

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

Ana Gabriella Carvalho Miguita

**Análise de anabolizantes apreendidos no Brasil por
Espectrometria de massas com ionização por *paper spray* e
métodos quimiométricos**

Belo Horizonte

2018

UFMG/ ICEx/ DQ. 1273^a

D. 699^a

Ana Gabriella Carvalho Miguita

**Análise de anabolizantes apreendidos no Brasil por
Espectrometria de massas com ionização por *paper spray* e
métodos quimiométricos**

Dissertação apresentada ao Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Química – Química Analítica.

Belo Horizonte

2018

M634a
2018
D

Miguita, Ana Gabriella Carvalho

Análise de anabolizantes apreendidos no Brasil por espectrometria de massas com ionização por paper spray e métodos quimiométricos [manuscrito] / Ana Gabriella Carvalho Miguita. 2018.

78 f. : il.

Orientador: Marcelo Martins de Sena.

Coorientadora: Clésia Cristina Nascentes.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais - Departamento de Química.

Inclui bibliografia.

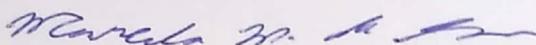
1. Química Analítica - Teses 2. Química legal - Teses 3. Esteróides anabólicos - Teses 4. Espectrometria de massa - Teses 5. Análise de componentes principais - Teses 6. Medicamentos - Adulteração e inspeção - Teses I. Sena, Marcelo Martins de, Orientador II. Nascentes, Clésia Cristina, Coorientadora III. Título.

CDU 043

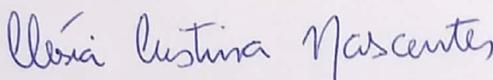
"Análise de Anabolizantes Apreendidos no Brasil por Espectrometria de Massas com Ionização por Paper Spray e Métodos Quimiométricos"

Ana Gabriella Carvalho Miguita

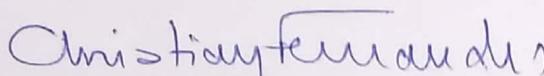
Dissertação aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:



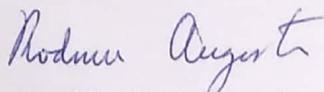
Prof. Marcelo Martins de Sena - Orientador
UFMG



Profa. Clésia Cristina Nascentes - Coorientadora
UFMG



Prof. Christian Fernandes
UFMG



Prof. Rodinei Augusti
UFMG

Belo Horizonte, 28 de fevereiro de 2018.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus que me permitiu concluir esta etapa me dando forças durante todo o percurso.

Aos meus pais por não medirem esforços para que eu pudesse alcançar meus objetivos, às minhas avós, tias, tios e primos por toda ajuda e apoio emocional. Vocês foram fundamentais nessa realização.

Aos meus amigos, que são minha segunda família, por me ajudarem de perto ou mesmo de longe a concluir esta etapa com incentivo, torcida e apoio.

Aos colegas do GQQATE e do Laboratório 157 pelo companheirismo e ajuda. Vocês tornaram essa caminhada mais leve.

Ao meu orientador Marcelo, e à minha coorientadora Clésia pelos ensinamentos, ajuda e dedicação durante esses dois anos.

Ao Departamento de Polícia Civil - MG e Superintendência da Polícia Federal – MG pela parceria e contribuição.

À CAPES pelo custeamento pessoal dessa pesquisa.

À Universidade Federal de Minas Gerais, ao Instituto de Ciências Exatas e ao departamento de Química, assim como a seus funcionários e professores.

A todos que participaram direta ou indiretamente para o desenvolvimento desta etapa.

Muito obrigada a todos vocês!

RESUMO

A falsificação de medicamentos tem sido motivo de preocupação dos órgãos de saúde há anos, devido aos problemas de saúde que podem ser causados, como reações alérgicas e efeitos colaterais, que podem até levar à morte. No Brasil, os dados mais recentes de apreensões de medicamentos pela Polícia Federal (de 2006 a 2011) revelam que os anabolizantes foram a segunda maior classe apreendida, ficando atrás apenas dos medicamentos para disfunção erétil. Portanto, este trabalho teve como principal objetivo avaliar a utilização da espectrometria de massas com ionização por *paper spray* (PS-MS) juntamente com métodos quimiométricos para analisar amostras apreendidas de anabolizantes. Um total de 75 amostras nas formas de comprimido, óleo e suspensão (sendo as duas últimas injetáveis) foram selecionados para este trabalho oriundas de apreensões realizadas pela Polícia Civil de Minas Gerais e pelas Polícias Federais de Minas Gerais e Brasília. Todas as amostras foram analisadas por PS-MS no modo positivo, sendo a faixa de massas de 50 – 1000 m/z , resultando em espectros contendo padrões dos respectivos princípios ativos contidos em cada anabolizante. Foi realizada então a análise de componentes principais (PCA) primeiramente para as amostras nas formas de comprimidos e suspensões e, posteriormente, das amostras oleosas, em que foi observada uma tendência à separação das amostras de acordo com os princípios ativos presentes, sendo possível observar os casos de adulterações. O método de seleção dos preditores ordenados (OPS) foi utilizado no modelo exploratório para as amostras oleosas com o intuito de melhorar a separação dos agrupamentos. Neste modelo, as amostras foram separadas de acordo com os princípios ativos presentes utilizando 28 variáveis e descrevendo 69,82% da variância, com 3 componentes principais.

Palavras-chave: Falsificação de medicamentos; anabolizantes; espectrometria de massas com ionização por paper spray, análise de componentes principais; análise forense.

ABSTRACT

Analysis of anabolic steroids seized in Brazil by paper spray mass spectrometry and chemometric methods

Drug counterfeiting has been a concern of health agencies for years, due to health problems that can be caused, such as allergic reactions and side effects, which can even lead to death. In Brazil, the most recent data on drug seizures by the Brazilian Police (from 2006 to 2011) show that anabolic steroids were the second largest seized class, behind only the drugs for erectile dysfunction. Therefore, the main objective of this work was to evaluate the use of paper spray mass spectrometry (PS-MS) together with chemometric methods to analyze seized anabolic samples. A total of 75 samples in tablet, oil and suspension forms, the last two in the injectable forms, were selected for this work, resulting from seizures carried out by the “Polícia Civil de Minas Gerais” and by the Federal Polices of Minas Gerais and Brasília. All samples were analyzed by PS-MS in the positive mode, the mass range 50 – 1000 m/z , resulting in spectra containing peaks related to the respective active principles contained in each sample. Principal component analysis (PCA) was then performed primarily for the samples in tablet and suspension forms and subsequently on the oily samples, for which a trend was observed for the separation of the samples according to the active principles present, being possible to detect cases of adulteration. The method of ordered predictor selection (OPS) was used in the exploratory model for the oily samples in order to improve the separation of the clusters with a reduced number of selective spectral variables. In this model, samples were clustered according two active principles present using 28 variables and describing 69.82% of the variance, with 3 principal components.

Keywords: Drug counterfeiting; anabolic steroids; mass spectrometry with paper spray mass spectrometry; principal component analysis; forensic analysis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fórmula estrutural da testosterona.	14
Figura 2. Número de incidentes envolvendo produtos farmacêuticos no período de 2012 a 2016.....	18
Figura 3. Classes de produtos falsificados reportados à OMS no período de 2013 a 2017.	20
Figura 4. Desenho esquemático de um espectrômetro de massas.	24
Figura 5. Representação esquemática da ionização <i>electrospray</i> (ESI).....	26
Figura 6. Desenho esquemático da montagem do sistema PS-MS.....	27
Figura 7. Representação de amostras simuladas num espaço hiperamostral e indicação das duas primeiras componentes principais.	30
Figura 8. Representação da decomposição da matriz de dados X de acordo com a PCA.....	30
Figura 9. Representação do modelo PLS-DA.....	32
Figura 10. Representação do método de seleção de variáveis usando OPS.	35
Figura 11. Frascos de alguns anabolizantes apreendidos utilizados nesse trabalho.	37
Figura 12. Aparato instrumental utilizado para as análises: a) Espectrômetro de massas Thermo LQC-Fleet; b) Fonte de ionização <i>paper spray</i>	38
Figura 13. Representação das matrizes para a construção do modelo PLS-DA. ...	40
Figura 14. Espectros de FT-IR das amostras oleosas de anabolizantes.	42
Figura 15. Espectros de FT-IR de (a) uma amostra de decanoato de nandrolona (b) óleo de girassol.	43
Figura 16. Gráfico de escores de PC1 x PC2 com os dados de FTIR.	44

Figura 17. Espectros PS(+)-MS de amostras de anabolizantes apreendidos cujas formas físicas e princípios ativos são (a) oleosa, acetato de trembolona; (b) suspensão, estanozolol; (c) comprimido, metandrostenolona.	49
Figura 18. Espectro PS(+)-MS de uma amostra rotulada como undecilenato de boldenona.....	51
Figura 19. Gráfico de T^2 de Hotelling x resíduos Q para o modelo de sólidos e suspensões.	52
Figura 20. Gráfico de escores de PC1 x PC2, para o modelo de sólidos e suspensões.	53
Figura 21. Espectros PS(+)-MS das amostras contendo (a) metandrostenolona, (b) testosterona.....	54
Figura 22. Gráfico de pesos de: a) PC1 e b) PC2, para o modelo de sólidos e suspensões.	56
Figura 23. Gráfico de escores de a) PC1xPC2 b) PC1xPC3, para o modelo de amostras oleosas.	57
Figura 24. Gráficos de pesos de a) PC1, b) PC2 e c) PC3, para o modelo de amostras oleosas.	58
Figura 25. Gráfico de de T^2 de Hotelling x resíduos Q, para o modelo de amostras oleosas com OPS.....	61
Figura 26. Gráficos de escores de (a) PC1xPC2 e (b) PC1xPC3, para o modelo de amostras oleosas com seleção de variáveis por OPS.....	62
Figura 27. Gráficos de pesos de a) PC1, b) PC2 e c) PC3, para o modelo de amostras oleosas com seleção de variáveis por OPS.....	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Resultados das análises realizadas de 2012 a 2014, publicados pelo WADA.	16
Tabela 2. Possíveis efeitos adversos causados pelo uso de anabolizantes. ...	17
Tabela 3. Informações sobre as amostras de anabolizantes utilizadas nesse trabalho.	36
Tabela 4. Condições experimentais para as medidas no ICP-MS.	45
Tabela 5. Faixa de concentrações ($\mu\text{g}/\text{comprimido}$) dos elementos em todos os comprimidos analisados.	46
Tabela 6. Faixa de concentrações ($\mu\text{g}/\text{frasco}$) dos elementos nos frascos de suspensão analisados.	47
Tabela 7. Parâmetros utilizados no método de seleção de variáveis OPS para cada classe de princípio ativo.	60
Tabela 8. Resultados do método OPS para cada classe: Vetores de partida, RMSECV, R_{CV} , nº de variáveis.	61
Tabela 9. Resultados das adulterações encontradas nas amostras analisadas.	65

LISTA DE ABREVIATURAS

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ATR - Reflectância Total Atenuada (*Attenuated Total Reflectance*)

CI - Ionização química (*Chemical ionization*)

CID - Código Internacional de Doenças

COI - Comitê Olímpico Internacional

DART-MS - Espectrometria de Massas de Alta Resolução com Ionização por Análise Direta em Tempo Real

DESI - Ionização por desorção electrospray (*Desorption electrospray ionization*)

EI - Ionização por impacto eletrônico (*Electron ionization*)

ESI - Ionização por *electrospray* (*Electrospray ionization*)

FTIR - Infravermelho Médio com Transformada de Fourier

GC-MS - Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas

HCA - Análise Hierárquica de Agrupamentos (*Hierarchical Cluster Analysis*)

HPLC-DAD - Cromatografia Líquida com Detector de Arranjo de Diodos

ICP-MS - Espectrometria de Massas com Plasma Indutivamente Acoplado (*Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*)

LDA - Análise Discriminante Linear (*Linear Discriminant Analysis*)

LOA - Vetor Pesos (*Loadings Vector*)

m/z - Razão massa-carga

MCR-ALS - Resolução Multivariada de Curvas com Mínimos Quadrados Alternados (*Multivariate Curve Resolution with Alternating Least Squares*)

NAS - Vetor Sinal Analítico Líquido (*Net Analyte Signal Vector*)

OMS - Organização Mundial da Saúde

OPS - Método de Seleção dos Preditores Ordenados (*Ordered Predictor Selection*)

PARAFAC - Análise de Fatores Paralelos (*Parallel Factor Analysis*)

PC - Componente Principal (*Principal Component*)

PCA - Análise de Componentes Principais (*Principal Component Analysis*)

PCR - Regressão por Componentes Principais (*Principal Component Regression*)

PLS - Mínimos Quadrados Parciais (*Partial Least Squares*)

PLS-DA - Análise Discriminante por Mínimos Quadrados Parciais (*Partial Least Squares Discriminant Analysis*)

PSI - *Pharmaceutical Security Institute*

PS-MS - Espectrometria de Massas com Ionização por *Paper Spray* (*Paper Spray Mass Spectrometry*)

Rcv - Coeficiente de Correlação da Validação Cruzada (*Cross Validation Correlation Coefficient*)

RMSECV - Raiz Quadrada do Erro Quadrático Médio da Validação Cruzada (*Root Mean Square Error of Cross Validation*)

SERS - Espectroscopia Raman amplificada por superfície

SIMCA - Modelos Independentes de Similaridade utilizando Componentes Principais (*Soft Independent Modelling of Class Analogies*)

SqREs - Vetor Resíduos (*Squared Residuals Vector*)

Stn - Vetor Razão Sinal-Ruído (*Signal-to-noise Ratio Vector*)

TOF - Análise por tempo de voo (*Time of flight*)

UHPLC-MS/MS - Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência Acoplada a Espectrometria de Massas Sequencial

USP - Farmacopeia Americana (*United States Pharmacopeial*)

VIP scores - Importância das Variáveis na Projeção dos Escores (*Variable Importance in Projection Vector*)

WADA - Agência Mundial Anti-Doping (*World Anti-Doping Agency*)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
2.1 Anabolizantes.....	14
2.1.1 Consumo de anabolizantes	14
2.1.2 Efeitos adversos	16
2.1.3 Falsificação de medicamentos	18
2.1.4 Legislação brasileira	21
2.1.5 Métodos analíticos empregados em análises de anabolizantes.....	22
2.2 Espectrometria de massas	23
2.2.1 Analisadores	24
2.2.2 Métodos de ionização	25
2.2.3 Ionização por <i>paper spray</i> (PS-MS)	26
2.3 Quimiometria.....	28
2.3.1 Análise de componentes principais (PCA).....	29
2.3.2 Análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA).....	31
2.3.3 Seleção dos preditores ordenados (OPS).....	33
3. METODOLOGIA.....	36
3.1 Amostras	36
3.2 Reagentes, materiais e instrumentação	37
3.3 Preparo de amostras	38
3.4 Processamento quimiométrico dos dados	39
3.4.1 Sólidos e suspensões.....	39
3.4.2 Óleos.....	39
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	41
4.1 Estudos preliminares	41
4.1.1 Espectroscopia no Infravermelho (ATR-FTIR)	41

4.1.2 Espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS).....	44
4.2 Análises por PS-MS.....	47
4.3 Modelos quimiométricos.....	51
4.3.1 Sólidos e suspensões.....	51
4.3.2 Oleosas.....	56
5. CONCLUSÕES.....	66
6. PERSPECTIVAS.....	67
REFERÊNCIAS.....	68

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, diversos casos envolvendo falsificação de medicamentos foram reportados pela mídia. De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), estima-se que 10% dos medicamentos mundiais sejam falsificados.¹ Tal falsificação pode ser dada pela adição de produtos que não constam nos rótulos, redução ou ausência de princípios ativos, como também pela utilização de embalagens falsas.²

No Brasil, o Relatório Brasil Original divulgou que, no período de 2008 a 2010 foram apreendidos quase 22 milhões de medicamentos falsos.³ De acordo com o mesmo relatório e dados da Polícia Federal, dentre os medicamentos apreendidos, as classes falsificadas mais comumente encontradas foram para disfunção erétil e anabolizantes, além daqueles para emagrecimento e tratamento de câncer.^{4,5}

Os anabolizantes vêm sendo amplamente utilizados nos últimos anos por atletas, com o objetivo de melhorar o desempenho esportivo, e por indivíduos jovens não atletas para fins estéticos, sendo também utilizados no tratamento de algumas doenças, tais como hipogonadismo e anemia.⁶⁻⁸ No Brasil a prevalência do consumo de anabolizantes pode variar de 2,1% e 31,6%, dependendo da região estudada e das características das amostras.⁹ As academias são os locais de maior incidência do uso, nos quais, muitas vezes, os usuários adquirem os medicamentos sem orientação médica e sem conhecimento da procedência dos produtos, utilizando-os de forma abusiva.^{7,9,10}

Dentre os problemas relacionados à utilização dos anabolizantes podem ser destacados seus efeitos colaterais, como problemas cardiovasculares, hepáticos, endócrinos, músculo-esqueléticos, renais, imunológicos, reprodutivos e psicológicos, havendo também relatos de casos de morte como possíveis consequências do seu uso abusivo.^{11,12} Além disso pode-se destacar a utilização de anabolizantes juntamente com outras drogas, como bebidas alcólicas e drogas de abuso, o que também podem levar à morte.¹³

Com relação à legislação, os anabolizantes se encontram na portaria de controle especial da ANVISA (lista C5 – Lista de Substâncias Anabolizantes).¹⁴ Portanto, sua comercialização só é permitida com a apresentação da cópia da

receita emitida por um médico ou dentista registrados, na qual devem constar dados do profissional, do paciente, além do Código Internacional de Doenças (CID). Entretanto, nos últimos anos diversos casos de venda ilegal de anabolizantes no Brasil foram relatados, sendo a maioria dos produtos falsificados e/ou provenientes de outros países, o que também é considerado crime no país.^{15,16}

Embora os anabolizantes sejam um grande alvo de falsificação de medicamentos, ainda não há muitos estudos sobre as análises de medicamentos suspeitos dessa classe. Dentre os estudos disponíveis, as técnicas analíticas mais amplamente utilizadas são cromatografia líquida e gasosa, normalmente acopladas a detectores por espectrometria de massas.¹⁷⁻

19

Uma técnica que tem recebido bastante atenção nos últimos anos, principalmente em análises de matrizes complexas, é a espectrometria de massas com ionização por *paper spray* (PS-MS), devido às suas vantagens de simplicidade, baixo custo, eficiência, rapidez, e baixo consumo de amostras e de solventes.²⁰ Esta técnica também tem ganhado bastante destaque em análises forenses, pela simplicidade de seu uso através de injeção direta das amostras, sem precisar de prévia separação cromatográfica. Considerando a natureza multivariada dos espectros gerados, o uso de PS-MS demanda muitas vezes a utilização conjunta de métodos quimiométricos, tendo sido empregada em aplicações forenses a problemas de documentoscopia,²¹ falsificação de bebidas^{22,23} e análise de drogas ilícitas.^{24,25}

Portanto, o presente trabalho tem por objetivo avaliar a utilização da espectrometria de massas com ionização por *paper spray* (PS-MS), como uma técnica rápida e simples, juntamente com métodos quimiométricos para analisar amostras apreendidas de anabolizantes. Nesse desenvolvimento foram utilizados métodos quimiométricos de análise exploratória, como a análise de componentes principais (PCA), juntamente com o método de seleção de variáveis OPS (*Ordered Predictors Seletion* - Seleção dos Preditores Ordenados).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Anabolizantes

A testosterona (Figura 1), principal hormônio natural masculino, foi isolada e caracterizada pela primeira vez em 1935, sendo posteriormente descobertos os seus efeitos anabólicos, como crescimento de massa muscular e força física, e os seus efeitos androgênicos, responsáveis pelo desenvolvimento das características sexuais masculinas. Com o intuito de obter substâncias com maior atividade anabólica e menor atividade androgênica e que tivessem um tempo de meia vida maior, pesquisadores passaram a sintetizar compostos derivados da testosterona, que são atualmente denominados esteroides anabolizantes.⁶

Desde então, os anabolizantes têm sido utilizados por atletas, para melhorar o desempenho esportivo, por indivíduos não atletas para fins estéticos, com o intuito de aumentar a massa muscular e a força física, podendo também ser de interesse veterinário, utilizados em animais para aumento de peso e massa muscular.^{6,26} Os anabolizantes também são utilizados para o tratamento de algumas doenças, como hipogonadismo, crescimento retardado, infertilidade, impotência, perda muscular, depressão, anemia, entre outras.⁸

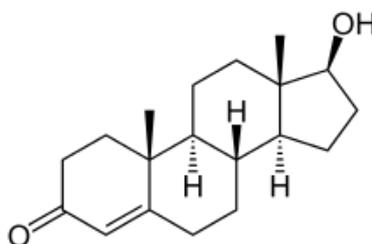


Figura 1. Fórmula estrutural da testosterona.

