



Universidade Estadual Paulista - UNESP
Instituto de Química - Araraquara
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA



*Desenvolvimento de métodos analíticos para a avaliação da
qualidade de cafés torrados, bebidas energéticas e
medicamentos contendo esteroides anabolizantes utilizando
a espectroscopia de RMN 1H*

Marcos Vinícius de Moura Ribeiro

Araraquara - SP

2018

Marcos Vinícius de Moura Ribeiro

***Desenvolvimento de métodos analíticos para a avaliação da
qualidade de cafés torrados, bebidas energéticas e
medicamentos contendo esteroides anabolizantes utilizando
a espectroscopia de RMN ¹H***

*Tese de Doutorado apresentada ao
Instituto de Química - Campus de
Araraquara da Universidade Estadual
Paulista, como requisito para obtenção do
título de Doutor em Química, no curso de
Pós-Graduação em Química.*

Orientador: Prof. Dr. Leonardo Pezza

Araraquara - SP

2018

FICHA CATALOGRÁFICA

R484d Ribeiro, Marcos Vinícius de Moura
Desenvolvimento de métodos analíticos para a avaliação da
qualidade de cafés torrados, bebidas energéticas e medicamentos
contendo esteroides anabolizantes utilizando a espectroscopia de
RMN ^1H / Marcos Vinícius de Moura Ribeiro. –
Araraquara : [s.n.], 2018
176 f. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto
de Química
Orientador: Leonardo Pezza

1. Ressonância magnética nuclear. 2. Adulterações. 3. Bebidas
energéticas. 4. Esteroides anabólicos. 5. Cafés. I. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: "Desenvolvimento de métodos analíticos para a avaliação da qualidade de cafés torrados, bebidas energéticas e medicamentos contendo esteroides anabolizantes utilizando a espectroscopia de RMN ^1H "

AUTOR: MARCOS VINÍCIUS DE MOURA RIBEIRO

ORIENTADOR: LEONARDO PEZZA

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em QUÍMICA, pela Comissão Examinadora:


Prof. Dr. LEONARDO PEZZA
Departamento de Química Orgânica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara


Prof^a. Dr^a. EDILENE CRISTINA FERREIRA
Departamento de Química Analítica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara


Prof. Dr. DANILO LUIZ FLUMIGNAN
Campus de Matão / Instituto Federal de São Paulo - IFSP - Matão


Prof. Dr. ARISTEU GOMES TININIS
Campus de Matão / Instituto Federal de São Paulo - IFSP - Matão


Prof^a. Dr^a. ADRIANA VITORINO ROSSI
Departamento de Química Analítica / Instituto de Química - UNICAMP - Campinas

Araraquara, 20 de abril de 2018

DADOS CURRICULARES

1. Dados Pessoais

Nome: Marcos Vinícius de Moura Ribeiro

Data de Nascimento: 17 de março de 1990

Naturalidade: Picos - PI

Nacionalidade: Brasileiro

Filiação: Pai: Pedro Ribeiro Neto; Mãe: Evangelina Borges de Moura Ribeiro

Nome em citações bibliográficas: RIBEIRO, M. V. M.; DE MOURA RIBEIRO, MARCOS VINÍCIUS; RIBEIRO, MARCOS VINÍCIUS DE MOURA.

Endereço Profissional

Departamentos de Química Analítica e Química Orgânica, Instituto de Química de Araraquara, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP. Rua Prof. Francisco Degni, 55, Bairro Quitandinha, CEP: 14800-060 - Araraquara, SP.

2. Formação Acadêmica

2014-Atual: Doutorado em Química

Área de Concentração: Química Analítica, RMN, Desenvolvimento e Validação de Métodos.

Universidade Estadual Paulista - Instituto de Química de Araraquara, Araraquara-SP.

Título da Tese: Desenvolvimento de métodos analíticos para a avaliação da qualidade de cafés torrados, bebidas energéticas e medicamentos contendo esteroides anabolizantes utilizando a espectroscopia de RMN ¹H.

Orientadora: Prof. Dr. Leonardo Pezza.

Bolsista: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES.

2012-2014: Mestrado em Química

Área de Concentração: Química Analítica, Desenvolvimento e Validação de Métodos.

Universidade Federal do Piauí - UFPI, Teresina-PI.

Título da Dissertação: Desenvolvimento e validação de métodos para a determinação de ácido fólico em formulações farmacêuticas por espectrofotometria derivativa.

Orientadora: Profa. Dra. Graziella Ciaramella Moita.

Bolsista: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq.

2008-2011: Licenciatura Plena em Química

Área de Concentração: Química Analítica, Métodos ópticos de análises, Emissão Atômica.

Universidade Federal do Piauí - UFPI, Teresina-PI.

Título da Monografia: Determinação da concentração de cromo em carnes de frango alimentados com ração suplementada.

