

ANÁLISES ESTEROIDAIAS EM SUPLEMENTOS ALIMENTARES PROTEICOS

Jéssica Brandão Pereira Mendes¹, Laura Beatriz Souza e Souza¹, Débora de Andrade Santana²
Luama Araújo dos Santos¹, Rebeca Oliveira de Santana¹, Gildeon Silva Marques³
Ademir Evangelista do Vale³, Anibal de Freitas Santos Júnior¹, Erika Maria de Oliveira Ribeiro¹

RESUMO

Os suplementos alimentares são produtos constituídos por várias substâncias, podendo ser utilizado via oral ou enteral e são atribuídos para suplementação alimentar. Pesquisas com suplementos alimentares têm apontado a presença de substâncias não declaradas nos rótulos, como pró-hormônios ou esteroides androgênicos anabólicos (EAAs). Objetivo: Realizar ensaios químicos e cromatográficos com amostras de suplementos alimentares proteicos a fim de detectar possíveis esteroides androgênicos anabólicos. Materiais e Métodos: Trata-se de um estudo analítico de natureza quali-quantitativa. Conclusão: As análises indicam a presença de esteroides em todas as amostras de suplementos alimentares proteicos avaliadas.

Palavras-chave: Suplementos Nutricionais. Esteroides. CLAE.

ABSTRACT

Steroid analyzes in protein food supplements

Food supplements consist of various substances, which can be used orally or enterally and are assigned for food supplementation. Research with dietary supplements pointed to substances not declared on the labels, such as prohormones or anabolic androgenic steroids (AAS). Objective: Conduct chemical and chromatographic tests with a sample of protein food supplements to detect possible anabolic androgenic steroids. Materials and Method: This is an analytical study of a quali-quantitative nature. Conclusion: Analyzes indicate the presence of steroids in all evaluations of dietary protein supplement samples.

Key words: Nutritional supplements. Steroids. HPLC.

1 - Departamento de Ciências da Vida, Universidade do Estado da Bahia - DCV/UNEB. Salvador, Bahia, Brasil.

2 - Departamento de Ciências Exatas e da Terra, Universidade do Estado da Bahia - DCET/UNEB, Salvador, Bahia, Brasil.

3 - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia - FAFAR/UFBA, Salvador-Bahia, Brasil.

E-mail dos autores:

jessicabpmendes@gmail.com

laurabs02@gmail.com

deboraquimicauneb@gmail.com

luamalaraujo@uneb.br

becafarmac@gmail.com

gil_silv@hotmail.com

avale@ufba.br

afjunior@uneb.br

eribeiro@uneb.br

INTRODUÇÃO

O consumo de suplementos alimentares tem crescido no Brasil, especialmente entre praticantes de exercícios físicos. Esses itens são definidos como produtos que devem ser administrados via oral ou enteral com o intuito de suplementar a alimentação (ANVISA, 2020).

Embora possam ser utilizados por pessoas de qualquer faixa etária e com diferentes finalidades, os suplementos são procurados, na maioria das vezes, para manutenção da saúde e melhora do condicionamento físico, e principalmente pela busca do corpo padrão que é veiculado pela mídia.

Esses produtos são mercadorias de fácil acesso que podem ser compradas em farmácias, academias de ginásticas e até mesmo pela internet, sem prescrição médica e/ou nutricional (Santos e Sampaio, 2014).

Dentre diversos tipos de suplementos alimentares, os proteicos têm sido um dos mais consumidos pelos desportistas. Isso deve-se ao fato dos seus inúmeros benefícios já comprovados (Costa e colaboradores, 2021).

Os suplementos proteicos podem ser constituídos de diferentes substâncias, sendo a proteína do soro do leite, popularmente chamada de whey protein, a mais conhecida e utilizada.

Whey protein é dividido em três categorias: concentrado, hidrolisado e isolado. O que os diferencia é a quantidade da filtração aos quais foram submetidos, processo esse que impacta diretamente nas concentrações de nutrientes de cada categoria.

Não é novidade que produtos comercializados podem sofrer variados tipos de fraudes. Algumas delas visam baratear a matéria prima e, com isso, a qualidade do produto decai e não atinge o que promete nos rótulos.

Nos suplementos proteicos é comum o amino spiking ou também conhecido como protein spiking, fraude esta que consiste no aumento da quantidade de nitrogênio, porém, com aminoácidos de baixo custo. Uma pesquisa apontou que, de 124 suplementos proteicos, 39% contêm indícios de amino spiking (ABENUTRI, 2022).

Um outro estudo analisou 634 amostras de suplementos alimentares não-hormonais e 14,8% incluíam esteroides androgênicos anabólicos (EAAs) que, sequer

eram citados na rotulagem (Geyer e colaboradores, 2004). Essas inadequações aumentam cada vez mais a desconfiança quanto à veracidade dos rótulos dos produtos comercializados.

Os esteroides, embora possuam efeitos como o crescimento, recuperação e resistência muscular podem causar alterações sistêmicas variadas (Pope Junior e colaboradores, 2014). O que não se sabe ao exato são as consequências do uso de suplementos alimentares contaminados com essas substâncias, a curto, médio e longo prazo.

Uma contaminação esteroidal, ainda que em percentual baixo de, por exemplo 0,00005%, pode positivar em exames antidoping (Costa e colaboradores, 2021).