2.1.1 Consumo de anabolizantes

A popularidade dos anabolizantes no meio atlético se iniciou em 1945,²⁷ e desde então há um crescente aumento do uso dessas substâncias, não só

por atletas, mas por jovens em geral. Diversos estudos recentes têm revelado o aumento do consumo de anabolizantes em diferentes países do mundo, como Estados Unidos,^{28,29} Suécia,³⁰ Austrália,³¹ Porto Rico³² e Irã,³³ sugerindo também que pelo menos 3% dos homens jovens dos países ocidentais já tenham utilizado anabolizantes em algum momento da vida.³⁴

No Brasil, estimativas realizadas em 2014 indicaram que a prevalência do consumo de esteroides anabolizantes no país variou entre 2,1% e 31,6%, dependendo da região estudada e das características das amostras, sendo as academias os locais de maior incidência do uso.⁹ Esse fato também foi evidenciado pelos estudos realizados em academias nas cidades de Belo Horizonte,⁷ São Paulo,¹⁰ João Pessoa³⁵ e Goiânia.³⁶ Todos esses trabalhos mostraram um consumo mais elevado por parte de indivíduos jovens do sexo masculino. Em relação à obtenção das substâncias, os estudos em Minas Gerais e São Paulo revelaram que grande parte dos indivíduos as adquiriram sem receitas médicas, havendo também certo desconhecimento em relação aos efeitos adversos que podem ser causados. Entre os anabolizantes mais utilizados de forma abusiva podem ser citados o Deca-durabolin® (decanoato de nandrolona), Hemogenin® (oximetolona), Winstrol® (estanozolol) e Durateston® (sais de testosterona).¹⁵

As formas de utilização podem variar, sendo comuns os chamados ciclos, em que os usuários fazem uso dos anabolizantes por um determinado período, normalmente de 6 a 18 semanas. Em um desses ciclos, chamado de ciclo de combinação, são administrados mais de um anabolizante concomitantemente e por vias de administração também distintas. As doses quando administradas de forma abusiva, podem ultrapassar 10 a 100 vezes às doses farmacêuticas, sendo também comum a utilização de anabolizantes para fins veterinários, como por exemplo, o Equipoise® (undecilenato de boldenona).¹⁵

No meio esportivo, as regras referentes ao controle de dopagem começaram a ser estabelecidas em 1967, quando o Comitê Olímpico Internacional (COI) criou uma comissão médica, formada por médicos e toxicologistas, para esse fim. Os anabolizantes foram incluídos na lista de substâncias proibidas em 1975. Cerca de 20 anos depois o COI criou a

Agência Mundial Anti-Doping (*World Anti-Doping Agency - WADA*), responsável por elaborar uma lista com as substâncias e métodos proibidos internacionalmente por atletas em competições, editada a cada ano, a fim de adicionar novas substâncias.¹⁵ A WADA também é responsável por credenciar os laboratórios que realizam as análises em atletas. Assim, esta agência possui a tradição de publicar anualmente relatórios estatísticos reportando dados de análises de amostras biológicas realizadas em atletas de diferentes esportes, olímpicos e não olímpicos. Os dados da Tabela 1 revelam a quantidade de resultados que deram positivo para anabolizantes e seus derivados nos anos de 2012 a 2014.³⁷⁻³⁹

Tabela 1. Resultados das análises realizadas de 2012 a 2014, publicados pelo WADA.

Ano	2012	2013	2014
Análises realizadas	267645	269878	283304
Resultados adversos e/ou atípicos	4723	5962	3866
Resultados adversos e/ou atípicos para anabolizantes	2279	3320	1812

2.1.2 Efeitos adversos

Há inúmeros relatos na literatura sobre os efeitos adversos causados pelo uso de anabolizantes, podendo ser destacados os efeitos cardiovasculares, hepáticos, endócrinos, músculo-esqueléticos, renais, imunológicos, reprodutivos e psicológicos.^{12,34} Tais efeitos estão resumidamente apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Possíveis efeitos adversos causados pelo uso de anabolizantes.

Alvo	Efeitos
Sistema cardiovascular	Hipertensão, trombose, dano cardíaco
Fígado	Dano hepatocelular
Sistema endócrino	Diminuição da tolerância à glicose, aparecimento de acnes, edemas, engrossamento da voz
Sistema músculo-esquelético	Aumento da taxa de tensões/rupturas musculares
Rins	BUN (Nitrogênio uréico sanguíneo) elevado, tumor de Wilm
Sistema reprodutivo	Diminuição dos hormônios reprodutivos, impotência, teratogenicidade
Sistema psicológico	Mudanças de humor, comportamento agressivo, depressão, psicose, vício

Além desses efeitos comumente destacados, também há relatos de casos de morte por danos cardiovasculares e suicídio como possíveis consequências do uso abusivo de anabolizantes.⁴⁰⁻⁴²

Outro problema relacionado a esses medicamentos é sua utilização juntamente com outras drogas, como bebidas alcóolicas e drogas de abuso, o que também podem levar à morte.¹³ DARKE *et al.* realizaram um estudo a fim de identificar a causa da morte de indivíduos que utilizavam anabolizantes, através de autópsia. De todos os casos, apenas um não continha nenhuma outra substância psicoativa no organismo, sendo que em um terço dos indivíduos, a causa da morte foi a alta toxicidade das drogas, sendo também constatados danos cardiovasculares em quase todos os casos.⁴³

Além disso, como muitos desses produtos são administrados mediante utilização de agulhas, o compartilhamento de material contaminado pode levar ao surgimento de doenças infectocontagiosas, como HIV e hepatite.¹⁵

2.1.3 Falsificação de medicamentos

De acordo com a Organização Mundial da Saúde - OMS (*World Health Organization – WHO*) medicamento falsificado é aquele “deliberada e fraudulentamente mal rotulado no que diz respeito à identidade ou origem”. A falsificação pode se dar pela substituição ou adição de produtos que não constam nas bulas, redução da quantidade de princípio ativo ou até a falta desse, podendo também os medicamentos serem fornecidos em embalagens e etiquetas falsas.²

Estima-se atualmente, que os medicamentos falsificados representem mais de 10% do mercado mundial, podendo variar de 1% em países desenvolvidos como EUA, Japão, Canadá, Austrália, etc., a uma faixa de 10-30% em países em desenvolvimento da África, Ásia e América Latina.⁴⁴

Dados da organização *Pharmaceutical Security Institute (PSI)* revelam que houve um aumento na incidência de criminalidade envolvendo produtos farmacêuticos nos últimos anos, passando de 2018 casos em 2012 para 3147 no ano de 2016, como mostrado na Figura 2.⁴⁵



Figura 2. Número de incidentes envolvendo produtos farmacêuticos no período de 2012 a 2016.

Além da falta de eficácia, os medicamentos falsificados podem causar diversos problemas à saúde, podendo até levar à morte.⁴⁶ Diversos casos já foram relatados em que a falsificação de medicamentos resultou em danos à população, como um caso ocorrido na Nigéria, em 1995, em que vacinas falsificadas contra meningite foram aplicadas em 50000 pessoas, levando à morte de 2500. Outro caso ocorreu em 2004 na Argentina, em que injeções para anemia contendo ingredientes altamente tóxicos foram aplicadas em inúmeras pessoas.^{1,44,47}

Dentre os medicamentos mais comumente falsificados, os principais alvos, em países em desenvolvimento, são formulações para malária, tuberculose e AIDS. Já em países desenvolvidos, as falsificações tendem a se concentrar em medicamentos de estilo de vida, como os utilizados para disfunção erétil e emagrecimento. Porém, a medida que o mercado se expandiu, outras classes farmacêuticas começaram a ser alvos como os medicamentos de alto custo para câncer e os antivirais.¹

A OMS publicou em 2017 dados referentes ao monitoramento de medicamentos com qualidade inferior ou falsificados. De acordo com esses dados, os produtos para estilo de vida, em que se enquadram os anabolizantes, medicamentos para disfunção erétil, cosméticos e produtos para emagrecimento, foram a quarta maior classe de medicamentos falsificados reportados nos anos de 2013 a 2017, ficando atrás apenas dos medicamentos contra malária, antibióticos e das classes dos anestésicos e analgésicos (Figura 3). Porém, o número de relatórios sobre os produtos relacionados ao estilo de vida poderia ser ainda maior, já que algumas autoridades podem considerar esses medicamentos menos importantes à saúde pública dos que os medicamentos contra doenças mais sérias, como por exemplo a malária, de modo que são dedicados menos recursos para investigar esses produtos, ou até para denunciar à OMS, quando eles são encontrados.⁴⁸



Figura 3. Classes de produtos falsificados reportados à OMS no período de 2013 a 2017.

No Brasil, de acordo com o Relatório Brasil Original de 2011, no período de 2008 a 2010 foram apreendidos quase 22 milhões de medicamentos falsos. Além disso, de 2007 até dezembro de 2010, foram realizadas 153 operações conjuntas da ANVISA com a Polícia Federal em combate aos crimes contra a saúde pública. Dentre as principais apreensões, foram encontradas mais de 135 mil unidades de medicamentos falsos e contrabandeados, e 355,6 toneladas de medicamentos sem registro, além de outros produtos como agrotóxicos, alimentos e produtos para a saúde.³

Em relação às classes dos medicamentos apreendidos, dados da Polícia Federal revelam que, de 2007 a 2010, os anabolizantes foram a segunda classe de medicamentos falsificados mais apreendidas, ficando em primeiro lugar os medicamentos para disfunção erétil. Esse perfil também se manteve em relação a medicamentos contrabandeados, sendo que quase 50% deles eram originários da indústria paraguaia.⁵

Outro trabalho revelou que, no período de 2006 a 2011, houve um grande aumento na quantidade de esteroides anabolizantes apreendidos pela Polícia Federal de Brasília, de 282 (janeiro de 2007) para 1468 (dezembro de 2011). Dentre os produtos analisados, quase um terço foram considerados

falsos, sendo que 48,6% não continham nenhum ingrediente ativo, 28,3% apresentavam ingredientes diferentes dos indicados nos rótulos e 16,1% declararam um fabricante inexistente.⁴⁹

2.1.4 Legislação brasileira

Os anabolizantes se enquadram na portaria 344/1998 da ANVISA na lista C5 – Lista de Substâncias Anabolizantes (sujeitas a controle especial em duas vias). Há quase 30 substâncias controladas por essa portaria (atualizada em 2012), além de seus sais, éteres, ésteres e isômeros.¹⁴

Em relação à comercialização, de acordo com a Lei nº 9965, de 27 de Abril de 2000, os anabolizantes devem ser comercializados somente com a apresentação da cópia da receita emitida por um médico ou dentista registrados, como citado a seguir:

Art. 1º A dispensação ou a venda de medicamentos do grupo terapêutico dos esteroides ou peptídeos anabolizantes para uso humano estarão restritas à apresentação e retenção, pela farmácia ou drogaria, da cópia carbonada de receita emitida por médico ou dentista devidamente registrados nos respectivos conselhos profissionais.¹⁶

A receita também deve conter os dados do profissional e do paciente, além do Código Internacional de Doenças (CID), e deve permanecer retida no estabelecimento farmacêutico por 5 anos. O não cumprimento dessa Lei é considerado infração sanitária, estando o infrator sujeito a penalidades. Entretanto, nos últimos anos, diversos casos de venda ilegal de anabolizantes têm chamado a atenção dos órgãos competentes em todo o Brasil, pois grande parte desses produtos apreendidos são fabricados clandestinamente, o que é considerado crime no país, já que só podem ser comercializados produtos que possuem registro da ANVISA. De acordo com o Decreto de Lei nº 2848, de 7 de dezembro de 1940, falsificar produtos destinados a fins terapêuticos ou medicinais, e a importação ou venda de tais produtos, leva a pena de reclusão, de 10 a 15 anos, além de multa.

2.1.5 Métodos analíticos empregados em análises de anabolizantes

Dentre os estudos desenvolvidos para análise de anabolizantes, a grande maioria é voltada para matrizes biológicas, como por exemplo, detecção das substâncias em sangue e urina, sendo, portanto, um pouco restrita a publicação de artigos envolvendo a análise de anabolizantes em suas formas farmacêuticas.^{50,51} Porém, tais estudos revelam diferentes técnicas utilizadas para as análises, como cromatografia líquida acoplada a diferentes detectores,^{18,52} cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas,^{46,53} espectrometria de massas de alta resolução com ionização por análise direta em tempo real (DART-MS),⁵⁴ assim como a utilização das espectroscopias no infravermelho próximo e Raman em um mesmo conjunto de amostras.⁵⁵ A seguir são apresentados detalhes desses métodos.

KOZLIK *et al.* aplicaram a cromatografia líquida com detector de arranjo de diodos (HPLC-DAD) para desenvolver e validar um método a fim de determinar e quantificar quatro sais de testosterona em amostras oleosas injetáveis. O método foi aplicado com sucesso na análise de amostras comerciais de testosterona de diferentes fontes, revelando que uma das amostras continha quantidade inferior dos ésteres em relação à quantidade declarada pelos fornecedores, enquanto outra amostra continha uma quantidade superior dos sais.⁵²

CHO *et al.* também desenvolveram e validaram um método para determinação de 26 anabolizantes, porém aplicando a cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a espectrometria de massas sequencial (UHPLC-MS/MS). O método foi aplicado para 19 medicamentos falsificados obtidos no mercado coreano, mostrando que cerca de 50% deles estavam adulterados.¹⁸

NEVES *et al.* utilizaram GC-MS para a determinação quantitativa de anabolizantes em produtos farmacêuticos apreendidos pela Polícia Federal brasileira. O método foi validado e 345 amostras foram analisadas, sendo 328 medicamentos e 17 suplementos dietéticos. Cerca de 42% dos medicamentos eram falsificados, e 5 suplementos continham esteroides anabolizantes não declarados.⁵³ Outro trabalho da mesma autora, também em parceria com a

Polícia Federal brasileira, teve como objetivo propor um método para discriminar ampolas originais e falsas de Durateston®, utilizando Espectroscopia no Infravermelho (FTIR), combinada com métodos quimiométricos. Após as análises das 96 amostras (49 originais e 47 falsificadas), foi aplicada a PCA nos espectros a fim de detectar diferentes grupos, correspondentes às amostras originais e diferentes tipos de falsificação. Posteriormente, tais grupos foram discriminados pela análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA), na qual o modelo apresentou 100% de taxas de eficiência, sensibilidade e especificidade.⁵⁶

PROKUDINA *et al.* empregaram DART-MS para determinação qualitativa de anabolizantes em suplementos e produtos farmacêuticos. Os autores verificaram que os anabolizantes podem ser analisados diretamente sem tratamento de amostra ou com tratamento mínimo (extração em metanol).⁵⁴

REBIERE *et al.* utilizaram a espectroscopia de infravermelho próximo para avaliar a homogeneidade de amostras de anabolizantes, na forma de comprimidos, com base em sua composição global. Em seguida, a espectroscopia Raman de imagens juntamente com o método quimiométrico MCR-ALS (Resolução Multivariada de Curvas com Mínimos Quadrados Alternados) forneceram imagens da distribuição espacial do princípio ativo e dos excipientes nos comprimidos, além da identificação dos perfis espectrais dos componentes puros. Com a combinação de tais técnicas foi possível discriminar 4 formulações diferentes em amostras semelhantes, sendo que em algumas estavam presentes dois princípios ativos enquanto em outras nenhum princípio ativo foi identificado.⁵⁵

2.2 Espectrometria de massas

A espectrometria de massas é uma técnica analítica que possui características como altas seletividade e sensibilidade, e encontra aplicações em diversas áreas da química e bioquímica, como controle de alimentos, análises forenses, monitoramento de processos e diagnósticos clínicos. A

espectrometria de massas é frequentemente empregada juntamente com outras técnicas, como cromatografia líquida e cromatografia gasosa, ou de forma autônoma por injeção direta das amostras.^{57,58}

Esta técnica consiste na ionização de átomos ou moléculas, seguida da separação dos mesmos de acordo com suas razões massa-carga (m/z) e, então, detecção e processamento dos sinais. Assim, um espectrômetro de massas é composto basicamente por quatro componentes (Figura 4), sendo o primeiro deles uma fonte de ionização, responsável por conferir carga aos analitos, podendo a formação dos íons ocorrer a partir da aplicação de uma alta energia, como por exemplo na ionização por impacto de elétrons, ou através de reações ácido/base. Os íons gerados são posteriormente acelerados por campos elétricos e magnéticos até chegarem aos analisadores, responsáveis por separá-los de acordo com suas diferentes razões m/z e/ou pelas fragmentações dos analitos de interesse. Por fim, os íons são enviados ao detector, responsável por medir a sua abundância por meio da conversão em sinais elétricos. Esses sinais são, então, processados por um sistema de aquisição de dados, fornecendo os espectros de massas.⁵⁷



Figura 4. Desenho esquemático de um espectrômetro de massas.

2.2.1 Analisadores

Dentre os diversos tipos de analisadores existentes, podem ser destacados os analisadores quadrupolos, por aprisionamento de íons (*Ion Trap*) e por tempo de voo (*time of flight – TOF*).⁵⁷

O analisador quadrupolo utiliza a estabilidade da trajetória em campos elétricos oscilantes para separar os íons de acordo com suas razões m/z . O dispositivo é formado por quatro barras (eletrodos) paralelas na direção dos

feixes dos íons. A essas barras são aplicadas uma voltagem de corrente contínua e uma radiofrequência, o que gera um campo eletrostático oscilante, permitindo que os íons sejam seletivamente estabilizados ou desestabilizados de acordo com a razão m/z . Dessa forma íons de diferentes valores m/z chegam ao detector, podendo por fim, serem diferenciados.⁵⁷

O analisador do tipo *Ion Trap* possui um princípio similar ao quadrupolo, porém ao invés dos íons descreverem uma trajetória através do ambiente quadrupolar, eles são aprisionados nele. Os íons, após adentrarem no dispositivo, adquirem movimentos de precessão que são sucessivamente cessados, ocorrendo, posteriormente, a detecção de acordo com suas razões m/z . Esse dispositivo é amplamente utilizado devido às suas vantagens, tais como alta sensibilidade, devido à capacidade de pré-concentrar os íons antes de serem enviados ao detector, e sua capacidade de identificar e quantificar componentes de alto e baixo peso molecular, até mesmo em misturas complexas.⁵⁷

2.2.2 Métodos de ionização

Existem diversos tipos de fontes de ionização, como a ionização por “impacto eletrônico” (*electron ionization* - EI) e a ionização química (*chemical ionization* - CI), que são métodos clássicos realizados sob alto vácuo e que requerem a utilização de elevadas energias de ionização e temperaturas, inviabilizando a análise de alguns analitos, como, por exemplo, biomoléculas de elevada massa molecular. Mais recentemente foram desenvolvidos métodos de ionização capazes de produzir íons à pressão atmosférica, possibilitando análises diretas e em tempo real de moléculas maiores e não voláteis, como a ionização por *electrospray* (ESI) e suas variantes, podendo ser destacadas a ionização por dessorção *electrospray* (DESI), análise direta em tempo real (DART) e a ionização por *paper spray* (PS-MS).^{20,57}

A ionização por *electrospray* (ESI) (Figura 5) proposta por John Fenn *et al.* em 1989, permite que íons em fase gasosa sejam gerados provenientes de espécies em soluções aquosas. Nessa técnica uma solução contendo a

amostra é borrifada na ponta de um tubo capilar, que sofre a ação de um potencial elétrico, para dentro de uma câmara aquecida, resultando na formação de gotas carregadas. Com a evaporação do solvente, há uma diminuição do tamanho dessas gotas, causando um aumento da repulsão eletrostática entre as cargas das suas superfícies, até a ocorrência do fenômeno de “explosão coulômbica” que favorece a liberação dos íons, formando-se, assim, um fino *spray* de partículas carregadas.⁵⁹

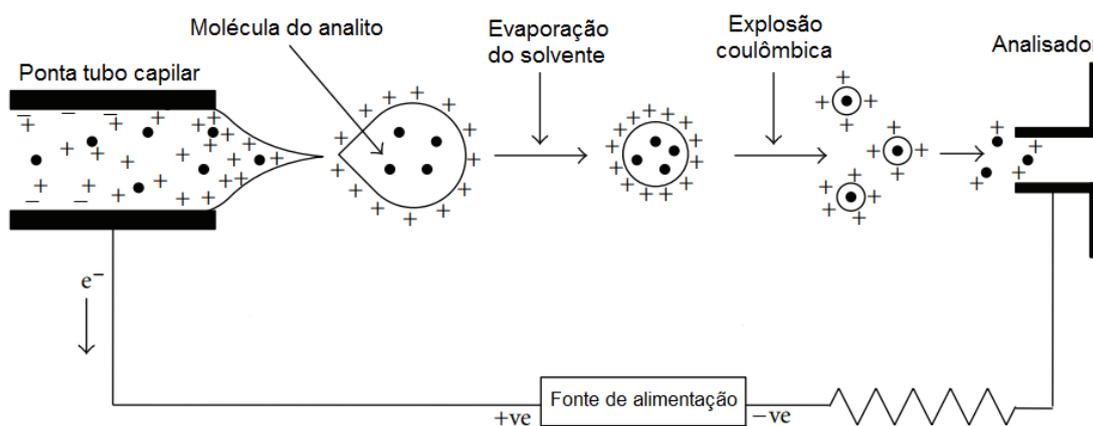


Figura 5. Representação esquemática da ionização *electrospray* (ESI).
(Adaptado de BARNEJEE, MAZUMDAR, 2011)⁶⁰

2.2.3 Ionização por *paper spray* (PS-MS)

A ionização por *paper spray* foi descrita por Cooks *et al.* em 2010 e desde então tem recebido bastante atenção devido às suas vantagens, tais como simplicidade, baixo custo, eficiência, rapidez, e baixo consumo de amostras e de solventes. Assim como a ESI e os demais métodos de ionização ambiente, essa técnica possibilita análises qualitativas e quantitativas de misturas complexas com o mínimo preparo de amostras.²⁰

Esta técnica consiste na aplicação de uma pequena quantidade de amostra (1-5 μL) a um substrato poroso, normalmente utilizando-se papel cromatográfico cortado na forma de um triângulo, o qual é posicionado na entrada do espectrômetro de massas. Em seguida, um pequeno volume de solvente (10-50 μL) é adicionado ao papel, e um potencial é aplicado na sua base a fim de se obter um fino *spray* de gotículas de solvente contendo os

analitos ionizados. A medida em que o solvente evapora ocorre a liberação dos íons dessolvatados que serão analisados pelo espectrômetro de massas.

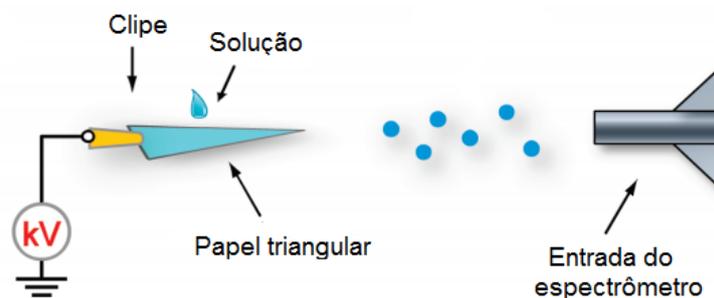


Figura 6. Desenho esquemático da montagem do sistema PS-MS.

