

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CENTRO-OESTE

DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA DETERMINAÇÃO DE
SIBUTRAMINA EM SUPLEMENTOS ALIMENTARES ATRAVÉS DE
CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS

GUARAPUAVA
2015

MARCUS DENNISON MACHADO ARAUJO

DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA DETERMINAÇÃO DE
SIBUTRAMINA EM SUPLEMENTOS ALIMENTARES ATRAVÉS DE
CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS

Dissertação apresentada sob orientação da Profa. Dra. Yohandra Reyes Torres, como requisito para obtenção do Título de Mestre em Química, pelo Programa de Pós-Graduação em Química Aplicada, na Universidade Estadual do Centro-Oeste

Orientadora: Profa. Dra. Yohandra Reyes Torres

GUARAPUAVA
2015

Catálogo na Publicação
Biblioteca Central da Unicentro, Campus Cedeteg

A663d Araujo, Marcus Dennison Machado
Desenvolvimento de metodologia analítica para determinação de sibutramina em suplementos alimentares através de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas / Marcus Dennison Machado Araujo. -- Guarapuava, 2015
xi, 79 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual do Centro-Oeste, Programa de Pós-Graduação em Química, área de concentração em Química Aplicada, 2015

Orientadora: Yohanda Reyes Torres

Banca examinadora: Maria Lurdes Felsner, Ieda Spacino Scarminio

Bibliografia

1. Química. 2. Química aplicada. 3. Suplementos alimentares. 4. Sibutramina. 5. CG-EM. 6. Validação de método. I. Título. II. Programa de Pós-Graduação em Química.

CDD 542

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus, por que sem ele nós não somos nada.

À minha família, minha mãe Maria José, meu pai João Batista, minha irmã Marília Daniella, meu irmão Maycon Daniel, meu cunhado Rafael Gomes e minha cunhada Alice Isabel, pelo apoio, amor, incentivo, estando sempre ao meu lado a todo momento me proporcionando toda confiança e força necessárias para alcançar meus objetivos.

À minha namorada Ana Carolina Pereira, por fazer parte da minha vida, pelo amor, apoio, carinho, cuidado, atenção, por me levantar nos momentos mais difíceis, por me ouvir ensaiar cada apresentação, pelos conselhos e pelas broncas que sempre me fizeram melhorar e acima de tudo por sempre estar ao meu lado e nunca desistir de mim.

À minha orientadora Profa. Dra. Yohandra Reyes Torres, pela amizade, orientação, aprendizado, apoio incondicional, pela dedicação e paciência a mim concedidos durante toda a realização desse trabalho, se mostrando não só uma orientadora, mais uma amiga, irmã, mãe para todas as horas.

À aluna de Pós Doutorado Liliane Lima pelo apoio, dedicação e paciência durante todas as realizações das análises deste trabalho.

À Profa. Dra. Maria Lurdes Felsner por contribuir significativamente para este trabalho, no tratamento estatístico dos dados obtidos.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação, pelos conhecimentos adquiridos.

Aos meus amigos, principalmente a Andressa Navarro e Cristian Oliveira pela demonstração constante de amizade e incentivo durante os dois anos de mestrado.

Aos colegas do Cronat.

À CAPES pela bolsa concedida

À Unicentro, e o Programa de Pós-Graduação em Química Aplicada, por permitirem que esse trabalho pudesse ser realizado.

RESUMO

Este trabalho apresenta a validação e aplicação do método analítico por CG-EM para determinação de sibutramina em suplementos alimentares. Inicialmente, foi realizado um estudo para otimização do procedimento de extração de sibutramina em suplementos alimentares. Para tal, foram realizados experimentos de adição de padrão e recuperação. O efeito do solvente extrator (metanol ou acetonitrila), número de ciclos de extração (3 ou 5) e fonte de homogeneização (ultrassom ou microondas) na porcentagem de recuperação de sibutramina foi investigado com o auxílio de planejamento fatorial 2^3 . Para verificar a adequabilidade do método analítico desenvolvido para a determinação de sibutramina em suplementos, os parâmetros de seletividade, linearidade, precisão e exatidão foram testados e os resultados avaliados por diferentes ferramentas estatísticas. Nas condições da análise, a sibutramina apresentou um tempo de retenção de 7,43 min, com pico cromatográfico estreito e ligeira cauda. A comparação dos cromatogramas e espectros de massas obtidos para o pico em 7,43 min do padrão de sibutramina, suplemento branco e suplemento fortificado, bem como, para as amostras estudadas, indicou que o método é seletivo. A alta seletividade do método é garantida ao aliar os dados cromatográficos de tempo de retenção a os dados espectroscópicos. Adicionalmente, toda a análise quantitativa foi realizada no modo de monitoramento seletivo de íons (SIM), onde apenas o íon m/z 114,1 (quantificador) e os íons qualificadores de m/z 72,1 e 137 foram monitorados pelo espectrômetro de massas. Os resultados indicaram que o método proposto apresenta exatidão e precisão adequadas com taxas de recuperação entre 80 – 115% e RSD para repetitividade e precisão intermediária entre 4,26 e 9,40%. Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) encontrados foram de 14,94 e 45,29 ng.mL^{-1} respectivamente, demonstrando a capacidade do método de determinar sibutramina em baixas concentrações. O método apresentou uma boa linearidade na faixa de concentrações estudadas (50 a 1100 ng.mL^{-1}) com coeficiente de determinação de 99,09% e não apresentou indicio de falta de ajuste $F_{faj} = 1,01$ ($p > 0,05$). Dessa forma, o estudo de validação demonstrou que a metodologia aplicada pode ser considerada validada para a finalidade proposta. Para verificar possíveis adulterações de suplementos alimentares emagrecedores com sibutramina, o método validado foi aplicado em nove amostras de suplementos de diferentes fabricantes. Contudo, não foi constatada a presença de sibutramina em nenhuma das amostras estudadas. Adicionalmente, uma análise da composição química de suplementos alimentares foi realizada para avaliar a conformidade com a composição química descrita no rótulo do produto. A presença de cafeína e o esteroide acetato de androst-5-en-3-ol-7,17-diona (DHEA) não declarados no rótulo de alguns produtos foi constatada, o que pode acarretar sérios riscos à saúde do consumidor. Nosso estudo indica a necessidade de um controle de qualidade mais rigoroso para garantir a segurança de consumo de suplementos alimentares.

Palavras-chaves: Suplementos alimentares, sibutramina, CG-EM, validação de método

ABSTRACT

This work presents the validation and application of a GC-MS analytical method for determination of sibutramine in food supplements. Initially, a study was conducted to optimize the extraction procedure of sibutramine from food supplements. For this, addition standard and recovery experiments were performed. The effect of the extractor solvent (methanol or acetonitrile), type of homogenization source (ultrason or microwave) and number of homogenization cycles (three or five) in the sibutramine recovery was investigated by factorial design 2³. To verify the suitability of the developed analytical method, the parameters selectivity, linearity, precision and accuracy were investigated by different statistical tools. Under the analytical conditions employed, Sibutramine had a retention time of 7.43 min and showed a narrow chromatographic peak slightly tail. Comparison of the chromatograms and mass spectra for the peak in 7.43 min for the standard, the reference supplement and the spiked supplement, as well as, for the samples studied indicate that the method is selective. The high selectivity of the method is guaranteed by combining chromatographic data retention time and the spectroscopic data. Additionally, all quantitative analyses were performed in the selective ion monitoring mode (SIM), where only the ion m/z 114.1 (quantifier) and the qualifiers ions m/z 72.1 and 137 were monitored by the mass spectrometer. The results indicated that the proposed method provides good accuracy and precision with appropriate recovery rates between 80-115% and RSD for repeatability and intermediate precision of 4.26 and 9.40%, respectively. The limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) were 14.94 and 45.29 ng·mL⁻¹, respectively, demonstrating the ability of the method to determine sibutramine in low concentrations. The method showed good linearity in the range of concentrations (50-1100 ng·mL⁻¹) with a determination coefficient of 99.09% and showed no indication of lack of fit $F_{faj} = 1.01$ ($p > 0.05$). Thus, the study demonstrated that the proposed analytical methodology can be considered validated for the determination of sibutramine in food supplements. To check possible tampering with sibutramine of weight-loss dietary supplements, the validated method was applied in nine samples from different manufacturers. However, sibutramine was not detected in any sample. Additionally, an analysis of the chemical composition of dietary supplements was performed to assess the agreement of the chemical composition described in the product label with the actual composition. The presence of caffeine and steroid Acetate androst-5-en-3-ol-7,17-dione (DHEA), not declared on the label of some products was observed, which can cause serious risks to the health of consumer. Our study indicates the need for a more rigorous quality control to ensure the safety of consumption of dietary supplements.

Keywords: dietary supplements, sibutramine, GC/MS, method validation

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| CAPÍTULO 1. INTRODUÇÃO | 1 |
| 1.1 Introdução | 2 |
| 1.2 OBJETIVOS | 3 |
| 1.2.1. Objetivo Geral | 3 |
| 1.2.2. Objetivos Específicos | 3 |
| REFERÊNCIAS | 4 |
| CAPÍTULO 2. CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE A SIBUTRAMINA | 6 |
| 2.1. História..... | 7 |
| 2.2. Estrutura e propriedades | 7 |
| 2.3. Mecanismo de ação..... | 7 |
| 2.4. Reações adversas | 10 |
| REFERÊNCIAS | 11 |
| CAPÍTULO 3. MÉTODOS ANALÍTICOS PARA A DETERMINAÇÃO DE SIBUTRAMINA | 12 |
| 3.1. Métodos Cromatográficos..... | 13 |
| 3.1.1. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) para a análise de sibutramina. 13 | |
| 3.1.2. Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massas (CG-EM) para a análise de sibutramina | 14 |
| 3.2. Aspectos Gerais sobre Validação de Métodos Analíticos | 19 |
| REFERÊNCIAS | 22 |
| CAPÍTULO 4. AMOSTRAGEM | 24 |
| 4.1. Suplementos Alimentares: Definição e Legislação | 25 |
| 4.2. Adultrações em Suplementos Alimentares | 25 |
| 4.3. Amostras de Suplementos Alimentares | 28 |
| REFERÊNCIAS | 28 |
| CAPÍTULO 5. OTIMIZAÇÃO DO PROCEDIMENTO DE EXTRAÇÃO DE SIBUTRAMINA A PARTIR DE SUPLEMENTOS ALIMENTARES | 32 |
| 5.1. Materiais | 33 |
| 5.1.1. Amostra de Suplemento | 33 |
| 5.1.2. Padrão de Sibutramina | 33 |
| 5.1.3. Equipamentos | 34 |
| 5.1.4. Reagentes | 34 |
| 5.2. Métodos | 34 |

| | |
|---|-----------|
| 5.2.1. Otimização da extração de sibutramina em suplementos alimentares | 34 |
| 5.2.2. Condições de análise por CLAE-UV | 36 |
| 5.3. Resultados e Discussões | 37 |
| 5.4. Conclusões Parciais | 39 |
| REFERÊNCIA | 40 |
| CAPÍTULO 6. VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO POR CG-EM PARA DETERMINAÇÃO DE SIBUTRAMINA EM SUPLEMENTOS ALIMENTARES..... | 41 |
| 6.1. Materiais | 42 |
| 6.1.1. Amostras..... | 42 |
| 6.1.2. Reagentes | 42 |
| 6.1.3. Equipamentos | 42 |
| 6.2. Métodos | 42 |
| 6.2.1. Condições de Análises por CG-EM | 42 |
| 6.2.2. Preparo das Amostras para Análise por CG-EM | 43 |
| 6.3. Validação do Método Analítico por CG-EM..... | 44 |
| 6.3.1. Seletividade | 45 |
| 6.3.2. Linearidade..... | 45 |
| 6.3.3. LD e LQ | 46 |
| 6.3.4. Precisão | 46 |
| 6.3.5. Exatidão..... | 47 |
| 6.4. Resultados e Discussões | 48 |
| 6.4.1. Seletividade | 48 |
| 6.4.2. Linearidade..... | 51 |
| 6.4.3. LD e LQ | 53 |
| 6.4.4. Precisão | 53 |
| 6.4.5. Exatidão: Teste de Adição e Recuperação | 55 |
| 6.5. Conclusões Parciais | 56 |
| REFERÊNCIAS | 57 |
| CAPÍTULO 7. ANÁLISE DE SUPLEMENTOS ALIMENTARES..... | 58 |
| 7.2. Análise da conformidade dos rótulos dos suplementos alimentares..... | 66 |
| REFERÊNCIAS | 75 |
| CAPÍTULO 8. CONCLUSÕES | 76 |
| ANEXOS | 78 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. Estrutura básica da β -fenetilamina..... | 08 |
| Figura 2. Fórmula estrutural dos enantiômeros da sibutramina..... | 08 |
| Figura 3. Fórmula estrutural dos neurotransmissores noradrenalina e adrenalina..... | 09 |
| Figura 4. Fórmula estrutural do neurotransmissor serotonina e do aminoácido triptofano..... | 10 |
| Figura 5. Estruturas dos metabolitos provenientes da sibutramina..... | 17 |
| Figura 6. Exemplo de Resultados obtidos através da Busca na Biblioteca de dados NIST do CG-EM: (A) Comparação entre o espectro obtido a partir da amostra analisada (em vermelho) e espectro da sibutramina constante na base de dados (em azul) e (B) Probabilidade do pico cromatográfico analisado ser sibutramina..... | 19 |
| Figura 7. Procedimento para otimização da extração de sibutramina considerando as variáveis do planejamento fatorial 2^3 | 36 |
| Figura 8. Cromatógrafo Líquido Waters Series 600 utilizado na otimização do procedimento de extração de sibutramina em suplementos alimentares..... | 37 |
| Figura 9. Gráfico de Pareto para os efeitos do planejamento fatorial 2^3 para a otimização do procedimento de extração de sibutramina em suplemento alimentar no nível de 95% de confiança..... | 39 |
| Figura 10. Gráfico dos efeitos principais para otimização da extração de sibutramina de suplementos..... | 39 |
| Figura 11. CG-MS Agilent Technologies 7890A utilizado para validação da metodologia analítica para determinação de sibutramina em suplementos alimentares..... | 43 |
| Figura 12. Procedimento otimizado para extração de sibutramina a partir de suplementos alimentares..... | 44 |
| Figura 13. Cromatograma do padrão de sibutramina na concentração $5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$: (A) Cromatograma de íons total (TIC) adquirido no modo SCAN e (B) Espectro de massas do pico cromatográfico em 7,43 min correspondente à sibutramina..... | 48 |
| Figura 14. Cromatograma do extrato do suplemento: (A) Cromatograma do suplemento sem sibutramina adquirido no modo SIM e (B) Cromatograma do suplemento fortificado com sibutramina ($2500 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$) adquirido no modo SIM..... | 50 |
| Figura 15. Curva analítica obtida por regressão linear para os dados de área do pico cromatográfico de sibutramina..... | 52 |

| | |
|--|----|
| Figura 16. Cromatograma adquirido em modo varredura para as amostras de suplementos analisados: (A) Amostra AM1, (B) Amostra AM2, (C) Amostra AM3, (D) Amostra AM4, (E) Amostra AM5, (F) Amostra AM6, (G) Amostra AM7, (H) Amostra AM8 e (I) Amostra AM9..... | 60 |
| Figura 17. Espectro de massas no tempo de retenção da sibutramina (7,4 min) obtido em modo varredura. (A): amostra AM1; (B) padrão de sibutramina de 5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ | 65 |
| Figura 18. Cromatograma obtido no modo varredura para a amostra AM1..... | 68 |
| Figura 19. Cromatograma obtido no modo varredura para a amostra AM2..... | 68 |
| Figura 20. Cromatograma obtido no modo varredura para a amostra AM3..... | 69 |
| Figura 21. Cromatograma obtido no modo varredura para a amostra AM4..... | 70 |
| Figura 22. Cromatograma obtido no modo varredura para a amostra AM5..... | 70 |
| Figura 23. Cromatograma obtido no modo varredura para a amostra AM6..... | 71 |
| Figura 24. Cromatograma obtido no modo varredura para a amostra AM7..... | 71 |
| Figura 25. Cromatograma obtido no modo varredura para a amostra AM8..... | 72 |
| Figura 26. Cromatograma obtido no modo varredura para a amostra AM9..... | 72 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1. Informações referentes ao registro e formula molecular das três formas de sibutramina encontradas no mercado..... | 08 |
| Tabela 2. Características dos suplementos utilizados nos estudos de determinação de sibutramina..... | 29 |
| Tabela 3. Informações sobre o laudo de qualidade da sibutramina utilizada como padrão de referência..... | 33 |
| Tabela 4. Níveis das variáveis do planejamento fatorial 2^3 para otimização do procedimento de extração de sibutramina a partir de suplementos alimentares..... | 35 |
| Tabela 5. Resultados dos ensaios do planejamento fatorial 2^3 para otimização do método de extração de sibutramina a partir de suplementos alimentares..... | 37 |
| Tabela 6. Preparo das soluções para análise da precisão intermediária para validação da metodologia de determinação de sibutramina em suplementos alimentares..... | 47 |
| Tabela 7. Preparo das soluções para análise da repetitividade para validação da metodologia de determinação de sibutramina em suplementos alimentares..... | 47 |
| Tabela 8. Preparo das soluções para análise da exatidão para validação da metodologia de determinação de sibutramina em suplementos alimentares..... | 48 |
| Tabela 9. Resultados da análise de regressão linear e do teste de falta de ajuste no nível de 95% de confiança..... | 52 |
| Tabela 10. Resultados da análise da precisão intermediária para validação da metodologia de determinação de sibutramina em suplementos alimentares..... | 54 |
| Tabela 11. Resultados da análise da repetitividade para validação da metodologia de determinação de sibutramina em suplementos alimentares..... | 54 |
| Tabela 12. Resultados da análise da exatidão para validação da metodologia de determinação de sibutramina em suplementos alimentares..... | 55 |
| Tabela 13. Tipos de substâncias identificadas nos suplementos analisados..... | 67 |
| Tabela 14. Compostos identificados nas amostras de suplementos analisados..... | 73 |

LISTA DE SIGLAS, SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

| | |
|-----------------|--|
| ANVISA | Agência Nacional de Vigilância Sanitária |
| AOAC | Association of Official Analytical Chemists (Associação Oficial dos Químicos Analíticos) |
| BCAA | Branched Chain Amino Acids |
| CG | Cromatografia Gasosa |
| CG-EM | Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas |
| CLA | Linoleic Acid Conjugate (Ácido Linoéico Conjugado) |
| CLAE | Cromatografia Líquida de Alta Eficiência |
| CLAE-UV | Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detecção no Ultra-Violeta |
| COI | Comitê Olímpico Internacional |
| CRONAT | Laboratório de Cromatografia e Produtos Naturais |
| EM | Espectrometria de Massas |
| EMEA | European Medicines Agency |
| F_{aj} | F para falta de ajuste |
| F_{obs} | F observado |
| $F_{regressão}$ | F para regressão |
| HPLC | High Performance Liquid Chromatography |
| INCQS | Instituto Nacional de Controle de Qualidade e Saúde |
| LD | Limite de Detecção |
| LQ | Limite de Quantificação |
| r | Coefficiente de Correlação |
| R^2 | Coefficiente de Determinação |
| RSD | Relative Standard Deviation (Desvio Padrão Relativo) |
| SCAN | Varredura |
| SIM | Selective Ion Monitoring (monitoramento seletivo de íons) |
| TIC | Total Ion Chromatogram (Cromatograma do total de íons) |

CAPÍTULO 1. INTRODUÇÃO

1.1. Introdução

Atualmente observa-se um crescimento das taxas de obesidade em todo o mundo. Segundo a Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico (Vigitel), que monitora o crescimento da obesidade no Brasil, em 2014 cerca de 17,5% da população masculina e feminina foram considerados obesos. Além disso, o estudo apontou que 53% de toda população adulta do país estava acima do peso (SBEM, 2014a; MINISTERIO DA SAÚDE, 2014; VIGITEL, 2014).

A obesidade é caracterizada pelo acúmulo excessivo de gordura corporal no indivíduo e pode ter origem em diversas causas como sedentarismo, fatores genéticos, metabólicos e comportamentais. O tratamento mais indicado segundo o Ministério da Saúde é a reeducação alimentar em conjunto com exercícios físicos regulares e uma adequação de modo de vida saudável. Contudo, o processo de emagrecimento requer tempo e determinação o que torna comum a busca por tratamentos complementares que aceleram a perda de peso (SBEM, 2014b; MINISTERIO DA SAÚDE, 2005; ABESO, 2003).

Dentre os métodos mais procurados está o consumo de suplementos alimentares que são comercializados com a indicação clara de resultados imediatos para a perda de peso e conquista do corpo ideal. Ao forte apelo publicitário para seu consumo soma-se o fato de não ser necessária a prescrição médica para a aquisição dos mesmos. Até o momento os suplementos não possuem um controle de qualidade específico estabelecido pela ANVISA, o que favorece a sua adulteração com substâncias que potencializam os efeitos preconizados em suas embalagens (BRASIL, 1998; FERREIRA, 2010).

A sibutramina é um fármaco clinicamente utilizado para auxiliar no processo de perda de peso (DIEFENBACH, 2007; MARTINS, 2008; MALUF *et al.*, 2010; YANO *et al.*, 2011; Lizot *et al.*, 2012; DEFÁVERI *et al.*, 2012) pois provoca sensação de saciedade ao usuário e acelera o metabolismo, auxiliando na queima de gordura (MARTINS, 2008; MASSONI e SUYENAGA, 2012). Contudo este fármaco pode acarretar alguns riscos à saúde, principalmente a pessoas com problemas cardiovasculares, por isso sua venda passou a ser controlada pela ANVISA sendo adquirida no Brasil apenas com prescrição médica. Devido às propriedades anorexígenas da sibutramina, já há relatos na literatura de adulteração de produtos para emagrecimento com essa substância (FANGHANEL *et al.*, 2000; GURSOY *et al.*, 2005).

Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi desenvolver uma metodologia para a identificação e determinação de sibutramina, presente como adulterante em suplementos

alimentares, utilizando métodos cromatográficos. Uma vez desenvolvida e validada, a metodologia pode ser aplicada a diferentes tipos de produtos emagrecedores disponíveis no mercado nacional e internacional que sejam de fácil acesso a população.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1. Objetivo Geral

Desenvolver e validar uma metodologia analítica para extração, detecção e quantificação de sibutramina presente em suplementos alimentares.

1.2.2. Objetivos Específicos

- Avaliar a eficiência de extração de sibutramina em suplementos alimentares por meio de ensaios de adição e recuperação do analito e uso de planejamento fatorial;
- Aplicar e/ou otimizar e validar um método de determinação por Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massas para quantificação de sibutramina extraída de suplementos alimentares;
- Aplicar a metodologia desenvolvida para detecção e quantificação de sibutramina em suplementos alimentares passíveis de conterem adulterações;
- Identificar outros possíveis adulterantes em suplementos alimentares.

REFERÊNCIAS

- ABESO (2003). Associação Brasileira para o Estudo da Obesidade e da Síndrome Metabólica. **Tratamento Dietético da Obesidade**. Revista da ABESO, nº 16. Disponível em: <<http://www.abeso.org.br/pagina/174/tratamento+dietetico+da+obesidade.shtml>>. Acesso em: 22 nov. 2014.
- BRASIL (1998). Portaria SVS/MS nº 222, de 24 de Março de 1998. Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de Alimentos para Praticantes de Atividade Física. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília.
- DEFÁVERI S. A. M.; LAPORTA V. L.; DOS SANTOS R. M.; DA SILVEIRA L. R.; ALVES P. M.; RUBIM M. A. (2012). Avaliação da qualidade das cápsulas de cloridrato de sibutramina manipuladas em farmácias. **Disciplinarum Scientia. Série: Ciências da Saúde**, Santa Maria, v. 13, n. 1, p. 71-83.
- DIEFENBACH, I.C.F. (2007). Sibutramina: **Validação de metodologia e avaliação biofarmacotécnica**. [Dissertação] Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria.
- FANGHANEL, G.; CORTINAS, L.; SANCHEZ-REYES, L.; BERBER, A. (2000). A clinical trial of the use of sibutramine for the treatment of patients suffering essential obesity. **International Journal Obesity**, v. 24(2), p. 144-50.
- FERREIRA, D. C. A. (2010). **Suplementos Alimentares: Adequabilidade à legislação e efeitos metabólicos em ratos**. [Dissertação] Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba. João Pessoa.
- GURSOY, A.; ERDOGAN, M.F.; CIN, M.O.; CESUR, M.; BASKAL, N. (2005). Effect of sibutramine on blood pressure in patients with obesity and well-controlled hypertension or normotension. **Endocrine Practice**, n.11, p.308-12.
- LIZOT, L.F.; SILVA, L.L.; SPANIOL, B.; ANTUNES, M.V.; LINDEN, R.; LANARO, R. (2010). Determinação rápida de fármacos básicos em plasma por cromatografia a gás com detector de nitrogênio e fósforo. **Química Nova**, v. 35, n. 6, p. 1222-1227.
- MALUF F. D E PONTAROLO R.; GILCÉLIA A. CORDEIRO, NOEMI NAGATA E PATRICIO PERALTA-ZAMORA. (2010). Determinação de sibutramina em formas farmacêuticas através de espectroscopia no infravermelho com refletância difusa e métodos de calibração multivariada. **Química Nova**, v. 33, n. 3, p. 649-652.
- MARTINS, L.F.S. (2008). **Controle de qualidade do cloridrato de sibutramina matéria-prima e cápsulas em farmácias magistrais e avaliação preliminar da estabilidade**. [Dissertação] Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre: UFRGS.
- MASSONI, T., SUYENAGA, S. E. (2012). SIBUTRAMINA SOB A ÓPTICA DA QUÍMICA MEDICINAL. **Revista Eletrônica de Farmácia** Vol. IX (4), 59 - 68. Disponível em: <<https://www.revistas.ufg.br/index.php/REF/article/view/15096>> Acesso em: 15 nov. 2014.