A literatura ainda carece de estudos químicos e bioquímicos que avaliem a composição dessas mercadorias. Sabendo disso, é primordial a constatação da veracidade dos rótulos dos suplementos proteicos, a fim de assegurar aos consumidores a qualidade no momento da aquisição desses itens.

Dessa maneira, objetiva-se analisar a presença de esteroides androgênicos anabólicos em amostras de whey protein comercializadas no Brasil.

MATERIAIS E MÉTODOS

O presente artigo trata-se de uma pesquisa analítica de natureza qualitativa, a qual será detalhada a seguir.

Obtenção das amostras

As amostras de suplementos alimentares foram obtidas através de doações feitas por praticantes de exercícios físicos e usuários de suplementos alimentares da cidade de Salvador-BA.

Ao todo, foram obtidas três amostras como alíquotas abertas (PSL1, PSL2 e PLS3) e uma de sachê fechado (PLS4), sendo todas do tipo proteína do soro do leite isolada e de marcas distintas, na apresentação em pó (quadro 1).

Extração

As amostras foram submetidas à maceração e remaceração (10 mL de metanol para cada grama da amostra) por três vezes consecutivas com metanol durante 72 h, à

temperatura ambiente. O filtrado obtido em cada etapa foi reunido e concentrado à pressão reduzida no rota-evaporador.

Sequencialmente, os quatro extratos brutos metanólicos obtidos foram submetidos à partição com $\text{CHCl}_3:\text{H}_2\text{O}$ (1:1), 25 mL de cada, ocorrendo assim, a formação de duas fases: a

clorofórmica, fase mais densa, na qual possivelmente estão os esteroides e, a fase aquosa, fase menos densa na qual estão os aminoácidos.

Para as análises subsequentes, a fase de interesse para o estudo foi a fase clorofórmica.

Quadro 1 - Composição das amostras de suplementos alimentares informadas nos rótulos comerciais.

Código das Amostras	Ingredientes	Gramagem utilizada
PSL 1: Proteína do soro do leite 1	Proteína isolada do soro de leite (WPI), aroma idêntico ao natural de chocolate que contém maltodextrina, cacau em pó e componentes aromáticos, emulsificante (lecitina de soja) (OBS: para que o produto se torne instantâneo), sucralose e acessulfame K.	8g
PSL 2: Proteína do soro do leite 2	Proteína isolada do soro de leite, aromas naturais e artificiais baunilha, cloridrato de tiamina, riboflavina, cloridrato de piridoxina, metilcobalamina e edulcorante sucralose.	8g
PSL 3: Proteína do soro do leite 3	Proteína isolada do soro de leite, mistura de vitaminas e minerais (fosfato dicálcico, cloreto de potássio, óxido de magnésio, ácido ascórbico, cloreto de sódio, acetato de vitamina E, sulfato de zinco, d-biotina, niacinamida, dióxido de silício, d-pantotenato de cálcio, acetato de vitamina A, sulfato de cobre, cloridrato de piridoxina, riboflavina, iodeto de potássio, filoquinona, cloridrato de tiamina, selenito de sódio, cianocobalamina, cloreto de cromo, ácido fólico, molibdato de sódio) lecitina de sódio, sabor natural e artificial, sucralose, goma xantana.	8g
PSL 4: Proteína do soro do leite 4	Proteína do soro de leite isolada, cacau em pó, café em pó, canela em pó, preparado de cafeína (cafeína e maltodextrina), aromatizantes, edulcorantes, sucralose e acessulfame de potássio e emulsificantes lecitina de girassol, lecitina de arroz e lecitina de soja.	8g

Soluções padrões comparativas utilizadas nas análises cromatográficas:

O Estanozolol (50mg/mL) e o Decanoato de Nandrolona (200mg/dL) foram as soluções padrões de esteroides androgênicos anabolizantes. Elas foram utilizadas como padrões, sendo o Estanozolol o padrão 1 (P1) e o Decanoato de Nandrolona o padrão 2 (P2).

Deteção e Análise por Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

PSL1, PSL2, PSL3, PSL4 e soluções padrões (Estanozolol e Decanoato de

Nandrolona) foram analisados por cromatografia de camada delgada (sílica gel).

A cromatografia possui duas fases: a móvel, na qual usa-se uma associação de solventes, e a estacionária, que é fixada em uma placa de alumínio ou de vidro.

Na fase móvel, para análise de esteroides, foi utilizado 10 mL de um sistema preparado com hexano e acetato de etila em uma proporção de 6:4.

Já a fase estacionária foi constituída por placas de alumínio revestidas com uma fina camada de sílica gel, material com alto potencial adsorvente, medindo três centímetros

de largura por seis centímetros de comprimento.

Primeiramente, as quatro amostras e os dois padrões foram aplicados nas placas de sílica gel. As aplicações foram feitas cerca de meio centímetro acima da base de cada placa, e isso através de tubos capilares de vidro, que transferiram cerca de 1 µl de cada solução.

Em seguida, as placas foram submetidas ao sistema de corrida previamente preparado e, em torno de um centímetro antes que a solução alcançasse toda a placa, elas foram retiradas para serem reveladas.

Revelação

Os reveladores utilizados foram: vapores de iodo e solução de Liebermann-Burchard. O iodo, ao se combinar com compostos orgânicos, tende a formar coloração marrom avermelhado.