(Adaptado de LIU *et al.*, 2011)⁶¹

A espectrometria de massas com ionização por *paper spray* tem sido amplamente utilizada nos últimos anos em análises de matrizes complexas. Na literatura são encontrados diversos estudos referentes a análises qualitativas e quantitativas de substâncias em matrizes biológicas,^{62,63} discriminação de microorganismos,⁶⁴ análise em alimentos,⁶⁵⁻⁶⁷ monitoramento de reações,⁶⁸ e diversas aplicações forenses, tais como em documentoscopia,²¹ falsificação de bebidas,^{22,23} análise de substâncias proibidas em cosméticos⁶⁹ e drogas ilícitas.^{24,25} Após o trabalho de DENG e YANG, teve início também a utilização da técnica PS-MS na obtenção de *fingerprints*, sendo possível sua utilização para identificação e diferenciação de amostras.⁷⁰

FEDICK *et al.* descreveram o uso de um substrato de papel, cuja superfície foi impressa a jato de tinta com nanopartículas de prata, utilizando as técnicas espectroscopia Raman amplificada por superfície (SERS) e espectrometria de massas com ionização por *paper spray*, para análises forenses. O objetivo do trabalho foi desenvolver um método mais rápido e simples, com o mínimo preparo de amostra, diminuindo o tempo gasto nas análises, o que é crucial em laboratórios forenses.⁷¹

WANG *et al.* aplicaram a PS-MS em análises diretas de compostos como hormônios, lipídios e drogas terapêuticas em tecidos biológicos utilizando um mínimo pré-tratamento das amostras. Na detecção de hormônios foram

utilizadas amostras de tecido animal. Através dos espectros de massas os autores identificaram os hormônios epinefrina (adrenalina) e norepinefrina (noradrenalina), cujas presenças foram posteriormente confirmadas. As demais análises também foram satisfatórias, sendo possível a identificação dos compostos de maneira rápida e eficiente.⁶³

TAVERNA *et al.* desenvolveram uma metodologia aplicando a PS-MS juntamente com técnicas quimiométricas, como a Análise Discriminante Linear (LDA, *Linear Discriminant Analysis*) e Modelos Independentes de Similaridade utilizando Componentes Principais (SIMCA) para a discriminação de óleo essencial de bergamota de outros 5 óleos similares. A análise foi realizada diluindo os óleos em etanol, adicionando uma solução de padrão interno e posteriormente depositando a solução no substrato de papel, que foi deixado ao ar livre para secagem antes de ser colocado na entrada do equipamento. Os modelos quimiométricos apresentaram bons resultados, dado que foram desenvolvidos um modelo para discriminação entre o óleo de bergamota e os demais óleos, e outro referente à mistura entre os óleos, propondo casos de adulteração. Ambos os modelos classificaram corretamente quase todas as amostras.⁷²

2.3 Quimiometria

Com o avanço das técnicas instrumentais e dos microcomputadores no início da década de 1970, tornaram-se necessários tratamentos de dados mais complexos do ponto de vista estatístico, pois novos equipamentos possibilitavam a obtenção rápida de respostas multivariadas a partir de medidas analíticas simples. Portanto, com o interesse de extrair maiores informações dos dados, ferramentas que já eram utilizadas em outras áreas da ciência passaram a ser utilizadas na química, o que deu origem à quimiometria.⁷³

A quimiometria é definida como uma disciplina da química que utiliza métodos matemáticos e estatísticos para planejar e selecionar condições

ótimas de um experimento e permitir a extração do máximo de informações a partir da análise de dados químicos.⁷³

Dentre os métodos utilizados para esse fim, podem ser destacados os de classificação não supervisionada, como a análise de componentes principais (PCA) e a análise hierárquica de agrupamentos (HCA), os métodos de classificação supervisionados, como a análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA) e o SIMCA, métodos de calibração multivariada como o PLS e o PCR, assim como os métodos de resolução de curvas, tais como a Resolução de Curvas Multivariada (MCR, *Multivariate Curve Resolution*) e a Análise de Fatores Paralelos (PARAFAC, *Parallel Factor Analysis*).

2.3.1 Análise de componentes principais (PCA)

A análise dos componentes principais (PCA) é classificada como um método exploratório, não supervisionado, isto é, apenas a natureza dos dados químicos é utilizada para se obter informações sobre o comportamento das amostras. Este método é utilizado para extrair informações projetando os dados em um espaço menor, reduzindo, assim, a dimensionalidade do espaço original do conjunto de dados sem afetar as relações entre as amostras e preservando a maior parte da variância.⁷⁴

Esse espaço de dimensões reduzidas possui novas variáveis, denominadas componentes principais (PC), obtidas a partir de combinações lineares das variáveis originais. Essas componentes descrevem as tendências relativas dos dados analíticos e são calculadas em ordem decrescente de importância. A primeira componente (PC1) é traçada no sentido de maior variância dos dados, descrevendo a maior quantidade de informação original (Figura 7). A segunda componente, PC2, por sua vez, tem a direção de máxima variância dos dados no subespaço ortogonal à PC1, descrevendo informação residual, ou seja, que não foi explicada pela primeira componente. E da mesma forma, as demais componentes são sempre direcionadas no sentido de maior variância, ortogonalmente às anteriores. A seleção do número

de componentes principais necessárias para descrever adequadamente o modelo se dá a partir do pseudoposto do conjunto de dados.⁷⁴

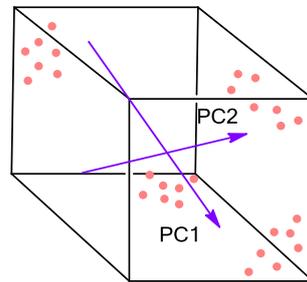


Figura 7. Representação de amostras simuladas num espaço hiperamostral e indicação das duas primeiras componentes principais.

A PCA é matematicamente descrita como:

$$X = TP^t + E \quad \text{Equação 1}$$

Ou seja, a matriz de dados originais (X) é decomposta em uma matriz de escores (T), que são as projeções das amostras no novo espaço das componentes principais, e uma matriz de pesos/loadings (P), determinados pelo cosseno dos ângulos formados entre as variáveis originais e as novas componentes principais. O símbolo t sobrescrito indica uma matriz transposta. A matriz E é composta pelos resíduos que não foram explicados em nenhuma das PC selecionadas.⁷⁴ Essa decomposição é representada pela Figura 8.

O diagrama ilustra a decomposição da matriz de dados X . No topo, a equação $X =$ é seguida por uma soma de produtos de matrizes. Cada termo da soma é representado por um retângulo com uma borda azul vertical e uma borda verde horizontal. O primeiro termo tem 'Pesos' escrito em verde acima e 'Escores' em azul abaixo. O segundo termo tem 'Componente principal' escrito em azul abaixo. Há um reticendo (...) entre os termos. Abaixo, a equação é reescrita como $X =$ seguido por uma matriz T (retângulo com borda azul vertical), uma matriz P^T (retângulo com borda verde horizontal) e uma matriz E (retângulo branco).

Figura 8. Representação da decomposição da matriz de dados X de acordo com a PCA.

A partir das informações contidas no novo espaço, é possível projetar os dados das amostras em um gráfico dos escores das componentes principais, permitindo observar a possível presença de agrupamentos naturais entre as amostras. E a interpretação de como as variáveis influenciam nessa discriminação se dá pela análise dos pesos (*loadings*), sendo possível identificar os fenômenos ou características responsáveis pelo agrupamento dos dados.⁷⁴

Os dados podem ser pré-processados a fim de reduzir variações indesejáveis que não contribuem para o modelo e podem influenciar nos resultados finais. Há dois tipos de pré-processamentos, os que são aplicados às amostras, com a finalidade de reduzir o ruído experimental e variações sistemáticas, por exemplo, e os que são aplicados às variáveis, podendo ser destacados a centragem dos dados na média e o autoescalamento. A centragem dos dados na média consiste em calcular a média de cada coluna da matriz e, posteriormente, subtrair tais valores de cada elemento das respectivas colunas, o que resulta em uma translação de eixos para seus valores médios, preservando a estrutura dos dados. O autoescalamento é iniciado da mesma forma que a centragem na média, porém, após os valores serem subtraídos das colunas, o resultado é dividido pelo desvio padrão dessa coluna. Dados compostos por escalares discretas são normalmente autoescalados, enquanto dados espectrais são apenas centrados na média, já que o autoescalamento torna os dados adimensionais.⁷⁴

2.3.2 Análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA)

A análise discriminante por mínimos quadrados parciais é um método de classificação supervisionado, isto é, as informações referentes à atribuição das amostras para as classes pré-determinadas são utilizadas na construção do modelo.⁷⁵

No PLS-DA, há uma matriz \mathbf{X} que contém as variáveis independentes, ou seja, os dados espectrais, e um vetor \mathbf{y} (ou matriz \mathbf{Y}), que contém as variáveis categóricas (*dummy variables*), as quais definem se uma amostra pertence ou

não a determinada classe, de modo que seja designado valor 1 para as amostras pertencentes à classe específica, e valor 0 para as amostras não pertencentes a ela.⁷⁵ O modelo está representado na Figura 9.

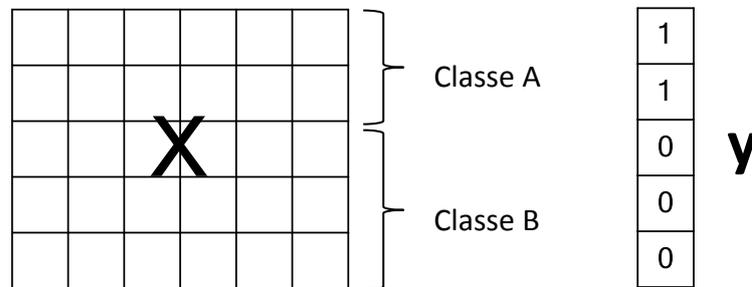


Figura 9. Representação do modelo PLS-DA.

O modelo PLS-DA pode ser matematicamente descrito a partir das equações abaixo:

$$X = TL^t + E \quad \text{Equação 2}$$

$$y = Tq^t + f \quad \text{Equação 3}$$

Em que **X** é a matriz dos dados instrumentais, **y** é o vetor que contém as variáveis categóricas, **T** é a matriz de escores, **L** e **q** contêm os pesos de **X** e **Y**, respectivamente, e **E** e **f** são as matrizes de resíduos de **X** e **Y**, respectivamente.⁷⁴

Para a construção do modelo, as amostras são separadas em dois conjuntos, de treinamento e teste. O conjunto de treinamento contém as amostras que serão usadas para construir o modelo, e o de teste contém as amostras que serão utilizadas para verificar seu desempenho de maneira independente. Assim, o modelo irá estimar um valor para **y**, podendo ou (na maioria das vezes) não ser exatamente igual a 0 ou 1. Um limite de decisão (*threshold*) precisa ser definido, podendo arbitrariamente ser fixado em um valor (como em 0,5, por exemplo) ou, mais frequentemente, ser estimado pela teoria Bayesiana. Valores de **y** acima desse limite indicam que a amostra pertence à respectiva classe, e valores abaixo do limite indicam que a amostra não pertence à classe.^{74,75}

Outro fator que diferencia a decomposição dos dados no método PLS-DA em relação à PCA é que os pesos da matriz \mathbf{X} não são ortogonais, o que possibilita a máxima variância entre os escores de \mathbf{X} e \mathbf{y} . Ou seja, a decomposição dos dados busca simultaneamente explicar a maior parte da variância em \mathbf{X} e \mathbf{y} . Portanto, as componentes estimadas são definidas como variáveis latentes, as quais não estarão necessariamente nas direções de máxima variância de \mathbf{X} .⁷⁵

Uma etapa importante do modelo PLS-DA é a validação cruzada. Nela, uma parte das amostras (ou apenas uma) é retirada do conjunto de calibração e o modelo é construído com as restantes. Em seguida, os erros de previsão para as amostras que foram separadas são estimados. O mesmo processo é realizado até que todas as amostras tenham ficado de fora. Essa etapa é realizada para a escolha do número de variáveis latentes do modelo.⁷⁴

Uma ferramenta utilizada para interpretação espectral em modelos PLS e PLS-DA são os vetores informativos de Importância das Variáveis na Projeção dos Escores (*Variable importance on projection – VIP scores*), pois tais vetores estimam a importância de cada variável na construção do modelo.⁷⁶ Os VIP scores de uma variável j podem ser calculados por:

$$VIP_j = \sqrt{J \frac{\sum_{k=1}^h v_k (w_{jk})^2}{\sum_{k=1}^h v_k}} \quad \text{Equação 4}$$

Onde J é o número de variáveis do conjunto, h é o número de variáveis latentes do modelo, \mathbf{w} é o vetor fator-peso (weight) entre o vetor coluna de \mathbf{X} e o vetor \mathbf{y} , e v_k representa a variância de \mathbf{X} .⁷⁶

2.3.3 Seleção dos preditores ordenados (OPS)

Os métodos de seleção de variáveis são utilizados com o intuito de melhorar a capacidade de previsão dos modelos e simplificar sua interpretação em métodos supervisionados, pois essa estratégia ajuda a identificar um subconjunto de variáveis que torna o modelo mais exato e robusto.

O método de seleção de preditores ordenados (Ordered predictors selection - OPS), desenvolvido por TEÓFILO *et al.*, em 2009, automatiza a seleção de variáveis usando vetores que possuem informações sobre os preditores mais importantes na matriz original.⁷⁷ Uma das vantagens desse método é a capacidade de analisar dados de qualquer natureza, sendo as variáveis contínuas ou discretas.

De modo geral, o objetivo do método é obter um vetor (vetor informativo, tais como VIP scores, vetores de regressão, NAS (vetor do sinal analítico líquido), LOA (vetor de pesos), SqREs (vetor dos resíduos), Stn (vetor da razão sinal-ruído)), ou combinações desses vetores, que contêm as informações da localização das melhores variáveis independentes para a predição (Figura 10A). Esses vetores são obtidos através dos cálculos efetuados com as variáveis dependentes e independentes, apenas com as independentes ou a partir da combinação de diferentes vetores obtidos com a mesma finalidade. Na segunda etapa, as variáveis originais são diferenciadas de acordo com os valores fornecidos pelo vetor informativo (Figura 10B). Quanto maior o valor absoluto, maior a importância da variável. Assim, na etapa seguinte (Figura 10C), as variáveis originais são ordenadas em ordem decrescente de importância. E por fim (Figura 10D), são construídos modelos PLS-DA que são avaliados através de validação cruzada. Um conjunto de variáveis (janela) é selecionado, e a ele é acrescido um incremento fixo de variáveis. Esse processo é realizado de forma sucessiva, até que todas ou uma porcentagem das variáveis sejam analisadas. Assim, os conjuntos de variáveis são avaliados, e aqueles que apresentarem os melhores parâmetros de qualidade, como menores valores de erro da validação cruzada (*Root Mean Square Error of Cross Validation* - RMSECV) e maior correlação entre os valores de y de referência e previstos (R_{cv}), serão as variáveis selecionadas.⁷⁷

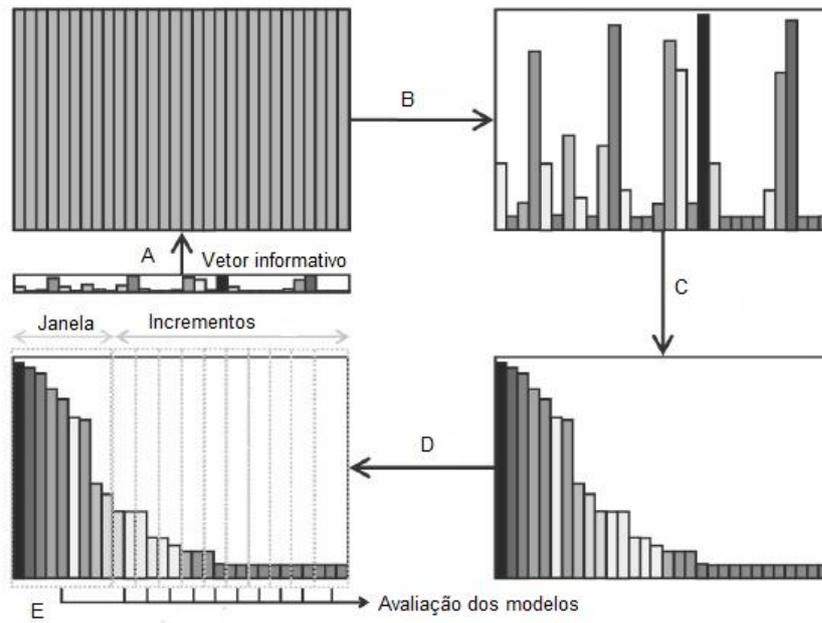


Figura 10. Representação do método de seleção de variáveis usando OPS.
 (Adaptado de TEÓFILO *et al.*)⁷⁷

3. METODOLOGIA

3.1 Amostras

Um total de 75 anabolizantes, nas formas de comprimido, óleo e suspensão (sendo as duas últimas injetáveis), foram selecionados para este trabalho oriundos de apreensões realizadas pela Polícia Civil de Minas Gerais e pelas Polícias Federais de Minas Gerais e Brasília. As informações sobre as amostras estão apresentadas na Tabela 3. Na Figura 11 estão apresentadas fotografias de alguns dos frascos das amostras analisadas.

Tabela 3. Informações sobre as amostras de anabolizantes utilizadas nesse trabalho.

Nome comercial	Princípio ativo no rótulo	Forma física	Número de amostras
Parabolan	Acetato de trembolona	Óleo	3
Trembolone Acetato	Acetato de trembolona	Óleo	5
Testoland Depot	Cipionato de testosterona	Óleo	2
Testex	Cipionato de testosterona	Óleo	1
Decaland Depot	Decanoato de nandrolona	Óleo	10
Deca Durabolin XT	Decanoato de nandrolona	Óleo	1
Nandrolone Decanoate	Decanoato de nandrolona	Óleo	1
Enantest	Enantato de testosterona	Óleo	2
Testenat Depot	Enantato de testosterona	Óleo	4
Testoviron	Propionato de testosterona	Óleo	2
Testosterone Propionato	Propionato de testosterona	Óleo	4
Boldebol	Undecilenato de boldenona	Óleo	3
Maxigan	Undecilenato de boldenona	Óleo	1
Testosterone	Testosterona	Suspensão	6
Stanozolol	Estanozolol	Suspensão	5

Stanozoland Depot	Estanozolol	Suspensão	6
Stanozoland	Estanozolol	Comprimido	5
Stan test	Testosterona e estanozolol	Suspensão	1
Metandrostenolona	Metandrostenolona	Comprimido	4
Oxitoland	Oximetolona	Comprimido	4
Anavar	Oxandrolona	Comprimido	3
Oxandroland	Oxandrolona	Comprimido	2



Figura 11. Frascos de alguns anabolizantes apreendidos utilizados nesse trabalho.

3.2 Reagentes, materiais e instrumentação

Foi utilizado metanol grau HPLC, adquirido da J.T. Backer (Center Valley, Pensilvânia, EUA), como solvente para as análises no PS-MS. Como substrato para aplicação das amostras na fonte de ionização foi utilizado papel cromatográfico número 1 da Whatman (Little Chalfont, Buckinghamshire, Reino Unido), cortado na forma de triângulos equiláteros com dimensões de 1,5 cm utilizando uma tesoura convencional previamente higienizada com uma solução metanol/água 50:50.

As medidas foram realizadas em um espectrômetro de massas Thermo Fisher LQC-Fleet com analisador do tipo *Ion Trap* (San Jose, Califórnia, USA). A fonte de ionização *paper spray* foi construída utilizando um clipe metálico do tipo jacaré, mantido em um suporte universal, o qual permite movimentação manual nos planos x, y e z, ajustando o posicionamento do papel à entrada do espectrômetro (Figura 12).



Figura 12. Aparato instrumental utilizado para as análises: a) Espectrômetro de massas Thermo LQC-Fleet; b) Fonte de ionização *paper spray*.

As condições do espectrômetro de massas utilizadas para as análises foram: potencial do *paper spray* (modo positivo) +4,0 kV; potencial do capilar 27,0 V; potencial das lentes 95 V; temperatura do capilar 200°C; distância entre o papel e a entrada do espectrômetro 0,5 cm; faixa de massas 50 – 1000 m/z . As condições não foram otimizadas, porque com a utilização desses parâmetros foram obtidos espectros satisfatórios.

3.3 Preparo de amostras

As condições experimentais para o preparo de amostras foram definidas através de otimização. Dessa forma, as amostras na forma de óleo e suspensão foram diluídas em metanol grau HPLC na proporção 1:1000. Alíquotas de 20,0 μL dessa solução foram transferidas para o triângulo de papel. As amostras na forma de comprimido foram pulverizadas utilizando almofariz e pistilo, e uma massa de cerca de 3,0 mg foi pesada e diluída em 500,0 μL de metanol grau HPLC. Posteriormente as soluções foram centrifugadas e alíquotas de 20,0 μL do sobrenadante foram transferidas para o triângulo de papel. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

3.4 Processamento quimiométrico dos dados

3.4.1 Sólidos e suspensões

Os dados espectrais obtidos das amostras de sólidos e suspensões foram organizados em uma mesma matriz de 36 linhas e 951 colunas, na qual cada linha representa uma amostra e cada coluna a intensidade relativa da razão m/z . Os modelos foram construídos no *software* MATLAB, versão 7.9.0.529 (The MathWorks, Natick, MA, EUA) utilizando o pacote PLS Toolbox, versão 5.2.2 (Eigenvector Research, Manson, WA, EUA). Dessa forma, foi feita a análise de componentes principais (PCA) utilizando como único pré-processamento a centragem dos dados na média.

3.4.2 Óleos

Os dados obtidos das amostras oleosas foram organizados em uma matriz de 39 linhas e 951 colunas. Inicialmente foi construído um modelo PCA com todas as amostras utilizando a faixa total de razão m/z , sendo os dados centrados na média como pré-processamento. A fim de melhorar o modelo, foi utilizado o método de seleção de variáveis OPS (disponibilizado pelos Professores Reinaldo F. Teófilo (UFV) e Márcia M. C. Ferreira (UNICAMP)) para que as variáveis mais importantes fossem selecionadas. Para isso, foi construído um modelo supervisionado PLS-DA para cada classe de princípios ativos, em que além da matriz \mathbf{X} referente aos dados espectrais, foi utilizado também um vetor \mathbf{y} para cada classe, o qual continha valores 1 para a classe em questão e 0 para as demais, como ilustrado na Figura 13. Posteriormente, o método OPS foi aplicado nos dados. Para iniciação do método foram utilizados valores de tamanho de janela e incrementos 2 e 1, respectivamente. Todos os vetores informativos gerados pelo OPS foram testados para cada uma das classes, com o intuito de se obter um modelo com baixo valor de RMSECV, alto valor de R_{cv} e um menor número de variáveis selecionadas. Por fim, as variáveis selecionadas pelo método foram combinadas entre si e testadas para o novo modelo PCA. As variáveis que resultaram em uma melhor separação

das classes foram as escolhidas. O pré-processamento utilizado no novo modelo PCA também foi a centragem dos dados na média.