MINISTÉRIO da saúde (2005). **Causas e consequências da obesidade**. Portugal. Disponível em:

<<http://www.portaldasaude.pt/portal/conteudos/enciclopedia+da+saude/ministeriosaude/obesidade/causaseconsequenciasdaobesidade.htm>>. Acesso em: 20 nov. 2014.

MINISTÉRIO da saúde (2014). **Obesidade**. Brasília. Disponível em:

<<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/secretarias/812-sas-raiz/daet-raiz/media-e-alta-complexidade/12-media-e-alta-complexidade/12768-sobrepeso-e-obesidade>>. Acesso em: 12 dez. 2014.

SBEM (2014a). Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia. **Números da Obesidade no Brasil**. Rio de Janeiro. Disponível em:

<<http://www.endocrino.org.br/numeros-da-obesidade-no-brasil/>>. Acesso em: 10 dez. 2014.

SBEM (2014b). Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia. **Obesidade**. Rio de Janeiro. Disponível em: < <http://www.endocrino.org.br/obesidade/>>. Acesso em: 11 dez. 2014.

VIGITEL (2014). Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para doenças Crônicas por

Inquérito Telefônico. [**Avaliação do peso da população brasileira**] Brasília. Disponível em:

<<http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2014/abril/30/Lancamento-Vigitel-28-04-ok.pdf>>. Acesso em: 20 dez. 2014.

YANO, H.M., GUARDIA, R.C.A., AURICCHIO, M.T. (2011). Detecção de sibutramina e metoclopramida em alimentos para atletas. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 70, n. 4, p. 599-605.

CAPÍTULO 2. CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE A SIBUTRAMINA

2.1. História

O cloridrato monoidratado de sibutramina, também conhecido por sibutramina, começou a ser sintetizado em meados da década de 80, tendo como proposta inicial o tratamento da depressão. Contudo, a sibutramina não apresentou efeitos farmacológicos significativos para este fim. Porém o fármaco demonstrou atividade para a redução de apetite, uma vez que se observou uma redução significativa na ingestão de alimentos pelos seus usuários, além de promover a elevação da termogênese, o que acelera a queima de gordura corporal (MARTINS, 2008; MASSONI e SUYENAGA, 2012).

Em 2010 a EMEA (European Medicines Agency) suspendeu a venda de sibutramina por estar ligada a um aumento do risco de acidentes cardiovasculares. No Brasil, também em 2010 a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) alertou sobre 37 notificações de efeitos adversos acarretados pelo uso da substância. Atualmente a venda de sibutramina é proibida em toda Europa e no Brasil ela é comercializada com algumas restrições, sendo necessário um receituário específico para sua compra (ANVISA, 2010; EMEA, 2010).

2.2. Estrutura e propriedades

A sibutramina é uma amina terciária derivada da anfetamina que apresenta como característica a presença da unidade estrutural da β -fenetilamina (Figura 1), formada por um anel benzênico no carbono β da cadeia etanolamina. À temperatura e pressão normais a sibutramina tem a forma de um pó cristalino branco a branco leitoso, com ponto de fusão de 192,5 °C e solubilidade em água de 2,9 mg.mL⁻¹. Além disso a sibutramina pode ser apresentada sob três formas diferentes (Tabela 1) sibutramina anidra, cloridrato de sibutramina e cloridrato monoidratado de sibutramina (DIEFENBACH, 2007; MARTINS, 2008; MASSONI e SUYENAGA, 2012).

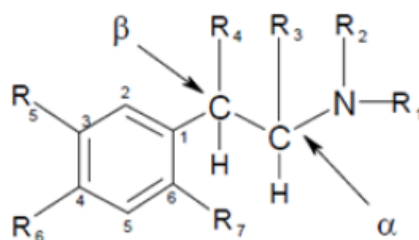


Figura 1. Estrutura básica da β -fenetilamina.
 FONTE: MASSONI e SUYENAGA, 2012.

Tabela 1. Informações referentes ao registro e forma molecular das três formas de sibutramina encontradas no mercado.

| | Sibutramina anidra | Cloridrato de sibutramina | Cloridrato de sibutramina monoidratado |
|------------------------------------|-------------------------------------|---|--|
| Registro no CAS^a | 106650-56-0 | 84485-00-7 | 125494-59-9-9 |
| Número DCB^b | 07984 | 07985 | 09375 |
| Fórmula molecular | C ₁₇ H ₂₆ ClN | C ₁₇ H ₂₆ ClN.HCl | C ₁₇ H ₂₆ ClN.HCl.H ₂ O |
| Massa molecular | 279,86 g·mol ⁻¹ | 316,36 g·mol ⁻¹ | 334,33 g·mol ⁻¹ |

^a = Chemical Abstracts Service, ^b = Denominações Comuns Brasileiras (Fonte: Modificado a partir de MARTINS, 2008).

Em sua estrutura química, a sibutramina possui um centro estereogênico podendo existir como uma mistura de dois enantiômeros (Figura 2), sendo a mesma comercializada na forma de racemato. Entretanto, existem estudos que apontam que o enantiômero *R* é o mais eficiente no tratamento de controle de peso e a forma *S* aparenta contribuir mais para a ocorrência de efeitos colaterais em ratos (GLICK *et al*, 2000; MARTIS, 2008; MASSONI e SUYENAGA, 2012).

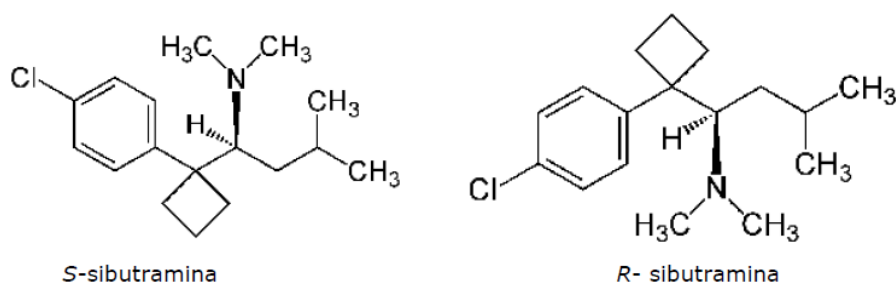


Figura 2. Fórmula estrutural dos enantiômeros da sibutramina.
 FONTE: MASSONI e SUYENAGA, (2012).

Por ser uma amina terciária a sibutramina apresenta um caráter mais apolar o que a torna mais volátil. Essa característica viabiliza o emprego da técnica de Cromatografia Gasosa para

análise direta da sibutramina sem a necessidade de derivatização prévia (DIEFENBACH, 2007; MARTINS, 2008).

2.3. Mecanismo de ação

A sibutramina possui um mecanismo de ação por inibição de recaptção em duas vias neurotransmissoras que resulta na redução do peso corporal, minimizando a ingestão de alimentos através da intensificação da saciedade e reduzindo a sensação de fome. Recomenda-se que o uso de sibutramina seja realizado com orientação médica juntamente com exercícios físicos e uma reeducação alimentar, somente quando dietas e atividades físicas não produzirem os resultados desejados (HANSEN *et al.*, 1999; MARTINS, 2008; MASSONI e SUYENAGA, 2012).

O neurotransmissor noradrenalina (Figura 3) é liberado pela glândula supra-renal e pode atuar também como supressor de adrenalina por apresentarem estruturas similares (Figura 3), tendo como seus efeitos principais a elevação do metabolismo, o aumento da frequência cardíaca e da pressão arterial. Ao impedir a recaptção da noradrenalina a sibutramina potencializa os efeitos deste hormônio, aumentando o gasto energético (DIEFENBACH, 2007).

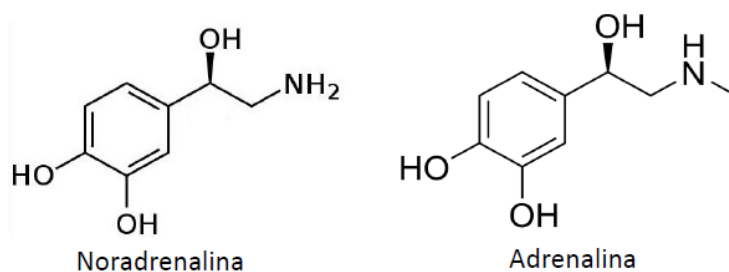


Figura 3. Fórmula estrutural dos neurotransmissores noradrenalina e adrenalina.

FONTE: modificado a partir de mazinger.sisib.uchile.cl Acesso em: 12 de set de 2014.

Já o neurotransmissor serotonina (Figura 4), produzido no cérebro a partir do aminoácido triptofano (Figura 4), atua como um vasoconstritor, estimulando a musculatura lisa presente nos órgãos, regulando assim o sono, o apetite e o humor. Quando ocorre a inibição da recaptção de serotonina, ocorre um aumento na sua concentração presente no corpo, tendo como efeito a diminuição da ansiedade e o aumento da saciedade. Assim a sibutramina atua através de dois mecanismos aumentando o gasto energético e diminuindo o apetite (CHAPELOT *et al.*, 2000; DIEFENBACH, 2007).

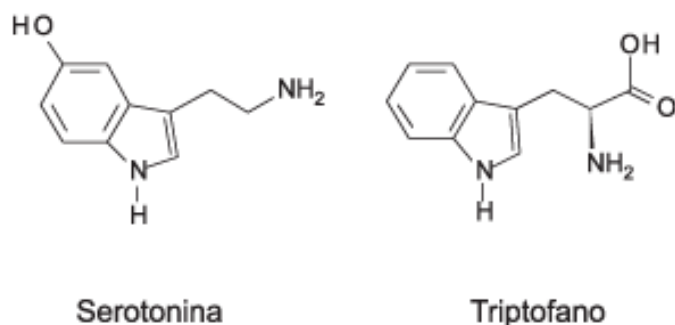


Figura 4. Fórmula estrutural do neurotransmissor serotonina e do aminoácido triptofano.

FONTE: modificado a partir de <http://www.scielo.br/img/revistas/qn/v33n2/16f01.gif> Acesso em: 12 de set de 2014.

2.4. Reações adversas

Estudos clínicos mostram que em geral, os principais efeitos indesejados ocasionados pela sibutramina são: boca seca, constipação, insônia, elevação da pressão sanguínea e aumento da frequência cardíaca. Existem relatos de efeitos menos frequentes como dismenorreia, taquicardia, dispneia, sudorese e alterações do paladar. Entretanto, esses efeitos relatados pelos pacientes ocorrem nas primeiras quatro semanas de uso diminuindo sua gravidade com o decorrer do tempo e não inviabiliza a continuidade do tratamento, sendo eles reversíveis. A utilização de sibutramina em pacientes com problemas cardiovasculares ou hipertensos deve ser mais rigorosa visto que a mínima alteração causada pela substância pode gerar problemas mais graves (FANGHANEL *et al.*, 2000; GURSOY *et al.*, 2005; MARTINS, 2008; MASSONI e SUYENAGA, 2012).

REFERÊNCIAS

- ANVISA (2010). Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Alerta SNVS/Anvisa/Nuvig/Gfarm nº 01**. Brasília. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/anvisa+portal/anvisa/pos+-+comercializacao+-+pos+-+uso/farmacovigilancia/publicacoes+farmacovigilancia/alertas+anvisa/2010+regiao+nacionais/20100128+0001>> Acesso em: 05 dez 2014.
- CHAPELOT, D.; MARMONIER C.; THOMAS F.; HANOTIN, C. (2000). Modalities of the food intake-reducing effect of sibutramine in humans. **Physiology Behavior**, v. 68, p.299-308.
- DIEFENBACH, I.C.F. (2007). Sibutramina: **Validação de metodologia e avaliação biofarmacotécnica**. [Dissertação] Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria.
- EMEA (2010). European Medicines Agency. **Questions and answers on the suspension of medicines containing sibutramine EMA/808179/2009**.
- FANGHANEL, G.; CORTINAS, L.; SANCHEZ-REYES, L.; BERBER, A. (2000). A clinical trial of the use of sibutramine for the treatment of patients suffering essential obesity. **International Journal of Obesity**, v. 24, n. 2, p. 144-50.
- GLICK, S.D.; HASKEW, R.E.; MAISONNEUVE, I.M.; CARLSON, J.N.; JERUSSI, T.P. (2000). Enantioselective behavioral effects of sibutramine metabolites. **European Journal of Pharmacology**, v.397, p.93-102.
- GURSOY, A.; ERDOGAN, M.F.; CIN, M.O.; CESUR, M.; BASKAL, N. (2005). Effect of sibutramine on blood pressure in patients with obesity and well-controlled hypertension or normotension. **Endocrine Practice**, n.11, p. 308-12.
- HANSEN, D.L.; TOUBRO, S; STOCK, M. J.; MACDONALD, I. A.; ASTRUP, A. (1999). The effect of sibutramine on energy expenditure and appetite during chronic treatment without dietary restriction. **International Journal of Obesity**, v. 23, n. 10, p. 1016-1024.
- MARTINS, L.F.S. (2008). **Controle de qualidade do cloridrato de sibutramina matéria-prima e cápsulas em farmácias magistrais e avaliação preliminar da estabilidade**. [Dissertação] Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre: UFRGS.
- MASSONI, T., SUYENAGA, S. E. (2012). Sibutramina sob a óptica da química medicinal. **Revista Eletrônica de Farmácia**. v. 9, n. 4, p. 59-68. Disponível em: <<https://www.revistas.ufg.br/index.php/REF/article/view/15096>> Acesso em: 15 nov. 2014.

**CAPÍTULO 3. MÉTODOS ANALÍTICOS PARA A DETERMINAÇÃO DE
SIBUTRAMINA**

3. Métodos Analíticos para a Determinação de Sibutramina

Na literatura são relatados vários métodos para determinação de sibutramina e seus metabólitos em amostras biológicas, formas farmacêuticas e alimentos suplementares para atletas incluindo métodos colorimétricos, espectrofotométricos, espectroscópicos e cromatográficos (DIEFENBACH, 2007; MARTINS, 2008; MALUF *et al.*, 2010; YANO *et al.*, 2011; Lizot *et al.*, 2012; DEFÁVERI *et al.*, 2012). Entretanto, nesta revisão serão apresentados os principais trabalhos já realizados sobre a determinação de sibutramina através de métodos cromatográficos, destacando-se a Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massas (CG-EM), utilizada no presente estudo.

A cromatografia é um método físico-químico que permite a separação dos componentes de uma mistura. Para tal, deve ocorrer a migração destes componentes no sistema cromatográfico em tempos diferentes como consequência de diferentes interações dos analitos com duas fases imiscíveis, sendo elas a fase móvel (líquido ou gás) e a fase estacionária, a qual é fixa em uma coluna ou em uma superfície sólida (DEGANI *et al.*, 1998; COLLINS *et al.*, 2006).

3.1. Métodos Cromatográficos

3.1.1. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) para a análise de sibutramina

Existem diversos trabalhos na literatura que empregam a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) com algumas modificações na fase móvel, nas proporções dos solventes utilizados para extração, tipo de detector e no tipo de coluna empregada para a determinação de sibutramina. Assim, não existe uma metodologia definida para determinação de sibutramina por CLAE, sendo as condições de análise adaptadas de acordo com os objetivos específicos para cada estudo realizado (CHEN *et al.*, 2002; SEGALL *et al.*, 2003; DIEFENBACH, 2007; MARTINS, 2008; ARIBURNU *et al.*, 2012).

Analisando a literatura observa-se que a maior parte das publicações trazem uma metodologia cromatográfica de separação da sibutramina de outros componentes da matriz através de uma coluna C18 com tamanho médio de partícula entre 4,0 e 5,0 μm (DIEFENBACH, 2007; ARIBURNU *et al.*, 2012). A separação dos diferentes componentes presentes na amostra é normalmente feita por eluição isocrática, com fase móvel de composição

e proporções variadas, com ou sem adição de modificadores (ácido, base, sal, entre outros). A fase móvel que vem sendo frequentemente mais utilizada é de metanol/água/trimetilamina, nas proporções, 80:20:0,5 (v/v/v) e 80:20:0,3 (v/v/v) (SEGALL *et al.*, 2003; DIEFENBACH, 2007; MARTINS 2008). Pode-se encontrar ainda outras composições de fase móvel como a de acetonitrila/água/ácido fórmico, nas proporções de 45:55:0,78 (v/v/v), além de acetonitrila (contendo 0,1% de ácido trifluoroacético) / ácido trifluoroacético 0,1%), nas proporções de 55:45 (v/v) (CHEN *et al.*, 2002; ARIBURNU *et al.*, 2012). Dessa maneira, a eluição no chamado modo reverso de eluição, que emprega uma fase estacionária apolar e uma fase móvel polar, é recomendada para a análise de sibutramina, molécula orgânica de baixa polaridade devido à presença de cadeias hidrocarbônicas, um átomo de cloro e um grupo amino terciário. A presença desse grupo amino terciário confere características básicas à sibutramina pelo que para controlar a retenção da sibutramina na fase estacionária e, modificar seu tempo de retenção, bem como, o formato de pico cromatográfico se faz necessário o uso de modificador ácido ou básico na fase móvel. O uso de modificador básico na fase móvel minimiza as interações do grupo amino com os grupos silanóis residuais presentes na fase estacionária resultando em maior reprodutibilidade do tempo de retenção e picos cromatográficos mais estreitos e simétricos. Já o uso de modificador ácido tem por finalidade diminuir o tempo de retenção da sibutramina ao ocorrer a protonação do grupo amino.

A presença de anel aromático na estrutura da sibutramina torna possível o uso de detector espectrofotométrico para a sua análise. O comprimento de onda de 223 ou 225 nm é normalmente utilizado para detecção da sibutramina quando utilizado detector por absorção no ultravioleta. No caso de detectores de fluorescência é reportado o monitoramento da sibutramina utilizando 225 nm para excitação e 316 nm para emissão de fluorescência. (SEGALL *et al.*, 2003; DIEFENBACH, 2007; MARTINS, 2008; ARIBURNU *et al.*, 2012).

No presente trabalho a técnica de CLAE-UV foi utilizada na otimização de um procedimento de extração de sibutramina a partir de suplementos alimentares utilizando como ferramenta um planejamento fatorial 2³.

3.1.2. Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massas (CG-EM) para a análise de sibutramina

A Cromatografia Gasosa (CG) e a Espectrometria de Massas (EM) são duas técnicas que foram combinadas para aliar o poder de resolução de misturas da cromatografia gasosa e a

alta especificidade da espectrometria de massas para a identificação de compostos orgânicos. O cromatógrafo gasoso trabalha geralmente com colunas capilares, as quais podem ser conectadas diretamente à fonte de ionização do espectrômetro. Em virtude dessas condições de funcionamento, o sistema de bombeamento do espectrômetro de massas tem a capacidade de captar todo o eluente da coluna. No caso da cromatografia líquida são comumente utilizadas colunas recheadas, nas quais a vazão do eluente precisa ser reduzida antes de ser encaminhada para a fonte do espectrômetro. Para isso devem ser utilizados divisores de fluxo, que não apresentam desempenho satisfatório, gerando perdas de detectabilidade (KITSON *et al.*, 1996; CHIARADIA *et al.*, 2008).

Somando-se ao problema ocasionado pela vazão da fase móvel os compostos separados por CLAE são relativamente pouco voláteis, o que dificulta a ionização utilizando as técnicas mais empregadas na EM, por isso fez-se necessário o desenvolvimento de uma tecnologia específica para a cromatografia líquida, o que torna o custo do equipamento superior ao CG-EM (LEANDRO *et al.*, 2005; CHIARADIA *et al.*, 2008; PRESTES *et al.*, 2009).

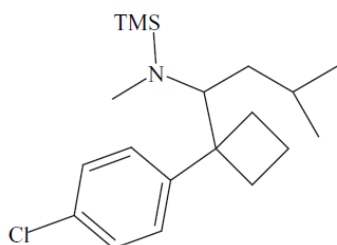
O CG-EM vem sendo um dos principais instrumentos empregados em análises de analitos em baixas concentrações e em misturas complexas, pois permite a separação cromatográfica dos componentes e a confirmação e determinação de vários compostos simultaneamente, através da disponibilidade de um banco de dados espectrais. Além dessa versatilidade, devido aos diversos modos de operação do espectrômetro de massas, a técnica pode ser altamente seletiva, bem como, sensível pois apresenta limites de detecção na ordem de nanogramas e trabalha com um volume de amostra muito baixo (LEANDRO *et al.* 2005; CHIARADIA *et al.*, 2008; PRESTES *et al.*, 2009).

Embora esta técnica seja muito utilizada para determinação de sibutramina em diversas matrizes, até o momento não foram encontrados estudos envolvendo a análise de sibutramina em suplementos alimentares através da cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas. Portanto, a revisão bibliográfica realizada neste estudo aborda estudos envolvendo a análise de sibutramina em diversas matrizes através da cromatografia gasosa.

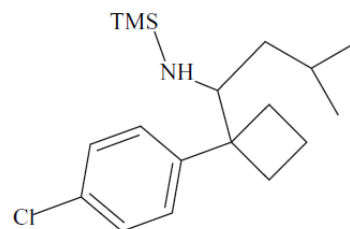
Lizot *et al.*, (2012) determinaram e validaram um método para identificação e quantificação de 40 fármacos de caráter básico, entre eles a sibutramina, em plasma humano. Para a extração dos fármacos da matriz empregou-se a extração líquido-líquido, sem etapa de evaporação do solvente. As análises foram realizadas em um cromatógrafo a gás com detector de nitrogênio-fósforo, caracterizando a retenção dos compostos através de seus índices de retenção, os quais apresentaram excelente reprodutibilidade e comparabilidade com amplas

bases de dados disponíveis no equipamento. A separação foi realizada em uma coluna capilar com 30 m de comprimento por 0,32 mm de diâmetro e 1 µm de espessura (30 m x 0,32 mm x 1 µm) contendo metilsilicone como fase estacionária. A temperatura inicial da coluna foi de 140 °C, mantida por 2 min, seguido de um incremento de temperatura de 10 °C.min⁻¹ até atingir 320 °C, sendo esta temperatura fixada por 5 min, totalizando o tempo de análise em 25 min. O gás de arraste utilizado foi o hélio, sob um fluxo constante de 4 mL.min⁻¹. O volume de injeção foi de 2 µL, com injetor mantido a 260 °C no modo de injeção sem divisão de fluxo (*splitless*). Segundo os autores, o método se mostrou apropriado devido a sua sensibilidade, rapidez e especificidade.

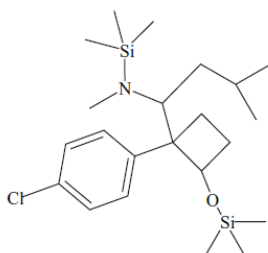
Em análises de urina, STRANO-ROSSI *et al.*, (2007) realizaram a detecção indireta de sibutramina através de seus metabólitos (Figura 5).



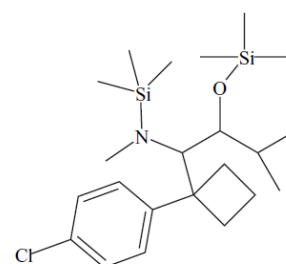
Mono-desmetilsibutramina (nor-S TMS)



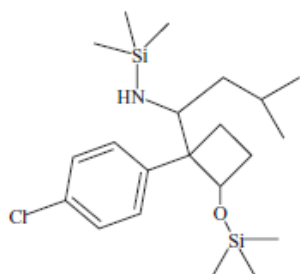
Bi-desmetilsibutramina (nor-nor-S TMS)



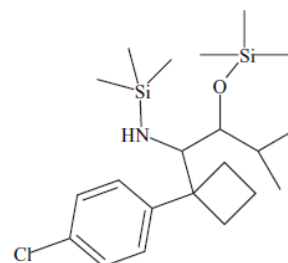
Mono-desmetilsibutramina hidroxilada
com grupo oxidril ligado ao anel
ciclobutano (OH-nor-S1)



Mono-desmetilsibutramina hidroxilada
com grupo oxidril ligados a cadeia
isopropílica (OH-nor-S2)



bi-desmetilsibutramina hidroxilado
(OH-nor-nor-S1)



bi-desmetilsibutramina hidroxilado com
cadeia isopropilica (OH-nor-nor-S2)

Figura 5. Estruturas dos metabolitos provenientes da sibutramina.