O teste de Liebermann-Burchard fundamenta-se na reação dos ésteres e do colesterol com o anidrido acético e ácido sulfúrico concentrado, do qual origina-se o aparecimento de um complexo de cor azul esverdeado.

Para isso, após a corrida, borrifou-se a solução sobre a placa e, logo em seguida, a placa foi aquecida até o surgimento do complexo corado mencionado.

Identificação de Triterpenos e Esteroides

A uma alíquota de 2,0 ml (2 mg) da solução, foram adicionados 10,0 mL de clorofórmio. A solução resultante foi dividida igualmente em duas porções utilizando dois tubos de ensaio. No primeiro tubo (tubo 1) foi realizada a reação de Liebermann-Burchard e no segundo tubo (tubo 2) a reação de Salkowski.

Na reação de Liebermann-Burchard, 5 mL de anidrido acético e 2 gotas de ácido sulfúrico concentrado, foram adicionados ao tubo de ensaio 1 (Bessa e colaboradores, 2007; Costa, 1994).

Ao tubo 2, na reação de Salkowski, adicionou-se cinco gotas de ácido sulfúrico concentrado (Bessa e colaboradores, 2007; Joly, 1998).

Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detecção por arranjo de Diodos (CLAE/HPLC-DAD)

A fim de desenvolver o método analítico com o HPLC-DAD utilizou-se um cromatógrafo líquido de alta eficiência (Shimadzu, LC solutions, modelo DGU-20A5 Prominence, Japão), equipado com detectores de arranjo de diodos (Shimadzu, modelo SPD-M20A Prominence, Japão). A coluna utilizada foi C18 (5 µm, 4,0 x 250 mm) da Sigma-Aldrich (EUA).

Os dados coletados foram analisados pelo software LC solutions.

Preparo das amostras e soluções padrões:

As amostras e os padrões foram preparadas numa concentração de 1 mg/mL em metanol. Além disso, foram previamente filtradas em algodão (para uma melhor segurança do aparelho e da pureza da amostra) e, posteriormente, filtradas em filtro de membrana, para então serem levadas ao HPLC.

Condições cromatográficas do método proposto para a determinação de esteroides por HPLC-DAD:

Foi realizado em gradiente de fase reversa, usando inicialmente 50% de metanol e solução de ácido acético a 1%, sendo que a concentração do metanol foi aumentando e, em 8 minutos de corrida, atingiu 100%.

A coluna utilizada foi C18, com um volume de injeção de 20 µL, em comprimentos de onda de 198, 220, 240, 260, 280, 340 nm, com vazão/fluxo de 0,1 mL/min a uma temperatura de 30°C, durante 10 min (tempo total de cada corrida).

RESULTADOS

Rendimento do extrato

Na tabela a seguir, são expostos os rendimentos das amostras.

Tabela 1 - Demonstração do rendimento das amostras.

Código das amostras	Rendimento inicial (g)	Rendimento após a separação de fases: fase clorofórmica (g)
PSL1	0,1889	0,0261
PSL2	0,2028	0,0451
PSL3	0,2248	0,0186
PSL4	0,3004	0,06399

Identificação de Esteroides

As reações colorimétricas com Liebermann-Burchard e Salkowski foram utilizadas para detecção de esteroides.

Tanto na reação de Liebermann-Burchard como na de Salkowski, foi possível observar uma leve alteração de cor na parte superior dos tubos de ensaio.

Nas amostras 1 e 3, a coloração observada foi esverdeada, e ambas de mesma intensidade. Por sua vez, nas amostras 2 e 4, a

coloração que se apresentou foi azul, sendo que, neste último, a coloração foi menos intensa do que a segunda amostra.

Nos segundos tubos, referentes à reação de Salkowski, após algum tempo, notou-se a presença de uma coloração avermelhada e estável, a qual foi mais intensa nas três primeiras amostras e menos intensa na última.

Dessa maneira, todas as amostras positivaram para esteroides e triterpenos (tabela 02).

Tabela 2 - Detecção de esteroides em amostras de whey protein utilizando as reações de Liebermann-Burchard e Salkowski.

Amostras	Esteroides (Reação de Liebermann Burchard)	Triterpenos (Reação de Salkowski)
PSL1	+	++
PSL2	+	++
PSL3	+	++
PSL4	+	+

Positivo = (+); Fortemente positivo = (++)

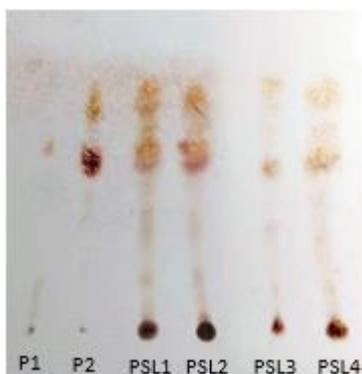


Figura 1 - CCDC das Amostras e Padrões (Fase móvel: hexano e acetato de etila; Revelador: Liebermann-Burchard.) Onde: P1 = padrão 1; P2 = padrão 2; PSL1 = amostra 1; PSL2 = amostra 2; PSL3 = amostra 3 e PSL4 = amostra 4.

Cromatografia em Camada Delgada Comparativa (CCDC)

Na figura acima é exposta a revelação das placas em sílica gel através da solução de Liebermann-Burchard. É possível observar que todas as amostras (pontos 3, 4, 5 e 6)

Como mostra a figura 01, encontrada a seguir, os padrões e as amostras foram reveladas no método pré estabelecido.

aparentam um fator de retenção igual ao das soluções utilizadas como padrões (pontos 1 e 2).