Matriz X	Vetores y		
Enantato testosterona	1	0	0
Propionato testosterona	0	1	0
Decanoato nandrolona	0	0	1
Decanoato nandrolona	0	0	1
Cipionato de testosterona	0	0	0
Enantato testosterona	1	0	0
Acetato de trembolona	0	0	0
Propionato testosterona	0	1	0

Figura 13. Representação das matrizes para a construção do modelo PLS-DA.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Estudos preliminares

O objetivo inicial deste trabalho era analisar as amostras de anabolizantes por Espectroscopia no Infravermelho (ATR-FTIR) e Espectrometria de Fluorescência de Raios-X (XRF). Posteriormente os dados seriam tratados quimiometricamente, construindo um modelo para cada técnica e fundindo-os, utilizando o método de fusão de dados, a fim de extrair informações a respeito da origem dessas amostras. Porém, como será mostrado a seguir, os espectros provenientes das análises no Infravermelho não mostraram informações relevantes. Além disso, a análise elementar para as amostras oleosas mostrou apenas a presença de alguns elementos, tais como brometo, os quais não seriam suficientes para discriminar as amostras. As análises também foram realizadas em um espectrômetro de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) com o objetivo de comparar os resultados obtidos e também analisar elementos que não seriam possíveis no XRF. Porém, por problemas técnicos no espectrômetro, apenas as análises no ICP-MS puderam ser finalizadas, e os resultados serão apresentados a seguir.

4.1.1 Espectroscopia no Infravermelho (ATR-FTIR)

Inicialmente, foram realizadas análises das amostras oleosas por Espectroscopia no Infravermelho médio com o intuito de se obter mais informações e testar a utilização desta técnica juntamente com métodos quimiométricos. As amostras nas formas de suspensão e comprimido já são usualmente analisadas por FT-IR na rotina dos laboratórios policiais, portanto não foram incluídas nessa etapa do trabalho. Assim, as amostras oleosas foram analisadas, sem nenhum pré-tratamento, utilizando um espectrofotômetro de Infravermelho com transformada de Fourier e acessório de reflectância total atenuada (Perkin Elmer, modelo Frontier Single Range). Os espectros das 39 amostras foram registrados entre 4000 e 550 cm^{-1} , com 16 varreduras.

A Figura 14 mostra os espectros MIR de todas as amostras. Pode-se notar que os espectros apresentam uma grande similaridade entre si, sendo difícil notar visualmente uma discriminação entre as amostras, mesmo estas contendo princípios ativos diferentes.

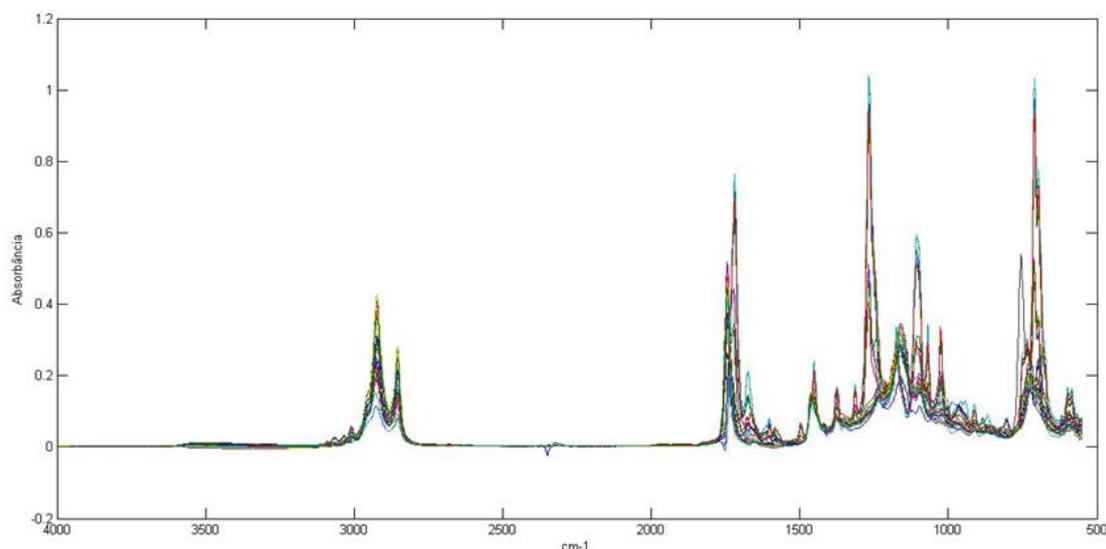


Figura 14. Espectros de FT-IR das amostras oleosas de anabolizantes.

Uma característica observada foi que parte dos espectros apresentaram uma grande semelhança com espectros de substâncias que são usualmente utilizadas como excipientes. Um exemplo é o espectro de uma amostra de decanoato de nandrolona comparado ao espectro do óleo de girassol, como ilustrado na Figura 15, na qual em (a) é mostrado o espectro do anabolizante e em (b) do óleo. A única banda que se difere com mais intensidade nos espectros está centrada 1679 cm^{-1} presente no espectro da amostra, característica de moléculas da classe 4-en-3-one,⁵⁶ como é o decanoato de nandrolona (17beta-hidroxi-estr-4-en-3-ona).

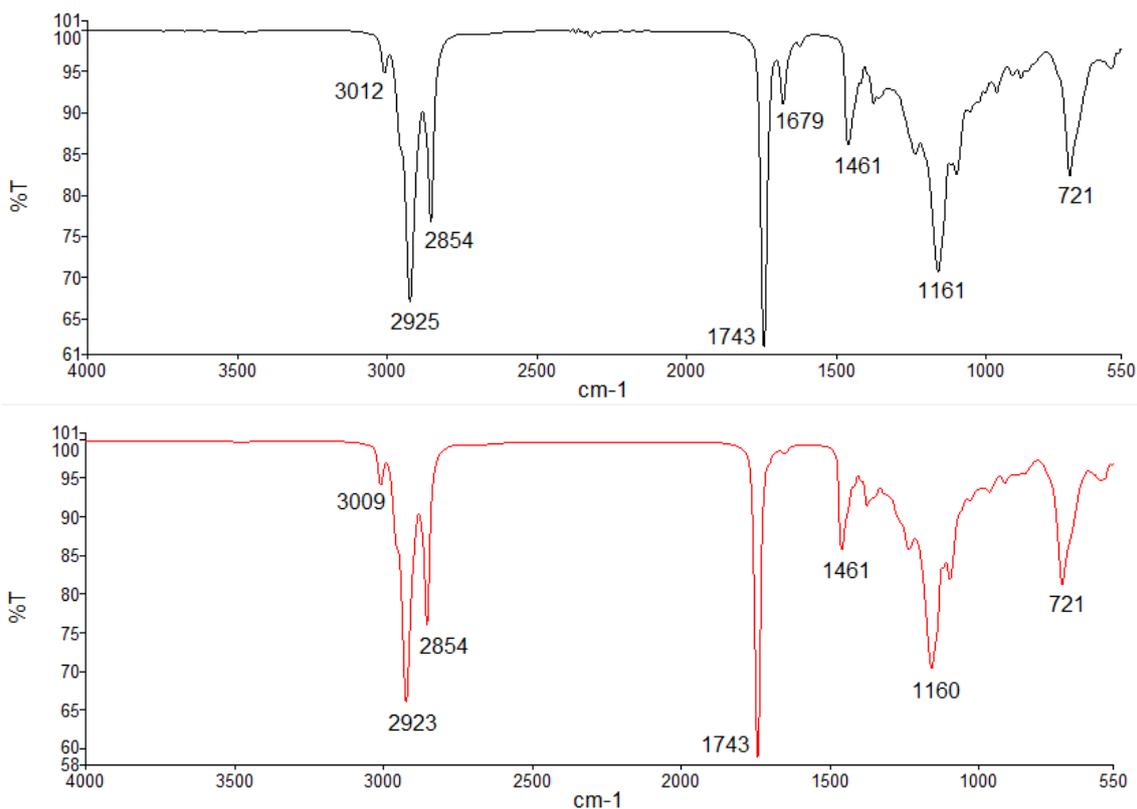


Figura 15. Espectros de FT-IR de (a) uma amostra de decanoato de nandrolona (b) óleo de girassol.

Foi construído um modelo PCA com os dados espectrais (Figura 16), em que a principal separação das classes se deu aparentemente pelos excipientes encontrados em maior quantidade nas amostras, devido à similaridade dos espectros, como discutido acima. Em que no lado positivo de PC1 (responsável por explicar 94,13% da variância) estão projetadas as amostras cujos espectros se assemelharam ao espectro do excipiente benzoato de benzila, e no lado negativo, as amostras cujos espectros se assemelharam aos espectros dos óleos vegetais utilizados comumente como excipientes.

Entretanto, devido à ausência de acesso a padrões dos princípios ativos (consequência de questões burocráticas) não foi possível extrair maiores informações dos espectros, assim como explorá-los utilizando outros modelos quimiométricos. Nessas condições, a FTIR não se mostrou adequada para a identificação das amostras de anabolizantes na forma de óleos.

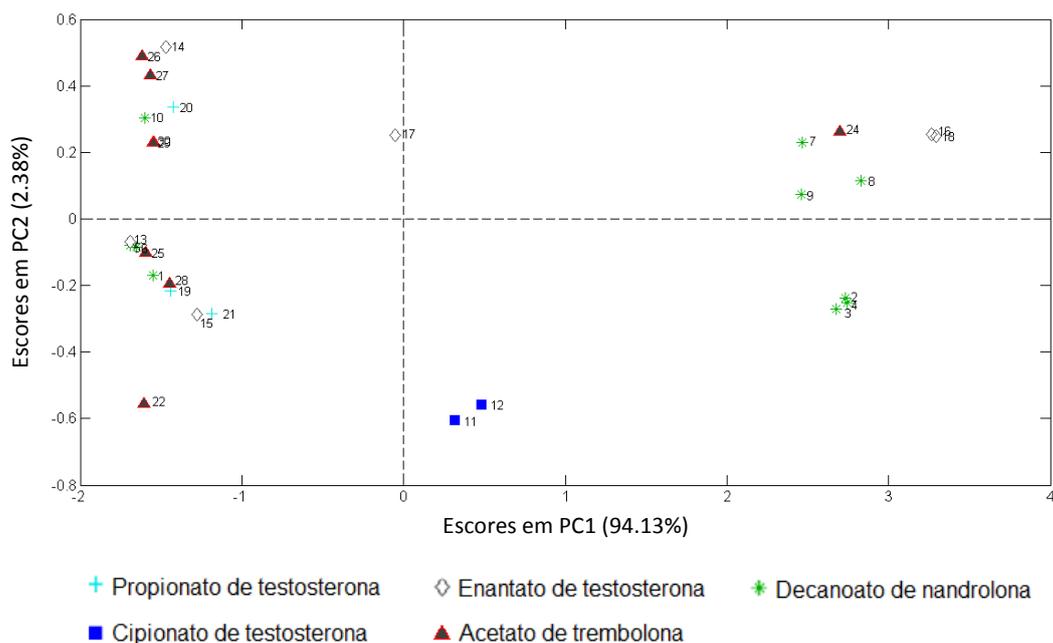


Figura 16. Gráfico de escores de PC1 x PC2 com os dados de FTIR.

4.1.2 Espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS)

A composição inorgânica dos anabolizantes nas formas de comprimido e suspensão foi determinada através da análise por ICP-MS. As amostras oleosas não foram analisadas por esta técnica, pois através de análises realizadas anteriormente por Fluorescência de raios X por reflexão total, constatou-se que quase nenhum elemento inorgânico era determinado. Assim, as 18 amostras sólidas foram pulverizadas utilizando almofariz e pistilo. Uma massa de cerca de 10,0 mg de amostra foi pesada e a ela acrescentados 200,0 µL de HNO₃ concentrado, para abertura da amostra. A solução foi colocada em banho-maria à 90°C por cerca de 10 minutos e, posteriormente, o volume foi completado com água deionizada até 2,0 mL. Para as amostras de suspensão, em que apenas 11 foram analisadas, 50,0 µL de amostra e 200,0 µL de HNO₃ foram colocados em banho-maria por 10 minutos, sendo o volume de 2,0 mL posteriormente completado com água deionizada. Todas as amostras foram centrifugadas por 5 minutos. As análises foram realizadas em um equipamento ICP-MS da Agilent Technologies série 7700 (Tóquio, Japão) que possui um

sistema de introdução de amostra fria, aumentando a estabilidade. Esse equipamento utiliza nebulizador MicroMist com câmara concêntrica PFA, gerador de frequência RF, cones de Ni e analisador quadrupolo. Para evitar interferências poliatômicas foi usado o gás He com fluxo de 4,7 mL/min. Para tratamento dos dados foi usado o *software* MassHunter Workstation (Agilent, Tóquio, Japão). As condições experimentais estão descritas na Tabela 4.

Tabela 4. Condições experimentais para as medidas no ICP-MS.

Potência do Plasma	1550 W
Velocidade bomba peristáltica	0,1 rps
Vazão gás nebulizador	1,09 L/min
Resolução	<1
Tempo de integração	0,3 s
Elementos	Li ⁷ , Na ²³ , Mg ²⁴ , Al ²⁷ , K ³⁹ , Ca ⁴³ , V ⁵¹ , Cr ⁵² , Mn ⁵⁵ , Fe ⁵⁶ , Co ⁵⁹ , Ni ⁶⁰ , Cu ⁶³ , Zn ⁶⁶ , As ⁷⁵ , Rb ⁸⁵ , Sr ⁸⁸ , Mo ⁹⁵ , Rh ¹⁰³ , Pd ¹⁰⁵ , Ag ¹⁰⁷ , Cd ¹¹¹ , In ¹¹⁵ , Sb ¹²¹ , Cs ¹³³ , Ba ¹³⁷ , Pt ¹⁹⁵ , Pb ²⁰⁴ , Tl ²⁰⁵ , Bi ²⁰⁹

As faixas de concentrações determinadas de analitos/comprimido analisado estão apresentadas na Tabela 5. Alguns elementos (Tl, Rh, Pt, Cs) apresentaram concentrações abaixo de seus respectivos limites de quantificação, e portanto, não foram quantificados.

A concentração dos analitos apresentou grande variação entre os comprimidos avaliados. Diversos compostos inorgânicos podem ser utilizados como excipientes em comprimidos, tais como carbonatos e óxidos de magnésio, óxidos de ferro, diversos sais de cálcio e compostos minerais, o que explica a elevada concentração de alguns elementos.⁷⁸

Entretanto, elementos tóxicos como chumbo e arsênio também apresentaram concentrações significativas em alguns comprimidos. Uma norma da Farmacopeia Americana (USP – *United States Pharmacopeia*) estabelece o limite de impurezas que podem estar presentes em medicamentos.⁷⁹ Portanto, de acordo com essa norma, o limite de concentração para o arsênio em medicamentos orais é de 1,5 µg/g,

considerando a dose máxima de 10 g do medicamento por dia ou seja, 15 µg/dia. O anabolizante no qual foi determinado 7,965 µg de As em um único comprimido continha o princípio ativo metandrostenolona. De acordo com informações de websites, a dose diária desse medicamento pode variar de 20 a 30 mg (de princípio ativo). Portanto, como o anabolizante contendo As tinha uma quantidade de 10 mg do princípio ativo, a dose diária poderia variar entre 2 e 3 comprimidos. Supondo que sejam consumidos 3 comprimidos, a quantidade de As ingerida em um dia é aproximadamente 23,89 µg, superior ao permitido pela USP.

Em relação ao limite de chumbo em medicamentos orais, a USP estabeleceu um limite de 0,5 µg/g (dose diária de 10 mg de medicamento). Nos anabolizantes analisados, um dos comprimidos, de oximetolona, apresentou uma quantidade de Pb igual a 3,661 µg. Considerando que a dose diária normalmente utilizada desse medicamento está na faixa de 25-150 mg, o anabolizante analisado poderia ser consumido até 3 vezes ao dia, o que levaria a uma quantidade de Pb ingerida de aproximadamente 10,98 µg/ dia, ou seja, o dobro da quantidade permitida. Desta forma, o consumo destes medicamentos podem acarretar problemas à saúde dos usuários.

Tabela 5. Faixa de concentrações (µg/comprimido) dos elementos em todos os comprimidos analisados.

Li	Na	Mg	Al
0,0126 – 0,0729	21,02 – 972,4	76,01 – 503,1	0,6571 – 277,3
K	Ca	V	Cr
8,935 – 36,33	22,54 – 3206	0,0009 – 0,4497	0,0096 – 5,264
Mn	Fe	Co	Ni
0,0283 – 0,6698	0,7086 – 31,30	>0,000 – 0,0116	>0,000 – 0,6775
Cu	Zn	As	Sr
>0,000 – 9,057	0,0527 – 0,5543	>0,000 – 7,965	0,1050 – 6,428
Mo	Pd	Ag	Cd
0,0040 – 0,0897	>0,000 – 0,0225	>0,000 – 0,0934	0,0006 – 0,0111
Sb	Ba	Pb	Bi
>0,000 – 0,1140	0,0538 – 2,593	0,0215 – 3,661	>0,000 – 0,0035

Para as amostras na forma de suspensão, as faixas das concentrações em µg de elemento por frasco estão apresentados na Tabela 6. Os elementos que apresentaram concentrações abaixo do limite de quantificação também não foram quantificados.

Tabela 6. Faixa de concentrações (µg/frasco) dos elementos nos frascos de suspensão analisados.

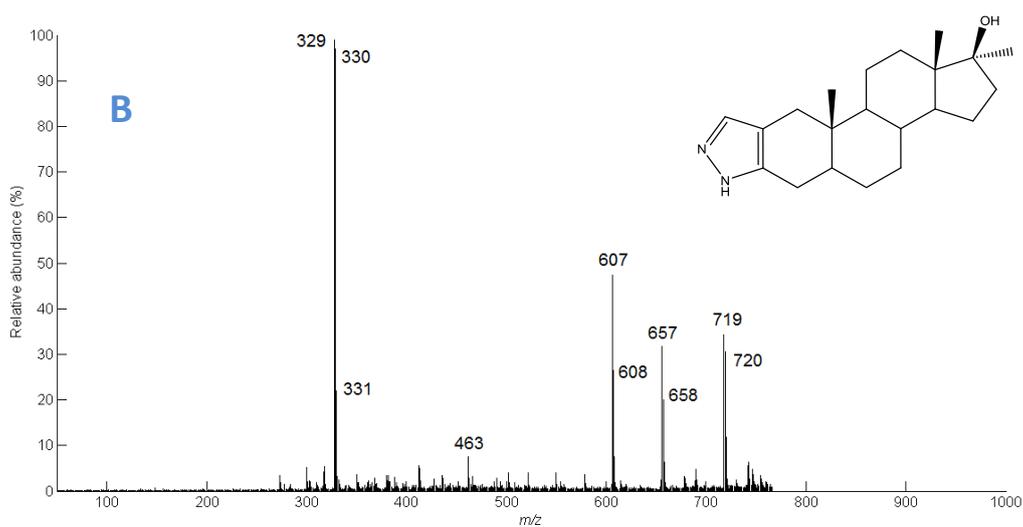
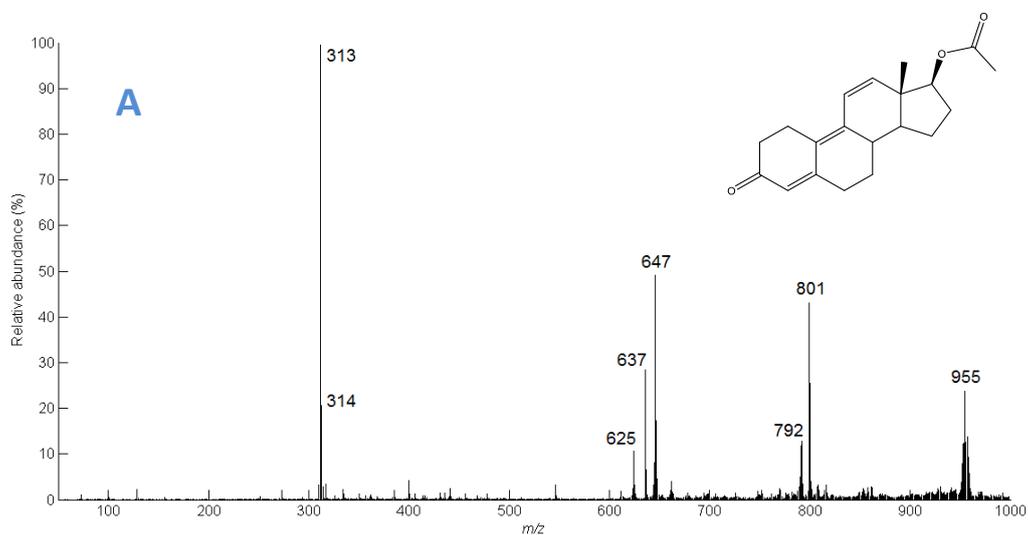
Li	Na	Mg	Al
0,3162 – 3,403	1665 – 8776	394,9 – 1944	7,346 – 78,90
K	Ca	V	Cr
148,5 – 1168	1419 – 8068	0,0139 – 0,1324	0,0598 – 2,756
Mn	Fe	Co	Ni
0,0235 – 1,499	>0,000 – 41,48	0,0212 – 0,1984	>0,000 – 5,419
Cu	Zn	As	Sr
>0,000 – 0,6958	0,5157 – 10,18	0,1810 – 1,4170	7,770 – 61,87
Mo	Pd	Cd	Ba
0,0121 – 0,2186	0,0165 – 0,0560	0,0258 – 0,4822	4,700 – 47,17
Pb	Ce		
0,0517 – 0,9317	0,0278 – 0,1194		

No caso das amostras líquidas, nenhum elemento apresentou concentração superior ao estabelecido pela USP. As amostras analisadas também apresentaram grande variação na composição. Sódio e Cálcio foram os analitos com concentrações mais altas.

4.2 Análises por PS-MS

Os espectros de massas foram obtidos após otimização das condições de análise, em que se constatou que no modo positivo a obtenção de íons era mais intensa, e os espectros, menos ruidosos. Portanto todos os espectros de massas foram obtidos no modo positivo, na faixa de 50 – 1000 *m/z*.

A Figura 17 apresenta os espectros de 3 amostras nas formas físicas óleo, suspensão e comprimido, respectivamente. A amostra de óleo continha o princípio ativo acetato de trembolona, a amostra de suspensão continha o estanozolol, e a amostra sólida continha metandrostenolona.