As amostras de urina foram tratadas por partição líquido-líquido, hidrólise enzimática, pré-concentração sob uma corrente de nitrogênio e derivatização antes de serem analisadas por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas. Os pesquisadores identificaram os sinais cromatográficos correspondentes a seis metabolitos provenientes da sibutramina sendo alguns derivados metilados e outros trimetilsilanos. Os derivados trimetilsilanos foram analisados em uma coluna capilar de metilsilicone (17 m x 0,20 mm x 0,11 μm) com temperatura inicial de 185 $^{\circ}\text{C}$ mantida por 2,5 min, e posterior rampa de aquecimento de 3 $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ até 210 $^{\circ}\text{C}$ aonde permaneceu por 3 min, seguido de um incremento de 15 $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ até 290 $^{\circ}\text{C}$. A temperatura do injetor foi de 280 $^{\circ}\text{C}$ com modo de injeção com divisão de fluxo (*Split*) 10:1. Para os derivados metilados a coluna capilar utilizada foi de fenil-metilsilicone (17 m x 0,2 mm x 0,33 μm). A temperatura inicial da coluna foi mantida em 90 $^{\circ}\text{C}$ por 1,5 min, seguindo de um incremento de temperatura de 25 $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ até 260 $^{\circ}\text{C}$ aonde foi mantida por 3 min, chegando a 300 $^{\circ}\text{C}$ a uma taxa de aquecimento de 25 $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ mantida novamente por 3 min. A temperatura do injetor e o método de injeção foram os mesmos utilizados na análise anterior. As leituras realizadas pelo espectrômetro de massas foram feitas pelo modo de varredura (*SCAN*). Os dados obtidos através do método analítico foram relevantes para detecção dos metabolitos produzidos pela sibutramina podendo ser aplicado em diferentes campos de análises forenses toxicológicas incluindo as análises anti-doping.

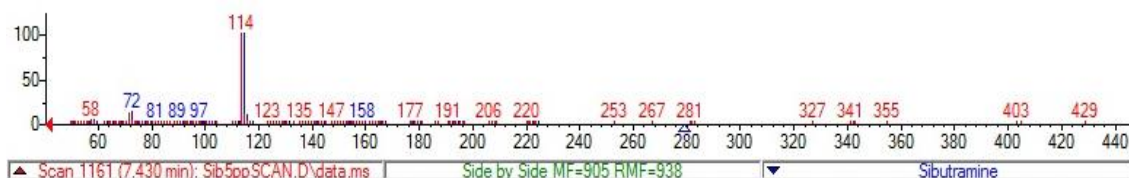
Seguindo o mesmo raciocínio STRANO-ROSSI *et al.*, (2008) realizaram um novo trabalho analisando a viabilidade da análise da saliva e da urina humana para detecção de estimulantes proibidos pelo controle antidoping. A coluna capilar de fenil-metilsilicone (17 m x 0,2 mm x 0,33 μm) foi novamente utilizada. No entanto a rampa de temperatura foi modificada para garantir o aparecimento de todos os picos cromatográficos dos estimulantes estudados. Os pesquisadores partiram de uma temperatura inicial de 85 $^{\circ}\text{C}$ mantida por 1,5 min, aumentando 15 $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ até atingir 270 $^{\circ}\text{C}$ seguido de um incremento de 50 $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ até 290 $^{\circ}\text{C}$ aonde foi mantida por 2,5 min. A temperatura do injetor foi de 270 $^{\circ}\text{C}$ com modo de injeção *splitless* pulsado, com uma pressão de pulso de 40 psi durante 0,5 min. O gás de arraste utilizado foi o hélio. As análises foram realizadas no modo de detecção SIM. Os resultados mostram que as concentrações absolutas e as suas variações em função do tempo transcorrido em relação ao consumo dos estimulantes foram diferentes na urina e na saliva, pelo fato dos estimulantes serem eliminados mais lentamente pela urina do que pela saliva. Contudo seria interessante utilizar as análises de saliva para complementar os resultados obtidos nos exames antidopings realizados atualmente.

SARDELA *et al.*, (2009) realizaram um estudo dos metabolitos de sibutramina presentes na urina humana através da cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas. A sibutramina foi administrada a cinco voluntários e foi coletada uma amostra de urina após 92 h. A coluna capilar utilizada apresentava 15 m de comprimento por 0,2 mm de diâmetro e 0,33 μm de espessura e sua temperatura inicial foi de 100 $^{\circ}\text{C}$ a qual foi mantida por 1 min. Em seguida a temperatura da coluna foi aumentada com taxa de aquecimento de 20 $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ até 290 $^{\circ}\text{C}$, aonde permaneceu por 5 min, totalizando um tempo de análise de 15,5 min. A temperatura do injetor foi mantida em 280 $^{\circ}\text{C}$ utilizando o modo de injeção *splitless*. Os resultados foram satisfatórios apresentando espectros de massas bem definidos para cada metabolito podendo ser utilizada como procedimento de confirmação em exames antidoping.

Uma das vantagens do acoplamento da cromatografia gasosa com a espectrometria de massas é que para conhecer a identidade de um pico cromatográfico é possível realizar a busca na biblioteca de espectros do espectrômetro de massas. Para tal, o espectro de massas do pico cromatográfico de interesse no cromatograma obtido pela análise da amostra é comparado com os espectros de massas registrados na biblioteca do equipamento, (Figura 6A). A busca na biblioteca de dados fornece a porcentagem de semelhança entre os espectros comparados. No entanto, cabe ao analista verificar a real correspondência entre esses espectros, tendo em conta

aspectos como, m/z do pico base do espectro, intensidades relativas entre os íons mais intensos ou mais representativos da substância em questão e composição isotópica (Figura 6B).

(A)



(B)

| # | Lib. | Match | R.Match | Prob. (%) | Name |
|---|------|-------|---------|-----------|-------------|
| 1 | M | 905 | 938 | 93.8 | Sibutramine |

Figura 6. Exemplo de Resultados obtidos através da Busca na Biblioteca de dados NIST do CG-EM: (A) Comparação entre o espectro obtido a partir da amostra analisada (em vermelho) e espectro da sibutramina constante na base de dados (em azul) e (B) Probabilidade do pico cromatográfico analisado ser sibutramina.

Tendo como base os trabalhos relatados na literatura, no presente estudo realizou-se a otimização e validação de método analítico por CG-EM seletivo para determinação de sibutramina em suplementos alimentares visando auxiliar no controle de qualidade dos produtos fornecidos pelo mercado de suplementos alimentares.

3.2. Aspectos Gerais sobre Validação de Métodos Analíticos

A preocupação com a segurança alimentar vem crescendo ao longo dos anos e com isso os métodos analíticos vêm se desenvolvendo para determinação de contaminantes como substâncias e/ou compostos químicos, para garantir a qualidade e segurança dos produtos. As técnicas de separação como por exemplo a CLAE e a CG estão ganhando cada vez mais espaço, por apresentarem versatilidade em análises quantitativas e qualitativas em diversos tipos de matriz. Entretanto, se faz cada vez mais importante a credibilidade e confiança dos resultados. O processo de validação de um método deve ser analisado pela sua eficiência segundo alguns parâmetros como: seletividade, linearidade, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), precisão (repetitividade e precisão intermediária) e exatidão. Os resultados desses parâmetros resultam na certeza ou não do método em questão ser confiável para sua aplicação. (BRASIL, 2003; RIBIANI *et al.*, 2004; ANDRADE, 2014).

A seletividade do método experimental representa a capacidade de avaliar de forma inequívoca a substância em exame na presença de componentes que podem interferir com a sua

determinação em uma amostra complexa. A seletividade garante que o pico de resposta seja exclusivamente do composto de interesse. Se a seletividade não for assegurada, pode comprometer a linearidade, exatidão e precisão (DIEFENBACH, 2007; ANDRADE, 2014).

O estudo da linearidade corresponde a capacidade do método de fornecer resultados proporcionais à concentração da substância em análise, dentro de uma determinada faixa de variação conhecida. Os resultados são estudados por métodos estatísticos específicos como a regressão linear pelo método dos mínimos quadrados, na maioria dos casos. A relação matemática entre o sinal e a concentração ou massa do analito na amostra deve ser determinada empiricamente, a partir de sinais medidos para massas ou concentrações conhecidas do mesmo. (RIBIANI *et al.*, 2004; ANDRADE, 2014).

A sensibilidade do método pode ser determinada pela variação da resposta do equipamento em função de uma pequena variação de concentração do analito, ou seja, pela inclinação da curva (coeficiente angular).

Para avaliar a capacidade do método de detectar e quantificar o analito em concentrações baixas são determinados os parâmetros de limite de detecção e limite de quantificação, respectivamente. O LD é a menor concentração de analito que o processo analítico pode diferenciar do ruído, porém não pode quantificar com precisão nas condições experimentais. Já o LQ representa a menor concentração da substância de interesse avaliada pelo método com exatidão e precisão aceitáveis (RIBIANI *et al.*, 2004; DIEFENBACH, 2007).

A precisão corresponde à dispersão de resultados entre os ensaios individuais, repetidos de uma mesma amostra, em ensaios semelhantes em condições definidas. A precisão é avaliada em vários níveis como de repetitividade, precisão intermediária ou reprodutibilidade. A repetitividade representa a concordância entre os resultados de várias análises em um curto intervalo de tempo obedecendo a condições de análises chamadas de condições de repetitividade, sendo elas: mesmo procedimento; mesmo analista; mesmo instrumento usado sob as mesmas condições e mesmo local. Essa determinação deve ser feita de um mínimo de nove determinações, seguida pela medida dos valores da área do pico ou altura do pico e determinação da estimativa do desvio padrão relativo de todas as análises (ANDRADE, 2012).

A precisão intermediária indica o efeito das variações intralaboratoriais devido a eventos como diferentes dias, analistas e equipamentos. A precisão intermediária é conhecida como a mais representativa da variabilidade dos resultados em um único laboratório. A reprodutibilidade é o grau de concordância entre os resultados obtidos pelo uso do mesmo procedimento analítico entre diferentes laboratórios, como parte de um estudo colaborativo,

assim os dados provenientes de apenas um laboratório não são suficientes para avaliar a reprodutibilidade do método (RIBIANI *et al.*, 2004).

O estudo da exatidão permite verificar se os resultados adquiridos para um determinado analito apresentam concordância com um valor teórico de referência considerado como valor verdadeiro. A exatidão pode ser avaliada de diversas maneiras como: o uso de materiais de referência certificados, a comparação de métodos analíticos, a adição de padrão e através de ensaios de recuperação (DIEFENBACH, 2007).

REFERÊNCIAS

- ANDRADE, K. J. (2014). **Otimização e Validação de Metodologias Analíticas para Determinação de 5-(Hidróximetil)-2-Furaldeído (HMF) em Alimentos com altos teores de açúcares.** [Dissertação] Universidade Estadual do Centro Oeste. Guarapuava.
- ARIBURNU, E.; ULUDAG, F. M.; YALCINKAYA, H.; YESILADA, E. (2012). Comparative determination of sibutramine as an adulterant in natural slimming products by HPLC and HPTLC densitometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.** v. 65, p. 77-81.
- Brasil (2003). Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução nº 899, de 29 de maio de 2003.** Determina a publicação do guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Disponível em: <<http://w-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=15132&word>>. Acesso em 09 jan 2015.
- CHEN, JUN; LU, WEI; ZHANG, QIZHI; JIANG, XINGUO (2002). Determination of the active metabolite of sibutramine by liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B.** v.785, p.197-203.
- COLLINS, C.H., BRAGA, G.L., BONATO, P.S. (2006). **Fundamentos de cromatografia.** Campinas: Editora da UNICAMP.
- DEFÁVERI S. A. M.; LAPORTA V. L.; DOS SANTOS R. M.; DA SILVEIRA L. R.; ALVES P. M.; RUBIM M. A. (2012). Avaliação da qualidade das cápsulas de cloridrato de sibutramina manipuladas em farmácias. **Disciplinarum Scientia. Série: Ciências da Saúde,** Santa Maria, v. 13, n. 1, p. 71-83.
- DEGANI, G. A. N.; CASS. B. Q.; VIEIRA, C. P. (1998). Cromatografia um breve ensaio. **Química nova na escola.**
- DIEFENBACH, I.C.F. (2007). Sibutramina: **Validação de metodologia e avaliação biofarmacotécnica.** [Dissertação] Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria.
- Kitson, F. G; Larsen, B. S; McEwen, C. N. (1996). **Cromatografia gasosa e espectrometria de massa - Um Guia Prático,** Academic: London. Disponível em: <http://books.google.com.br/books?hl=pt-BR&lr=&id=T2I4XSBREf0C&oi=fnd&pg=PP2&ots=dRVEuQhKLR&sig=XMyowmj-hWhmxcySuBhCDNaOJ2Q&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false>. Acesso em 16 out 2014.
- LEANDRO, C. C.; FUSSELL, R. J.; KEELY, B. J. (2005). Determination of priority pesticides in baby foods by gas chromatography tandem quadrupole mass spectrometry. **Journal of Chromatography A.** v.1085, p.207-212.
- LIZOT, L.F.; SILVA, L.L.; SPANIOL, B.; ANTUNES, M.V.; LINDEN, R.; LANARO, R. (2012). Determinação rápida de fármacos básicos em plasma por cromatografia a gás com detector de nitrogênio e fósforo. **Química Nova,** v. 35, n. 6, p. 1222-1227.

MALUF F. D E PONTAROLO R.; GILCÉLIA A. CORDEIRO, NOEMI NAGATA E PATRICIO PERALTA-ZAMORA. (2010). Determinação de sibutramina em formas farmacêuticas através de espectroscopia no infravermelho com refletância difusa e métodos de calibração multivariada. **Química Nova**, v. 33, n. 3, p. 649-652.

MARTINS, L.F.S. (2008). **Controle de qualidade do cloridrato de sibutramina matéria-prima e cápsulas em farmácias magistrais e avaliação preliminar da estabilidade**. [Dissertação] Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre: UFRGS.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C.B.G.; COLLINS, C.H.C.; JARDIM, I.C.S.F.; MELO, L.F.C. (2004). Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780.

ROSSI-STRANO, S.; COLAMONICI, C.; BOTRÈ, F. (2007). Detection of sibutramine administration: a gas chromatography/mass spectrometry study of the main urinary metabolites. **Rapid Communicative Mass Spectrom.** v. 21, p. 79-88.

ROSSI-STRANO, S.; COLAMONICI, C.; BOTRÈ, F. (2008). Parallel analysis of stimulants in saliva and urine by gas chromatography/mass spectrometry: Perspectives for “in competition” anti-doping analysis. **Analytica Chimica Acta.** v. 606, p. 217-222.

SARDELA, V. F.; MOTTA, M.T.R.; PADILHA, M.C.; PEREIRA, H.M.G.; AQUINO NETO, F.R. (2009). Analysis of sibutramine metabolites as N-trifluoroacetamide and O-trimethylsilyl derivatives by gas chromatography-mass spectrometry in urine. **Journal of Chromatography B.** v. 877, p. 3003-3011.

SEGALL, A.I., COLLADO, E.A.; RICCI, R.A.; PIZZORNO, M.T. (2003). Reversed-phase HPLC determination of sibutramine hydrochloride in the presence of its oxidatively-induced degradation products. **Journal of Líquid Chromatography & Related Technologies**, v.26, n. 6, p.977-86.

YANO, H.M.; GUARDIA, R.C.A.; AURICCHIO, M.T. (2011). Detecção de sibutramina e metoclopramida em alimentos para atletas. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 70, n. 4, p. 599-605.

CAPÍTULO 4. AMOSTRAGEM

Neste capítulo serão descritas informações acerca dos suplementos alimentares, escolhidos como amostras no presente estudo, incluindo uma revisão bibliográfica e notícias sobre adulterações em suplementos alimentares.

4.1. Suplementos Alimentares: Definição e Legislação

A portaria número 222/98 da Secretaria de Vigilância Sanitária é a atual legislação vigente no Brasil para suplementos alimentares. Os mesmos são definidos como: “Alimentos especialmente formulados e elaborados para praticantes de atividade físicas, incluindo formulações contendo aminoácidos oriundos da hidrólise de proteínas, aminoácidos essenciais quando utilizados em suplementação para alcançar alto valor biológico e aminoácidos de cadeia ramificada, desde que estes não apresentem ação terapêutica ou tóxica” (BRASIL, 1998). Os suplementos podem ser encontrados na forma de tabletes, drágeas, cápsulas, pós, granulados, pastilhas mastigáveis, líquidos, preparações semissólidas e suspensões. A mesma portaria classificou os suplementos alimentares nas categorias descritas a seguir (FERREIRA, 2010).

Os Repositores Hidroeletrólíticos são produtos que apresentam em sua formulação concentrações variadas de eletrólitos como sódio e cloreto, associada a concentrações variadas de carboidratos, com o objetivo de reposição hídrica e eletrolítica decorrente da prática de atividade física. Os Repositores Energéticos são outra classificação de suplementos alimentares, segundo a legislação atual exercida no Brasil, que contêm no mínimo 90% de carboidratos na sua formulação, podendo ser acrescidos de vitaminas e minerais (BRASIL, 1998).

Alimentos Proteicos são definidos como produtos com predominância de proteínas, podendo ser hidrolisadas ou não, em sua composição. Formulados com o intuito de aumentar a ingestão deste nutriente ou complementar a dieta, cujas necessidades proteicas não estejam sendo satisfatoriamente supridas pela qualidade ou quantidade alimentar rotineira. Existem também os Alimentos Compensadores que são produtos que devem conter concentração variada de macronutrientes tais como proteínas, carboidratos e gorduras, visando à adequação destes nutrientes na dieta de praticantes de atividade física (FERREIRA, 2010).

A portaria classifica outra categoria como Aminoácidos de cadeia ramificada que são conhecidos como BCAA (*branched chain amino acids*) compreendem três aminoácidos essenciais: leucina, isoleucina e valina, encontrados em fontes proteicas de origem animal.

Esses aminoácidos atuam como importante fonte energética para o músculo esquelético, durante períodos de estresse metabólico. Nessas situações, os BCAA's podem promover a síntese proteica, evitar o catabolismo proteico e servir como substrato para a gliconeogênese. Por fim, a portaria define Outros Alimentos com fins específicos para praticantes de atividades físicas como sendo outra categoria contendo produtos com várias formulações destinadas às necessidades metabólicas específicas ocasionadas pela prática de exercício físico (BRASIL, 1998; FERREIRA, 2010).

O Brasil diferencia-se de outros países por excluir alguns produtos do grupo de “Alimentos para Praticantes de Atividades Físicas”, tais como produtos fitoterápicos, estimulantes, hormônios e outras substâncias proibidas pelo Comitê Olímpico Internacional (COI). Com a evolução no conhecimento científico e com a necessidade de atualização da legislação sanitária de alimentos, a ANVISA com o propósito de melhorar o controle sanitário na área de alimentos, visando o cuidado com a saúde pública da população, publicou em novembro de 2008 a Consulta Pública N° 60 que propôs modificar a classificação dos suplementos alimentares no Brasil (FERREIRA, 2010).

Segundo a ANVISA alimentos para atletas são: “Produtos especialmente formulados para auxiliar os atletas a suprir suas necessidades nutricionais adicionais com o objetivo de rendimento. Esse produto visa complementar a alimentação do atleta e não deve ser utilizado como substituto de refeições ou única fonte alimentar” (BRASIL, 2008). A consulta também propôs a inclusão de dois novos grupos para os alimentos para atletas, sendo eles, “suplementos de creatina para atletas” e “suplementos de cafeína para atletas” que compõem o grupo denominado “compostos nitrogenados para atletas”, e redefinir o grupo de “Alimentos Compensadores” para “Suplemento alimentar para atletas em situações especiais” (FERREIRA, 2010).

Além dessas categorias descritas, os suplementos passaram a ser classificados como, “Repositor hidroeletrólítico para atletas”, “Repositor energético para atletas” e “Suplementos proteicos para atletas”, apresentando algumas modificações dependendo da composição específica para cada categoria. Entretanto, mesmo com o aumento das pesquisas em relação à qualidade dos suplementos alimentares, o crescimento do mercado não tem sido acompanhado de atualizações na legislação vigente. Isso proporciona fraudes e adulterações nos produtos que chegam até o consumidor, levando a eventuais riscos à saúde por um dano não esperado como consequência da presença de substâncias não informadas em seus rótulos (IBCA, 2004; FERREIRA, 2010).

4.2. Adultrações em Suplementos Alimentares

Os suplementos alimentares são utilizados para diversos fins, como equilibrar a dieta, melhorar o desempenho físico e perder peso, o que vem levando a um crescimento significativo do consumo destes produtos. Por isso, muitos suplementos associam aos seus rótulos o termo “produtos naturais”, que é geralmente interpretado como uma garantia de confiança e qualidade de segurança pelo usuário, visto que a preocupação com possíveis contaminantes é constante. Entretanto, estudos comprovam que a realidade do mercado de suplementos demonstra que diversos tipos de suplementos podem originar algum tipo de risco para a saúde pública por estarem adulterados com substâncias proibidas, não declaradas ou até mesmo em excesso. Este fato pode ser decorrente da classificação da ANVISA que classifica suplementos alimentares como alimento e não como medicamento o que favorece as fraudes com alguns fármacos para potencializar os seus resultados. (GURLEY *et al.*, 2000; DE COCK *et al.*, 2001; PARRA *et al.*, 2011; GOMES, 2011; MARTINS, 2012; DECONINCK *et al.*, 2014).

Os casos mais frequentes de contaminação são: a existência de um contaminante que está presente na matéria-prima, a ocorrência de uma contaminação cruzada durante o processo de fabricação, a contaminação durante o processo de embalagem, transporte ou armazenamento, a incorporação no produto de quantidades de substâncias diferentes das que são referidas na rotulagem e a adulteração com substâncias que podem ser incorporadas com o objetivo de aumentar a eficiência do produto (COLE e FETROW, 2003; MARTINS, 2012).

Mesmo sem um controle de qualidade específico para os suplementos alimentares, a ANVISA alerta sobre alguns produtos que apresentam em sua composição alguma substância considerada ilícita, tais como esteroides anabolizantes e os estimulantes a base de compostos anfetamínicos, como a sibutramina. Em julho de 2012 a ANVISA emitiu um alerta para o risco sobre o consumo de alguns tipos de suplementos alimentares, como: o Jack3D, Oxy Elite Pro e Lipo-6 Black, entre outros, por causarem graves danos à saúde dos usuários (MOLINA, 2012).

Outro caso de adulteração em suplementos alimentares aconteceu em Chicago onde um policial que precisava emagrecer comprou um determinado suplemento para o ajudar na perda de peso, porém o rótulo do produto indicava a presença de vários ingredientes naturais mas não se referia a presença de anfetaminas, que foram detectadas nos exames periódicos de rotina. Caso parecido aconteceu no Brasil em 2007 onde uma empresa foi interdita sob a acusação de fabricar e vender suplementos adulterados (PEREIRA, 2007; COHEN, 2009).

O Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) detectou a presença de sibutramina na composição do suplemento alimentar denominado GF-1 Body Size, além disso a empresa também foi acusada de comercializar o CLA (Ácido Linoléico Conjugado), sem registro no Ministério da Saúde e proibido pela ANVISA (PEREIRA, 2007; COHEN, 2009).

Gomes (2011) realizou uma pesquisa de substâncias ilícitas em suplementos alimentares aplicando técnicas cromatográficas e espectroscópicas. Os resultados apontam que 15% das amostras analisadas continham substâncias ilícitas (efedrina e mefedrona), além verificar a inconformidade da composição descrita nos rótulos de alguns produtos.

Como mencionado anteriormente, com o grande consumo de suplementos alimentares pela população. Faz-se necessário realizar pesquisas relacionadas à qualidade destes produtos.

4.3. Amostras de Suplementos Alimentares

Para o estudo da validação da metodologia analítica e da otimização da extração de sibutramina foi utilizado uma matriz de um suplemento alimentar que não apresentasse pico cromatográfico por CLAE-UV ou por CG-EM que indicasse a presença de sibutramina, o suplemento escolhido foi o whey protein. Já para as análises das aplicações da metodologia foram utilizados nove suplementos alimentares de fabricantes diversos. Os mesmos foram catalogados (Tabela 2) pela atribuição de siglas arbitrárias que não permitissem a identificação da marca do produto analisado. Como critério de seleção dos suplementos para análise foi adotado que os mesmos fossem termogênicos e apresentassem na embalagem indicações de uso para reduzir o apetite, a sensação de fome e auxílio na perda de peso. Os suplementos alimentares analisados foram adquiridos no comércio local de Guarapuava, pela internet e no mercado internacional.

Tabela 2. Características dos suplementos utilizados nos estudos de determinação de sibutramina.

| Amostra | Tipo de Suplemento | | |
|----------------|---------------------------|----------------------|--------|
| | Redutor de apetite | Queimador de gordura | Outros |
| AM1 | | | X |
| AM2 | X | | |
| AM3 | | | X |
| AM4 | X | X | |
| AM5 | X | X | |
| AM6 | | X | |
| AM7 | X | X | |
| AM8 | X | X | |
| AM9 | X | X | |

REFERÊNCIAS

BRASIL (1998). Portaria SVS/MS nº 222, de 24 de Março de 1998. Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de Alimentos para Praticantes de Atividade Física. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília.

COLE, M.R.; FETROW, C.W. (2003). Adulteration of dietary supplements. **American Journal of Health-System Pharmacy**. n. 60, p. 1576 – 80.

COHEN, P.A. (2009). American Roulette – Contaminated Dietary Supplements. **New England Journal Medicine**. v. 361, n. 16, p. 1523 – 1525.

DE COCK, K. J. S.; DELBEKE, F. T.; VAN EENDO, P.; DESMET, N.; ROELS, K.; DE BACKER, P. (2001). Detection and determination of anabolic steroids in nutritional supplements. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v. 25, p. 843-852.