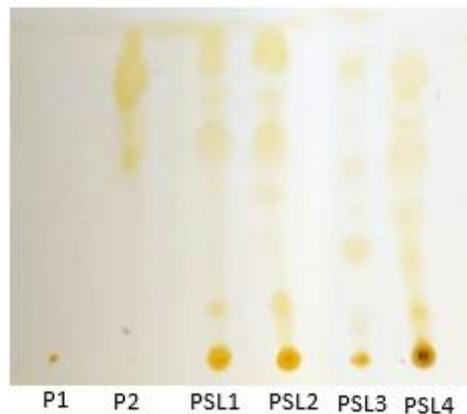


Figura 2 - CCDC das Amostras e Padrões (Fase móvel: hexano e acetato de etila; Revelador: Iodo.) Onde: Onde: P1 = padrão 1; P2 = padrão 2; PSL1 = amostra 1; PSL2 = amostra 2; PSL3 = amostra 3 e PSL4 = amostra 4.

Na revelação das placas com iodo, as amostras apresentaram fator de retenção iguais ao padrão Decanoato de Nandrolona. O primeiro padrão não apareceu na placa revelada com iodo.

A partir das revelações das placas cromatográficas, foi possível calcular o fator de retenção (Rf) de todas as soluções utilizadas (tabela 03).

Tabela 3 - Fatores de retenção (Rf) dos padrões e amostras revelados com Liebermann-Burchard e cristais de iodo.

	Liebermann-Burchard	Cristais de iodo
--	---------------------	------------------

Códigos das Amostras	Rf _{amostras}	Rf _{padrões}	Rf _{amostras}	Rf _{padrões}
PSL1	0,58	P1: 0,57	0,18	P2: 0,78
	0,66	P2: 0,83	0,75	
	0,85		1,0	
PSL2	0,61	P1: 0,57	0,18	P2: 0,78
	0,68	P2: 0,83	0,75	
	0,76		1,06	
PSL3	0,74	P1: 0,57	0,12	P2: 0,78
	1,0	P2: 0,83	0,39	
			0,54	
		1,03		
PSL4	0,74	P1: 0,57	0,15	P2: 0,78
	1,0	P2: 0,83	0,33	
			0,51	
			0,72	

Nas placas reveladas com Liebermann-Burchard, as amostras 1 e 2 apresentaram três manchas com os respectivos fatores de retenção e as amostras 3 e 4, apenas duas manchas, sendo possível dessa forma, calcular dois Rfs, os quais foram exatamente iguais nestas duas últimas amostras.

Em Liebermann-Burchard, a solução padrão 1 (Estanazolol) apresentou Rf de 0,57 e a solução padrão 2 (Decanoato de Nandrolona) apresentou Rf de 0,83. De modo geral, as amostras obtiveram Rfs próximos ao das soluções padrões, sendo que a amostra 1 foi a que apresentou Rfs mais aproximados, sendo 0,58 e 0,85.

Nas placas reveladas com iodo, não foi visualizado presença de manchas no ponto

referente à solução padrão 1, impossibilitando o cálculo do Rf da mesma.

Entretanto, o Rf da solução padrão 2 foi de 0,78. As amostras 1 e 2 apresentaram Rfs aproximados, de 0,75. A amostra 4 apresentou Rf também próximo, de 0,72 e a amostra 3 não teve Rf tão próximo ao da solução padrão, quanto às outras amostras.

Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detecção por Arranjo de Diodos (CLAE/HPLC-DAD)

As soluções preparadas a partir de Estanazolol e Decanoato de Nandrolona foram submetidas à Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC).