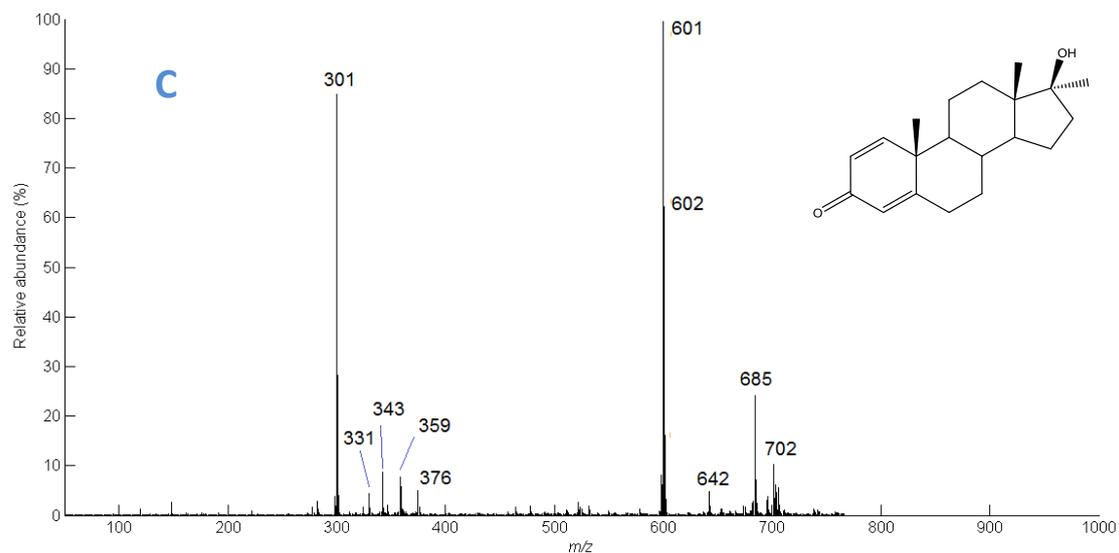


Figura 17. Espectros PS(+)-MS de amostras de anabolizantes apreendidos cujas formas físicas e princípios ativos são (a) oleosa, acetato de trembolona; (b) suspensão, estanozolol; (c) comprimido, metandrostenolona.

O primeiro espectro (Figura 17a) é referente ao anabolizante Trembolone acetate (marca RWR Latin America, especializada em produtos veterinários), cujo princípio ativo informado no rótulo é o acetato de trembolona. No espectro de massas é possível observar os sinais referentes ao acetato de trembolona, em m/z 313 $[M + H]^+$ e 314 (forma isotópica do C^{13}), assim como seu dímero em 625 $[2M + H]^+$, e o aduto desse dímero com íon Na^+ em m/z 647 $[2M + Na]^+$. O sinal em m/z 637 pode ser referente ao diacilglicerol (DAG) de fórmula molecular $C_{39}H_{74}O_5N$ na forma protonada. Os sinais em m/z 801 e 955 podem indicar a presença de triacilgliceróis (TAG) de fórmulas moleculares $C_{49}H_{94}O_6$ e $C_{57}H_{104}O_9$,^{80,81} respectivamente, nas formas $[TAG + Na]^+$.^{81,82}

O segundo espectro (Figura 17b) é referente à amostra Stanozolol (marca RWR), cujo princípio ativo indicado no rótulo é o estanozolol. No espectro é possível observar os sinais referentes ao estanozolol em m/z 329 $[M + H]^+$, assim como seu dímero em m/z 657 $[2M + H]^+$. O sinal em m/z 331 pode corresponder ao EDTA, utilizado como excipiente, na forma do aduto $[M + K]^+$ e o sinal em m/z 658 pode ser referente ao excipiente PEG $[M + Mg]^+$. Os demais sinais podem estar relacionados a contaminantes que são comumente encontrados como tensoativos e surfactantes, tais como polipropilenoglicol e triton, por exemplo.

Por fim, o terceiro espectro (Figura 17c) é referente à amostra Metandrostenolona, (marca Landerlan, Paraguai), cujo princípio ativo é metandrostenolona. Assim como nos espectros anteriores, é possível observar os sinais referentes ao princípio ativo e seu dímero, em m/z 301 $[M + H]^+$ e 601 $[2M + H]^+$. Os sinais entre a região de m/z 343 e 359 podem ser referentes aos excipientes comumente utilizados em comprimidos, tais como lactose e sacarose, assim como em m/z 702, referente a $[2M + NH_4]^+$, sendo M = lactose, sacarose. Outros sinais podem indicar a presença de excipientes, como em m/z 331 referente ao laurilsulfato de sódio $[M + Ca^{43}]^+$, m/z 642 referente ao amido, de fórmula molecular $(C_6H_{10}O_5)_7$, e em 376 correspondente ao PVP (polivinilpirrolidona) $[M + Ca^{43}]^+$.

Observando os espectros também foi possível identificar casos de adulteração de princípios ativos, em que nas amostras eram encontrados outros princípios ativos além dos especificados nos rótulos, ou até mesmo princípios ativos trocados. Um exemplo é apresentado no espectro da Figura 18, mostrando uma amostra rotulada como undecilenato de boldenona, cuja massa molecular é 452,7 mg/mol. Porém, pelo espectro pode-se notar que não há nenhum sinal nessa faixa de m/z ou algum sinal que poderia ser de uma molécula derivada dele. Entretanto, está presente o sinal em m/z 345, referente à molécula de propionato de testosterona. Também apareceram os sinais em m/z 689 e 711 referentes ao dímero do princípio ativo, e ao dímero com uma molécula de Na, respectivamente. Portanto, pode-se concluir que houve falsificação nessa amostra, e ao invés do princípio ativo undecilenato de boldenona, o que estava presente era o propionato de testosterona. Esse resultado pode ser confirmado pelo laudo da Polícia Federal (por GC-MS), em que se constatou apenas a presença do propionato de testosterona na amostra.

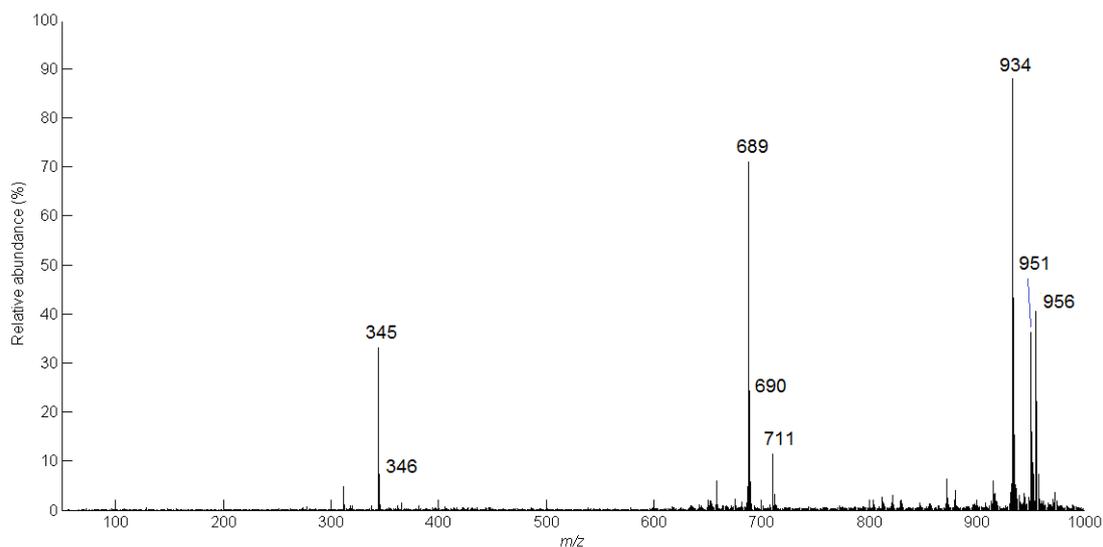


Figura 18. Espectro PS(+)-MS de uma amostra rotulada como undecilenato de boldenona.

Após as análises, constatou-se que todas as amostras rotuladas como undecilenato de boldenona, mesmo sendo de duas marcas diferentes (Boldebol e Maxigan) eram falsificadas, como exemplificado acima. Em todos esses casos o princípio ativo encontrado foi o propionato de testosterona. Além desses, houveram outros casos de adulteração de princípio ativo.

4.3 Modelos quimiométricos

4.3.1 Sólidos e suspensões

Os dados relativos aos espectros de massas para as amostras nas formas de comprimido e suspensão foram organizados em uma matriz de 36 linhas por 951 colunas para a análise por PCA. O modelo explicou 50,89% da variância dos dados utilizando-se 2 componentes principais. As demais componentes não continham informações relevantes para a separação dos agrupamentos e, portanto, foram desprezadas.

Foi verificado a possível presença de amostras anômalas através do gráfico de T^2 de Hotelling *versus* resíduos Q, com 95% de confiança. Como pode-se observar na Figura 19, não há nenhuma amostra no quadrante

superior direito, ou seja, que tenha simultaneamente altos resíduos e alta influência no modelo. Uma amostra com elevado resíduo é pouco modelada (variância não incluída no modelo) e pode ser excluída, enquanto uma amostra com alta influência tem muita contribuição para o modelo (variância incluída). Portanto, este foi considerado um bom modelo para uma análise exploratória dos dados.

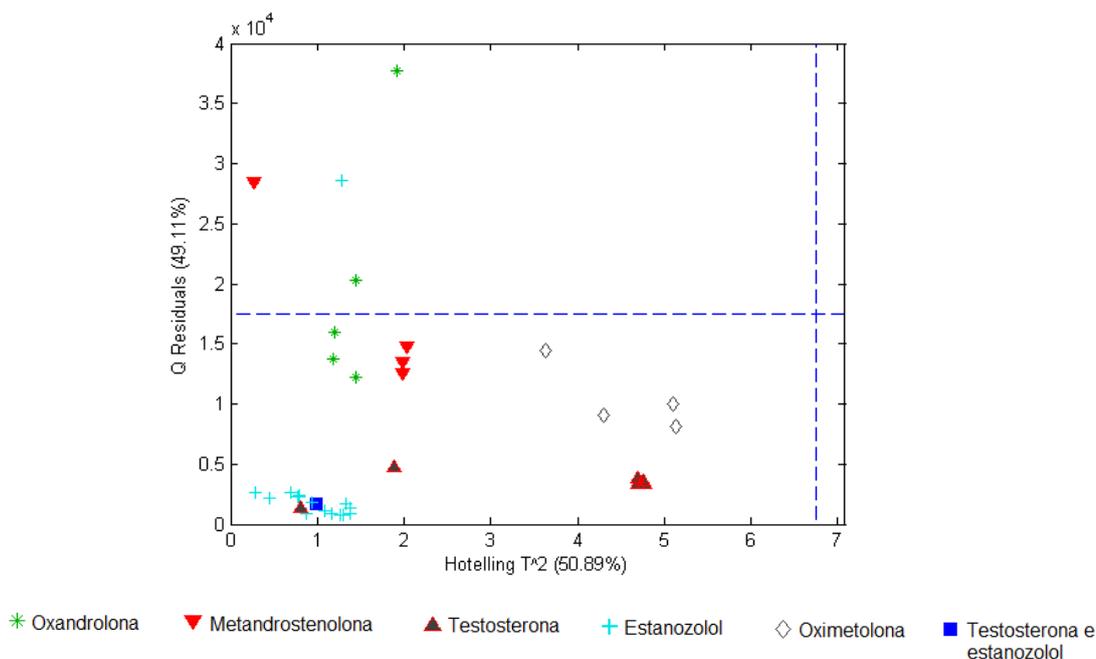


Figura 19. Gráfico de T^2 de Hotelling x resíduos Q para o modelo de sólidos e suspensões.

Com relação aos escores de PC1 *versus* PC2, através do gráfico da Figura 20 é possível observar que em PC1, responsável por 34,95% da variância, houve uma discriminação das amostras da classe estanozolol em oposição às demais classes. Vale ressaltar que o princípio ativo estanozolol está presente em amostras na forma de comprimido e também de suspensão. Já em PC2, que explicou 15,94% da variância, no lado negativo se formaram dois agrupamentos, um contendo as amostras da classe oximetolona e outro com as amostras da classe oxandrolona. No lado positivo da segunda componente, formaram-se os agrupamentos das classes metandrostenolona e testosterona.

É importante destacar que os ícones representados no gráfico estão de acordo com os princípios ativos indicados nos rótulos, portanto, a amostra 4, que contém os princípios ativos testosterona e estanozolol em sua formulação (confirmado pelos sinais característicos no espectro de massas), deve ter uma quantidade muito superior de estanozolol em comparação à testosterona, dado que a amostra ficou agrupada no lado positivo de PC1 juntamente com as amostras da classe estanozolol.

A amostra 25, cujo rótulo indicava a presença apenas de metandrostenolona, continha também estanozolol (evidenciado pelo sinal característico no espectro de massas). Portanto, ela também se agrupou juntamente com as demais amostras contendo estanozolol. O mesmo tipo de adulteração ocorreu com a amostra 36, em cujo rótulo constava apenas a presença de testosterona, porém, após as análises verificou-se também a presença de estanozolol, e dessa forma, a amostra foi projetada no gráfico entre os dois agrupamentos formados. Ambos os espectros estão apresentados na Figura 21.

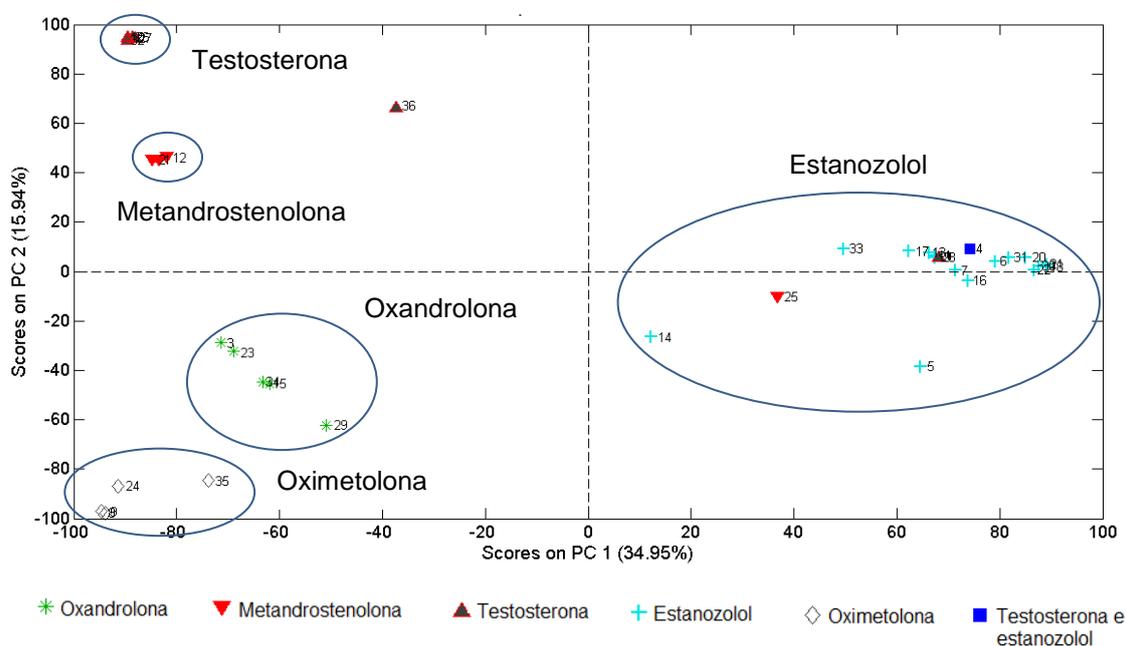


Figura 20. Gráfico de escores de PC1 x PC2, para o modelo de sólidos e suspensões.

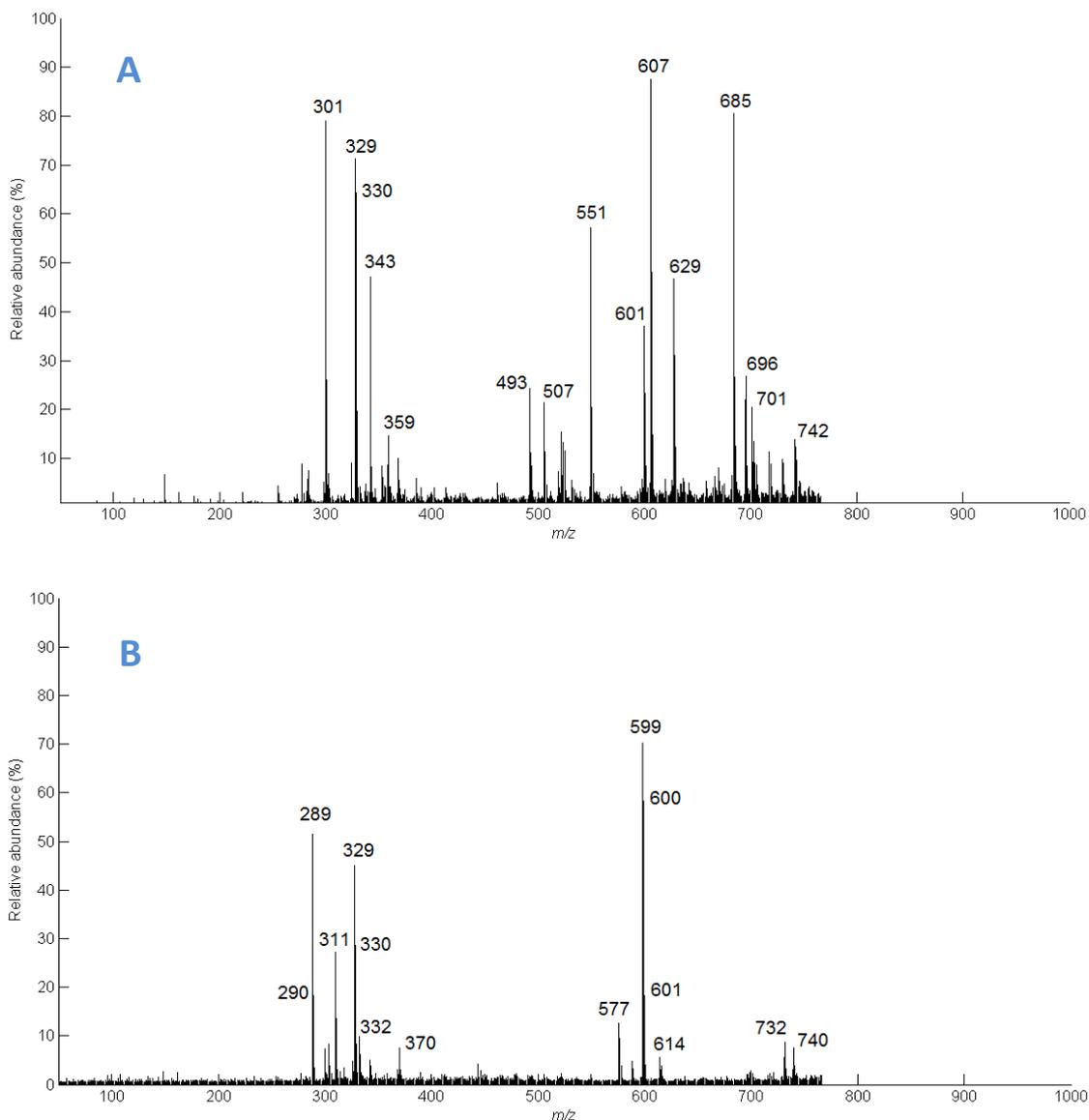
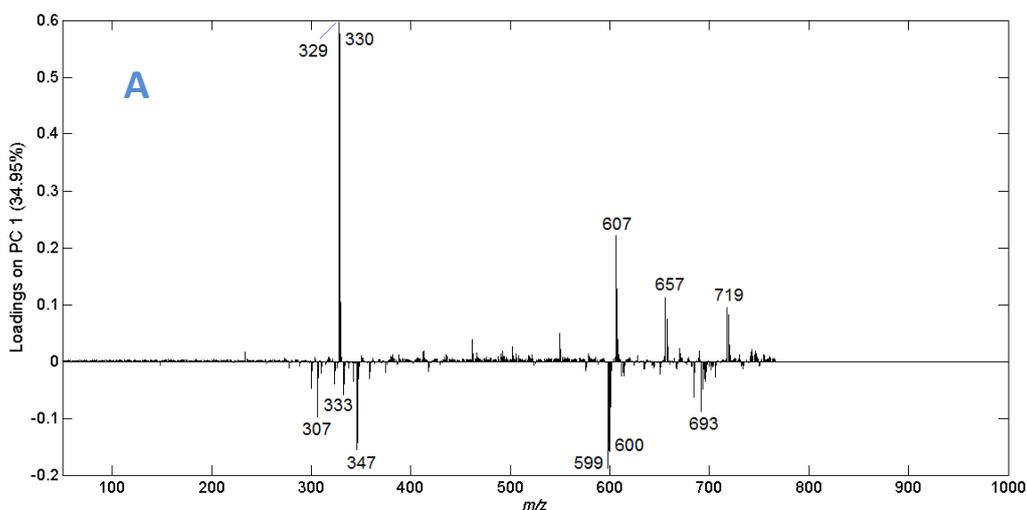


Figura 21. Espectros PS(+)-MS das amostras contendo (a) metandrostenolona, (b) testosterona.

No espectro da Figura 21a, em que no rótulo indicava a presença apenas de metandrostenolona, é possível observar os sinais característicos desse princípio ativo, em m/z 301 $[M + H]^+$ assim como seu dímero em m/z 601 $[2M + H]^+$, e também, os sinais característicos do princípio ativo estanozolol, em m/z 329 e 330 $[M + H]^+$. O segundo espectro (Figura 21b), em que o rótulo indicava a presença apenas de testosterona, apresenta os sinais referentes a esse princípio ativo em m/z 289 e 290 $[M + H]^+$ e ao seu dímero em m/z 577 $[2M + H]^+$, além dos sinais referentes ao estanozolol, em m/z 329 e 330 $[M + H]^+$.