Orientadora: Profa. Dra. Naise Mary Caldas Silva.

Bolsista: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq.

3. Produção Bibliográfica

Artigos completos submetidos, aceitos e publicados em periódicos

RIBEIRO, M.V.M.; BORALLE, N.; FELIPPE, L. G.; PEZZA, H.R.; PEZZA, L. ¹H NMR determination of adulteration of anabolic steroids in seized drugs. *Steroids* (Submetido).

RIBEIRO, M.V.M.; BORALLE, N.; PEZZA, H.R.; PEZZA, L. Authenticity assessment of anabolic androgenic steroids in counterfeit drugs by ¹H NMR. *Analytical Methods* v. 10, p. 1140-1150, 2018.

LOPES, F. C. C.; FONSECA, L.; MOITA, G. C.; RIBEIRO, M. V. M. Development and validation of methods using derivative spectrophotometry for determination of dipyrone in pharmaceutical formulations. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research* v. 9 (6), p. 1000-1010, 2018.

TOCI, A.T.; RIBEIRO, M.V.M.; TOLEDO, P.R.A.B.; BORALLE, N.; PEZZA, H.R.; PEZZA, L. Fingerprint and authenticity of Brazilian roasted coffees by ¹H NMR. *Food Science and Biotechnology*, v. 27 (1), p. 19-26, 2018.

RIBEIRO, M. V. M.; BORALLE, N.; PEZZA, H. R.; PEZZA, L.; TOCI, A. T. Authenticity of roasted coffee using ¹H NMR spectroscopy. *Journal of Food Composition and Analysis*, v. 57, p. 24-30, 2017.

RIBEIRO, M. V. M.; MELO, I. S.; LOPES, F. C. C.; MOITA, G. C. Development and validation of a method for the determination of folic acid in different pharmaceutical formulations using derivative spectrophotometry. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 52, p. 741-750, 2016.

Resumos publicados em anais de congressos

RIBEIRO, M. V. M.; BORALLE, N.; PEZZA, H. R.; PEZZA, L.; TOCI, A. T. Authenticity of Roasted Coffee using ^1H NMR Spectroscopy. In: *The Food Factor I Barcelona Conference*, 2016, Barcelona - Espanha.

RIBEIRO, M. V. M.; BORALLE, N.; PEZZA, H. R.; PEZZA, L. Avaliação da qualidade de medicamentos contendo esteroides anabolizantes utilizando a espectroscopia de RMN ^1H . In: *18º Encontro Nacional de Química Analítica*, 2016, Florianópolis - SC.

RIBEIRO, M. V. M.; CATELANI, T. A.; PEZZA, H. R.; PEZZA, L.; TOCI, A. T. Estudo da adulteração de cafés torrados e moídos utilizando a RMN ^1H aliada a quimiometria. In: *18º Encontro Nacional de Química Analítica*, 2016, Florianópolis - SC.

RIBEIRO, M. V. M.; TOCI, A. T.; PEZZA, H. R.; PEZZA, L. Evaluation of authenticity by ^1H NMR of brazilian commercial coffee blends. In: *38ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química*, 2015, Águas de Lindóia - SP.

RIBEIRO, M. V. M.; MELO, I. S.; LOPES, F. C. C.; MOITA, G. C. Utilização da espectrofotometria derivativa para a determinação de ácido fólico em diferentes formas farmacêuticas. In: *67ª Reunião Anual da SBPC*, 2015, São Carlos - SP.

LOPES, F. C. C.; RIBEIRO, M. V. M.; FONSECA, L.; MOITA, G. C. Desenvolvimento e validação de métodos para a determinação de dipirona em formulações farmacêutica por espectrofotometria derivativa. In: *67ª Reunião Anual da SBPC*, 2015, São Carlos - SP.

ALONSO, G. G.; RIBEIRO, M. V. M.; TOLEDO, P. R. A. B.; MILANI, M. I.; PEZZA, H. R.; PEZZA, L. Desenvolvimento de uma metodologia analítica ambientalmente mais benigna na determinação de iodato em sais de cozinha por spot test-reflectância difusa. In: *55º Congresso Brasileiro de Química*, 2015, Goiânia - GO.

ALONSO, G. G.; RIBEIRO, M. V. M.; TOLEDO, P. R. A. B.; PEZZA, H. R.; PEZZA, L. Desenvolvimento de metodologia analítica ambientalmente benigna para a determinação de iodato em sal destinado ao consumo humano. In: XXVII Congresso de Iniciação Científica da UNESP, 2015, Araraquara - SP.

RIBEIRO, M. V. M.; MELO, I. S.; MOITA, G. C. Desenvolvimento e validação de método para a determinação de ácido fólico em formulações farmacêuticas por espectrofotometria derivativa. In: 17º Encontro Nacional de Química Analítica, 2013, Belo Horizonte - MG.