DECONINCK, E.; CAUWENBERGH, T.; BOTHY, L. J.; CUSTERS, D.; COURSELLE, P.; DE BEER, O. J. (2014). Detection of sibutramine in adulterated dietary supplements using attenuated total reflectance-infrared spectroscopy. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v. 100, p. 279 – 283.

FERREIRA, D. C. A. (2010). **Suplementos Alimentares: Adequabilidade à legislação e efeitos metabólicos em ratos**. [Dissertação] Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba. João Pessoa.

GOMES, A.F.C. (2011). **Pesquisa de substâncias ilícitas em suplementos alimentares**. [Dissertação] Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa. Caparica.

GURLEY, B. J.; GARDNER, S. F.; HUBBARD, M. A. (2000). Content versus label claims in ephedracontaining dietary supplements. **American Journal of Health-System Pharmacy**. v. 57, p. 963-969.

IBCA (2004). Instituto Brasileiro de Educação para o Consumo de Alimentos e Congêneres. Associação Brasileira da Indústria de Alimentos Dietéticos e para Fins Especiais. **Suplementos Alimentares: relatório de pesquisa**. Disponível em:<http://www.abiad.org.br/pdf/consumidor_e_suplementos_alimentares.pdf>. Acesso em: 30 jun de 2013.

MARTINS, P. A. (2012). Suplementos alimentares adulterados com medicamentos: Um problema de saúde pública. **Riscos e Alimentos**.

MOLINA, D. (2012). Anvisa alerta para risco de consumo de suplemento alimentar. **ANVISA**, Brasília. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/anvisa+portal/anvisa/sala+de+imprensa/assunto+de+interesse/noticias/anvisa+alerta+para+risco+de+consumo+de+suplemento+alimentar>>. Acesso em 15 jul 2013.

PARRA, T. M. R.; PALMA, A.; PIERUCCI, R. T. P. A. (2011). Contaminação de suplementos alimentares dietéticos usados para prática esportiva: uma revisão de literatura. **Revista Brasileira de Ciências do Esporte**, Florianópolis, v. 33, n. 4, p. 1071 – 1084.

PEREIRA, E. (2007). Interditada fábrica de suplemento alimentar adulterado. **UOL Notícias**, São Paulo. Disponível em: <http://noticias.uol.com.br/saude/ultimas-noticias/estado/2007/06/19/interditada-fabrica-de-suplemento-alimentar-adulterado.htm>. Acesso em: 15 jul. 2013.

**CAPÍTULO 5. OTIMIZAÇÃO DO PROCEDIMENTO DE EXTRAÇÃO DE
SIBUTRAMINA A PARTIR DE SUPLEMENTOS ALIMENTARES**

Para garantir uma melhor extração de sibutramina a partir de suplementos alimentares investigou-se a influência de três variáveis na porcentagem de recuperação de sibutramina através de um planejamento fatorial 2³ utilizando experimentos de adição/recuperação do analito. Todas as análises foram realizadas no Laboratório de Cromatografia e Produtos Naturais (CRONAT) em parceria com o Laboratório de Bioprocessos de Cogumelos localizados na Universidade Estadual do Centro-Oeste no campus CEDETEG.

5.1. Materiais

5.1.1. Amostra de Suplemento

Para a determinação da melhor condição de extração que permite uma maior porcentagem de recuperação de sibutramina a partir de suplementos alimentares escolheu-se uma amostra de suplemento que não apresentava nenhum sinal de sibutramina tanto por CLAE-UV quanto por CG-EM.

5.1.2. Padrão de Sibutramina

Utilizou-se um padrão de sibutramina fornecido por uma farmácia de manipulação localizada em Guarapuava, Paraná, garantindo toda sua qualidade e pureza segundo laudo de qualidade (ANEXO A). Na Tabela 3 estão citadas as principais informações sobre o laudo de qualidade da sibutramina utilizada no estudo.

Tabela 3. Informações sobre o laudo de qualidade da sibutramina utilizada como padrão de referência.

| Característica | Descrição |
|--|-------------------------------|
| Nome | Sibutramina HCl monohidratada |
| Data de Fabricação | 01/03/2012 |
| Data de Validade | 28/02/2015 |
| País de Origem | Índia |
| Massa Molecular | 342,32 g·mol ⁻¹ |
| Classe Terapêutica | Anorexígeno |
| Ponto de Fusão | 191,5 °C |
| Solubilidade em água | 2,9 mg·mL ⁻¹ |
| Identificação por Infravermelho | Positivo |
| Identificação pela reação de cloretos | Positivo |
| Teor de Pureza | 99,9% |

5.1.3. Equipamentos

As amostras foram pesadas em uma balança analítica GILBERTINI - CRYSTAL 200 SMI, com precisão de quatro casas decimais. Durante a extração da amostra foi utilizado um agitador de tubos (Vortex – Phoenix-AP56) e posteriormente as amostras foram submetidas a duas fontes de homogeneização, micro-ondas convencional (CONSUL MU31A0) e banho ultrassônico (Ultra CLEAR/UNIQUE). Para melhor separação do sobrenadante as amostras foram centrifugadas em centrífuga microprocessada (QUIMIS). As análises por CLAE foram realizadas em um cromatógrafo líquido Waters Series 600 equipado com um sistema de detecção por arranjo de diodos.

5.1.4. Reagentes

Os reagentes utilizados neste trabalho foram de grau HPLC e todas as soluções foram preparadas com água ultrapura obtida pelo sistema Millipore Type 1 Ultrapure Water, modelo Simplicity UV. Para os estudos da extração de sibutramina foram utilizados os solventes metanol grau HPLC (Tedia) 99,9%, a acetronitrila grau HPLC (LiChrosolv) 99,8% e o diclorometano (Mallinckrodt) 99,9%.

5.2. Métodos

5.2.1. Otimização da extração de sibutramina em suplementos alimentares

A otimização da extração foi realizada por experimentos de adição e recuperação de sibutramina ao suplemento alimentar utilizado como branco ou referência neste estudo. Testes de solubilidade da sibutramina padrão foram realizados primeiramente em diversos solventes como diclorometano, metanol, acetoneitrila e soluções aquosas ácida (pH = 3,0) e básica (pH = 12,0). A sibutramina foi bem solúvel em diclorometano, metanol e acetoneitrila e parcialmente solúvel nas soluções aquosas testadas. Devido à maior volatilidade do diclorometano quando comparado ao metanol e à acetoneitrila esse solvente foi descartado para evitar erros nas concentrações das soluções padrão por evaporação do solvente nos frascos de análise.

Para a otimização da extração foi realizado um Planejamento Fatorial 2³ avaliando a relação entre as variáveis tipo de solvente orgânico extrator, número de extrações e método de

homogeneização (Tabela 4) com um nível de confiança de 95% através da análise dos efeitos pelos gráficos de Pareto e de efeitos padronizados e principais. O software estatístico empregado para tratar os dados foi o Minitab 16.

Tabela 4. Níveis das variáveis do planejamento fatorial 2^3 para otimização do procedimento de extração de sibutramina a partir de suplementos alimentares.

| Níveis | Solvente | Número de Extrações | Método de Extração |
|--------|--------------|---------------------|--------------------|
| - | Metanol | 3x | Ultrassom |
| + | Acetonitrila | 5x | Micro-ondas |

Para comparar a eficiência do processo de extração, 0,50g de suplemento alimentar foram enriquecidos com 2 mL de uma solução padrão de sibutramina de $5000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ e deixados em repouso, ao abrigo da luz durante 24 h. Após esse período, foi adicionado o solvente extrator e as misturas de suplemento fortificado e o solvente extrator foram expostas a duas fontes de homogeneização, banho ultrassônico durante 10 min ou micro-ondas durante 15 s. A separação do sobrenadante foi efetuada por centrifugação em 2400 rpm por 5 min. A resposta avaliada foi a porcentagem de recuperação de sibutramina determinada por CLAE com detecção espectrofotométrica descrita no item 5.2.2. Os melhores resultados foram utilizados como critérios para a escolha dos parâmetros para extração de sibutramina a partir de suplementos alimentares e o método de extração otimizado foi então empregado em todas as extrações de sibutramina a partir de suplementos. Na Figura 7 está expresso o esquema do procedimento de extração utilizado.

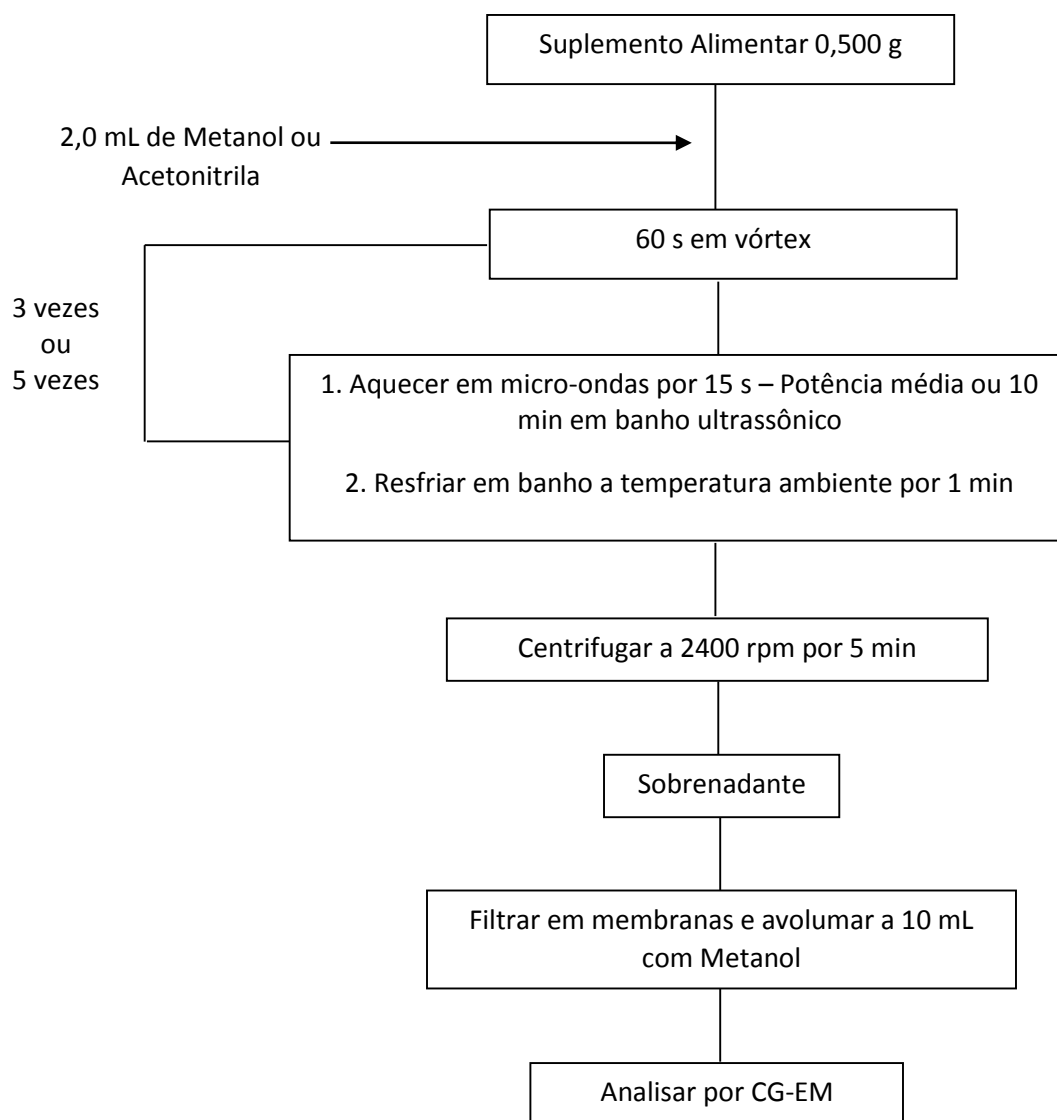


Figura 7. Procedimento para otimização da extração de sibutramina considerando as variáveis do planejamento fatorial 2³.

5.2.2. Condições de análise por CLAE-UV

A quantificação de sibutramina por CLAE-UV foi realizada no cromatógrafo líquido Waters Series 600 equipado com um sistema de detecção por arranjo de diodos. Todas as amostras foram dissolvidas em metanol (grau HPLC) e filtradas por membranas de 0,22 µm de nylon. As condições analíticas para determinação de sibutramina foram desenvolvidas e validadas durante o trabalho de conclusão de curso de OLIVEIRA, (2014).

A coluna empregada como fase estacionária foi XTerraPhenyl (5µm 4,6 x 250mm). A temperatura da coluna foi de 30 °C. A cromatografia foi realizada em fase reversa no modo de eluição isocrático com 80% de acetonitrila e 20% H₂O/NH₄OH 0,02% (pH = 12-13) (v/v). A

vazão da fase móvel foi de $1,0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ e a injeção da amostra foi manual através de um sistema de alça de amostragem (loop) de $5 \mu\text{L}$. O comprimento de onda de detecção empregado foi de 225 nm . A detecção da sibutramina foi verificada em um tempo de retenção próximo de 11 min . A Figura 8 exibe o cromatógrafo líquido utilizado na realização do procedimento.



Figura 8. Cromatógrafo Líquido Waters Series 600 utilizado na otimização do procedimento de extração de sibutramina em suplementos alimentares.

FONTE: Arquivo pessoal.

5.3. Resultados e Discussões

Para a otimização do procedimento foi realizada a extração de acordo com os critérios estabelecidos no planejamento fatorial 2^3 descrito no item 5.2.1. Como resposta à otimização, foi determinada a concentração de sibutramina por CLAE-UV e calculada a porcentagem de recuperação de sibutramina em relação à adicionada ao suplemento. Todos os ensaios foram realizados em triplicata. A Tabela 5 mostra os valores de porcentagem de recuperação para cada ensaio.

Tabela 5. Resultados dos ensaios do planejamento fatorial 2^3 para otimização do método de extração de sibutramina a partir de suplementos alimentares.

| Ensaio | Solvente | Número de Extrações | Método de Extração | % Recuperação (Média \pm DP) |
|--------|--------------|---------------------|--------------------|--------------------------------|
| 1 | Metanol | 3x | Ultrassom | $32,3 \pm 1,05$ |
| 2 | Acetonitrila | 3x | Ultrassom | $26,6 \pm 1,50$ |
| 3 | Metanol | 5x | Ultrassom | $31,8 \pm 1,45$ |
| 4 | Acetonitrila | 5x | Ultrassom | $29,9 \pm 1,70$ |

| | | | | |
|---|--------------|----|------------|-------------|
| 5 | Metanol | 3x | Microondas | 86,6 ± 3,58 |
| 6 | Acetonitrila | 3x | Microondas | 68,9 ± 5,97 |
| 7 | Metanol | 5x | Microondas | 95,6 ± 1,01 |
| 8 | Acetonitrila | 5x | Microondas | 70,9 ± 1,69 |

Os resultados da otimização da extração demonstram que o uso do microondas possibilitou recuperações maiores de sibutramina e no intervalo de 80-120% aceito pela ANVISA (2013) para a faixa de concentrações do analito na matriz da ordem de ppb e ppm. A Figura 9 mostra o gráfico de Pareto para os efeitos padronizados dos fatores considerados no planejamento fatorial 2³. O gráfico de Pareto mostra que o método de extração empregado, ultrassom ou micro-ondas, foi muito significativo no processo de extração da sibutramina a partir do suplemento. O uso do micro-ondas aumentou a porcentagem de recuperação em duas vezes se comparado ao ultrassom (Figura 9). Da mesma forma, o solvente de extração, metanol ou acetonitrila, foi um fator importante para a extração do analito, sendo o metanol mais eficiente (Figura 9). Verifica-se também que há um efeito de interação entre os fatores solvente e método de extração, sendo que a combinação metanol e micro-ondas produziu as melhores recuperações (Figuras 9 e 10). O número de ciclos de extração não influenciou significativamente a porcentagem de extração de sibutramina, mas os efeitos secundários entre, número de extrações e solvente extrator e entre número de extrações e método de extração, ficaram no limite de significância para o nível de confiança de 95%. Por esse motivo, o método de extração final compreende 3 ciclos de extração devido à economia de tempo e de reagentes no processo de extração, bem como, o metanol como solvente extrator e aquecimento por micro-ondas.

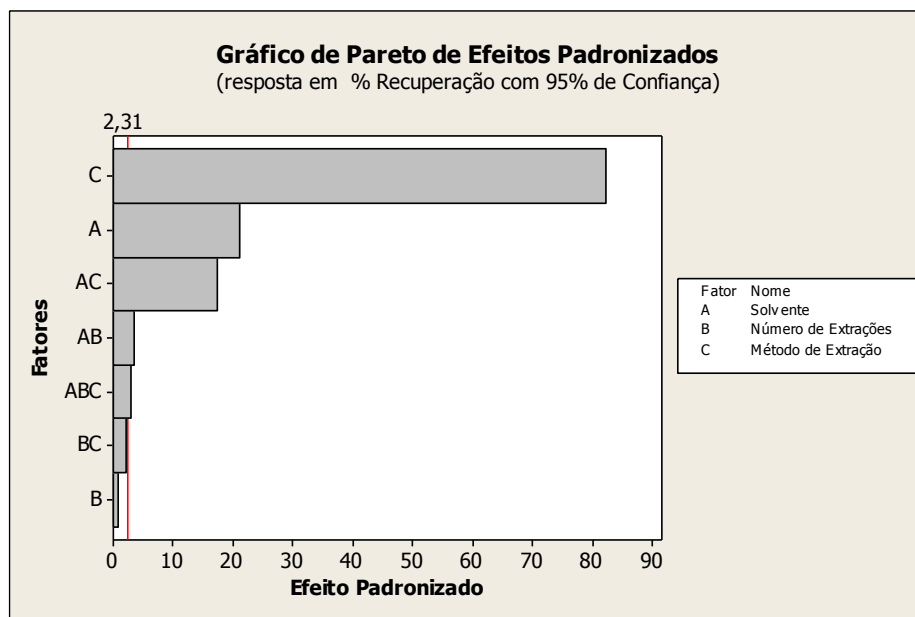


Figura 9. Gráfico de Pareto para os efeitos do planejamento fatorial 2^3 para a otimização do procedimento de extração de sibutramina em suplemento alimentar no nível de 95% de confiança.

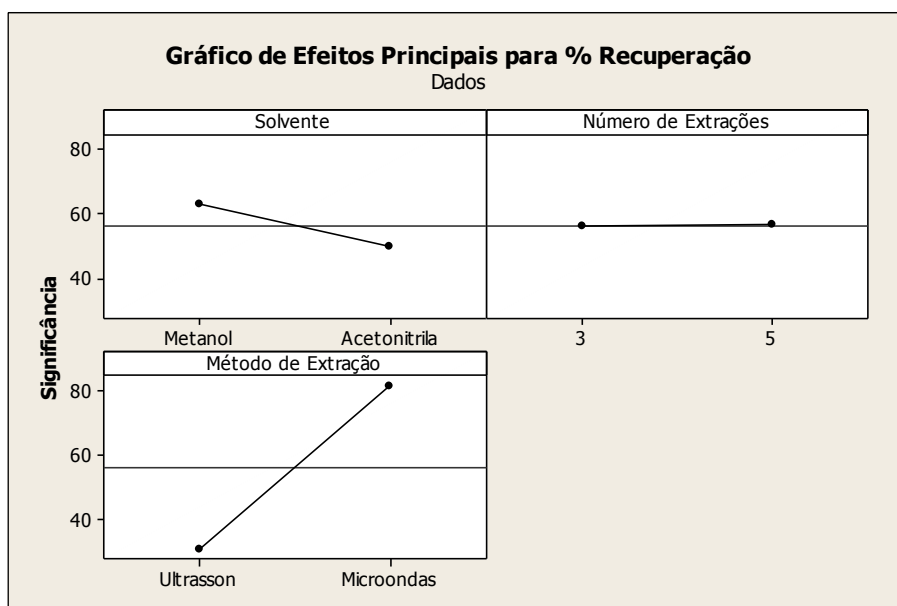


Figura 10. Gráfico dos efeitos principais para otimização da extração de sibutramina de suplementos.

5.4. Conclusões Parciais

A partir do estudo realizado foi possível adequar um método de recuperação de sibutramina a partir de suplementos alimentares. O processo de extração final resultou relativamente simples e usa metanol como solvente, em três ciclos de extrações utilizando o micro-ondas para favorecer a solubilização da sibutramina. O método desenvolvido permitiu porcentagens de recuperação entre 80 e 115 %.

REFERÊNCIA

OLIVEIRA, S. C. (2014). Otimização de Metodologia Analítica para Extração e Quantificação de Sibutramina em Suplementos Alimentares. [Trabalho de Conclusão de Curso] Universidade Estadual do Centro Oeste. Guarapuava.

NETO, S. B. B.; SCARMINIO, S. I 7 BRUNS E. R. Como fazer experimentos: aplicações na ciência e na indústria. Editora Bookman. p. 120-155.

**CAPÍTULO 6. VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO POR CG-EM PARA
DETERMINAÇÃO DE SIBUTRAMINA EM SUPLEMENTOS ALIMENTARES**

6.1. Materiais

6.1.1. Amostras

Para o estudo de validação da metodologia analítica proposta foi utilizado um suplemento alimentar que não apresentava nenhum pico cromatográfico pelas técnicas de CLAE-UV e CG-EM que indicasse a presença de sibutramina, conforme descrito no item 5.1.1.

6.1.2. Reagentes

O solvente utilizado foi o metanol grau HPLC (Tedia) com 99,9% de teor de pureza.

6.1.3. Equipamentos

As análises por CG-EM foram realizadas em um cromatógrafo gasoso acoplado a um espectrômetro de massas (Agilent 7890A series) com ionização por elétrons e analisador de massas de quadrupolo.

6.2. Métodos

6.2.1. Condições de Análises por CG-EM

As análises de sibutramina em suplementos alimentares foram realizadas em sistema de CG-EM, com um espectrômetro de massa de ionização por elétrons modelo 5975C VL MSD (Agilent Technologies). A separação dos componentes das amostras foi obtida utilizando uma coluna capilar de sílica Agilent 19091S-433 de temperatura máxima de trabalho igual a 325 °C e dimensões de 30m x 250µm x 0,25 µm. O hélio foi utilizado como gás de arraste em um fluxo constante de 1 ml·min⁻¹. O programa de temperatura do forno aplicado teve início a 85 °C com taxa de aquecimento de 30 °C por min até 260 °C. A partir dessa temperatura foi diminuída a taxa de aquecimento em 10 °C por min até a temperatura final de 310 °C. O tempo total de análise foi de 12,3 min. A temperatura da interface entre o CG e o EM foi de 310 °C. Os espectros de massa foram obtidos por ionização de elétrons (EI) a 70 eV. Para as análises

qualitativas, o espectrômetro de massas foi operado no modo varredura e foram monitorados os íons no intervalo de 50 a 500 m/z (modo SCAN). Para as análises quantitativas foi utilizado o modo de monitoramento seletivo dos íons, conhecido como modo SIM (selective ion monitoring). Para tal, foram selecionados os íons m/z 72,1, 114,1 e 137, os quais foram escolhidos pela inspeção do espectro de massas obtido para a sibutramina padrão. A análise dos dados foi efetuada usando o software GCMS5975 Data Analysis (MSD ChemStation G1701EA E.02.02.1431). Os arquivos que trazem as características e certificam que o equipamento está calibrado são chamados de Tunes e estão em anexo (ANEXO B e C). A Figura 11 exibe o cromatógrafo gasoso utilizado na realização do procedimento.



Figura 11. CG-MS Agilent Technologies 7890A utilizado para o desenvolvimento e validação da metodologia analítica para determinação de sibutramina em suplementos alimentares.
FONTE: Arquivo pessoal.

6.2.2. Preparo das Amostras para Análise por CG-EM

Todas as amostras de suplementos analisadas por CG-EM foram primeiramente extraídas levando em consideração as condições de extração encontradas pelo planejamento fatorial descrito no capítulo 5. Primeiramente, 0,50 gramas de suplemento (fortificado ou não com sibutramina) foram adicionados 2,0 mL de metanol. A mistura foi agitada em vortéx por 60 s e a seguir aquecida por 15 s em micro-ondas. Após esse tempo, a mistura foi resfriada em banho com água a temperatura ambiente. Para facilitar a separação do sobrenadante, as amostras foram centrifugadas a 2400 rpms durante 5 min. O sobrenadante foi filtrado em

membrana de nylon 0,45 μm e avolumado em balão volumétrico de 5,0 mL. A Figura 12 detalha passo a passo o procedimento de extração otimizado.