Os pesos das variáveis em PC1 e PC2 estão apresentados nos gráficos da Figura 22. Com relação aos pesos positivos de PC1, destacaram-se aquelas variáveis que discriminam as amostras contendo o princípio ativo estanozolol em m/z 329 e 330 $[M + H]^+$ e seu dímero em m/z 657 $[2M + H]^+$. No lado negativo, os pesos mais significativos referem-se às variáveis que caracterizam as amostras contendo oxandrolona em m/z 307 $[M + H]^+$, oximetolona em m/z 333 $[M + H]^+$, e testosterona em m/z 599 e 600, referentes ao aduto do dímero com um átomo de sódio $[2M + Na]^+$.

Os pesos que se destacam positivamente em PC2 são característicos das variáveis que mais contribuem para destacar as amostras contendo testosterona, em m/z 289, 311, 599 e 600, e metandrostenolona em m/z 301 $[M + H]^+$. No lado negativo, se destacam os pesos relacionados à distinção das amostras contendo oxandrolona em m/z 307, e oximetolona em m/z 333 e 347.



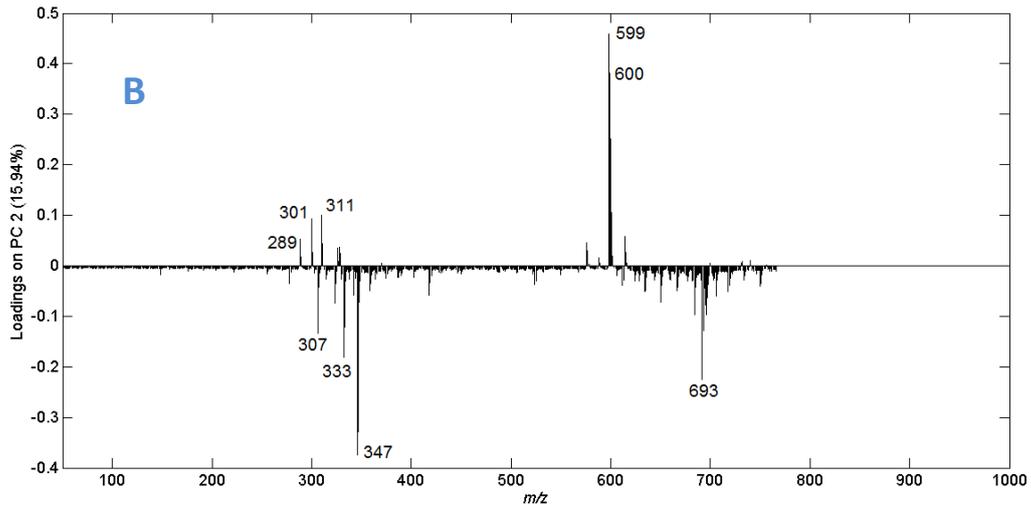
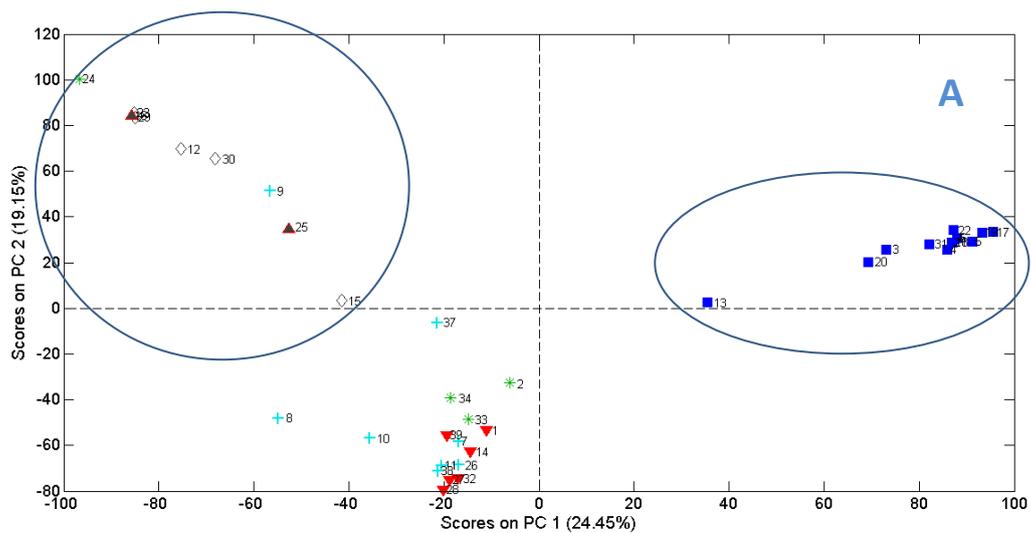


Figura 22. Gráfico de pesos de: a) PC1 e b) PC2, para o modelo de sólidos e suspensões.

4.3.2 Oleosas

Inicialmente, foi gerado um modelo PCA com os dados das amostras oleosas, utilizando-se 3 componentes principais que explicaram 56,16% da variância. Na Figura 23 são apresentados os gráficos de escores de PC1 *versus* PC2 e PC1 *versus* PC3.



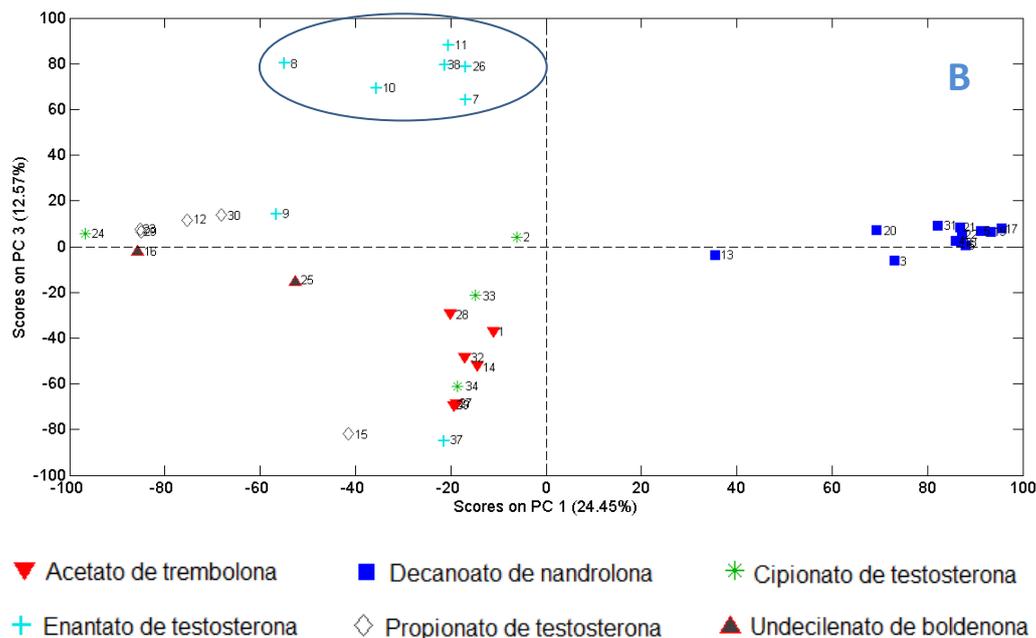


Figura 23. Gráfico de escores de a) PC1xPC2 b) PC1xPC3, para o modelo de amostras oleosas.

No gráfico de PC1 *versus* PC2, houve uma discriminação das amostras contendo o princípio ativo decanoato de nandrolona, agrupadas no lado positivo, em relação às demais amostras no lado negativo. Na projeção em PC2, houve uma tendência de separação das amostras de propionato de testosterona (circuladas no gráfico da Figura 23a) das restantes. Vale ressaltar que, assim como no gráfico de escores das amostras de comprimido e suspensão, os ícones foram definidos de acordo com os princípios ativos indicados nos rótulos. Portanto, no agrupamento das amostras de propionato de testosterona são encontrados diferentes ícones devido às adulterações efetuadas com esse princípio ativo.

No gráfico de PC1 *versus* PC3, só ocorreu o agrupamento das amostras contendo enantato de testosterona. As demais classes não se separam em nenhuma outra componente de menor variância explicada. Por isso, essas componentes foram desconsideradas.

A Figura 24 apresenta os gráficos de pesos para cada componente principal deste modelo.

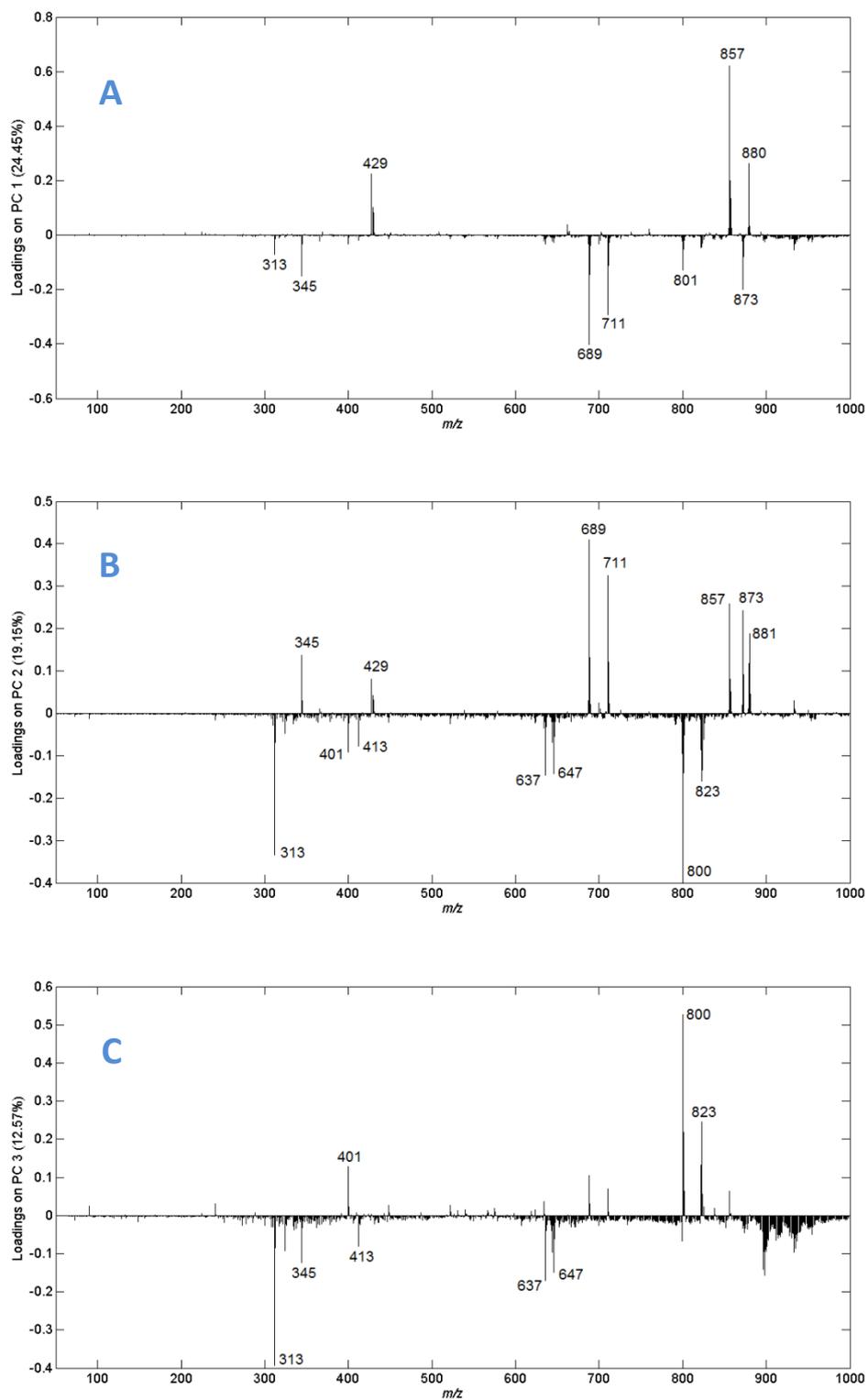


Figura 24. Gráficos de pesos de a) PC1, b) PC2 e c) PC3, para o modelo de amostras oleosas.

Os sinais característicos das amostras contendo decanoato de nandrolona em m/z 429 $[M + H]^+$, 857 $[2M + H]^+$ e 880 $[2M + Na]^+$ contribuíram

de forma positiva para PC1. Com relação aos pesos negativos, se destacaram os sinais em m/z 313, referente ao acetato de trembolona $[M + H]^+$; 345 referente ao propionato de testosterona $[M + H]^+$, seu dímero $[2M + H]^+$ em m/z 689 e seu aduto de sódio $[2M + Na]^+$ em 711; e também o sinal em m/z 801 referente ao dímero do enantato de testosterona $[2M + H]^+$.

Com relação aos pesos da segunda componente, os sinais característicos das amostras de propionato de testosterona, em m/z 345, 689, 711 e 873, e das amostras contendo decanoato de nandrolona, em m/z 429, 857 e 881, contribuíram positivamente. E os sinais referentes ao acetato de trembolona, em m/z 313 e 637, ao enantato de testosterona, em m/z 401, 800 e 823, e ao cipionato de testosterona, em m/z 413, contribuíram de maneira negativa.

No gráfico de pesos de PC3, contribuíram positivamente os sinais referentes ao enantato de testosterona, enquanto no lado negativo se destacaram os sinais característicos dos princípios ativos acetato de trembolona, propionato de testosterona e cipionato de testosterona.

Embora os pesos mais importantes para explicar os agrupamentos tenham sido os característicos de cada princípio ativo, as separações dos grupos não foram tão efetivas, levando-se em conta que mesmo de forma visual seria possível identificar no espectro sinais correspondentes ao princípio ativo presente em cada amostra. Assim, com o intuito de melhorar essas separações foi utilizado o método de seleção de variáveis OPS, responsável por selecionar as variáveis mais importantes para descrever o modelo.

Para isso, adotou-se uma ideia original. Primeiramente, foi criado um modelo de classificação supervisionada PLS-DA para cada classe de princípio ativo. Porém, nesse caso, os anabolizantes foram separados de acordo com o princípio ativo que estava presente na amostra, avaliado através dos espectros de massas. Portanto, como foi observado que a classe undecilenato de boldenona continha todas as amostras falsificadas, sendo que o princípio ativo presente era o propionato de testosterona, a classe do sal de boldenona não foi considerada e as amostras passaram então, a ser consideradas como propionato de testosterona. Assim, foi feito um modelo de classificação para 5

classes: acetato de trembolona, decanoato de nandrolona, cipionato de testosterona, enantato de testosterona e propionato de testosterona, para o qual o vetor \mathbf{y} continha a variável categórica 1 correspondentes às amostras pertencentes aquela respectiva classe e 0 para as demais amostras.

Os parâmetros utilizados para a seleção de variáveis, tais como o número de variáveis latentes do modelo original (h_{mod}) e o número de variáveis latentes do modelo OPS (h_{ops}) estão apresentados na Tabela 7.

Tabela 7. Parâmetros utilizados no método de seleção de variáveis OPS para cada classe de princípio ativo.

	h_{mod}	h_{ops}
Acetato de trembolona	2	6
Decanoato de nandrolona	2	11
Cipionato de testosterona	2	12
Enantato de testosterona	3	8
Propionato de testosterona	3	16

O conjunto de variáveis para cada classe foi escolhido de acordo com os menores valores de somas do erro quadrático da validação cruzada (RMSECV), maiores valores de coeficientes de correlação da validação cruzada (R_{cv}) e menores números de variáveis selecionadas. Os modelos foram testados e os melhores resultados, ou seja, os conjuntos escolhidos, estão apresentados na Tabela 8, em que R representa o vetor de regressão do modelo, C é o vetor de correlações entre x e y, RC a combinação desses dois vetores e VIP são os VIP escores.

Tabela 8. Resultados do método OPS para cada classe: Vetores de partida, RMSECV, R_{cv} , nº de variáveis.

	Vetores	RMSECV	R_{cv}	Nº Var
Acetato de trembolona	VIP – R	0,066	0,983	10
Decanoato de nandrolona	VIP – C	0,092	0,980	14
Cipionato de testosterona	VIP – R	0,099	0,943	18
Enantato de testosterona	VIP – R	0,289	0,617	4
Propionato de testosterona	VIP – RC	0,139	0,945	4

Posteriormente, todos os conjuntos de variáveis foram combinados entre si a fim de se obter uma melhor separação no modelo PCA. A melhor combinação foi resultado da fusão entre as variáveis das classes acetato de trembolona e cipionato de testosterona. Assim, um novo modelo PCA foi gerado utilizando 28 variáveis e descrevendo 69,82% da variância, com 3 componentes principais.

A presença de amostras anômalas também foi verificada nesse modelo pelo gráfico de T^2 de Hotelling *versus* resíduos Q (Figura 25), com um intervalo de confiança de 95%. Nenhuma amostra apresentou, simultaneamente, elevados resíduos e alta influência, sendo, portanto, o modelo considerado satisfatório para a análise dos dados.

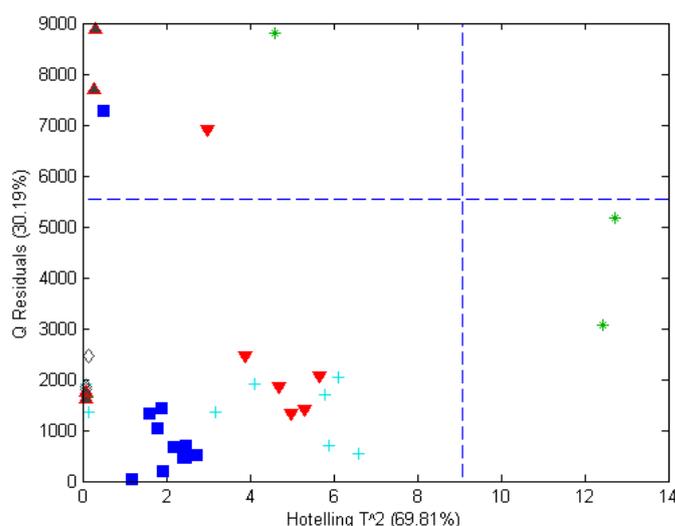


Figura 25. Gráfico de de T^2 de Hotelling x resíduos Q, para o modelo de amostras oleosas com OPS.

Utilizando-se a seleção de variáveis, foi possível discriminar todas as classes das amostras oleosas discutidas nesse trabalho com apenas 3 componentes principais, como pode ser observado na Figura 26.

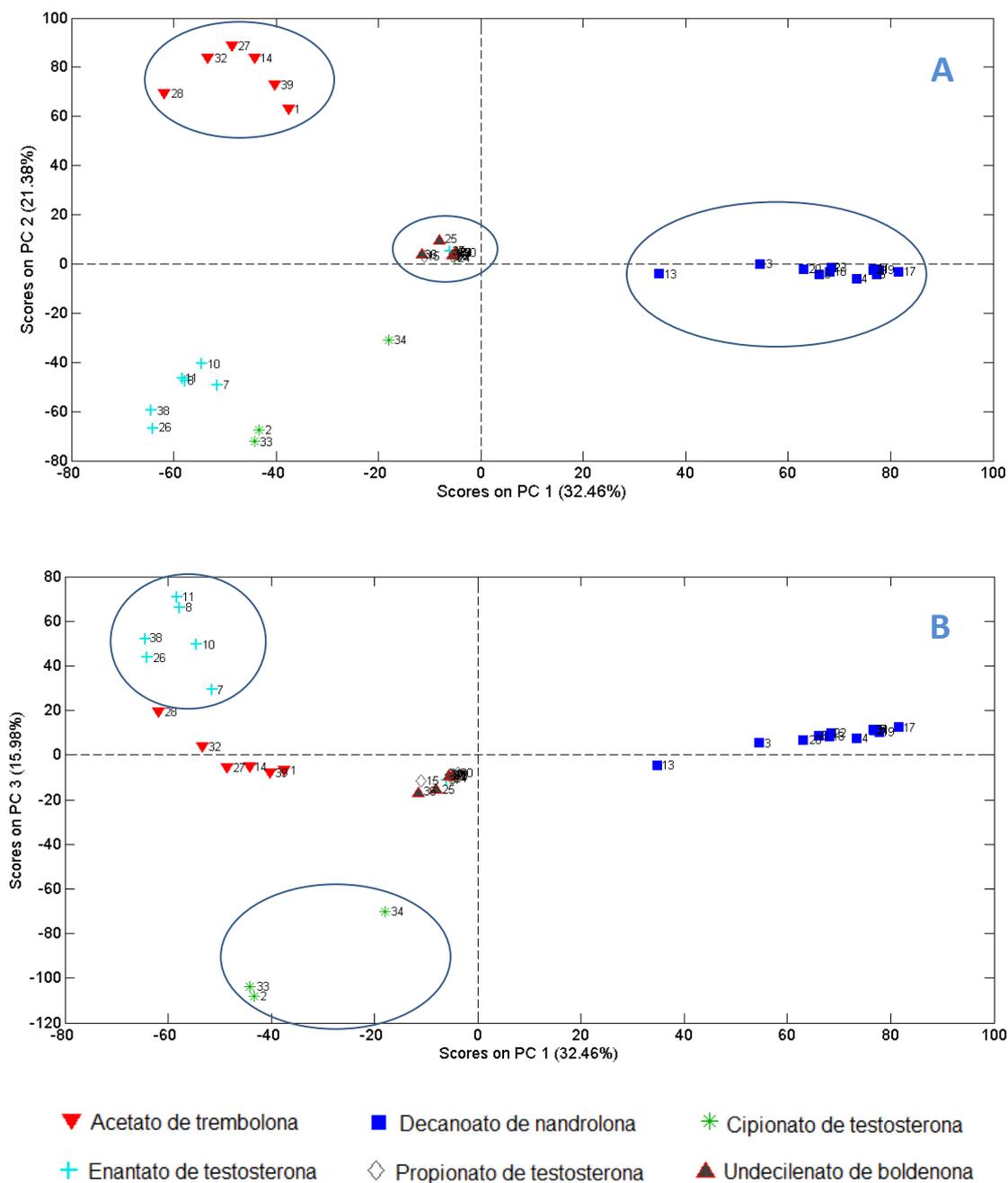


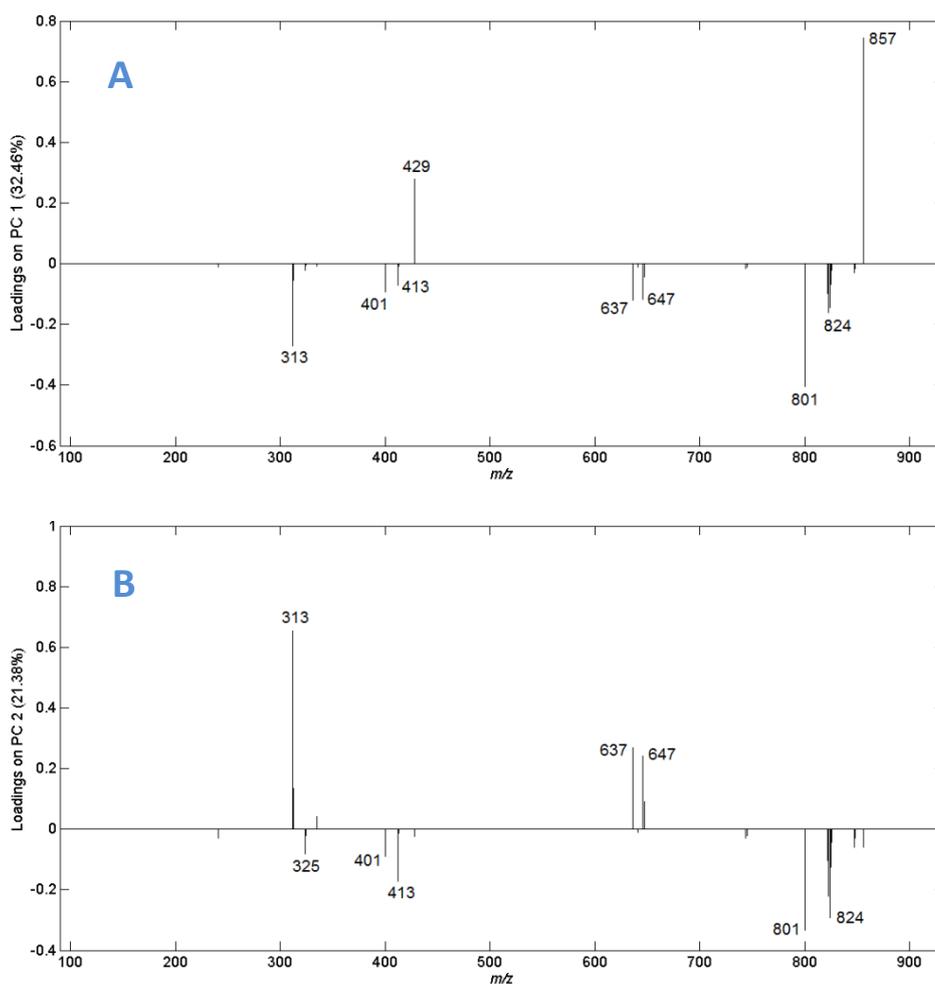
Figura 26. Gráficos de escores de (a) PC1xPC2 e (b) PC1xPC3, para o modelo de amostras oleosas com seleção de variáveis por OPS.