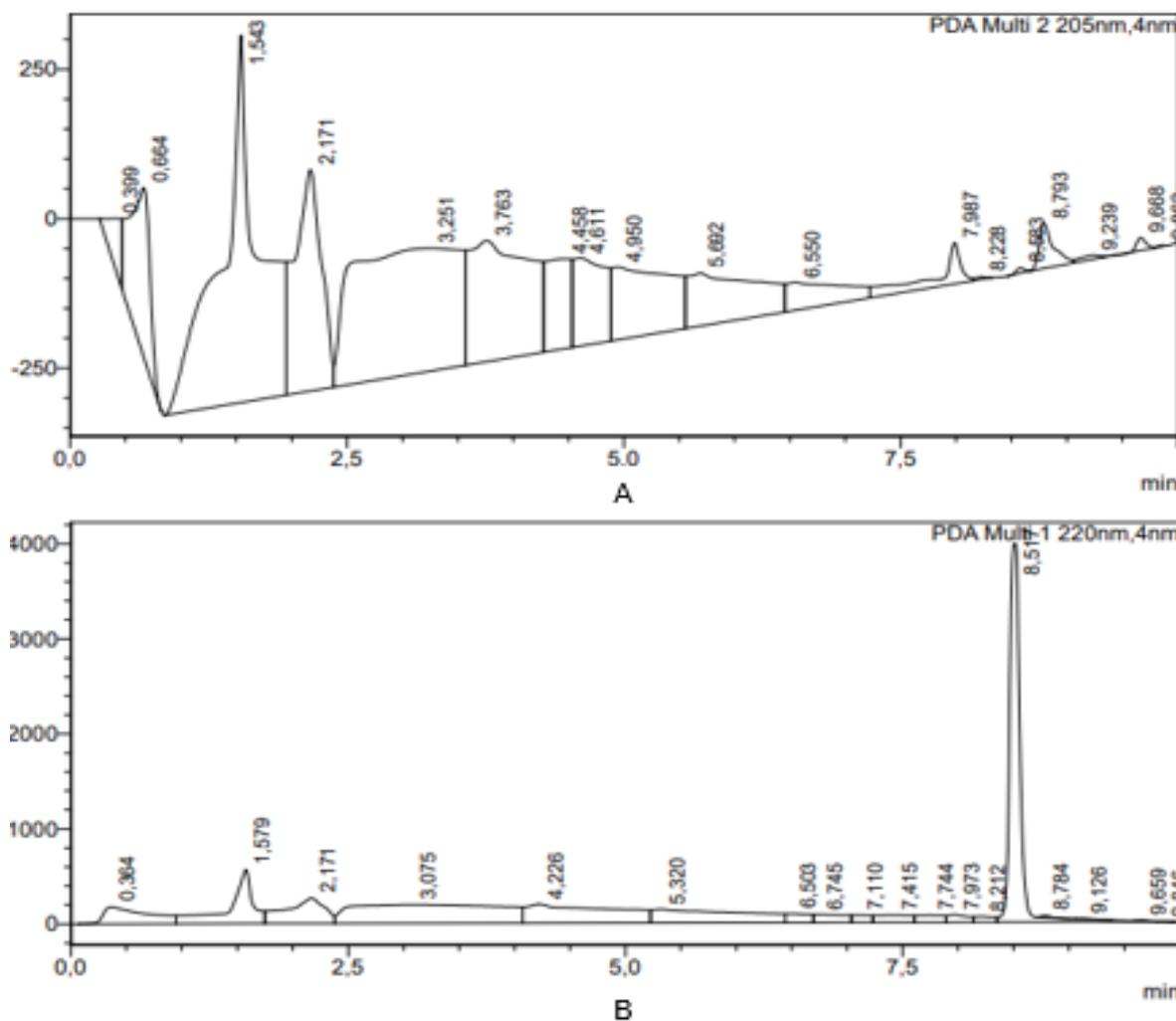


Figura 3 - Cromatogramas das soluções utilizadas como padrões. Onde: P1 = solução padrão 1 - Estanozolol; P2 = solução padrão 2 - Decanoato de Nandrolona.

A solução de Estanozolol, no comprimento de onda de 205 nm, apresentou picos nos minutos 1,5; 2,1; 3,7, 7,9, 8,0; 8,7 e 9,6 (figura 3A), enquanto a solução de Decanoato de Nandrolona, no comprimento de

onda 220 nm, teve picos em 1,5; 2,1; 8,5 minutos (figura 3B). Em seguida, as amostras foram submetidas a ambos os comprimentos de onda, 205 e 220 nm (figura 04)