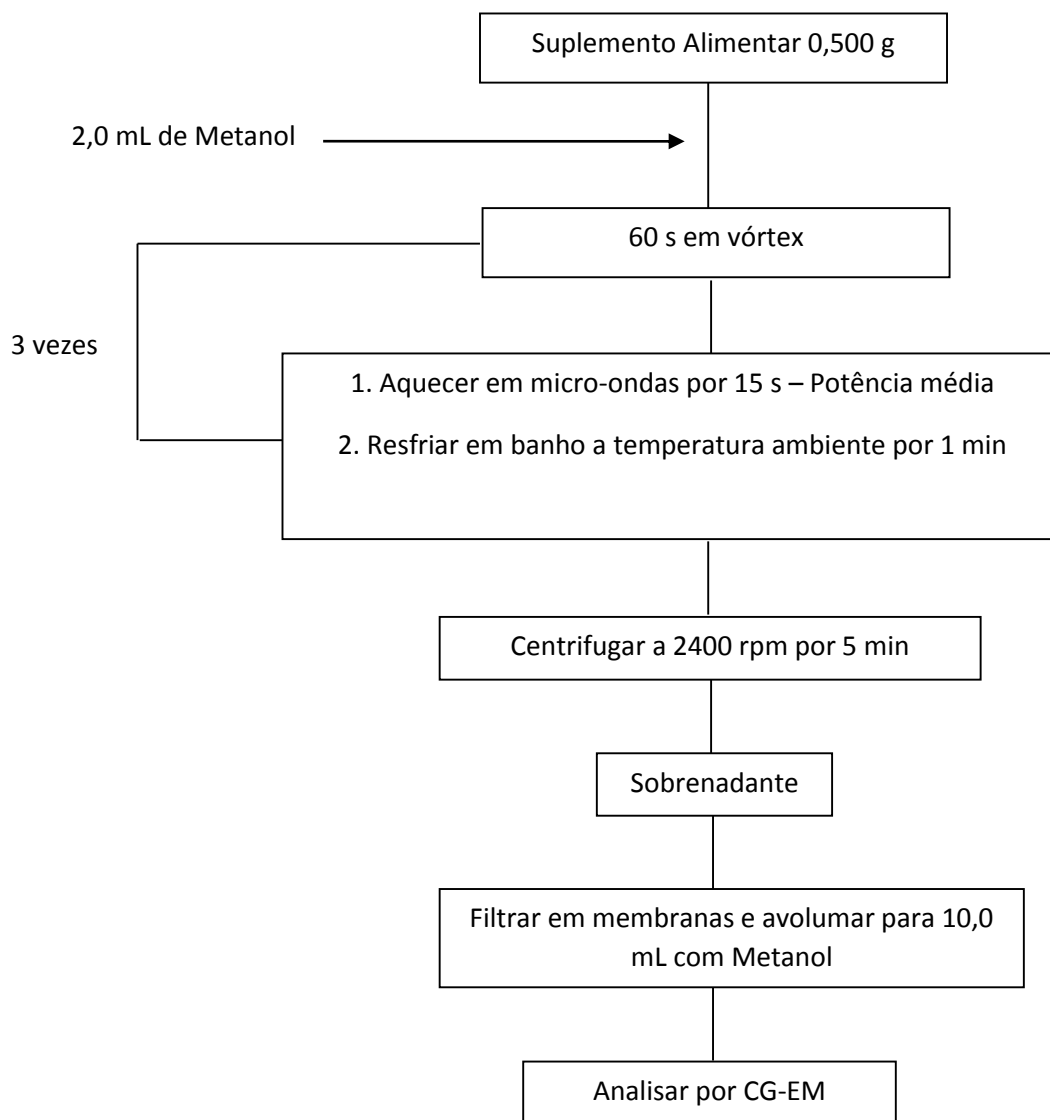


Figura 12. Procedimento otimizado para extração de sibutramina a partir de suplementos alimentares.

6.3. Validação do Método Analítico por CG-EM

O processo de validação de um método deve ser analisado pela sua eficiência segundo alguns parâmetros como: seletividade, linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, precisão (repetitividade e precisão intermediária) e exatidão. Os resultados desses parâmetros resultam na certeza ou não do método em questão ser confiável para sua aplicação (ANVISA 2003; RIBIANI *et al.*, 2004; ANDRADE, 2014).

6.3.1. Seletividade

Para análise de seletividade foram preparadas duas amostras distintas. Primeiramente, 0,50 g de suplemento foram enriquecidos com uma alíquota de 250 μL de uma solução padrão de sibutramina de $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, para uma concentração de 5000 ng de sibutramina por grama de suplemento. Após 24 horas, o suplemento enriquecido foi extraído conforme procedimento de extração otimizado (Figura 11). Adicionalmente, foi preparada uma amostra branco pela extração de 0,50 g de suplemento. Todos os extratos foram filtrados por membrana e analisados por CG-EM, inicialmente no modo varredura, pelo monitoramento dos íons no intervalo de m/z de 50 a 500 e, posteriormente no modo SIM onde foram monitorados apenas os íons m/z 72,1, 114,1 e 137. O íon m/z 114,1 foi utilizado como íon quantificador e os íons 72,1 e 137 como íons qualificadores. A escolha desses íons foi realizada pela inspeção do espectro de massas obtido para uma solução padrão de sibutramina de $5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ a qual foi injetada no CG-EM nas condições analíticas descritas no item 6.2.1.

Assim a seletividade do método foi avaliada pela comparação dos cromatogramas da amostra branco, do padrão de sibutramina e do extrato do suplemento enriquecido. A análise foi baseada na inspeção da ocorrência de picos cromatográficos com o tempo de retenção da sibutramina e análise do espectro de massas para esse componente (modo varredura).

6.3.2. Linearidade

A partir de uma solução estoque de sibutramina na concentração de $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ foi obtida uma solução de trabalho com concentração final de $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de sibutramina. Foram então pré-estabelecidas seis concentrações de sibutramina preparadas a partir da solução de trabalho, sendo elas 50, 100, 300, 500, 700 e $1100 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$. Cada solução padrão foi preparada em triplicata. A linearidade foi verificada por regressão linear dos dados de calibração e pelo teste de falta ajuste no nível de 95% de confiança. Para avaliação da significância dos coeficientes da equação da curva de calibração (intercepto e coeficiente angular) foi aplicado um teste-*t* e intervalos de confiança e de predição foram construídos no mesmo nível de confiança (ANDRADE, 2014).

6.3.3. LD e LQ

Os valores dos limites de LD e LQ foram calculados utilizando-se os resultados da curva de calibração obtida para a avaliação da linearidade do (item 6.3.2). A determinação dos respectivos limites foi realizada a partir do desvio padrão do intercepto e do valor da inclinação da curva de calibração conforme as Equações 1 e 2:

$$LD = \frac{3 \cdot s}{b} \quad \text{Equação 1.}$$

$$LQ = \frac{10 \cdot s}{b} \quad \text{Equação 2.}$$

Em que:

s = desvio padrão do intercepto da curva de calibração

b = inclinação da curva de calibração

6.3.4. Precisão

A precisão do método de determinação de sibutramina por CG-EM foi verificada a partir do estudo da repetitividade e de precisão intermediária e expressa por meio do desvio padrão relativo, conforme a Equação 3.

$$\%DPR = s \cdot 100/x \quad \text{Equação 3.}$$

Sendo que:

s = Desvio padrão;

\bar{x} = Média das Concentrações

As estimativas da repetitividade e da precisão intermediária foram obtidas pela análise de três níveis de concentração (baixo, médio e alto) de sibutramina em suplementos alimentares e extraídos conforme procedimento otimizado e ilustrado na Figura 11. Para as análises da precisão intermediária as amostras de suplementos (0,50 g) foram fortificadas com 2500 e 25000 ng de sibutramina para uma concentração de 5000 ng.g⁻¹ e 50000 ng.g⁻¹, respectivamente

(Tabela 6). Para a precisão intermediária as soluções foram analisadas em três dias diferentes, sendo que os extratos foram preparados a cada dia de análise.

Tabela 6. Preparo das soluções para análise da precisão intermediária para validação da metodologia de determinação de sibutramina em suplementos alimentares.

| | | |
|--|-----------|------------|
| Solução de trabalho ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) | 10 | 100 |
| Alíquota (μL) | 250 | 250 |
| Massa de sibutramina adicionada a 0,5 g de suplemento (ng) | 2500 | 25000 |
| Volume final da extração (mL) | 5 | 5 |
| Fator de Diluição | - | 1:10 |
| Concentração final de sibutramina ($\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$) | 500 | 500 |

Na análise da repetitividade as soluções foram injetadas no cromatógrafo em um único dia em um curto intervalo de tempo, ou seja, no período da manhã e à tarde. Os suplementos foram fortificados nas concentrações de 1000, 5000, 50000 ng de sibutramina por grama de suplemento sendo preparados em triplicatas (Tabela 7).

Tabela 7. Preparo das soluções para análise da repetitividade para validação da metodologia de determinação de sibutramina em suplementos alimentares.

| | | | |
|--|----------|-----------|------------|
| Solução de trabalho ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) | 1 | 10 | 100 |
| Alíquota (μL) | 500 | 500 | 500 |
| Massa de sibutramina adicionada a 0,5 g de suplemento (ng) | 500 | 2500 | 25000 |
| Volume final da extração (mL) | 5 | 5 | 5 |
| Fator de Diluição | - | - | 1:5 |
| Concentração final de sibutramina ($\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$) | 100 | 500 | 1000 |

6.3.5. Exatidão

A exatidão do método foi avaliada por meio de teste de recuperação em quatro ensaios distintos. As concentrações variaram de 5000 $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ a 10000 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de sibutramina em suplemento. Após o enriquecimento, foi realizado o procedimento descrito no capítulo 5. Cada extração foi realizada com 2,5 mL do solvente e resultando na adição de 5,0 mL de solvente. As amostras mais concentradas de 10000, 5000 e 10000 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ foram avolumadas para 10,0 mL, retirou-se uma alíquota desta solução diluindo-a em 10,0 mL para obtenção de uma concentração final de 500 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ (Tabela 8). A eficiência da recuperação foi calculada de acordo com a Equação 4.

$$\text{Recuperação (\%)} = C_1 \cdot 100\% / C_2$$

Onde:

C_1 = Concentração experimental;

C_2 = Concentração teórica

Tabela 8. Preparo das soluções para análise da exatidão para validação da metodologia de determinação de sibutramina em suplementos alimentares.

| Concentração de sibutramina por grama de suplemento ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) | 5 | 50 | 1000 | 5000 |
|---|----------|-----------|-------------|-------------|
| Solução de trabalho ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) | 10 | 100 | 5000 | 5000 |
| Alíquota (μL) | 250 | 250 | 100 | 500 |
| Massa de sibutramina adicionada a 0,5 g de suplemento (μg) | 2,5 | 25 | 500 | 2500 |
| Volume final (mL) | 5 | 5 | 10 | 10 |
| Fator de diluição | - | 1:5 | 1:100 | 1:500 |
| Concentração final de sibutramina ($\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$) | 500 | 1000 | 500 | 500 |

6.4. Resultados e Discussões

6.4.1. Seletividade

Para verificar se o método analítico desenvolvido é seletivo para determinar sibutramina em suplementos alimentares primeiramente uma solução padrão de sibutramina de $5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ em metanol foi analisada e monitorada no modo de varredura (Figura 13). Pode-se verificar na Figura 13A que o cromatograma apresenta apenas o pico da sibutramina entre 7,4 e 7,5 min, sendo um pico estreito mas com ligeira cauda devido à interação entre o grupo amino e sítios ativos da fase estacionária. Para verificar a identidade do pico cromatográfico observado foi realizada uma busca na biblioteca de dados NIST do CG-EM e foi possível confirmar que o padrão utilizado corresponde à sibutramina e apresentou o espectro de massas ilustrado na Figura 13B.

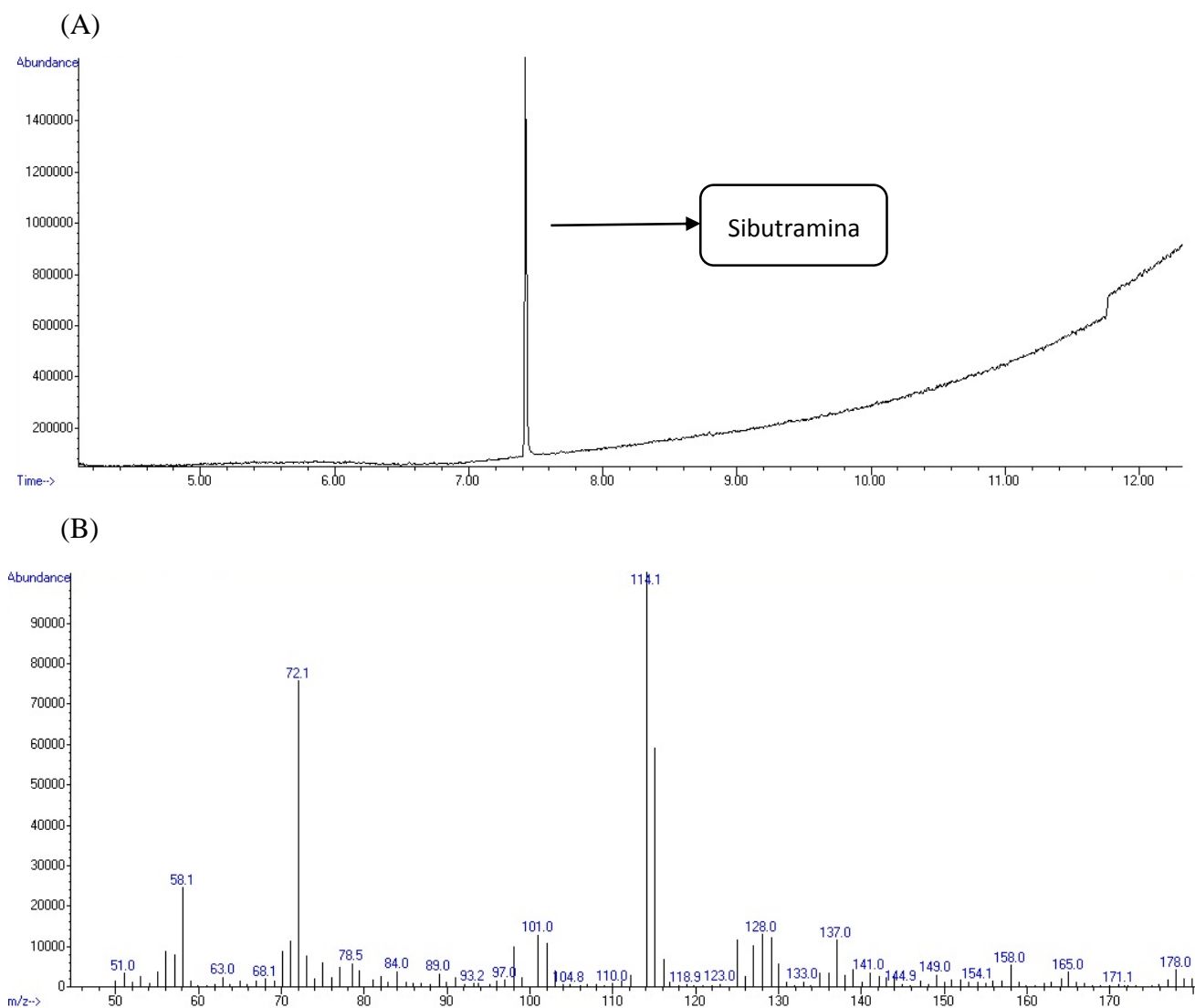


Figura 13. Cromatograma do padrão de sibutramina na concentração $5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$: (A) Cromatograma de íons total (TIC) adquirido no modo SCAN e (B) Espectro de massas do pico cromatográfico em 7,43 min correspondente à sibutramina.

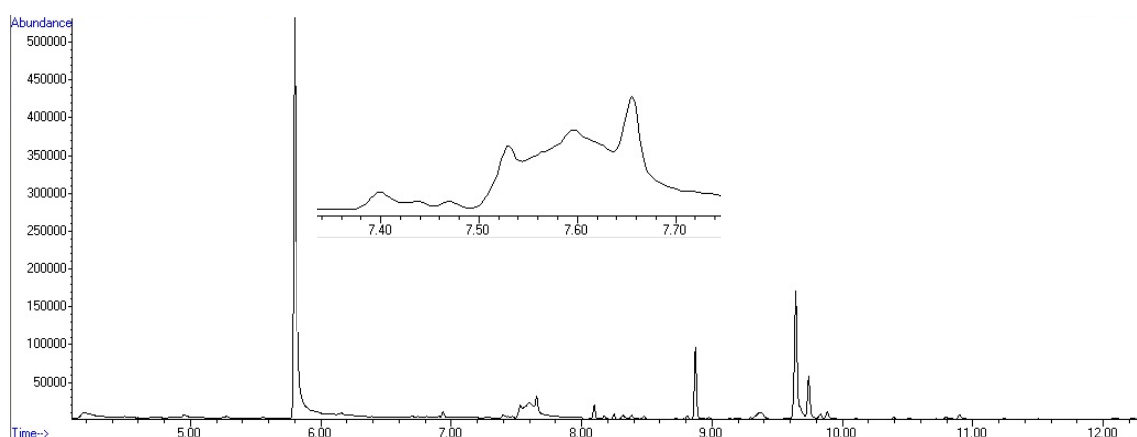
Dependendo do modo como os cromatogramas são adquiridos em CG-EM temos que o detector de massas pode se comportar como um detector universal e/ou um detector específico. Quando os dados são adquiridos no modo varredura o analisador do espectrômetro de massas varia a voltagem aplicada ao conjunto de quadrupolos de maneira que é possível detectar todos os íons produzidos no intervalo de m/z previamente determinado. Tem se assim o cromatograma de íons total (em inglês TIC) que mostra a abundância absoluta de todos os íons produzidos para cada tempo de retenção. Já quando o espectrômetro de massas opera no modo de monitoramento de íons seletivo (SIM) apenas os íons de m/z preestabelecida pelo analista são adquiridos. Nesse modo de detecção a CG-EM se torna uma técnica analítica muito seletiva ou

específica dependendo de se os íons escolhidos são de ampla ocorrência ou característicos do analito em questão.

Tendo em conta o espectro de massas obtido para a sibutramina (Figura 13B), neste trabalho foi escolhido o íon mais intenso de m/z 114,1 do espectro de massas da sibutramina como íon quantificador. Os íons de m/z 72,1 e 137 foram escolhidos como qualificadores. Assim, o pico cromatográfico em 7,43 min somente será identificado e quantificado como sibutramina quando presente os íons escolhidos nas proporções relativas observadas no espectro da solução padrão de sibutramina. Deve-se mencionar que como os íons qualificadores tem m/z pequena e apresentam uma porcentagem relativa baixa, os mesmos não podem ser considerados como exclusivos da sibutramina. Porém a combinação de tempo de retenção e o monitoramento da abundância relativa dos três íons torna o método analítico altamente seletivo.

Na Figura 14 são mostrados os cromatogramas adquiridos no modo SIM para (A) o extrato de uma amostra branco de suplemento alimentar que não contem sibutramina e (B) o extrato da mesma amostra de suplemento alimentar enriquecida com sibutramina na concentração $2500 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ resultando em uma concentração em solução após extração de $500 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$.

(A)



(B)

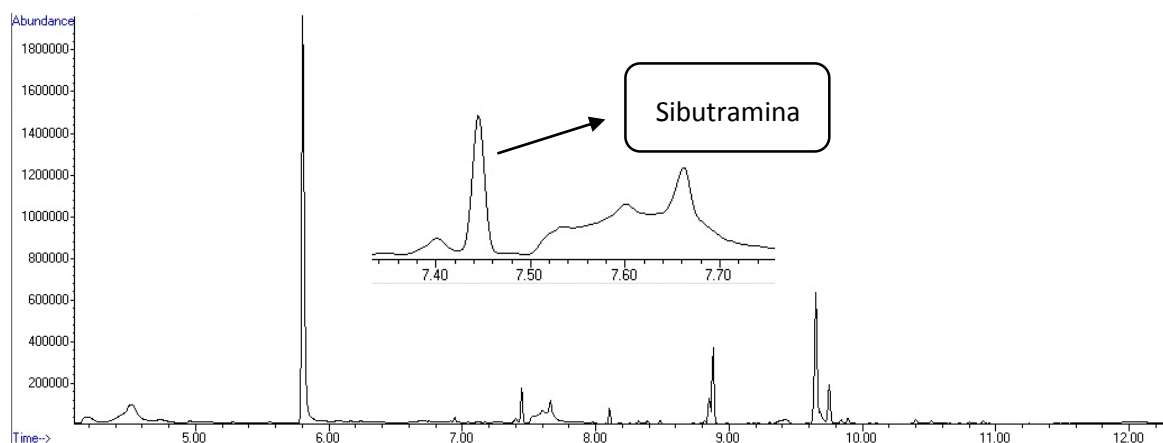


Figura 14. Cromatograma do extrato do suplemento: (A) Cromatograma do suplemento sem sibutramina adquirido no modo SIM e (B) Cromatograma do suplemento fortificado com sibutramina ($2500 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$) adquirido no modo SIM.

Levando em consideração que o pico cromatográfico da sibutramina ocorre entre 7,43 e 7,46 min, pode-se observar a ausência do mesmo no cromatograma do branco utilizado. Portanto, pode-se concluir que o método é seletivo para determinação de sibutramina em amostras de suplementos e que outros componentes da matriz não apresentarão interferência para a quantificação de sibutramina no suplemento.

6.4.2. Linearidade

Para determinar a linearidade do método analítico desenvolvido para determinação de sibutramina em suplementos alimentares por CG-EM foi construída uma curva de calibração em seis níveis de concentração sendo elas 50, 100, 300, 500, 700, 1100 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$. Aos dados de área do pico cromatográfico de sibutramina e sua concentração foi aplicado o método de regressão linear dos mínimos quadrados, obtendo uma curva analítica de calibração (Figura 15) (ANDRADE, 2014).

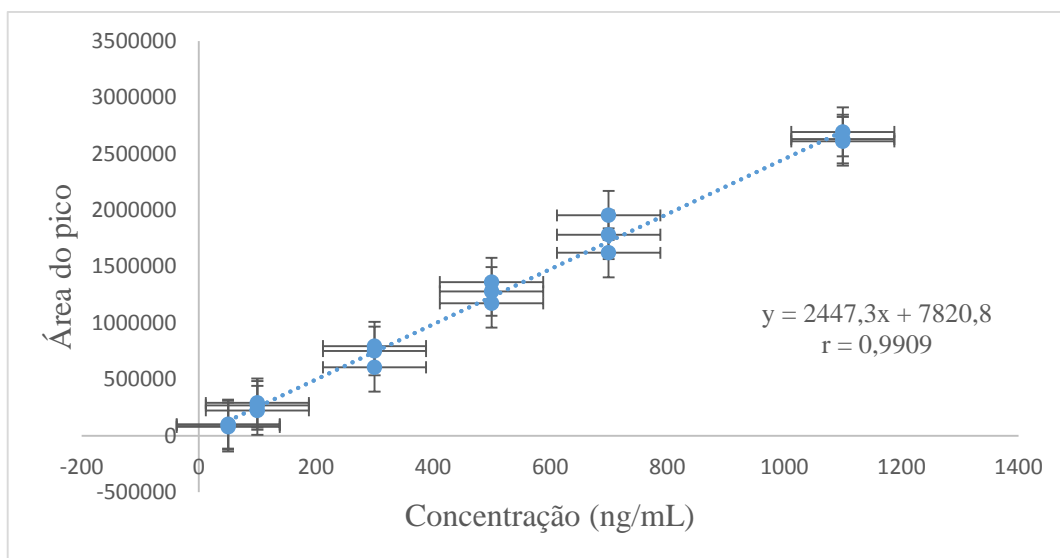


Figura 15. Curva analítica obtida por regressão linear para os dados de área do pico cromatográfico de sibutramina.

A Anvisa (2003) estabelece como critério mínimo aceitável o coeficiente de correlação (r) igual a 0,99 o que demonstra que o coeficiente de correlação obtido encontra-se dentro dos limites recomendados (Tabela 9). O coeficiente de determinação R^2 determina a variabilidade dos dados experimentais. Através desse estudo foi obtido um valor de R^2 igual a 99,09%, valor que demonstra o bom ajuste do modelo linear a os dados da curva de calibração, pois apenas 0,91% da variabilidade é devida aos resíduos (ANDRADE, 2014).

Tabela 9. Resultados da análise de regressão linear e do teste de falta de ajuste no nível de 95% de confiança.

| Regressão* | | Falta de ajuste** | | r | R^2 |
|---|--------------|-------------------|--------------|------------------------------|--------------|
| $F_{\text{regressão}}$ | valor de p | F_{faj} | valor de p | | |
| 1733,25 | 0,000 | 1,01 | 0,441 | 0,9909 | 99,0% |
| Coeficientes de Calibração \pm Erro Padrão | | | | $t_{\text{observado}}^{***}$ | valor de p |
| Intercepto: 7821 \pm 34381 | | | | 0,23 | 0,823 |
| Inclinação: 2447,29 \pm 58,78 | | | | 41,63 | 0,000 |

* $F_{\text{crítico}}(0,05; 1,16) = 4,49$; ** $F_{\text{faj}}(0,05; 4, 12) = 3,26$; *** $t_{\text{crítico}}(0,025,16) = 2,12$

Para verificar a linearidade do método realizou-se o teste de falta de ajuste (F_{faj}) aos dados da curva de calibração (Tabela 8). Como F_{faj} não foi significativo a 95% de confiança ($p > 0,05$) e $F_{\text{regressão}}$ apresentou valor muito superior ao do $F_{\text{crítico}}$ pode-se afirmar que os resultados fornecidos pelo modelo linear são significativos, sendo o mesmo adequado para correlacionar a área do pico da sibutramina com a sua concentração em cada amostra (ANDRADE, 2014). Este resultado pode ser ressaltado pela regressão linear que apresentou um valor de $F_{\text{regressão}}$ altamente significativo ($p = 0,000$) observado em 95% de confiança.