A discriminação em PC1 das amostras contendo decanoato de nandrolona se deu devido à contribuição positiva dos sinais em m/z 429 e 857,

como pode-se observar na Figura 27. Com relação aos pesos negativos, destacam-se nesta componente os sinais característicos das amostras contendo acetato de trembolona (m/z 313 e 637), enantato de testosterona (m/z 401, 801 e 824) e cipionato de testosterona (m/z 413).

Em PC2, ocorreu a discriminação do acetato de trembolona, devido à contribuição positiva dos pesos em m/z 313, 637 e 647. A contribuição negativa dos pesos nesta componente caracterizou as amostras de enantato de testosterona (m/z 401, 801 e 824) e cipionato de testosterona (m/z 413).

Na terceira componente, os pesos que se destacaram positivamente foram os associados ao enantato de testosterona, enquanto a contribuição negativa dos pesos se deu pelos sinais característicos do cipionato de testosterona.



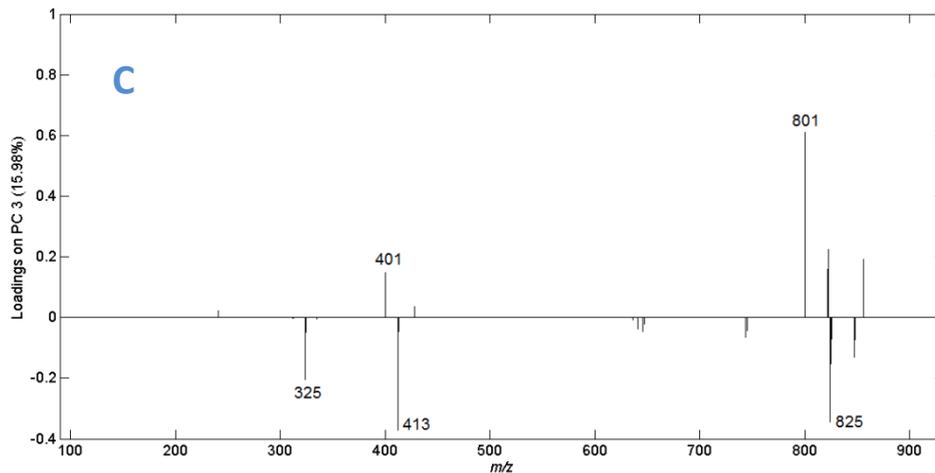


Figura 27. Gráficos de pesos de a) PC1, b) PC2 e c) PC3, para o modelo de amostras oleosas com seleção de variáveis por OPS.

A técnica PS-MS juntamente com métodos quimiométricos se mostrou eficiente para análise de anabolizantes, mesmo em caso de adulterações dos princípios ativos, seja pela adição de substâncias além das indicadas nos rótulos, como pela troca de princípios ativos, podendo ser uma técnica alternativa para uso os laboratórios forenses.

Dentre as 39 amostras oleosas, 7 foram consideradas falsas com relação à adulteração de princípios ativos. Dentre elas, 4 amostras estavam rotuladas como undecilenato de boldenona, 2 como enantato de testosterona e 1 amostra como cipionato de testosterona. Em todos os casos ocorreu a adulteração pelo princípio ativo propionato de testosterona.

Dentre as 18 amostras de comprimidos, 2 foram consideradas falsas. Uma amostra rotulada como metandrostenolona e uma como oxandrolona continham estanozolol ao invés desses princípios ativos.

Com relação às 18 amostras de suspensões, para a amostra que, de acordo com o rótulo, continha estanozolol e testosterona em sua formulação, após as análises constatou-se apenas a presença do estanozolol. Outras 2 amostras de testosterona também foram adulteradas, com a adição de estanozolol.

Os dados estão resumindo as adulterações encontradas nas amostras analisadas são apresentados na Tabela 9.

Tabela 9. Resultados das adulterações encontradas nas amostras analisadas.

Quantidade de amostras	Princípio ativo do rótulo	Forma física	Adulteração
2	Enantato de testosterona	Óleo	Substituição por propionato de testosterona
4	Undecilenato de boldenona	Óleo	Substituição por propionato de testosterona
1	Cipionato de testosterona	Óleo	Substituição por propionato de testosterona
1	Testosterona e estanozolol	Suspensão	Presença apenas de estanozolol
2	Testosterona	Suspensão	Adição de estanozolol
1	Metandrostenolona	Comprimido	Substituição por estanozolol
1	Oxandrolona	Comprimido	Substituição por estanozolol

5. CONCLUSÕES

Esta dissertação buscou avaliar a utilização da técnica PS-MS juntamente com métodos quimiométricos para analisar amostras de anabolizantes apreendidas no Brasil. Portanto, nesse contexto, 39 anabolizantes oleosos, 18 suspensões e 18 sólidos, provenientes de diferentes apreensões, foram analisados de maneira rápida, com um mínimo preparo de amostra e um consumo de solvente praticamente insignificante (alguns microlitros). Em todos os espectros de massas foi possível identificar os princípios ativos presentes nas amostras, sendo também revelados alguns casos de adulteração desses produtos.

A esses resultados foi aplicada a PCA, primeiramente nas amostras sólidas e líquidas, cujo modelo mostrou uma separação dos agrupamentos referentes aos princípios ativos encontrados em cada amostra, com apenas 3 componentes principais. Posteriormente, a PCA foi aplicada às amostras oleosas, que continham 5 diferentes princípios ativos. Inicialmente, a separação de tais agrupamentos não foi tão efetiva. Num processo de otimização, foi utilizado o método de seleção de variáveis OPS, e um novo modelo PCA foi gerado com apenas algumas variáveis seletivas. Neste modelo, as 5 classes de anabolizantes foram separadas utilizando 3 componentes principais.

A análise dos anabolizantes como objetivo de identificar seus princípios ativos é uma prática de rotina em laboratórios forenses. Portanto, a utilização da PS-MS mostrou-se uma alternativa viável para esse fim, sendo uma técnica muito mais rápida do que a convencional (GC-MS).

Com relação aos estudos preliminares, verificou-se, nas condições realizadas, que a técnica FTIR não se mostrou adequada para a identificação das amostras de anabolizantes oleosos, sendo necessário estudos mais aprofundados. Nas análises por ICP-MS, foram encontradas elevadas concentrações de metais tóxicos em alguns comprimidos, como Pb e As, superior ao permitido pela Farmacopeia Americana. Portanto, o consumo destes medicamentos pode acarretar problemas à saúde dos usuários.

6. PERSPECTIVAS

Devido a alguns problemas encontrados, como a grande heterogeneidade das amostras, e a falta de acesso a padrões dos princípios ativos, pois a sua aquisição foi inviável durante o período de desenvolvimento desse trabalho, não foi possível obter mais informações e realizar outros estudos com as amostras de anabolizantes. Porém, após adquirirmos tais padrões (o que deverá ser feito nos próximos meses, após a obtenção da licença da ANVISA), temos como perspectivas para esse trabalho a quantificação dos princípios ativos pelo método quimiométrico de resolução de curvas MCR-ALS (*MCR-Alternating Least Squares*), utilizando os espectros de infravermelho médio das amostras.

A vantagem do MCR-ALS em relação aos métodos convencionais de calibração multivariada, tais como o PLS e PCR, é permitir a quantificação do analito na presença de interferentes, sem que eles sejam previamente calibrados, além da possibilidade de construir modelos de calibração utilizando um número relativamente pequeno de amostras.⁸³

Assim, cada um dos diferentes princípios ativos poderiam ser quantificados, a partir dos respectivos padrões, mesmo na presença dos excipientes, e com um número de amostras limitado. Além disso, seria possível ainda identificar e estimar os espectros de outras possíveis amostras presentes.

REFERÊNCIAS

- (1) Dégardin, K.; Roggo, Y.; Margot, P. Understanding and fighting the medicine counterfeit market. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2014**, *87*, 167–175.
- (2) Definitions of SSFFC Medical Products
<http://www.who.int/medicines/regulation/ssffc/definitions/en/> (accessed Mar 7, 2017).
- (3) BRASIL. Ministério da Justiça. *Brasil Original - Compre essa atitude*; Conselho Nacional de Combate à Pirataria e Delitos Contra a Propriedade Intelectual: Brasília, 2011.
- (4) Hurtado, R. L.; Lasmar, M. C. Medicamentos falsificados e contrabandeados no Brasil: panorama geral e perspectivas de combate ao seu consumo. *Cad. Saude Publica* **2014**, *30*, 891–895.
- (5) Ames, J.; Souza, D. Z. Falsificação de medicamentos no Brasil. *Rev. Saude Publica* **2012**, *46*, 154–159.
- (6) Yesalis, C. E.; Bahrke, M. S. Anabolic-androgenic steroids. Current issues. *Sports Med.* **1995**, *19*, 326–340.
- (7) Domingues, S. F.; Marins, J. C. B. Utilização de recursos ergogênicos e suplementos alimentares por praticantes de musculação em Belo Horizonte -MG. *Fit. Perform. J.* **2007**, *6*, 219–226.
- (8) Neri, M.; Bello, S.; Bonsignore, A.; Cantatore, S.; Riezzo, I.; Turillazzi, E.; Fineschi, V. Anabolic androgenic steroids abuse and liver toxicity. *Mini Rev. Med. Chem.* **2011**, *11*, 430–437.
- (9) Abrahin, O. S. C.; de Sousa, E. C.; Santos, A. M. Prevalence of the Use of Anabolic-Androgenic Steroids in Brazil: A Systematic Review. *Subst. Use Misuse* **2014**, *49*, 1156–1162.
- (10) Silva, L. S. M. F.; Moreau, R. L. de M. Uso de esteróides anabólicos androgênicos por praticantes de musculação de grandes academias da cidade de São Paulo. *Rev. Bras. Ciências Farm. Brazilian J. Pharm. Sci.* **2003**, *39*, 327–333.
- (11) Kanayama, G.; Hudson, J. I.; Pope, H. G. Illicit anabolic-androgenic steroid use. *Horm. Behav.* **2010**, *58*, 111–121.
- (12) Maravelias, C.; Dona, A.; Stefanidou, M.; Spiliopoulou, C. Adverse effects of anabolic steroids in athletes. *Toxicol. Lett.* **2005**, *158*, 167–175.

- (13) Pope, 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. *Endocr. Rev.* **2014**, *35*, 341–375.
- (14) ANVISA. *Resolução RDC nº 39*; 2012.
- (15) Passagli, M. F. *Toxicologia Forense - Teoria e Prática*, 4th ed.; Millenium, Ed.; Campinas, 2013.
- (16) Brasil. Decreto Lei nº 9965. Restringe a Venda de Esteroides ou Peptídeos Anabolizantes https://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/l9965.htm (accessed Jul 24, 2017).
- (17) Thevis, M.; Schrader, Y.; Thomas, A.; Sigmund, G.; Geyer, H.; Schänzer, W. Analysis of confiscated black market drugs using chromatographic and mass spectrometric approaches. *J. Anal. Toxicol.* **2008**, *32*, 232–240.
- (18) Cho, S.-H.; Park, H. J.; Lee, J. H.; Do, J.-A.; Heo, S.; Jo, J. H.; Cho, S. Determination of anabolic–androgenic steroid adulterants in counterfeit drugs by UHPLC–MS/MS. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2015**, *111*, 138–146.
- (19) Görög, S. Advances in the analysis of steroid hormone drugs in pharmaceuticals and environmental samples (2004–2010). *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2011**, *55*, 728–743.
- (20) Wang, H.; Liu, J.; Cooks, R. G.; Ouyang, Z. Paper spray for direct analysis of complex mixtures using mass spectrometry. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2010**, *49*, 877–880.
- (21) Amador, V. S.; Pereira, H. V.; Sena, M. M.; Augusti, R.; Piccin, E. Paper Spray Mass Spectrometry for the Forensic Analysis of Black Ballpoint Pen Inks. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2017**, *28*, 1965–1976.
- (22) Pereira, H. V.; Amador, V. S.; Sena, M. M.; Augusti, R.; Piccin, E. Paper spray mass spectrometry and PLS-DA improved by variable selection for the forensic discrimination of beers. *Anal. Chim. Acta* **2016**, *940*, 104–112.
- (23) Teodoro, J. A. R.; Pereira, H. V.; Sena, M. M.; Piccin, E.; Zacca, J.; Augusti, R. Paper spray mass spectrometry and chemometric tools for a fast and reliable identification of counterfeit blended Scottish whiskies. *Food Chem.* **2017**, *237*, 1058–1064.
- (24) Carvalho, T. C.; Tosato, F.; Souza, L. M.; Santos, H.; Merlo, B. B.; Ortiz, R. S.; Rodrigues, R. R. T.; Filgueiras, P. R.; França, H. S.; Augusti, R.; et al. Thin layer chromatography coupled to paper spray ionization mass spectrometry for cocaine and its adulterants analysis. *Forensic Sci. Int.* **2016**, *262*, 56–65.

- (25) Teunissen, S. F.; Fedick, P. W.; Berendsen, B. J. A.; Nielen, M. W. F.; Eberlin, M. N.; Cooks, R. G.; van Asten, A. C. Novel Selectivity-Based Forensic Toxicological Validation of a Paper Spray Mass Spectrometry Method for the Quantitative Determination of Eight Amphetamines in Whole Blood. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2017**.
- (26) Palermo Neto, J. Anabolizantes e Pecuária de Corte. *Rev. Educ. Contin. em Med. Veterinária e Zootec.* **1998**, *1*, 10–15.
- (27) Da Silva, P. R. P.; Danielski, R.; Czepielewski, M. A. Esteróides anabolizantes no esporte. *Rev Bras Med Esporte* **2002**, *8*, 235–243.
- (28) McCabe, S. E.; Brower, K. J.; West, B. T.; Nelson, T. F.; Wechsler, H. Trends in non-medical use of anabolic steroids by U.S. college students: results from four national surveys. *Drug Alcohol Depend.* **2007**, *90*, 243–251.
- (29) Pope, H. G.; Kanayama, G.; Athey, A.; Ryan, E.; Hudson, J. I.; Baggish, A. The lifetime prevalence of anabolic-androgenic steroid use and dependence in Americans: Current best estimates. *Am. J. Addict.* **2014**, *23*, 371–377.
- (30) Hakansson, A.; Mickelsson, K.; Wallin, C.; Berglund, M. Anabolic Androgenic Steroids in the General Population: User Characteristics and Associations with Substance Use. *Eur. Addict. Res.* **2012**, *18*, 83–90.
- (31) Dunn, M.; White, V. The epidemiology of anabolic–androgenic steroid use among Australian secondary school students. *J. Sci. Med. Sport* **2011**, *14*, 10–14.
- (32) Acevedo, P.; Jorge, J. C.; Cruz-Sánchez, A.; Amy, E.; Barreto-Estrada, J. L. A ten-year assessment of anabolic steroid misuse among competitive athletes in Puerto Rico. *West Indian Med. J.* **2011**, *60*, 531–535.
- (33) Momtazi, S.; Rawson, R. Substance abuse among Iranian high school students. *Curr. Opin. Psychiatry* **2010**, *23*, 221–226.
- (34) Kanayama, G.; Hudson, J. I.; Pope, H. G. Illicit anabolic–androgenic steroid use. *Horm. Behav.* **2010**, *58*, 111–121.
- (35) Nogueira, F. R. S.; Brito, A. F.; Vieira, T. I.; De Oliveira, V. C.; Linka, R.; Gouveia, B. Prevalência de uso de recursos ergogênicos em praticantes de musculação na cidade de João Pessoa, Paraíba. *Rev. Bras. Ciências do Esporte* **2015**, *37*, 56–64.
- (36) Araújo, L. R.; Andreolo, J.; Silva, M. S. Utilização de suplemento alimentar e anabolizante por praticantes de musculação nas academias de Goiânia-GO. *Rev. Bras. Ciência e Mov.* **2002**, *10*, 13–18.

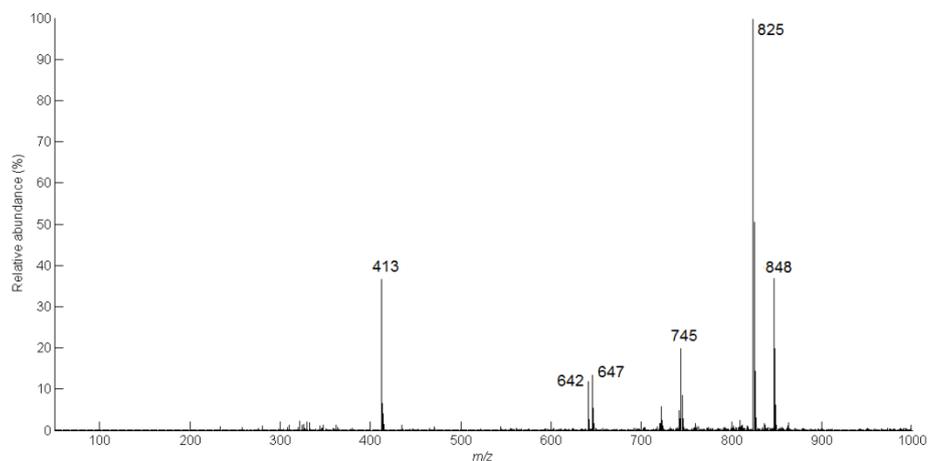
- (37) WADA. 2012 Anti-Doping Testing Figures Report <https://www.wada-ama.org/sites/default/files/resources/files/WADA-2012-Anti-Doping-Testing-Figures-Report-EN.pdf> (accessed May 1, 2017).
- (38) WADA. 2013 Anti-Doping Testing Figures Report https://www.wada-ama.org/sites/default/files/wada_2013_anti-doping_testing_figures_report_en.pdf (accessed May 1, 2017).
- (39) WADA. 2014 Anti-Doping Testing Figures Report https://www.wada-ama.org/sites/default/files/wada_2014_anti-doping-testing-figures_full-report_en.pdf (accessed May 1, 2017).
- (40) Thiblin, I.; Petersson, A. Pharmacoepidemiology of anabolic androgenic steroids: a review. *Fundam. Clin. Pharmacol.* **2005**, *19*, 27–44.
- (41) Frati, P.; Busardo, F.; Cipolloni, L.; Dominicis, E.; Fineschi, V. Anabolic Androgenic Steroid (AAS) Related Deaths: Autoptic, Histopathological and Toxicological Findings. *Curr. Neuropharmacol.* **2015**, *13*, 146–159.
- (42) Di Paolo, M.; Agozzino, M.; Toni, C.; Luciani, A. B.; Molendini, L.; Scaglione, M.; Inzani, F.; Pasotti, M.; Buzzi, F.; Arbustini, E. Sudden anabolic steroid abuse-related death in athletes. *Int. J. Cardiol.* **2007**, *114*, 114–117.
- (43) Darke, S.; Torok, M.; Dufloy, J. Sudden or Unnatural Deaths Involving Anabolic-androgenic Steroids. *J. Forensic Sci.* **2014**, *59*, 1025–1028.
- (44) Fernandez, F. M.; Green, M. D.; Newton, P. N. Prevalence and Detection of Counterfeit Pharmaceuticals: A Mini Review. *Ind. Eng. Chem. Res.* **2007**, *47*, 585–590.
- (45) Pharmaceutical Security Institute (PSI) <http://www.psi-inc.org/incidentTrends.cfm> (accessed May 14, 2017).
- (46) Pellegrini, M.; Rotolo, M. C.; Di Giovannadrea, R.; Pacifici, R.; Pichini, S. A simple toxicological analysis of anabolic steroid preparations from the black market. *Ann Toxicol Anal.* **2012**, *24*, 67–72.
- (47) Counterfeit Drugs Story. *Bull. World Health Organ.* **2006**, *84* (9).
- (48) WHO. *Global Surveillance and Monitoring System for substandard and falsified medical products*; 2017.
- (49) Neves, D. B. J.; Marcheti, R. G. A.; Caldas, E. D. Incidence of anabolic steroid counterfeiting in Brazil. *Forensic Sci. Int.* **2013**, *228*, e81–e83.
- (50) Mazzarino, M.; Oreggia, M.; Botrè, F. Application of fast gas chromatography/mass spectrometry for the rapid screening of synthetic anabolic steroids and other drugs in anti-doping analysis. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2007**, *21*, 4117–4124.