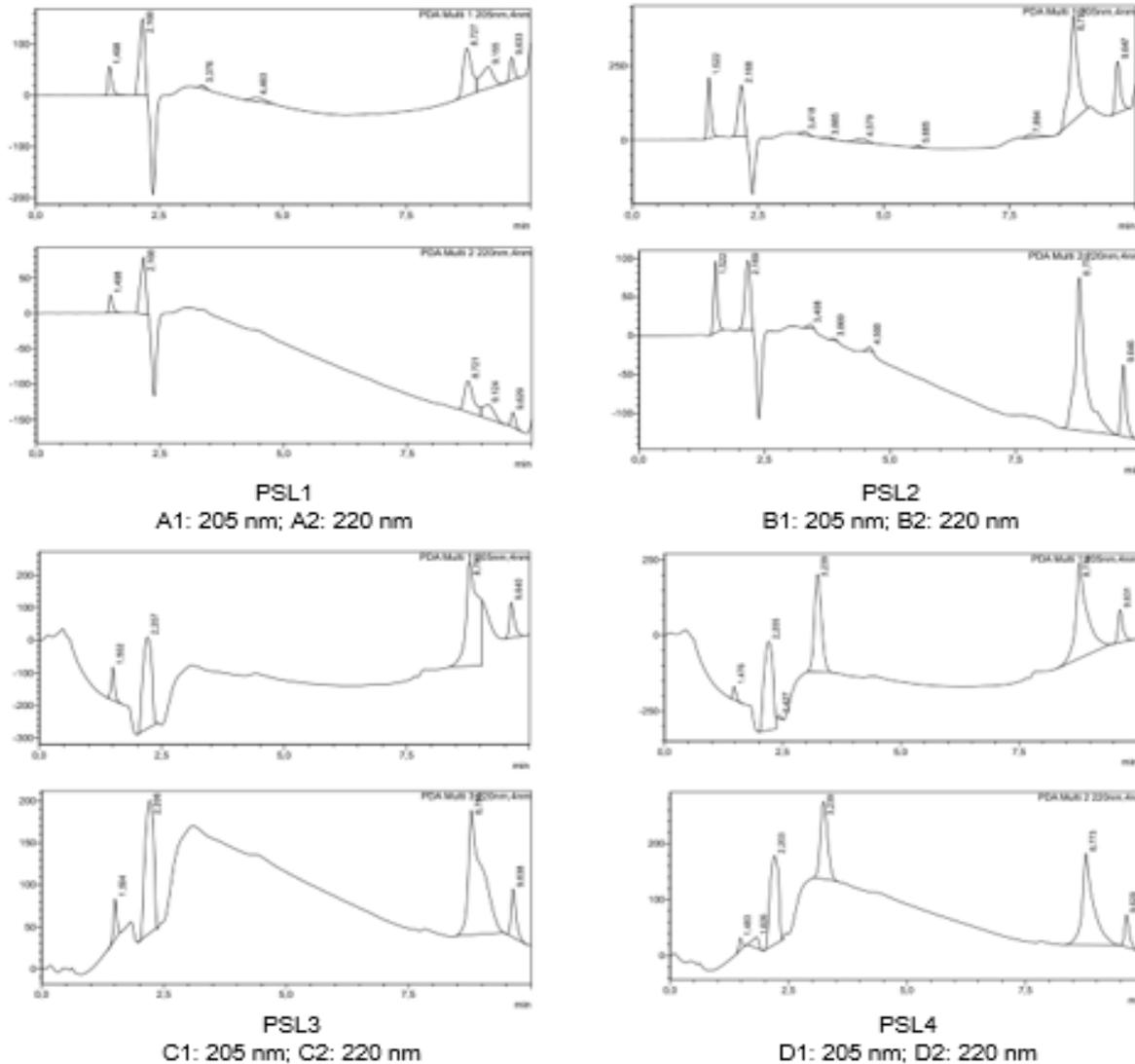


Figura 4 - Cromatogramas das amostras em diferentes comprimentos de onda.

A amostra 1 (figura 4A1), no comprimento de onda 205 nm, teve picos em 1,4, 2,1, 3,3, 4,4, 8,7, 9,1 e 9,6 minutos. Em 220 nm (figura 4A2), os picos foram semelhantes, com exceção dos minutos 3,3 e 4,4, os quais não apareceram.

A segunda amostra (figura 4B1) em 205 nm se elevou em 1,5, 2,1, 3,4, 3,8, 4,5, 5,6, 7,8, 8,7 e 9,6 minutos e, em 220 nm (figura 4B2), apenas o pico em 5,6 minutos não aparece.

A amostra 3 (figura 4C1 e C2) se comportou de maneira similar em ambos os comprimentos de onda, apresentando picos em 1,5, 2,2, 8,7 e 9,6 minutos.

Já a quarta e última amostra, em 205 nm (figura 4D1) se elevou em 1,4, 2,2, 2,4, 3,2, 8,7, 9,6 minutos e, em 220 nm (figura 4D2), além dos picos citados, apareceu um novo em 1,8 minutos e em 2,4 não houve pico, como no comprimento de onda anterior.

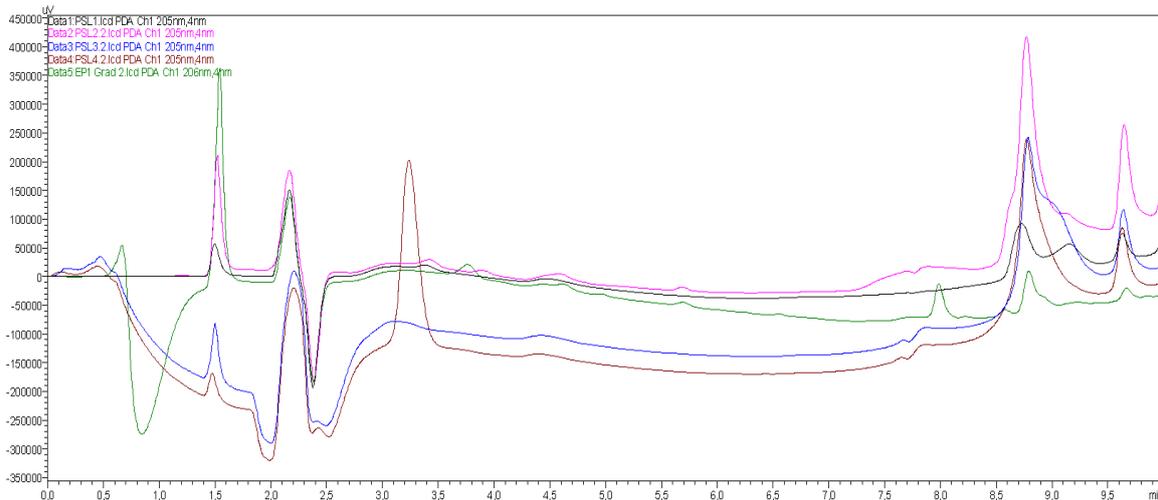


Figura 5 - Cromatograma comparativo entre a solução de Estanozolol e as amostras. Onde: Preto = PSL1; Rosa = PSL2; Azul = PSL3; Vermelho = PSL4; Verde = solução de Estanozolol.

Nas figuras 05 e 06 é possível observar as amostras e as soluções utilizadas como padrões. As amostras 1 e 2 apresentaram picos em 1,5 e 2,2 minutos, tal qual à solução de

Estanozolol, porém em picos menores. Já nos minutos 8,7 e 9,6 em que o Estanozolol se elevou, todas as amostras tiveram comportamentos iguais e com picos mais altos.