A significância dos coeficientes da calibração (inclinação e intercepto) foi verificada no intervalo de confiança de 95% de confiança. O resultado do *test-t* indicou que o intercepto da curva pode ser desconsiderado da equação, isto se justifica por este coeficiente não apresentar significância, ou seja, quando a reta é prolongada, ela passará pela origem dos eixos da curva de calibração.

Os resultados para inclinação da curva de calibração mostraram ser significativos ($p < 0,05$) e pelo valor de *t* maior que do *t crítico*. Deste modo, pode-se afirmar que o método analítico proposto é sensível a pequenas variações na concentração de sibutramina.

Levando em consideração todas as análises e mantendo o intercepto, o modelo é representado pela equação:

$$\text{Área} = 7820,8 + 2447,3 * \text{Concentração de sibutramina em ng.mL}^{-1}$$

6.4.3. LD e LQ

Os valores de LD e LQ foram calculados para determinar qual a quantidade mínima de sibutramina que pode ser analisada pelo método, os valores encontrados utilizando os dados da curva analítica nas equações 1 e 2 foram de 14,94 ng.mL⁻¹ e 45,29 ng.mL⁻¹, respectivamente. ROSSI-STRANO *et.al* (2007) encontraram valores de LD e LQ para a análise em CG-EM de estimulantes em saliva e urina humana para o controle “antidoping”, dentre os estimulantes estudados por ele estava a sibutramina. Os valores encontrados por ROSSI-STRANO *et.al* (2007) foram 5 ng.mL⁻¹ de LD e 10 ng.mL⁻¹ de LQ. Esse estudo foi realizado utilizando uma faixa de concentração de 1, 2, 5, 10, 25, 50, 100 e 200 ng.mL⁻¹, o que justifica os valores menores encontrados de LD e LQ.

6.4.4. Precisão

Para o estudo da repetitividade do método as amostras foram fortificadas com 500, 2500 e 25000 ng de sibutramina para cada meio grama de suplemento. As análises foram realizadas em triplicata e em único dia, porém, em períodos diferentes, manhã e tarde. Na Tabela 10 estão expressos os valores de concentrações encontrados associados à precisão da determinação obtida como desvio padrão e desvio padrão relativo.

Tabela 10. Resultados da análise da repetitividade para validação da metodologia de determinação de sibutramina em suplementos alimentares.

| | | | |
|--|-------------|--------------|--------------|
| Concentração inicial (ng.g⁻¹) | 500 | 2500 | 25000 |
| Concentração após extração (ng.ml⁻¹) | 100 | 500 | 5000 |
| Concentração final (ng.ml⁻¹) | 100 | 500 | 5000 |
| Média ± DP | 137,0 ± 5,8 | 625,2 ± 33,2 | 984,4 ± 93,1 |
| Recuperação Média % | 137,0 | 125,0 | 98,4 |
| RSD (%) | 4,26 | 5,32 | 9,46 |

A precisão intermediária do método foi determinada através da análise de duas concentrações diferentes de sibutramina em três dias consecutivos. Foram enriquecidas amostras de suplemento com sibutramina nas concentrações de 2500 ng.g⁻¹ e 25000 ng.g⁻¹, seguido pelo procedimento de extração. Após a extração as amostras foram avolumadas para 5,0 mL sendo que a amostra enriquecida com 25000 ng.g⁻¹ foi diluída para obter uma concentração final de 500 ng.mL⁻¹. As amostras foram preparadas em triplicatas verdadeiras e as soluções extrativas foram analisadas por CG-EM. Os resultados obtidos para as recuperações de sibutramina em suplemento obtida pelo respectivo método em dias diferentes foram expressos, conforme a Tabela 11.

Tabela 11. Resultados da análise da precisão intermediária para validação da metodologia de determinação de sibutramina em suplementos alimentares.

| Concentração inicial (ng.g⁻¹) | 5000A | 5000B | 5000C | 50000A | 50000B | 50000C |
|--|--------------|--------------|--------------|---------------|---------------|---------------|
| Concentração após extração (ng.ml⁻¹) | 500 | 500 | 500 | 5000 | 5000 | 5000 |
| Concentração final (ng.ml⁻¹) | 500 | 500 | 500 | 500 | 500 | 500 |
| 1 dia | 594,2 | 592,1 | 528,7 | 437,4 | 508,9 | 524,4 |
| 2 dia | 563,3 | 579,2 | 568,9 | 546,2 | 562,2 | 514,6 |
| 3 dia | 561,7 | 584,2 | 540,2 | 488,7 | 495,4 | 484,9 |
| Média ± DP | 578,6 ± 32,4 | | | 489,7 ± 46,0 | | |
| Recuperação Média% | 111,6 | | | 101,40 | | |
| RSD (%) | 5,60 | | | 9,40 | | |

Segundo a ANVISA (2003), são aceitáveis valores de RSD (%) que estejam abaixo de 15%. Os resultados demonstram que o método desenvolvido é preciso por apresentar valores de RSD (%) menores que 15% para a determinação de sibutramina em suplementos.

6.4.5. Exatidão: Teste de Adição e Recuperação de Padrão

Para a elaboração do teste de recuperação quatro amostras de suplementos foram fortificadas com sibutramina em diferentes níveis de concentração, sendo eles: 2500 ng, 25000 ng, 500µg e 2500 µg para cada meio grama de suplemento, preparando todos os níveis de concentração em triplicata. Os resultados de recuperação foram calculados de acordo com a Equação 4, e na Tabela 12 estão apresentados os valores das análises de recuperação obtidos.

Tabela 12. Resultados da análise da exatidão para validação da metodologia de determinação de sibutramina em suplementos alimentares.

| Concentração inicial (ng.g) | Concentração Teórica (ng·mL ⁻¹) | Concentração Experimental (ng·mL ⁻¹) | Recuperação (%) | Média ± DP |
|-----------------------------|---|--|-----------------|---------------|
| 2500 | 500 | 561,79 | 112,35 | 112,41 ± 2,95 |
| | | 584,26 | 116,85 | |
| | | 540,23 | 108,04 | |
| 25000 | 1000 | 932,33 | 93,23 | 98,91 ± 8,62 |
| | | 1088,40 | 108,84 | |
| | | 946,58 | 94,65 | |
| Concentração inicial (µg.g) | Concentração Teórica (µg·mL ⁻¹) | Concentração Experimental (µg·mL ⁻¹) | Recuperação (%) | Média ± DP |
| 500 | 500 | 445,03 | 89,00 | 87,69 ± 4,90 |
| | | 468,69 | 93,73 | |
| | | 401,71 | 80,34 | |
| 2500 | 500 | 397,14 | 79,42 | 82,97 ± 3,44 |
| | | 440,67 | 88,13 | |
| | | 406,77 | 80,34 | |

O método proposto por CG-EM apresenta exatidão adequada para análise de sibutramina em suplementos alimentares segundo as normas da ANVISA, pois os resultados obtidos estão dentro da faixa estabelecida de 80 – 120% de recuperação. Adicionalmente, segundo a Associação Oficial dos Químicos Analíticos (AOAC INTERNACIONAL 2012) para concentrações na ordem de nanogramas utilizadas no presente trabalho a faixa aceitável é mais ampla variando entre 60 – 115 %. Analisando os resultados observou-se que a recuperação foi menor para as maiores concentrações em µg.g do que para as concentrações em ng.g, isto pode ser justificado pelo fato de que as concentrações na ordem de µg.g precisam ser diluídas mais vezes para que possam entrar na curva de calibração obtida no item 6.4.2. o que pode gerar erros diminuindo assim a porcentagem de recuperação das mesmas.

6.5. Conclusões Parciais

Com o desenvolvimento do presente trabalho foi possível validar a metodologia analítica proposta por CG-EM para quantificação de sibutramina em suplementos alimentares. Pode-se afirmar que o método apresentou linearidade adequada na faixa de calibração utilizada, foi seletivo para todas as amostras analisadas e apresentou precisão e exatidão adequadas.

REFERÊNCIAS

ANDRADE, K. J. (2014). **Otimização e Validação de Metodologias Analíticas para Determinação de 5-(Hidróximetil)-2-Furaldeído (HMF) em Alimentos com altos teores de açúcares.** [Dissertação] Universidade Estadual do Centro Oeste. Guarapuava, 2014.

ANVISA (2003). Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução n° 899, de 29 de maio de 2003.** Determina a publicação do guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Disponível em: <http://w-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=15132&word>. Acesso em 09 jan 2015.

AOAC INTERNACIONAL (2012). Association of Oficial Analytical Chemists. **Guidelines For Standard Method Performance Requirements Aoac Official Methods Of Analysis (2012).** Appendix F, p. 2. Disponível em:<www.aoac.org>. Acesso em: novembro de 2014.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C.B.G.; COLLINS, C.H.C.; JARDIM, I.C.S.F.; MELO, L.F.C. (2004). Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova.** v. 27, n 5, p. 771-780.

ROSSI-STRANO, S.; COLAMONICI, C.; BOTRÈ, F. (2007). Detection of sibutramine administration: a gas chromatography/mass spectrometry study of the main urinary metabolites. **Rapid Communicative Mass Spectrom.** v. 21, p. 79-88.

CAPÍTULO 7. ANÁLISE DE SUPLEMENTOS ALIMENTARES

Para investigar a possibilidade de adulteração de suplementos alimentares por sibutramina foram adquiridas amostras dos mesmos no comércio local de Guarapuava – PR, pela internet e no mercado internacional. Como critério de seleção dos suplementos alimentares para análise foi adotado que os mesmos fossem termogênicos e apresentassem na embalagem indicações de uso para reduzir o apetite, a sensação de fome e auxiliar na perda de peso. Os reagentes utilizados e as condições de análises foram as descritas no capítulo 6.

Após a extração dos suplementos seguindo o procedimento proposto, os extratos foram injetados no CG-EM e os dados adquiridos no modo de varredura para análise qualitativa (Figura 16).

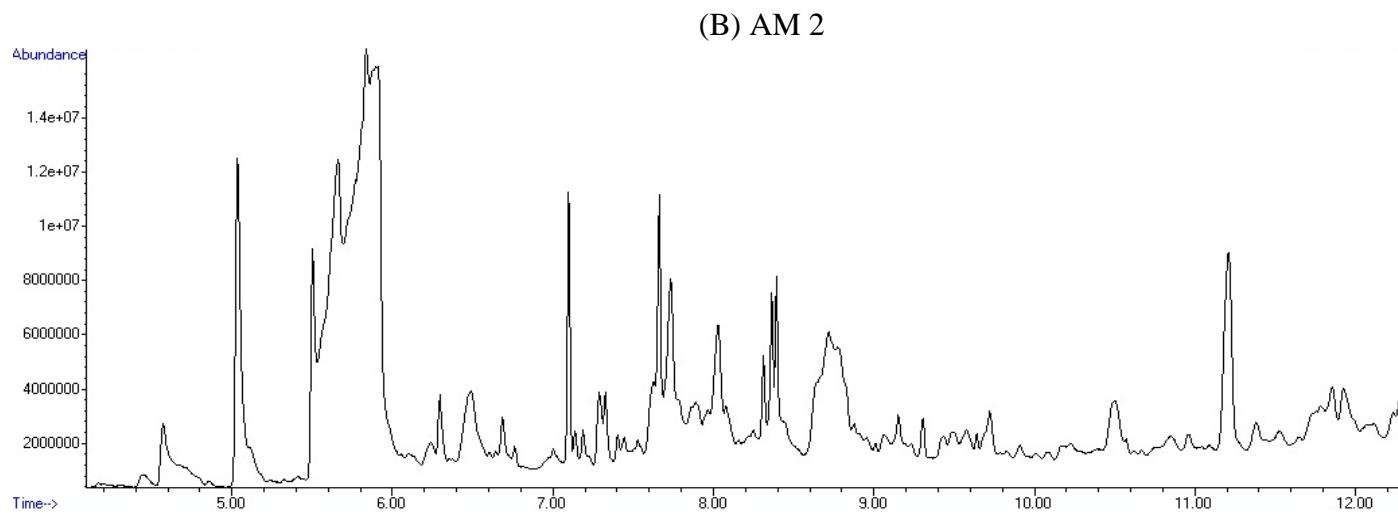
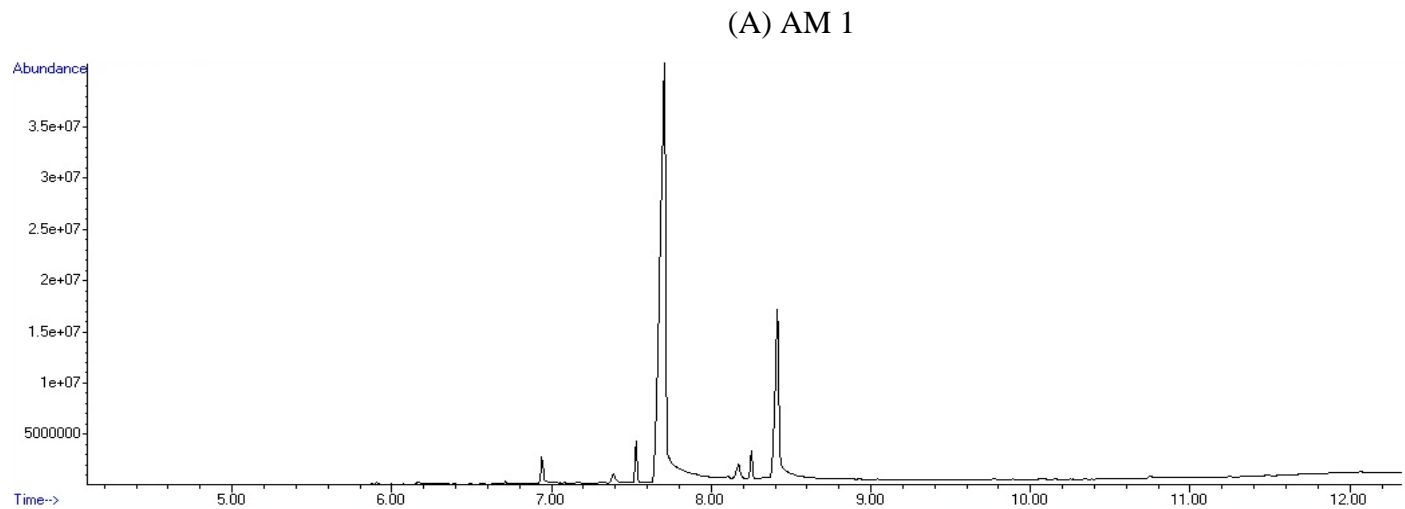


Figura 16. Cromatograma adquirido em modo varredura para as amostras de suplementos analisados: (A) Amostra AM1, (B) Amostra AM2, (C) Amostra AM3, (D) Amostra AM4, (E) Amostra AM5, (F) Amostra AM6, (G) Amostra AM7, (H) Amostra AM8 e (I) Amostra AM9.

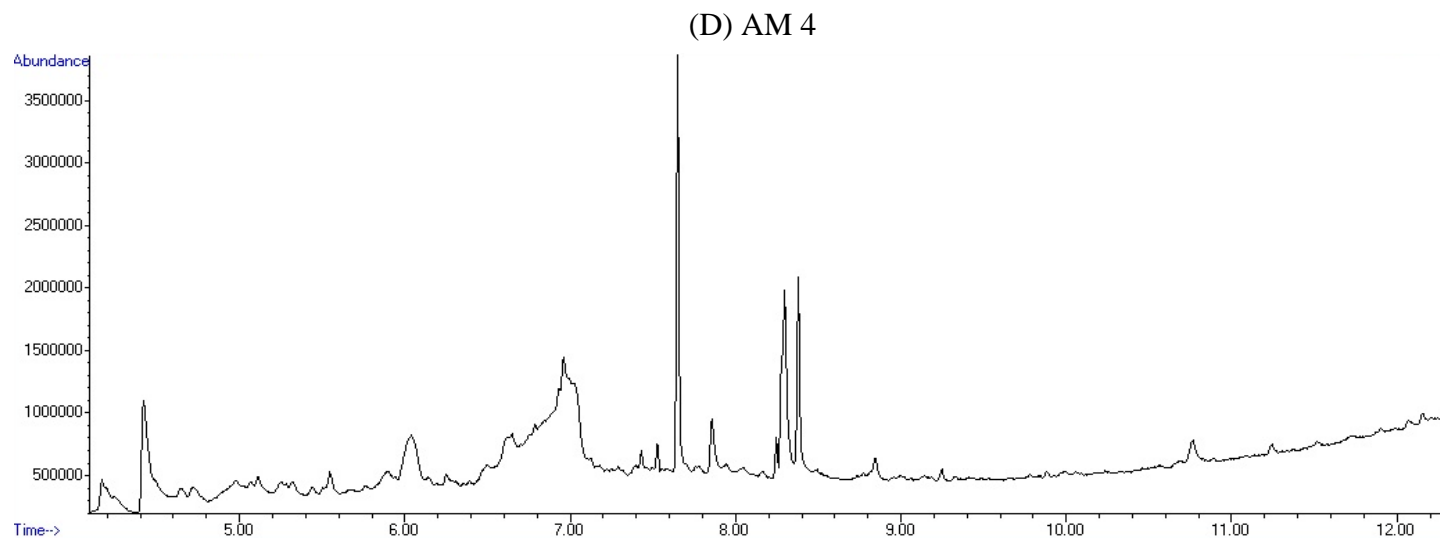
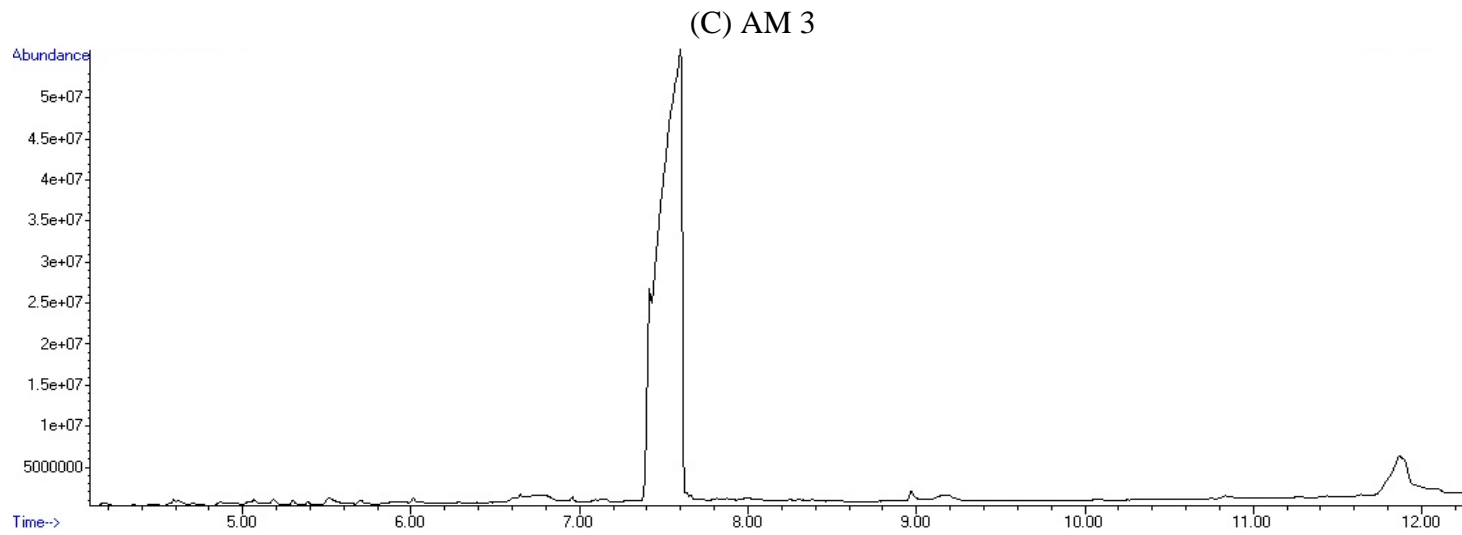


Figura 16. Continuação.

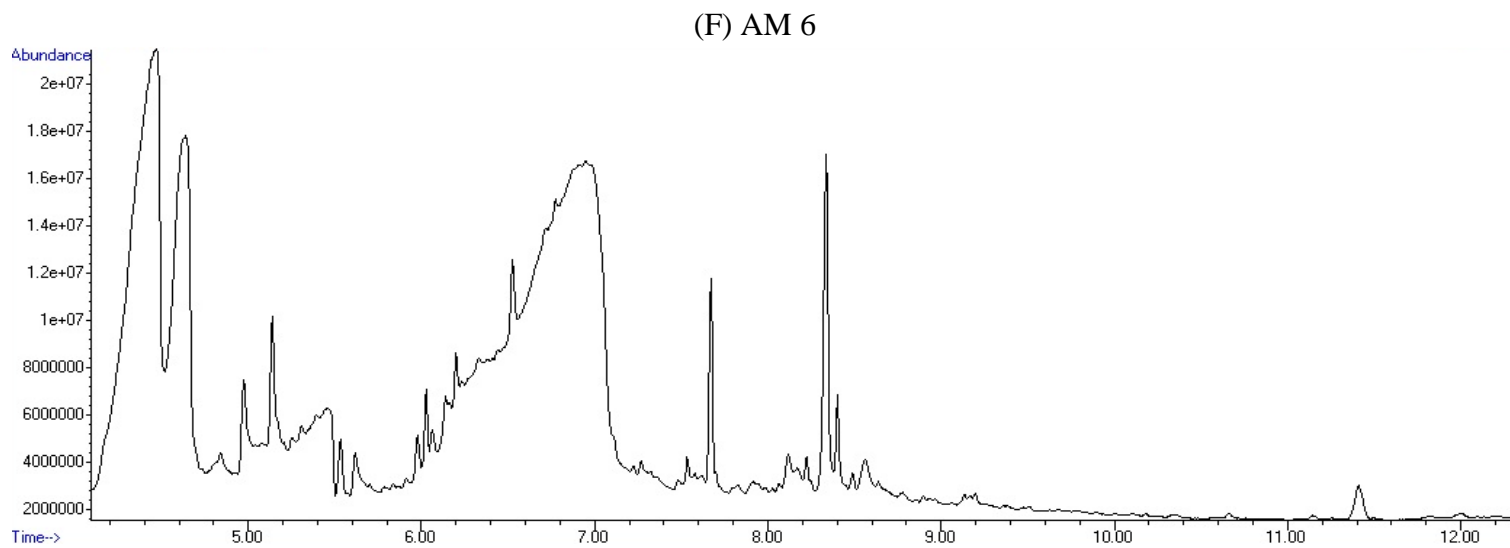
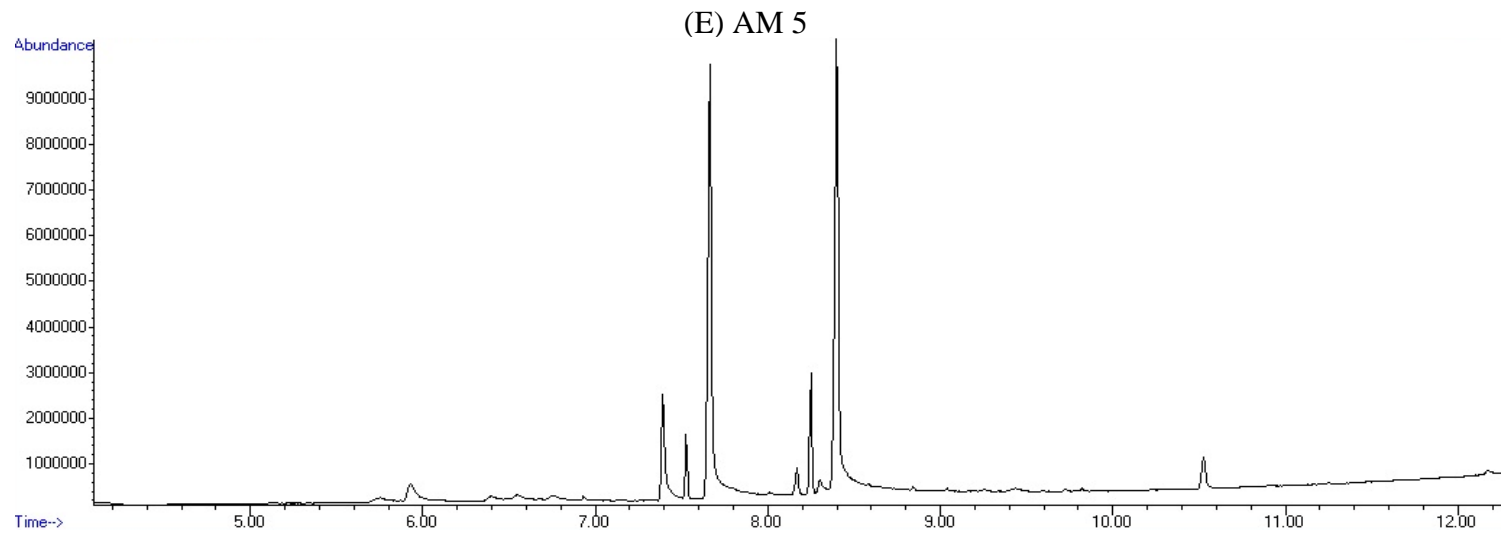


Figura 16. Continuação.

