.abril.com.br/saude/suplementos-os-brasileiros-adoram/>