- (51) Pozo, O. J.; Van Eenoo, P.; Deventer, K.; Elbardissy, H.; Grimalt, S.; Sancho, J. V.; Hernandez, F.; Ventura, R.; Delbeke, F. T. Comparison between triple quadrupole, time of flight and hybrid quadrupole time of flight analysers coupled to liquid chromatography for the detection of anabolic steroids in doping control analysis. *Anal. Chim. Acta* **2011**, *684*, 107–120.
- (52) Kozlik, P.; Tircova, B. Development of the fast, simple and fully validated high performance liquid chromatographic method with diode array detector for quantification of testosterone esters in an oil-based injectable dosage form. *Steroids* **2016**, *115*, 34–39.
- (53) Neves, D. B. J.; Caldas, E. D. GC–MS quantitative analysis of black market pharmaceutical products containing anabolic androgenic steroids seized by the Brazilian Federal Police. *Forensic Sci. Int.* **2017**, *275*, 272–281.
- (54) Prokudina, E. A.; Prchalová, J.; Vyšatová, E.; Kuchař, M.; Rajchl, A.; Lapčík, O. Analysis of anabolic androgenic steroids by direct analysis in real time ionization with time-of-flight mass spectrometry. *Int. J. Mass Spectrom.* **2015**, *392*, 28–33.
- (55) Rebiere, H.; Ghyselincq, C.; Lempereur, L.; Brenier, C. Investigation of the composition of anabolic tablets using near infrared spectroscopy and Raman chemical imaging. *Drug Test. Anal.* **2016**, *8*, 370–377.
- (56) Neves, D. B. J.; Talhavini, M.; Braga, J. W. B.; Zacca, J. J.; Caldas, E. D. Detection of Counterfeit Durateston® Using Fourier Transform Infrared Spectroscopy and Partial Least Squares - Discriminant Analysis. *J. Braz. Chem. Soc.* **2016**, *28*, 1288–1296.
- (57) Hoffman, E.; Stroobant, V. *Mass Spectrometry – Principles and applications*, 3rd ed.; John Wiley & Sons Inc, Ed.; Chichester, 2007.
- (58) Shen, L.; Zhang, J.; Yang, Q.; Manicke, N. E.; Ouyang, Z. High throughput paper spray mass spectrometry analysis. *Clin. Chim. Acta* **2013**, *420*, 28–33.
- (59) Crotti, A. E. M.; Vessecchi, R.; Lopes, J. L. C.; Lopes, N. P. Espectrometria de massas com ionização por “electrospray”: processos químicos envolvidos na formação de íons de substâncias orgânicas de baixo peso molecular. *Quim. Nova* **2006**, *29*, 287–292.
- (60) Banerjee, S.; Mazumdar, S. Electrospray Ionization Mass Spectrometry: A Technique to Access the Information beyond the Molecular Weight of the Analyte. *Int. J. Anal. Chem.* **2011**, *2012*, 1–40.
- (61) Liu, J.; Wang, H.; Manicke, N. E.; Lin, J.-M.; Cooks, R. G.; Ouyang, Z. Development, Characterization, and Application of Paper Spray Ionization. *Anal. Chem.* **2010**, *82*, 2463–2471.

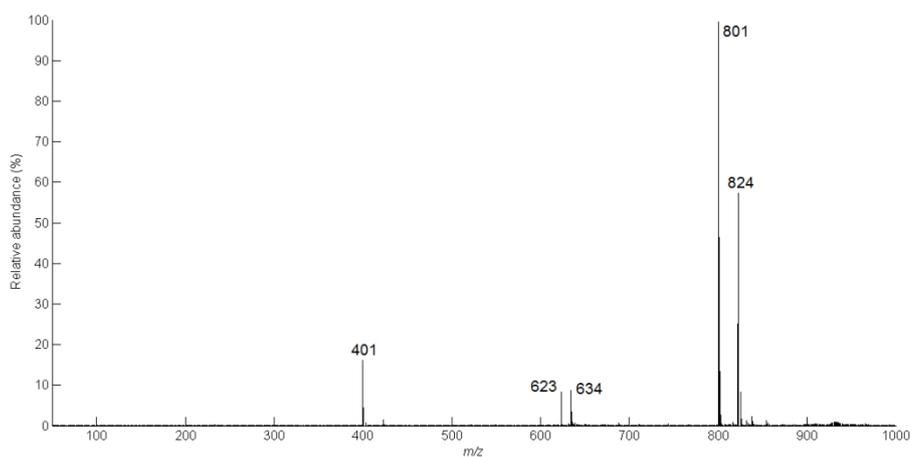
- (62) Wang, H.; Ren, Y.; McLuckey, M. N.; Manicke, N. E.; Park, J.; Zheng, L.; Shi, R.; Cooks, R. G.; Ouyang, Z. Direct quantitative analysis of nicotine alkaloids from biofluid samples using paper spray mass spectrometry. *Anal. Chem.* **2013**, *85*, 11540–11544.
- (63) Wang, H.; Manicke, N. E.; Yang, Q.; Zheng, L.; Shi, R.; Cooks, R. G.; Ouyang, Z. Direct Analysis of Biological Tissue by Paper Spray Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **2011**, *83*, 1197–1201.
- (64) Hamid, A. M.; Jarmusch, A. K.; Pirro, V.; Pincus, D. H.; Clay, B. G.; Gervasi, G.; Cooks, R. G. Rapid discrimination of bacteria by paper spray mass spectrometry. *Anal. Chem.* **2014**, *86*, 7500–7507.
- (65) Sneha, M.; Dulay, M. T.; Zare, R. N. Introducing mass spectrometry to first-year undergraduates: Analysis of caffeine and other components in energy drinks using paper-spray mass spectrometry. *Int. J. Mass Spectrom.* **2017**, *418*, 156–161.
- (66) Donna, L.; Taverna, D.; Indelicato, S.; Napoli, A.; Sindona, G.; Mazzotti, F. Rapid assay of resveratrol in red wine by paper spray tandem mass spectrometry and isotope dilution. *Food Chem.* **2017**, *229*, 354–357.
- (67) Garrett, R.; Rezende, C. M.; Ifa, D. R. Coffee origin discrimination by paper spray mass spectrometry and direct coffee spray analysis. *Anal. Methods* **2013**, *5*, 5944–5948.
- (68) Resende, S. F.; Teodoro, J. A. R.; Binatti, I.; Gouveia, R. L.; Oliveira, B. S.; Augusti, R. On-surface photocatalytic degradation of methylene blue: In situ monitoring by paper spray ionization mass spectrometry. *Int. J. Mass Spectrom.* **2017**, *418*, 107–111.
- (69) Ma, Q.; Bai, H.; Li, W.; Wang, C.; Li, X.; Cooks, R. G.; Ouyang, Z. Direct identification of prohibited substances in cosmetics and foodstuffs using ambient ionization on a miniature mass spectrometry system. *Anal. Chim. Acta* **2016**, *912*, 65–73.
- (70) Deng, J.; Yang, Y. Chemical fingerprint analysis for quality assessment and control of Bansha herbal tea using paper spray mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta* **2013**, *785*, 82–90.
- (71) Fedick, P. W.; Bills, B. J.; Manicke, N. E.; Cooks, R. G. Forensic Sampling and Analysis from a Single Substrate: Surface Enhanced Raman Spectroscopy Followed by Paper Spray Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **2017**, *89*, 10973–10979.
- (72) Taverna, D.; Di Donna, L.; Mazzotti, F.; Tagarelli, A.; Napoli, A.; Furia, E.; Sindona, G. Rapid discrimination of bergamot essential oil by paper spray mass spectrometry and chemometric analysis. *J. Mass Spectrom.* **2016**, *51*, 761–767.

- (73) Bruns, R. E.; Faigle, J. F. G. Quimiometria. *Quim. Nova* **1985**, 8 (2), 99–105.
- (74) Ferreira, M. M. C. *Quimiometria - Conceitos, Métodos e Aplicações*; UNICAMP, Ed.; Campinas, 2015.
- (75) Brereton, R. G.; Lloyd, G. R. Partial least squares discriminant analysis: taking the magic away. *J. Chemom.* **2014**, 28, 213–225.
- (76) Tran, T. N.; Afanador, N. L.; Buydens, L. M. C.; Blanchet, L. Interpretation of variable importance in Partial Least Squares with Significance Multivariate Correlation (sMC). *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **2014**, 138, 153–160.
- (77) Teófilo, R. F.; Martins, J. P. A.; Ferreira, M. M. C. Sorting variables by using informative vectors as a strategy for feature selection in multivariate regression. *J. Chemom.* **2009**, 23, 32–48.
- (78) Pessanha, A. F. V.; Rolim, L. A.; Peixoto, M. S.; Silva, R. M. F.; Rolim-Neto, P. J. Influência dos excipientes multifuncionais no desempenho dos fármacos em formas farmacêuticas. *Rev. Bras. Farmácia* **2012**, 93, 136–145.
- (79) Elemental Impurities Updates | USP <http://www.usp.org/chemical-medicines/elemental-impurities-updates> (accessed Jan 27, 2018).
- (80) Vaclavik, L.; Cajka, T.; Hrbek, V.; Hajslova, J. Ambient mass spectrometry employing direct analysis in real time (DART) ion source for olive oil quality and authenticity assessment. *Anal. Chim. Acta* **2009**, 645, 56–63.
- (81) Alves, J. de O. *Espectrometria de massas com ionização electrospray (ESI-MS) e métodos quimiométricos: caracterização de azeite de oliva (extra virgem e puro) e outros óleos vegetais e quantificação de óleos adulterantes em azeite de oliva extra virgem*, Universidade Federal de Minas Gerais, 2010.
- (82) Simas, R. C. *Caracterização de óleos vegetais e petróleo por espectrometria de massas em condições ambiente e com alta exatidão e resolução*, Unicamp, 2010.
- (83) Março, P. H.; Valderrama, P.; Alexandrino, G. L.; Poppi, R. J.; Tauler, R. Resolução Multivariada de Curvas com Mínimos Quadrados Alternantes: Descrição, Funcionamento e Aplicações. *Quim. Nova* **2014**, 37, 1525–1532.

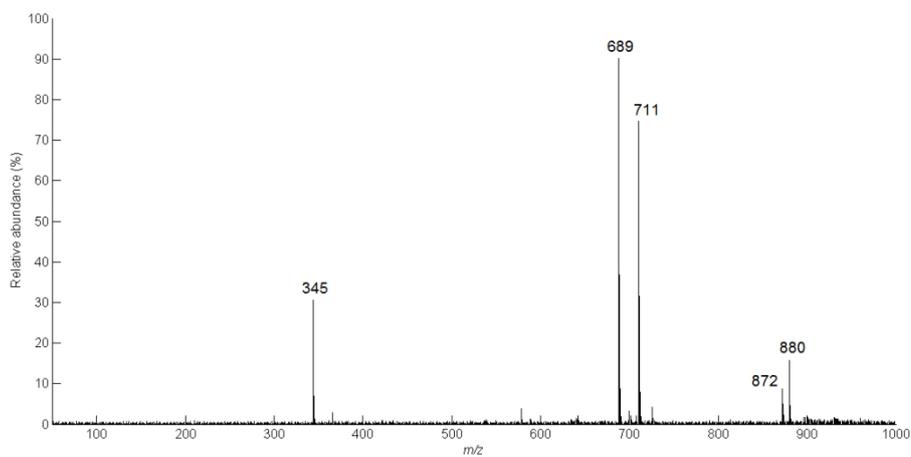
ANEXOS



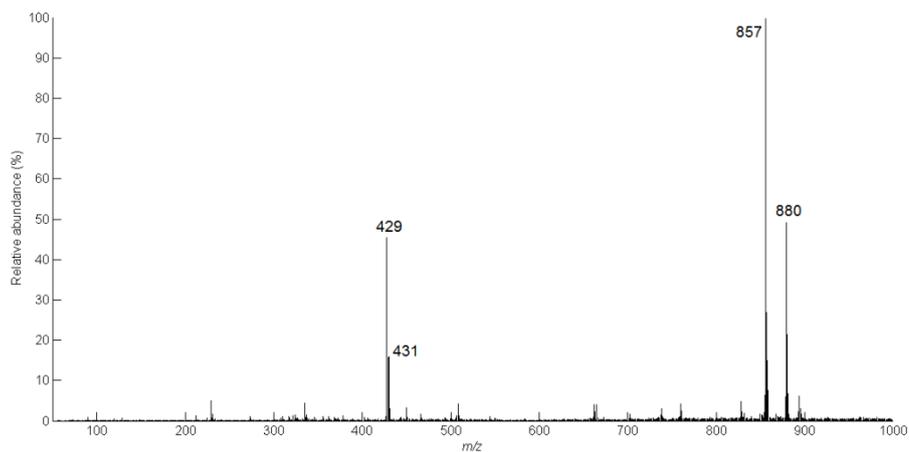
Espectro PS(+)-MS de uma amostra contendo cipionato de testosterona.



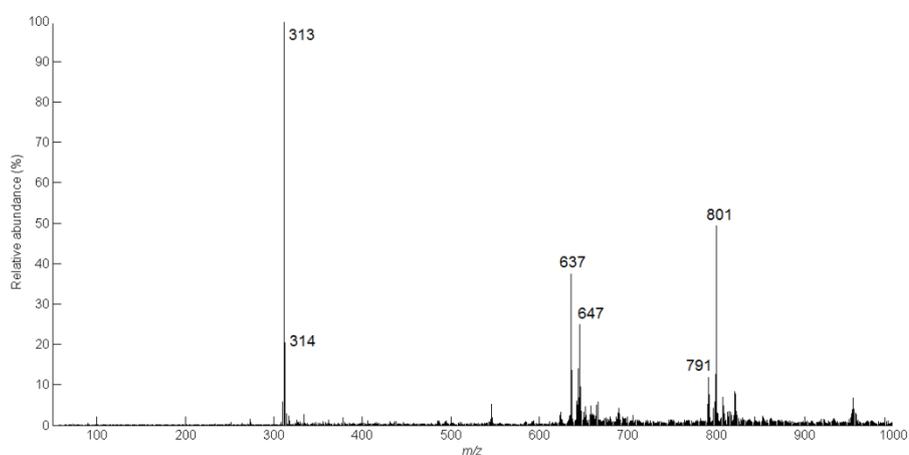
Espectro PS(+)-MS de uma amostra contendo enantato de testosterona.



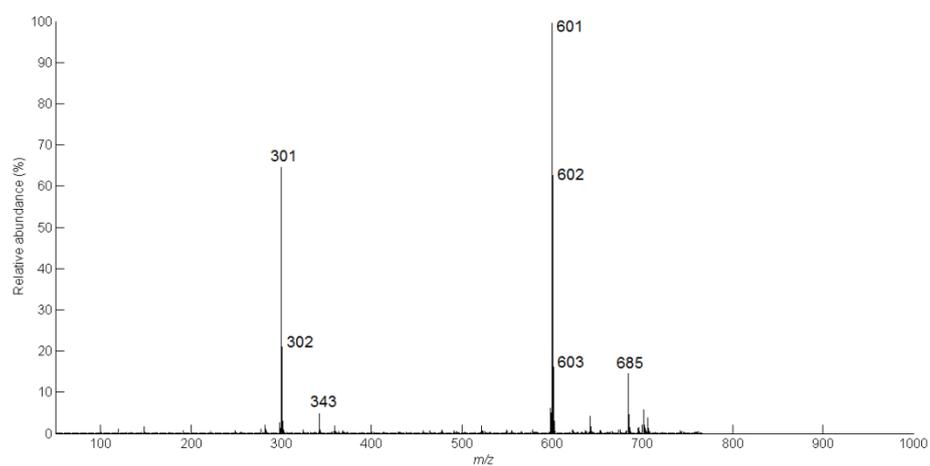
Espectro PS(+)-MS de uma amostra contendo propionato de testosterona.



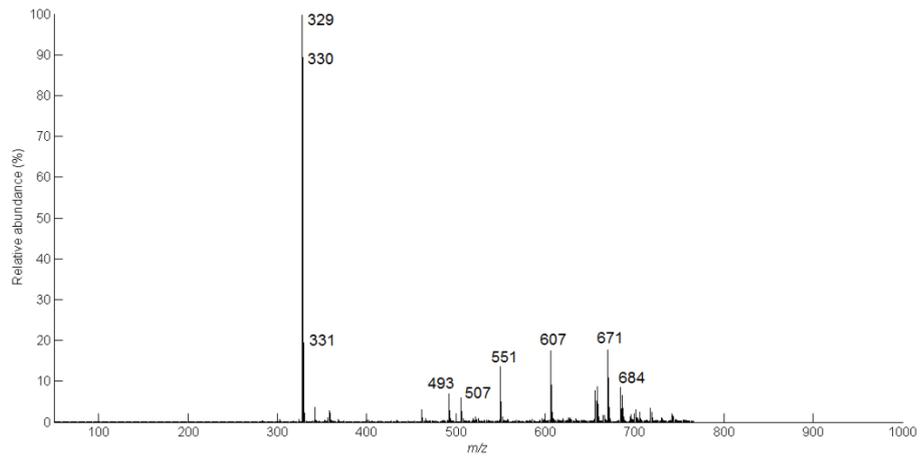
Espectro PS(+)-MS de uma amostra contendo decanoato de nandrolona.



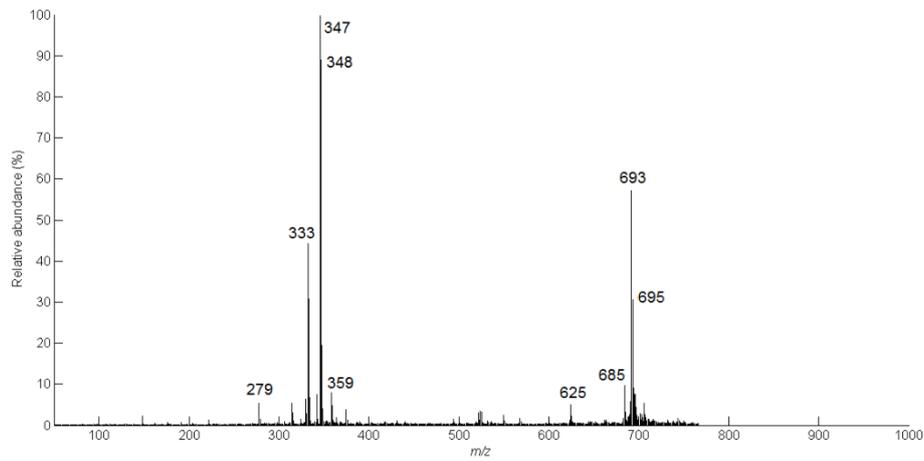
Espectro PS(+)-MS de uma amostra contendo acetato de trembolona.



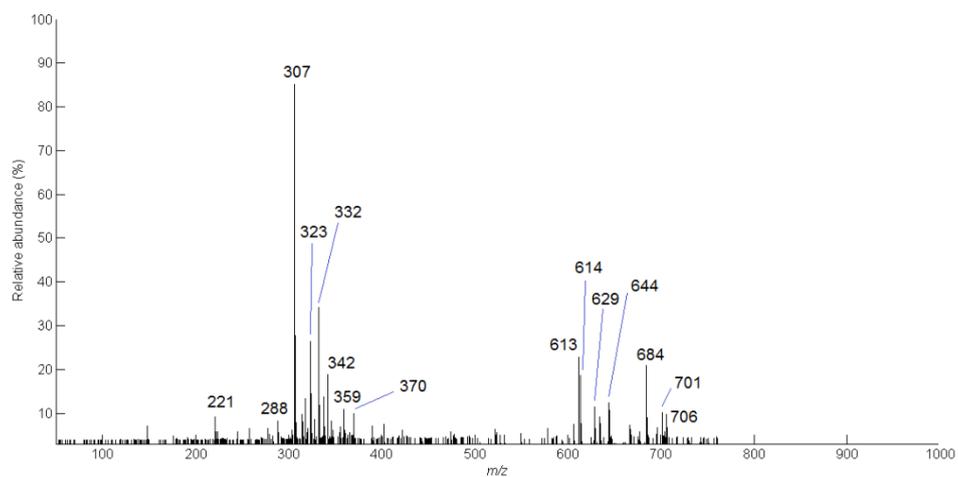
Espectro PS(+)-MS de uma amostra contendo metandrostenolona.



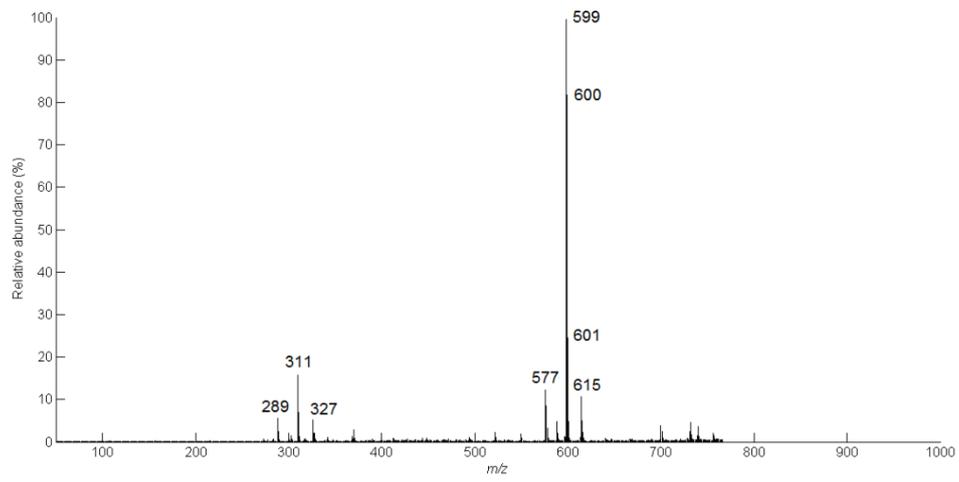
Espectro PS(+)-MS de uma amostra contendo estanozolol.



Espectro PS(+)-MS de uma amostra contendo oximetolona.



Espectro PS(+)-MS de uma amostra contendo oxandrolona.



Espectro PS(+)-MS de uma amostra contendo testosterona.