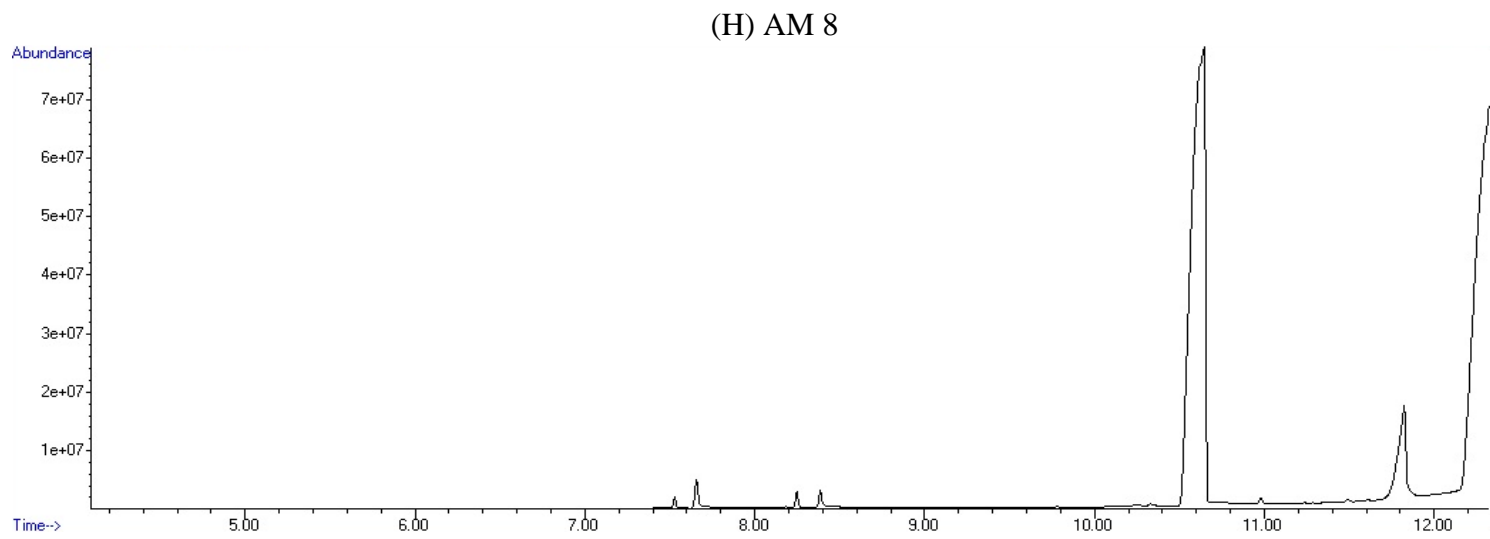
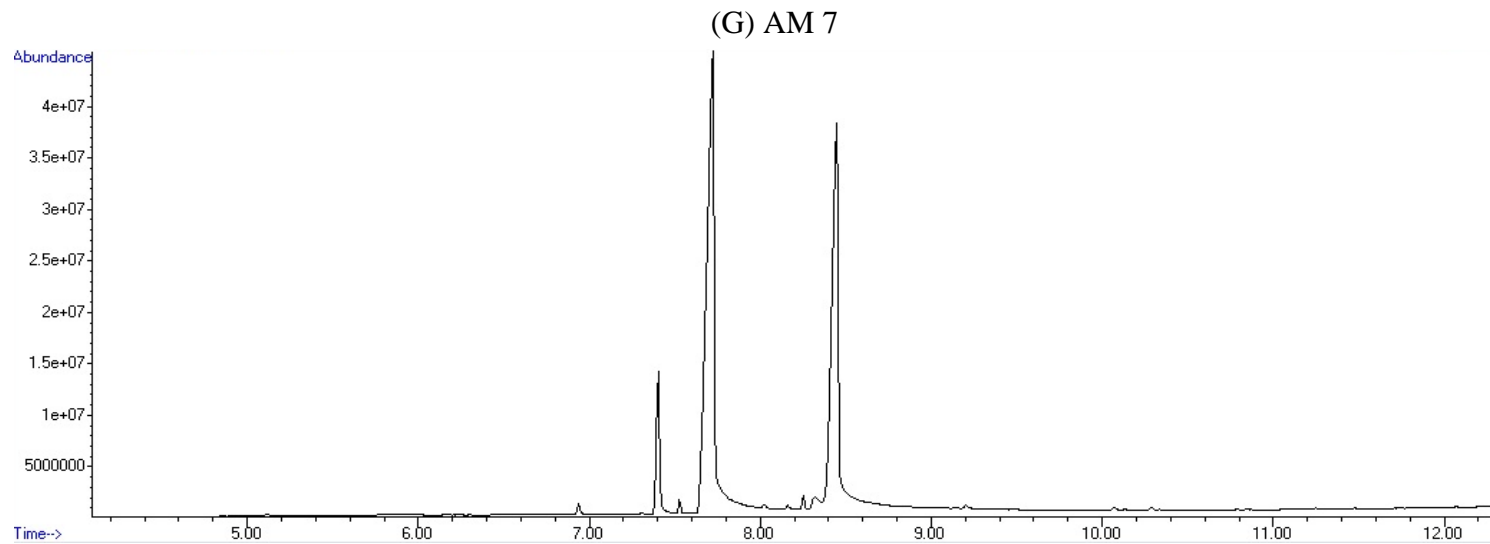


Figura 16. Continuação.

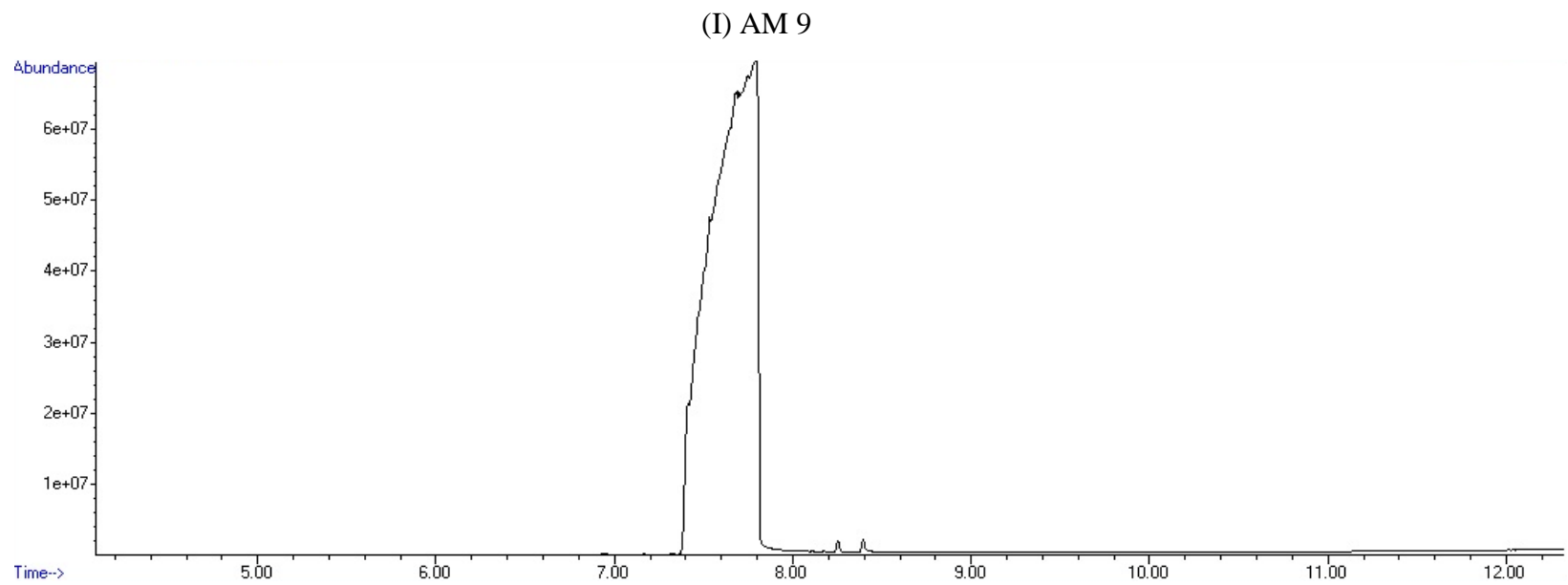
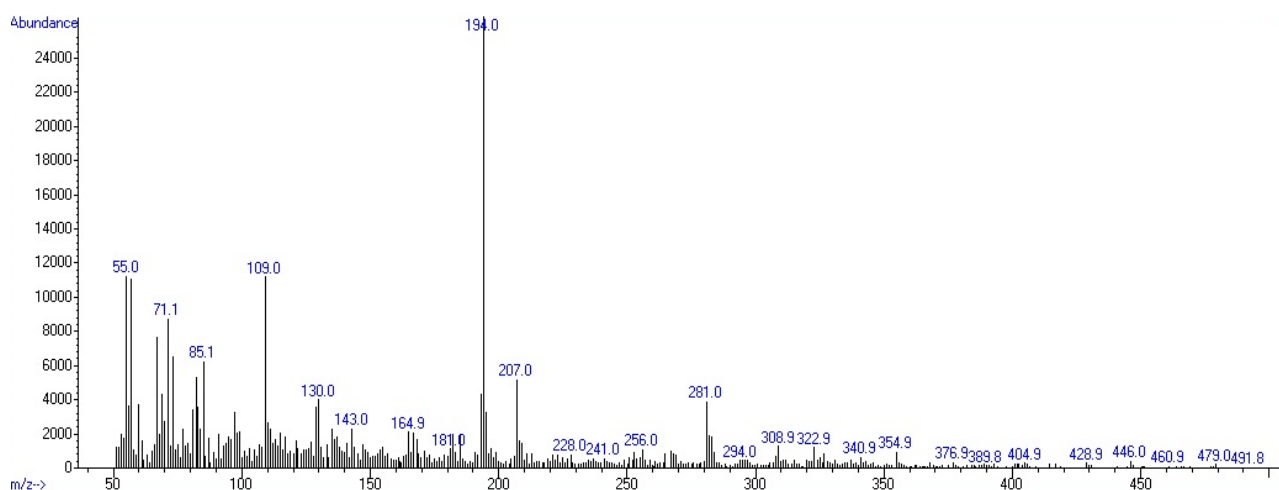


Figura 16. Continuação.

A pesar de todas as amostras apresentarem algum tipo de pico cromatográfico no tempo de retenção da sibutramina (Figura 16) os mesmos não apresentaram espectros de massas semelhantes ao da sibutramina e a busca na base de dados NIST não indicou a presença de sibutramina. Por esse motivo é importante aliar os dados cromatográficos (tempo de retenção) aos dados espectrais, pois somente a coincidência de ambas as informações é que confere especificidade suficiente à análise para poder afirmar com confiabilidade a presença ou não de determinado componente.

Para exemplificar como foi conduzida a análise para determinar a presença ou não de sibutramina nos suplementos, na Figura 17 estão apresentados o espectro de massas no tempo de retenção da sibutramina (7,4 min) da amostra AM1 e do padrão de sibutramina de $5 \mu\text{g.mL}^{-1}$, ambos obtidos em modo varredura.

(A) Espectro de massas obtido para o pico com tempo de retenção 7,4 min no cromatograma da amostra AM1.



(B) Espectro de massas obtidos para para o pico com tempo de retenção 7,4 no cromatograma do padrão de sibutramina 5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

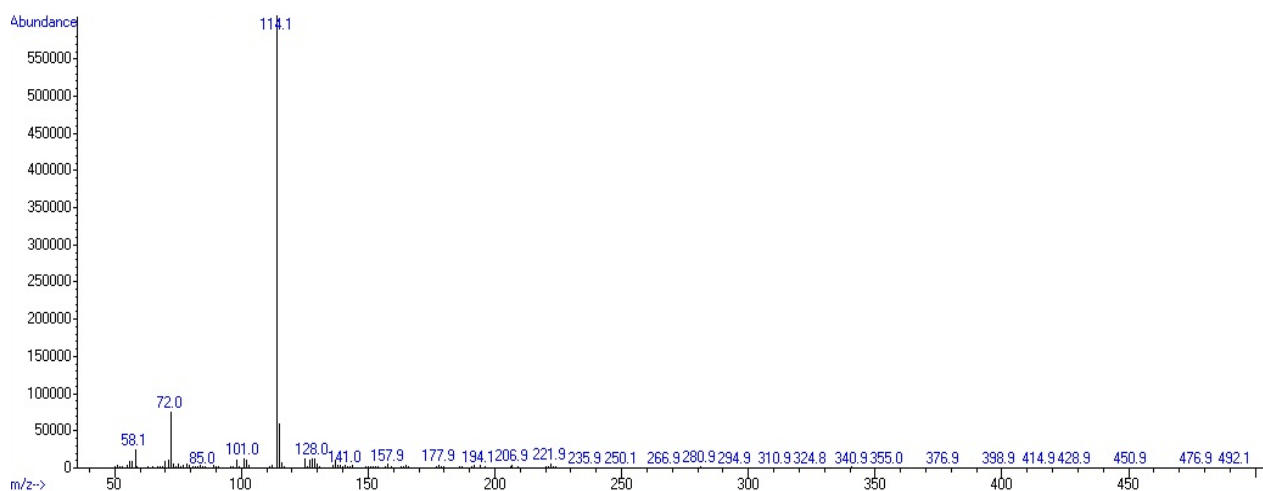


Figura 17. Espectro de massas no tempo de retenção da sibutramina (7,4 min) obtido em modo varredura. (A): amostra AM1; (B) padrão de sibutramina de 5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

Observa-se que apesar de a amostra AM1 ter apresentado um pico no tempo de retenção da sibutramina, esse componente apresentou um espectro de massas muito diferente do mesmo para o padrão de sibutramina, indicando tratar-se de um composto químico diferente.

Neste trabalho foram analisados apenas nove suplementos alimentares e nenhum deles apresentou sibutramina em sua composição. Por esse motivo, o método quantitativo desenvolvido não pode ser aplicado às amostras analisadas. No entanto, o método desenvolvido foi validado e pode ser aplicado para o monitoramento da qualidade de suplementos alimentares.

7.1. Análise da conformidade dos rótulos dos suplementos alimentares

Para complementação deste trabalho as amostras foram analisadas no modo varredura para identificação de outros compostos, podendo monitorar assim a conformidade da composição dos produtos com as especificações dos rótulos, lembrando que a técnica de cromatografia gasosa só permite o monitoramento de compostos voláteis.

Três amostras apresentaram substâncias que não estavam declaradas no rótulo (cafeína e Acetato de Androst-5-en-3-ol-7,17-diona). A legislação brasileira não obriga a descrição de cafeína quando a mesma é oriunda de fontes naturais e está presente em baixíssimas concentrações, como quando utilizados ingredientes como o cacau. Caso contrário, outros

produtos como refrigerantes de cola ou a base de guaraná, achocolatados em pó, entre outros, deveriam descrever a concentração de cafeína na tabela nutricional presente em seus rótulos. Contudo, nas amostras que foram identificadas a presença de cafeína não apresentavam ingredientes naturais que possam contribuir para a presença de cafeína no suplemento (MIDC, 2014, ABENUTRI, 2014).

A identificação estrutural dessas substâncias foi realizada através da análise dos respectivos espectros de massa, com base nas bibliotecas espectrais disponíveis no equipamento (apenas foram considerados compostos cuja certeza na identificação foi superior a 60%). Ao analisar os cromatogramas pode-se verificar a presença de outras substâncias que estão em conformidade com a composição descrita no rótulo. Para melhor disposição dos resultados utilizou-se o modelo de GOMES (2011). De maneira geral os tipos das substâncias identificadas estão relacionadas na Tabela 13.

Tabela 13. Tipos de substâncias identificadas nos suplementos analisados.

| Amostras | AM1 | AM2 | AM3 | AM4 | AM5 | AM6 | AM7 | AM8 | AM9 |
|-----------------------------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| Aminoácidos | | X | | | | X | | | |
| Ácidos graxos | X | X | | X | X | X | X | X | X |
| Estimulantes | X | | X | | | | X | | X |
| Vitaminas | | X | | X | | X | | | |
| Substancias não declaradas | X | | | | X | | | X | |
| Outros | | | | X | X | | | X | |

No cromatograma da amostra AM1 (Figura 18) foi possível identificar cinco compostos (I a V) com compatibilidade superior a 60% entre o espectro de massas obtido e o espectro de massas da biblioteca NIST. Para essa amostra foi constatada a presença de cafeína (pico II), estimulante não declarado no rótulo da amostra. Os demais picos (I, III, IV, V) são ácidos graxos. As estruturas dos compostos identificados estão presentes na Tabela 14.

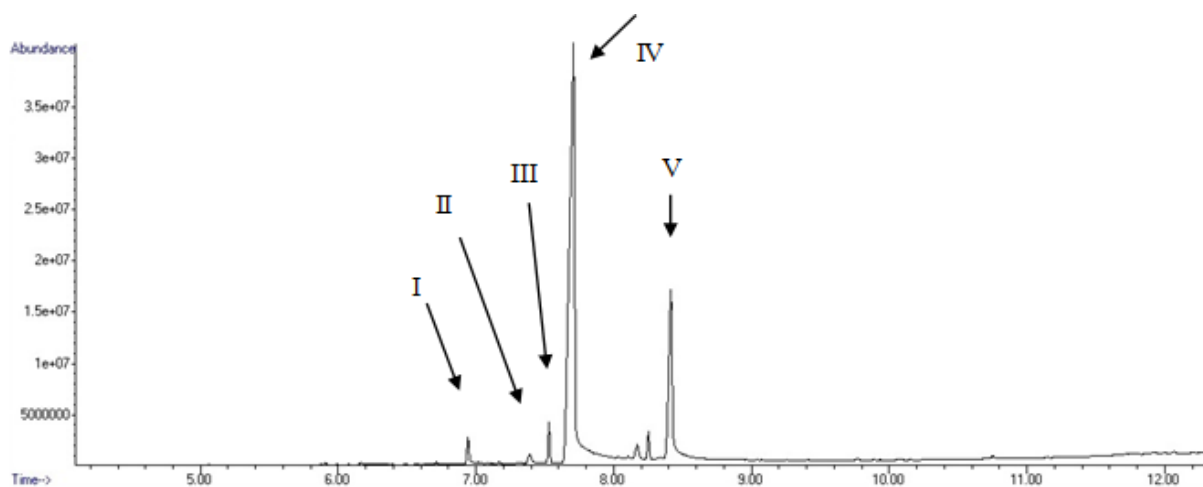


Figura 18. Cromatograma obtido no modo varredura para a amostra AM1.

No cromatograma da amostra AM2 (Figura 19) foi possível identificar quatro compostos (I a V) sendo estes todos possíveis derivados de substâncias declaradas no rótulo do produto (Tabela 14). O pico I corresponde ao composto Indol que contém o esqueleto heterocíclico do aminoácido triptofano. O composto II é a Niacinamida, proveniente da vitamina B3. O composto III é derivado da vitamina B6 conhecido como 3-piridinometanol -5-hidroxi-4,6-dimetil ou ardenina. Já o composto IV é um ácido graxo.

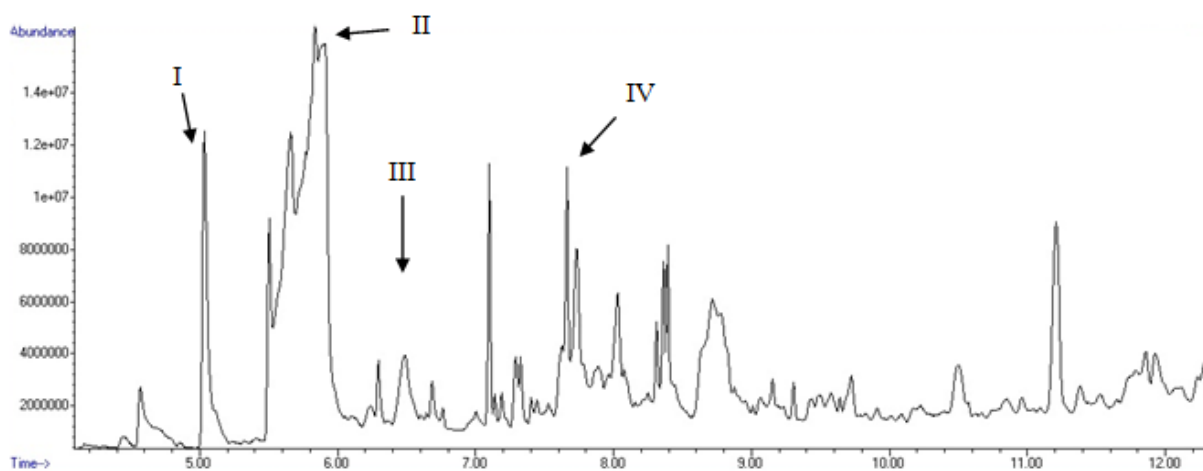


Figura 19. Cromatograma obtido no modo varredura para a amostra AM2.

No cromatograma da amostra AM3 (Figura 20) apenas pode ser identificado, com grau de probabilidade superior a 60%, o pico I como sendo a cafeína (Tabela 14).

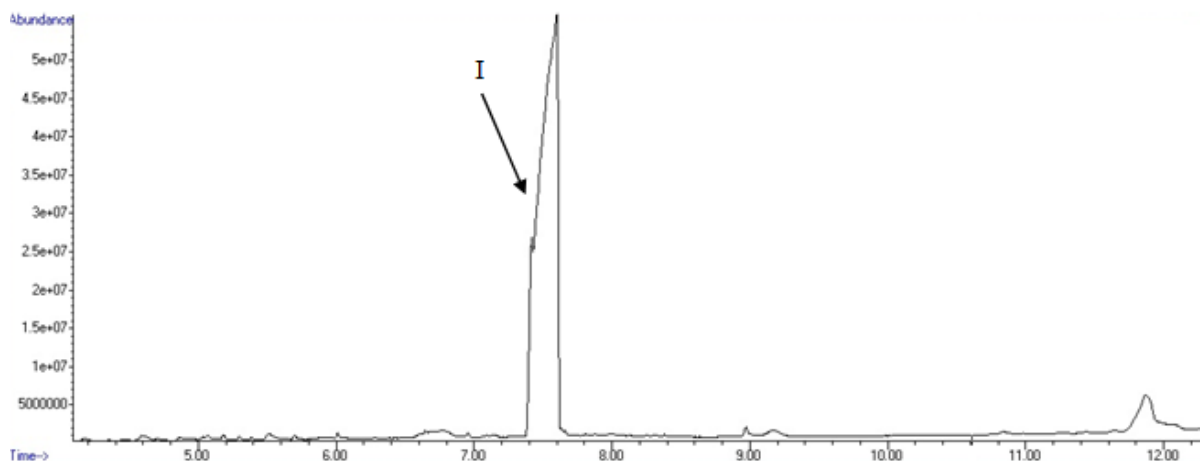


Figura 20. Cromatograma obtido no modo varredura para a amostra AM3.

As amostras AM3 e AM4 são provenientes do mesmo local sendo diferenciadas pelo número do lote de produção. Analisando os cromatogramas das duas amostras (Figura 21 e 22) observou-se a similaridade entre eles, contudo foi possível identificar compostos diferentes entre as amostras. Na amostra AM4 identificou-se a presença de um isômero da vitamina B3, conhecido como ácido isonicotínico (I), e um produto de degradação do ácido ferúlico que possui ação antioxidante (II). Já para amostra AM5 foram identificados os compostos cafeína (II), 1,6-anidro- β -D-Glucopiranosose (I), derivado de um carboidrato, e o acetato de androst-5-en-3-ol-7,17-diona, esteróide popularmente conhecido como DHEA (VI). Esse esteróide é utilizado na perda de peso e é derivado da dehidroepiandrosterona, um hormônio esteroide produzido a partir do colesterol pelas glândulas suprarrenais. A dehidroepiandrosterona é precursora da testosterona, o que em excesso pode ser prejudicial para saúde principalmente das mulheres. Contudo, um estudo publicado pela Clinical Investigative Medicine indicou que o uso do DHEA é seguro para o consumo humano em uma dosagem máxima de 200 mg por dia durante quatro semanas, e que a mesma não apresentou efeitos graves adversos. Entretanto, não existem estudos minuciosos para garantir sua segurança para uso a longo prazo, também não se sabe como ele reage com doenças preexistentes e anomalias genéticas, e assim seu uso ainda pode ser um risco para a saúde (DAVIDSON *et al.*, 2000; Worrel *et al.*, 2011).

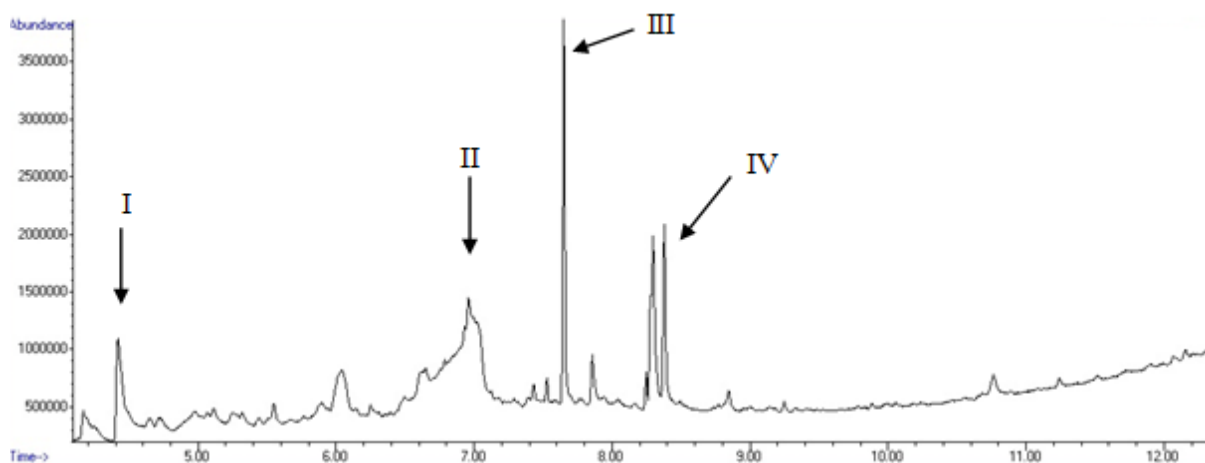


Figura 21. Cromatograma obtido no modo varredura para a amostra AM4.