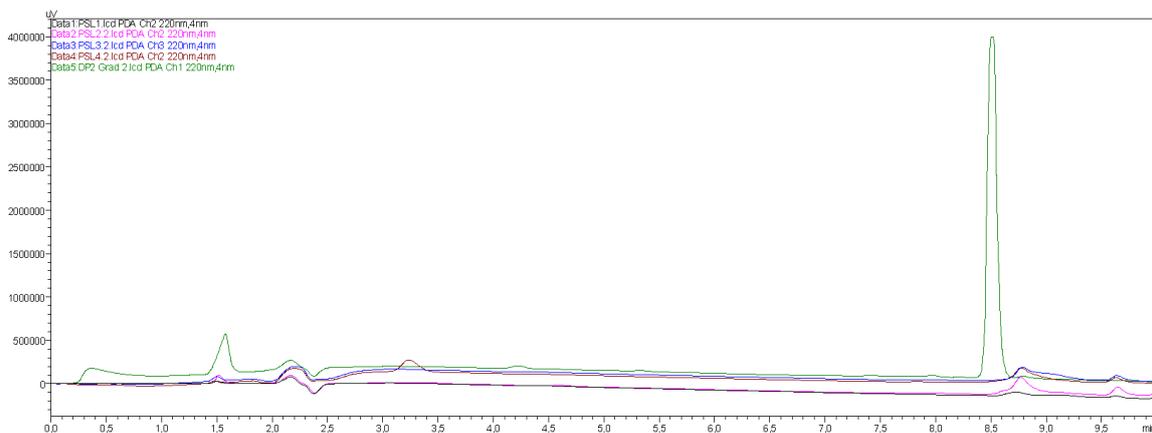


Figura 6 - Cromatograma comparativo entre a solução de Decanoato de Nandrolona e as amostras. Onde: Preto = PSL1; Rosa = PSL2; Azul = PSL3; Vermelho = PSL4; Verde: solução de Decanoato de Nandrolona.

As amostras apresentam picos próximos da solução de Decanoato de Nandrolona. PSL2 e PSL3 tiveram picos em 1,5 minutos, bem como a solução padrão e, PSL1 e PSL4 tiveram picos bem próximos, em 1,4 minutos. Em outro momento, a solução de Decanoato apresentou pico em 2,1 minutos, bem como PSL1 e PSL2. Já PSL3 e PSL4 apresentaram picos próximos, em 2,2 minutos. O maior pico da solução foi em 8,5 minutos, sendo que todas as amostras apresentaram

picos próximos, em 8,7 minutos, porém em menor concentração.

DISCUSSÃO

Nas reações de Liebermann-Burchard e Salkowski, a manifestação da coloração azul esverdeada é consequência da formação de um esteroide aromático, o qual se dá pela desidratação e posterior oxidação dos anéis do ciclopentanoperidrofentreno (Burke, 1974; Xiong e colaboradores, 2007).

Sendo assim, a mudança de cor para azul e verde, ainda que de maneira comedida, é fator indicativo da possível presença de esteroides nas amostras.

Ainda com relação à reação de Salkowski, o outro tipo de coloração que surgiu, a qual foi estável, é indicativo da presença de triterpenos (Silva, Lima, 2016), dos quais, por sua vez, derivam-se os esteroides.

Na cromatografia em camada delgada foi observado que em algumas placas, como por exemplo, na revelada com Liebermann-Burchard, o Estanozolol está visível, ainda que em baixa intensidade. Já nas placas cromatográficas reveladas em iodo, o Estanozolol não apareceu provavelmente devido à baixa concentração (50mg/mL) e a dificuldade em transferi-la para a placa de sílica gel, pois a mesma solidifica rapidamente dentro do capilar.

A solução de Decanoato de Nandrolona, por possuir uma concentração maior (200mg/mL) e não solidificar dentro do capilar, apareceu com maior facilidade nas placas cromatográficas.

No momento da revelação das placas, tanto com Liebermann-Burchard, quanto com iodo, é possível afirmar que os padrões e as amostras possuem uma polaridade considerável, dado que elas apresentaram mobilidade significativa nas placas de sílica gel, fator indicativo de afinidade pelo solvente.

Os Rf's das amostras, em comparação com os das soluções padrões, em sua maioria são similares. Estes resultados sugerem que, possivelmente, as amostras possuam contaminação com os esteroides Estanozolol e Decanoato de Nandrolona.

No HPLC-DAD, as soluções usadas como padrões foram submetidas aos comprimentos de onda determinados, porém foi observado que a máxima absorção do Estanozolol foi em 205 nm e o Decanoato de Nandrolona em 220 nm, sendo, portanto, os únicos comprimentos utilizados. Estes resultados corroboram com Tavares (2019), que realizou outras análises em HPLC com as mesmas substâncias, e ambas apresentaram máxima absorção no comprimento de onda de 240 nm, faixa esta próxima às utilizadas.

As substâncias padrões, quando submetidas ao HPLC, apresentaram mais de um pico. Isso deve-se ao fato de serem substâncias comerciais, as quais podem possuir algumas variações. Em análises cromatográficas, Ahi, Beotra, Jain (2010)

conseguiram detectar análogos do Estanozolol, sendo elas o 3-hidróxi-estanozolol (3OHSTL), o 4-β-hidróxi-estanozolol (STL4OH) e o 16-β-hidróxiestanozolol (STL16OH).

É possível observar também que ambas as soluções padrões, embora em concentrações diferentes, se comportam inicialmente de maneira semelhante, fator esse que pode indicar a presença de excipientes iguais nestas soluções.