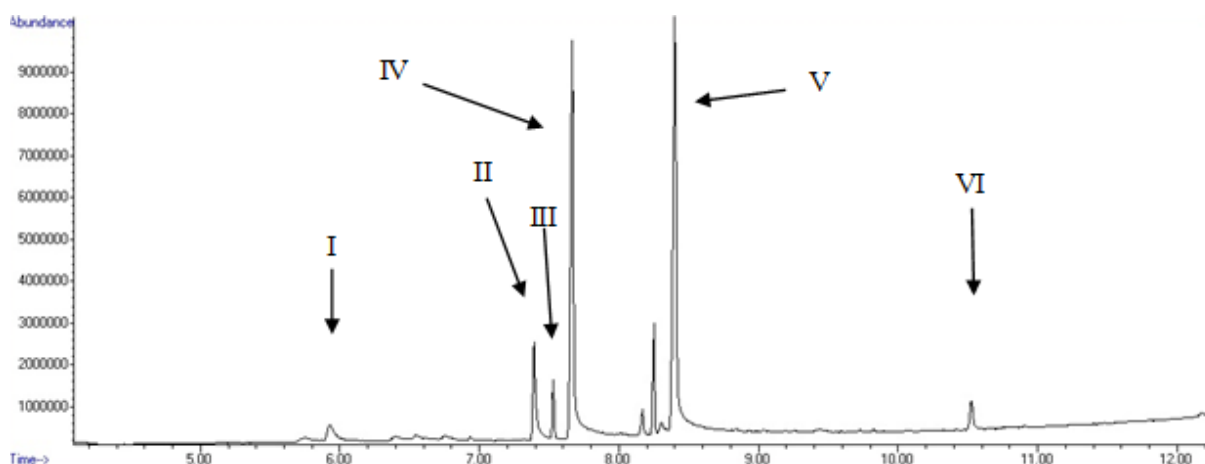


Figura 22. Cromatograma obtido no modo varredura para a amostra AM5.

No cromatograma da amostra da AM6 (Figura 23) foi possível identificar cinco compostos (I a V) com certeza superior a 60%. Os compostos I e III são provenientes do aminoácido L-Carnetina. O composto II é derivado da vitamina B1 e os demais compostos (IV e V) são ácidos graxos. As estruturas dos compostos identificados estão presentes na Tabela 14.

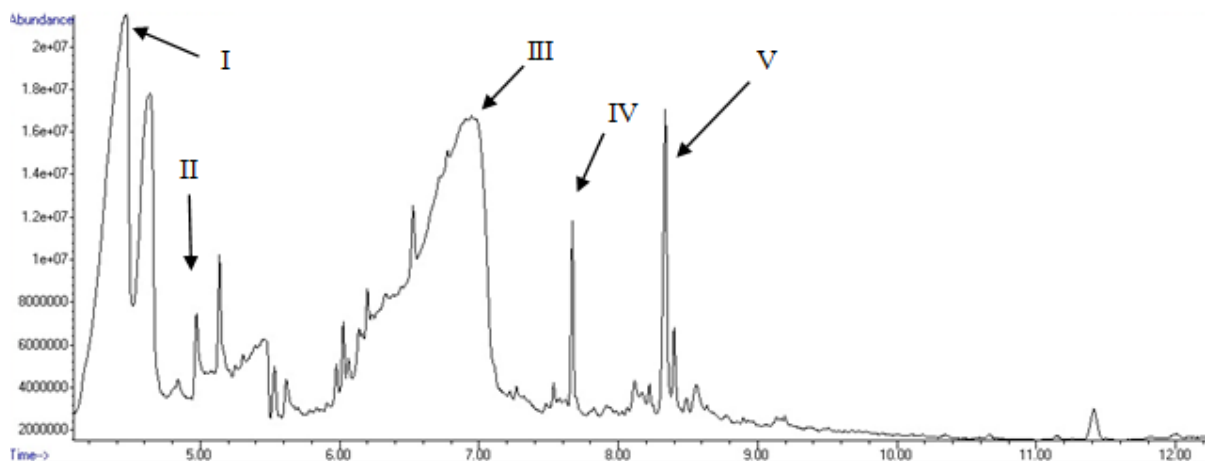


Figura 23. Cromatograma obtido no modo varredura para a amostra AM6.

No cromatograma da amostra AM7 (Figura 24) foram identificados a cafeína (I) e os ácidos graxos (II e III) (Tabela 14).

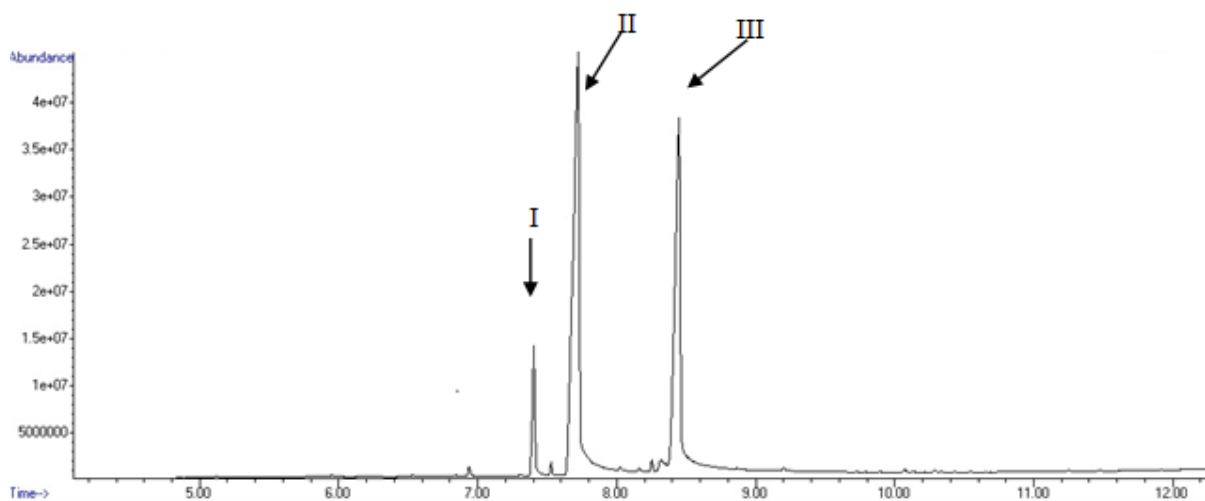


Figura 24. Cromatograma obtido no modo varredura para a amostra AM7.

No cromatograma da amostra AM8 (Figura 25) foram identificados quatro compostos (I a IV) com probabilidade superior a 60% (Tabela 14). O composto I corresponde à cafeína, a qual não consta no rótulo do produto. Os compostos II e III são ácidos graxos e o composto IV é o esteróide DHEA, especificado no rótulo do produto. Pode-se observar também a presença de um pico bem intenso com um tempo de retenção próximo a 12,5 min. Contudo, a rampa de temperatura utilizada na corrida cromatográfica não foi adequada para completa eluição desses componentes menos voláteis e neste trabalho não foi possível sua identificação.

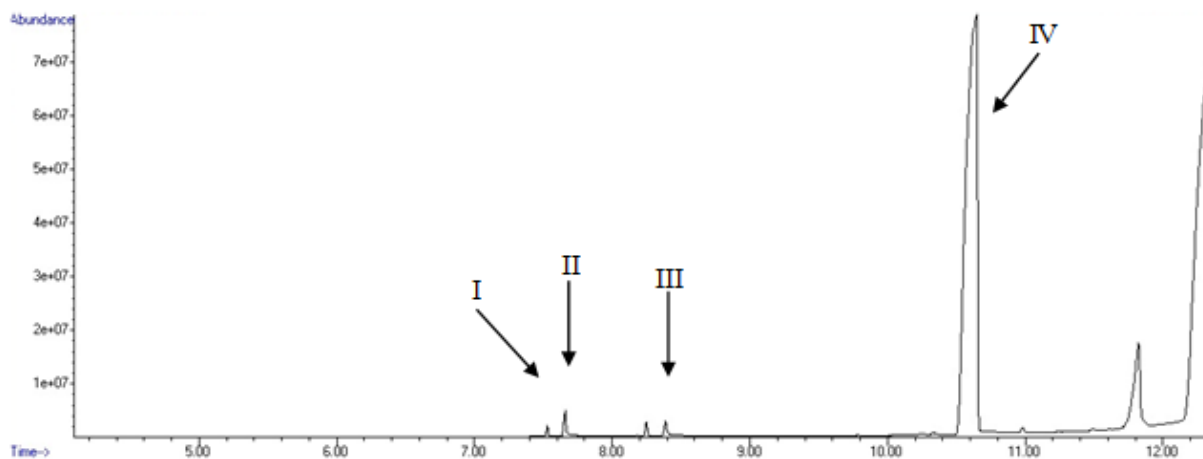


Figura 25. Cromatograma obtido no modo varredura para a amostra AM8.

No cromatograma da amostra AM9 (Figura 26) foram identificados dois compostos (I e II) com probabilidade superior a 60% (Tabela 14). Destes, nenhum é considerado sibutramina, sendo caracterizados como cafeína (I) e ácido graxo (II).

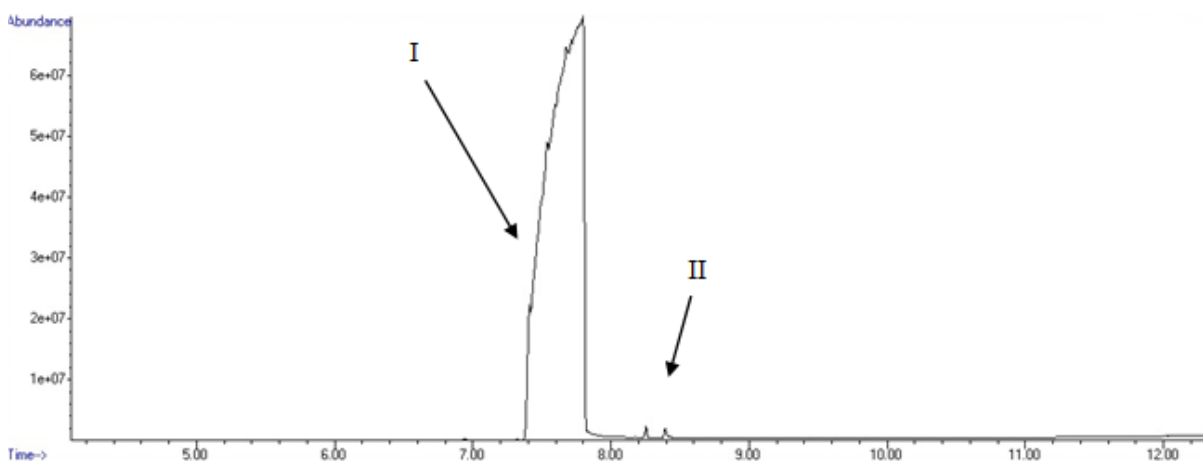
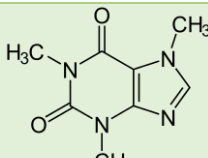
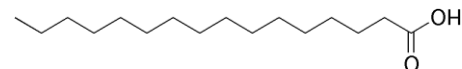
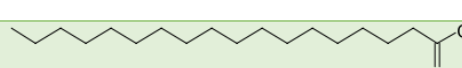
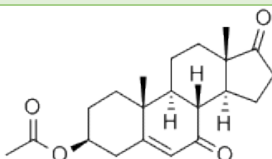
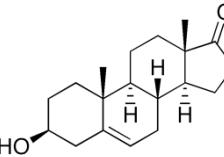

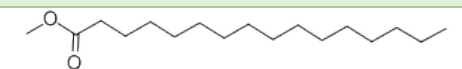
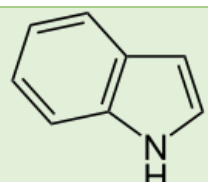
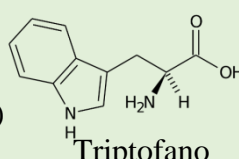
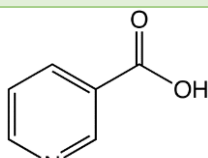
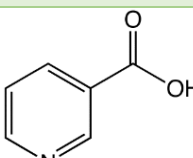
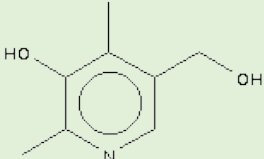
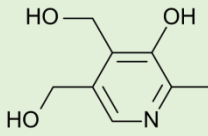
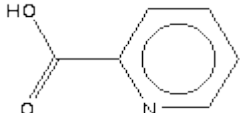
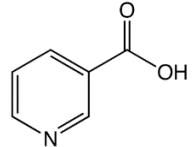
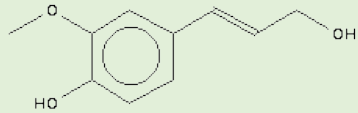
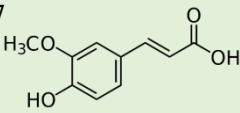
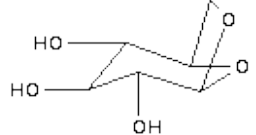
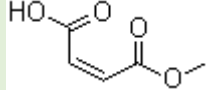
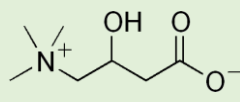
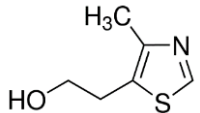
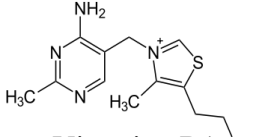
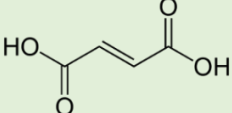
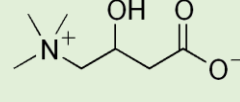


Figura 26. Cromatograma obtido no modo varredura para a amostra AM9.

Tabela 14. Compostos identificados nas amostras de suplementos analisados.

| Amostra | Estrutura Molecular Nome IUPAC e/ou Nome comum | Massa Molecular (g/mol) | Íons m/z | Proveniente |
|--|---|-------------------------|-----------------------------|---|
| AM1/AM3/ AM7/ AM8/ AM9 |  Cafeína | 194,08 | 67, 109, 194 (100%) | |
| AM1/ AM2/ AM4/ AM5/ AM6/ AM7/ AM8 |  Ácido Hexadecanóico | 256,24 | 60 (100%), 73, 129 | |
| AM1/ AM4/ AM5/ AM6/ AM7/ AM8/ AM9 |  Ácido Octodecanóico | 284,27 | 60 (100%), 129, 284 | |
| AM5/ AM8 |  Acetato de Androst-5-en-3-ol-17- diona (DHEA) | 344,19 | 134 161 284 (100%) |  dehidroepiandr osterona |
| AM1 |  Ácido Tetradecanóico | 228,20 | 73 (100%), 129, 185 | |
| AM1/ AM5 |  Hexadecanoato de metila | 270,25 | 74 (100%), 87, 143 | |
| AM2 |  Indol | 117,05 | 63, 90, 117 (100%) |  Triptofano |
| AM2 |  Niacinamida | 122,04 | 78, 106, 122 (100%) |  Vitamina B3 |

| | | | | |
|------------|--|--------|----------------------------|---|
| AM2 |  <p>Ardenina</p> | 153,07 | 53, 124, 153 (100%) |  <p>Vitamina B6</p> |
| AM4 |  <p>Ácido 2- piridinocarboxílico (Ácido isonicotínico)</p> | 123,03 | 52, 79 (100%), 106 |  <p>Vitamina B3</p> |
| AM4 |  <p>4-((1E)-3-Hidroxi-1-propenil) 2-methoxifenol</p> | 180,07 | 124, 137 (100%), 180 |  <p>Ácido Ferúlico</p> |
| AM5 |  <p>1, 6-anidro-β-D-Glucopirranose</p> | 162,05 | 60 (100%), 73, 98 | |
| AM6 |  <p>Éster monometílico do ácido 2-buteno dioico (ácido maléico)</p> | 130,02 | 53, 85, 99 (100%) |  <p>L-Carnitina</p> |
| AM6 |  <p>5-etanol-4metiltiazol</p> | 143,04 | 85, 112 (100%), 143 |  <p>Vitamina B1</p> |
| AM6 |  <p>Ácido fumárico</p> | 116,01 | 53, 88, 98 (100%) |  <p>L-Carnitina</p> |

REFERÊNCIAS

ABENUTRI (2014). Associação Brasileira das Empresas de Produtos Nutricionais. **Fantástico divulga testes do Inmetro em marcas de Whey- Resposta do Setor Regulado**. São Paulo.

DAVIDSON, M.; MARWAH, A.; SAWCHUK, R.J.; MAKI, K.; MARWAH, P.; WEEKS, C.; LARDY, H. (2000). "Safety and Pharmacokinetic Study with Escalating Doses of 3-acetyl-7-oxo-dehydroepiandrosterone in Healthy Male Volunteers". **Clinical Investigative Medicine**. v. 23, n 5, p. 300-310.

MIDC (2014). Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior. **Programa de análise de produtos: Relatório final sobre a análise em suplementos proteicos para atletas – Whey Protein**. Rio de Janeiro, mai 2014. Disponível em: <http://estaticog1.globo.com/2014/08/22/Relatorio_final_Whey_Protein.pdf>. Acesso em: 20 dez 2014.

WORREL, E. M.; GURKOVSKAYA, V. O.; LEONARD, T. S.; LEWIS, B. P.; WINSAUER, J. P. (2011). Effects of 7-keto dehydroepiandrosterone on voluntary ethanol intake in male rats. **Alcohol**. v. 45, p. 349 – 354.

CAPÍTULO 8. CONCLUSÕES

A partir do estudo realizado constatou-se que o método de extração otimizado através do planejamento fatorial para a recuperação de sibutramina a partir de suplemento alimentar foi simples e eficiente, permitindo recuperações entre 80-115%.

O desenvolvimento do presente trabalho permitiu a validação de uma metodologia analítica por CG-EM para detecção e quantificação de sibutramina em suplementos alimentares. Pode-se afirmar que o método analítico apresentou linearidade adequada na faixa de calibração utilizada, foi seletivo para todas as amostras analisadas e apresentou precisão e exatidão adequadas.

Esses fatores demonstram que o método cromatográfico foi eficaz para determinação deste contaminante na matriz de suplemento analisada, permitindo assim sua aplicação em amostras de suplementos alimentares passíveis de adulterações.

O método CG-EM desenvolvido apresenta outras vantagens em relação aos métodos cromatográficos existentes na literatura como a rapidez da análise, sua alta seletividade e baixos limites de detecção e quantificação, podendo ser detectada e quantificada a sibutramina em suplementos em quantidades da ordem de poucos nanogramas ($LD = 14,94 \text{ ng.mL}^{-1}$ e $LQ = 45,29 \text{ ng.mL}^{-1}$).

Apesar de a sibutramina não ter sido identificada nas amostras investigadas verificou-se, ao longo deste estudo, algumas inconformidades da composição descrita no rótulo, e pode-se esperar que casos similares aconteçam também em outros suplementos alimentares. Estas substancias não declaradas podem acarretar riscos para a saúde tendo em conta o aumento do poder de compra da população, que leva ao consumo, por vezes exagerado deste tipo de produtos.

ANEXOS

| | |
|---|----|
| ANEXO A – Laudo de qualidade da sibutramina utilizado como padrão de referência..... | 79 |
| ANEXO B – Tune (Tune evaluateiton) referente às condições de calibração do GC-EM (A)... | 80 |
| ANEXO C – Tune (Autotune) referente às condições de calibração do GG-EM (B)..... | 81 |

ANEXO A – Laudo de qualidade da sibutramina utilizado como padrão de referência.



Certificado de Análise

Nr.Ctrl.: 0000467/201400-0000181/201300G00-010662901

SIBUTRAMINA HCL MONOHIDRATADA (B2) (P.344/98) - 0,020 KG

C.A.S.: 125494-59-9

D.C.B.: 09375

Página: 01

Data de Fabricação: 01/03/2012

Lote de Fabricação: 32/11BS0012/12

Data de Validade: 28/02/2015

País de Origem: INDIA

Lote Galena (CIQ): 1405035801

Ordem Fracionamento (OF): 00286501001

Dados do Requisitante

Requisitante: Galena Química e Farmaceutica Ltda
Endereço: Rua Pedro Stancato, 860

CNPJ: 57.442.774/0001-90
Cidade: Campinas/SP

Fone: 0800 7714 270
CEP: 13.082/050

Fórmula Molecular: C17H26ClN.HCl.H2O

Peso Molecular: 334,32

Classe Terapêutica: Anorexígeno

Armazenamento: ARMAZ.TEMP.AMB.CONTROLADA, FECHADO, PROTEGIDO DA LUZ E UMIDADE

| Análises/Componentes | Especificações | Incerteza de Medição (U) | Resultados das Análises |
|---|--------------------------------------|--------------------------|-----------------------------|
| LABORATORIO FISICO-QUIMICO | | | |
| - DESCRICAO (1) | Po cristalino de cor branca a creme. | | Po cristalino de cor branca |
| - AGUA (KARL FISHER) (1) | 4,50 % a 6,00 % | 4,54% | 5,49 % |
| - IDENTIFICACAO POR INFRAVERMELHO (1) | Positivo | | Positivo |
| - RESIDUO DE IGNICAO (1) | Não mais que 0,10 % | 0,08 % | 0,06 % |
| - METAIS PESADOS (1) | Nao mais que 10 ppm | | Nao mais que 10 ppm |
| - IDENTIFICACAO PELA REACAO DE CLORETOS (1) | Positivo | | Positivo |
| - IDENTIFICACAO POR ROTACAO OPTICA (1) | 19,9 ° a 20,1 ° | | 19,9 ° |
| - DOSEAMENTO (BASE ANIDRA) (1) | 98,0 % a 102,0 % | 1,40 % | 99,9 % |
| - IMPUREZAS ORGANICAS (1) | Conforme | | Conforme |
| - DENSIDADE APARENTE (7) | Informativo | | NA |

Observações

- Os resultados presentes neste Certificado de Análise tem seus valores restritos a este lote.

- As análises foram realizadas no Laboratório de Controle da Qualidade Galena.

Referências: (1)USP34/NF29; (7)GALENA

- A incerteza expandida de medição relatada é declarada como a incerteza padrão da medição multiplicada pelo fator de abrangência K. Para o ensaio Água por Karl Fisher K=2,52; pH K=2,37; Ponto de Fusão K=2,65; Perda por Dessecação K=2,10; para os demais testes do escopo, K=2, que, para uma distribuição normal, corresponde a uma probabilidade de 95%. A incerteza padrão de medição foi determinada de acordo com a publicação EA-4/02.

Resultado: (X)Aprovado

Data Início: 04/06/2014

Data Término: 04/06/2014

Lúcia Eli Scareli
Farmacêutica Responsável
CRF-SP: 16.148

Renata Timm
Gerente da Qualidade
CRF-SP: 24.404

ANEXO B – Tune (Tune evaluation) referente às condições de calibração do GC-EM (A).

```
System Verification - Tune (Detector Optimization) Portion

Instrument Name      : GCMS5975
DC Polarity         : Positive
Filament            : 1
BasePeak should be 69 or 219
Position of mass 69                69.00 OK
Position of mass 219               219.00 OK
Position of mass 502               502.00 OK
Position of isotope mass 70        70.00 OK
Position of isotope mass 220       220.00 OK
Position of isotope mass 503       503.00 OK
Ratio of mass 70 to mass 69(0.5 - 1.6%) 1.24 OK
Ratio of mass 220 to mass 219(3.2 - 5.4%) 4.34 OK
Ratio of mass 503 to mass 502(7.9 - 12.3%) 10.27 OK
Ratio of 219 to 69 should be > 40% and is 112.83 OK
Ratio of 502 to 69 should be > 2.4% and is 14.92 OK

Mass 69 Precursor (<= 3%)          1.16 OK
Mass 219 Precursor (<= 6%)         2.46 OK
Mass 502 Precursor (<= 12%)        2.64 OK

Testing for a leak in the system
Ratio of 18 to 69 (<20%)           36.98 High
Ratio of 28 to 69 (<10%)           7.28 OK

There is a high amount of water in your system.
Wait 24 hours for the system to bake out and rerun system verification.

Electron Multiplier Voltage          1600 OK

One or more specifications was out of range.
Please correct before continuing.

Failure of one or more tests may be caused by
selecting the wrong DC Polarity.
Please verify that the correct DC Polarity has been set
by removing the detector cover and checking the label
at the top of the EID.
```

ANEXO C – Tune (Autotune) referente às condições de calibração do GG-EM (B).