Tanto o Estanozolol, quanto o Decanoato de Nandrolona, são moléculas grandes e apolares, sendo assim, acredita-se que necessitam de tempo de corrida um pouco maior para se manifestarem no cromatograma. Assim, os picos mais próximos ao final das corridas, tendem a ser, de fato, os padrões.

Os picos iniciais em menor intensidade, antecedentes ao primeiro minuto, não foram considerados, pois assemelham-se com o tempo morto, o qual refere-se ao tempo que a fase móvel leva para chegar ao final da coluna. PSL2 foi a amostra que apresentou maior número de picos semelhantes aos padrões, sendo seis idênticos e dois muito próximos, seguido de PSL1, a qual apresentou quatro picos idênticos e três próximos. PSL3, dos quatro picos expostos, três são iguais aos padrões e, PSL4 apresentou dois picos iguais e seis aproximados. Essa semelhança entre amostras e padrões podem indicar presença esteroidal nas amostras analisadas.

CONCLUSÃO

Há escassez de estudos científicos que analisem suplementos alimentares buscando detectar esteroides androgênicos anabólicos, sendo este, uma das poucas pesquisas nesta vertente.

Os resultados obtidos através das análises químicas parecem indicar a presença de triterpenos e esteroides nas amostras. De igual maneira, as análises cromatográficas, tanto em camada delgada, quanto na líquida de alta eficiência, também indicam a possível presença de esteroides.

Para estudos futuros, sugere-se a continuidade da pesquisa com maior variedade de amostras e padrões.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à CAPES, ao CNPq, à FAPESB e ao PICIN/UNEB pela bolsa e suporte financeiro.

REFERÊNCIAS

- 1-Anvisa. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC n. 656, de 15 de Junho de 2020. Dispõe sobre a prescrição dietética, pelo nutricionista, de suplementos alimentares. Brasília. 2020.
- 2-Ahi, S.; Beotra, A.; Jain, S. Detection of mono-hydroxylated metabolites of stanozolol by HPLC-ESI (+) MS/MS in Indian sports persons. *Drug Testing and Analysis*. New Delhi. Vol. 1. Num. 11-12. p. 538-544. 2010.
- 3-ABENUTRI. Associação Brasileira de Empresas de Produtos Nutricionais. Resultados de análises de proteínas reprovadas no mercado de suplementos - Amino spiking. São Paulo. 2022.
- 4-Bessa, T.; Terrones, M.G.H.; Santos, D.Q. Avaliação fitotóxica e identificação de metabólitos secundários da raiz de *Cenchrus echinatus*. *Revista Horizonte Científico*. Uberlândia. Vol.1. Num. 1. 2007.
- 5-Burke, R. W.; Dianodstone, B. I.; Velapoldi, R. A.; Menis, O. Mechanisms of the Liebermann-Burchard and Zak Color Reactions for Cholesterol. *Clinical chemistry*. Vol. 20. Num. 7. p. 794-801. 1974.
- 6-Costa, A. F. Farmacognosia. Fundação Calouste Gulbenkian. 1994.
- 7-Costa, B.R.B; Cruz, M.N.S; Roiffé, R.R.; Padilha, M.C. Suplementos alimentares: uma fonte de doping não intencional? *Brazilian Journal of Food Technology*. Vol. 24. 2021.
- 8-Costa, F.R.; Maricato, E.; Dias, A.M.N.; Baptista, E.B. Proteínas do soro do leite: propriedades funcionais e benefícios para a saúde humana. *Lecturas: Educación Física y Deportes*. Vol. 25. Num. 272.2021.
- 9-Geyer, H.; Parr, M.K; Koehler, K.; Mareck, U.; Schänzer, W.; Thevis, M. Nutritional Supplements Cross-Contaminated and Faked with Doping Substances. *Journal of Mass Spectrometry*. Cologne. Vol. 43. Num. 7. 2004. p.892-902.
- 10-Joly, A.B. Botânica: Introdução a taxonomia vegetal. São Paulo. Nacional. 1998.
- 11-Pope Junior, H.G.; Wood, R.I.; Rogol, A.; Nyberg, F.; Bowers, L.; Bhasin, S. Adverse health consequences of performance-enhancing drugs: an Endocrine Society Scientific Statement. *Endocrine Reviews*. Vol. 35. Num. 3.2014. p. 341-375.
- 12-Santos, J.A.; Sampaio, K.P.B. Os riscos do consumo de suplemento alimentar sem orientação do profissional nutricionista. *Revista ENAF Science*. Vol. 9. Num. 01. 2014. p. 102-106.
- 13-Silva, A.C.O.; Lima, R.A. Identificação das classes de metabólitos secundários no extrato etanólico dos frutos e folhas de *Eugenia uniflora* L. *Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental*. Vol. 3. Num. 2. 2016. p. 381-388.
- 14-Tavares, I.S. Determinação de estimulantes, esteroides anabolizantes, diuréticos e laxante por HPLC-DAD e LC-MS/MS em suplementos alimentares adulterados disponíveis no Brasil. Tese de Doutorado. USP- SP. São Paulo. 2019.
- 15-Xiong, Q.; Wilson, W.K.; Pang, J. The Liebermann-Burchard Reaction: Sulfonation, Desaturation, and Rearrangement of Cholesterol in Acid. *Lipids*. Vol. 42. Num. 1. 2007. p. 87-96.

Recebido para publicação em 09/08/2023
Aceito em 25/02/2024