AGUIAR, R. L. R.; CALDAS, N. M.; RIBEIRO, M. V. M.; MENEZES, E. A. Avaliação do teor de metais em amostras de carne de frango. In: 52º Congresso Brasileiro de Química, 2012, Recife - PE.

RIBEIRO, M. V. M.; ROQUE, A. K. L.; VIEIRA, E. C.; CALDAS, N. M. Determinação da concentração de cromo na carne de frango de corte alimentados com ração suplementada. In: 4º Congresso Norte-Nordeste de Química e 2º Encontro Norte-Nordeste de Ensino de Química, 2011, Natal - RN.

ROQUE, A. K. L.; RIBEIRO, M. V. M.; VIEIRA, E. C. Avaliação da concentração de Fe e Cu em carne de caprinos. In: 4º Congresso Norte-Nordeste de Química e 2º Encontro Norte-Nordeste de Ensino de Química, 2011, Natal - RN.

LIMA, M. G.; RIBEIRO, M. V. M.; MIRANDA, M. O.; OLIVEIRA, A. L. N. F.; CARVALHO, A. D. F. Análise de água do rio Poti, uma atividade de campo como estratégia no ensino de química e educação ambiental. In: 4º Congresso Norte-Nordeste de Química e 2º Encontro Norte-Nordeste de Ensino de Química, 2011, Natal - RN.

MIRANDA, M. O.; RIBEIRO, M. V. M.; LIMA, M. G.; FERNANDES, K. A.; SILVA, F. I.; ALVES, M. J.; OLIVEIRA, A. L. N. F. Proposta de jogos didáticos para um melhor aprendizado no ensino de química. In: 4º Congresso Norte-Nordeste de Química e 2º Encontro Norte-Nordeste de Ensino de Química, 2011, Natal - RN.

ROQUE, A. K. L.; RIBEIRO, M. V. M.; FERNANDES, I. A.; MENEZES, E. A.; VIEIRA, E. C. Avaliação da concentração de Al em água fervida utilizando ebulidor. In: XX Seminário de Iniciação Científica da UFPI, 2011, Teresina - PI.

Participação em Eventos e Congressos

- 1º Escola de RMN da AUREMN, 2017 (São Carlos-SP).
- 18º Encontro Nacional de Química Analítica, 2016 (Florianópolis-SC).
- 38ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2015 (Águas de Lindóia-SP).
- 67ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência, 2015 (São Carlos-SP).
- II Workshop: Ano Internacional da Luz - IYL, 2015 (Araraquara-SP).
- I Workshop: Ano Internacional da Luz - IYL 2015, 2015 (Araraquara-SP).
- 1º UNESP NMR Symposium - Recent Advances in NMR Spectroscopy: A Powerful Tool for Fundamental and Applied Research, 2014 (Araraquara-SP).
- I Fórum de Licenciatura da UFPI: Desafios e perspectivas da formação docente, 2012 (Teresina-PI).
- 4º Congresso Norte Nordeste de Química, 2011 (Natal-RN).
- 2º Encontro Norte-Nordeste de Ensino de Química, 2011 (Natal-RN).
- 1º Congresso Químico do Brasil, 2010 (João Pessoa-PB).
- I Encontro de Iniciação à Docência - I ENID, 2010 (Teresina-PI).
- II Encontro dos Estudantes de Química do Piauí, 2010 (Teresina-PI).
- XIX Seminário de Iniciação Científica - UFPI, 2010 (Teresina-PI).
- I Encontro dos Estudantes de Química do Piauí, 2009 (Teresina-PI).

*Aos meus pais Pedro e Evangelina por todo
amor, dedicação e confiança.*

Amo vocês.

Agradecimentos

Quero agradecer, em primeiro lugar, aos meus pais, Pedro e Evangelina por serem meu porto seguro, exemplos a serem seguidos, e por estarem sempre ao meu lado me apoiando em todas as decisões.

Aos meus irmãos Marcelo e Michellys, pela paciência e companheirismo em todos os momentos. Aos meus sobrinhos: Glória Stephanny, Maria Alice e Gabriel pelos momentos de descontração nas horas vagas.

Aos meus familiares de São Paulo, principalmente a minha tia Francisca, por ter sido minha segunda mãe em São Paulo.

Ao meu orientador Prof. Dr. Leonardo Pezza, pelos ensinamentos, confiança e incentivo durante a orientação, que tornaram possível a conclusão de mais essa etapa.

Às professoras Aline Toci e Helena Pezza pela co-orientação e contribuições dadas durante a execução do trabalho.

Aos técnicos de laboratório Nivaldo Boralle e Lucinéia pela imensa ajuda no desenvolvimento do trabalho.

Ao meu grande amigo Paulo Bueno por todo companheirismo, momentos de descontração, e por me mostrar o significado de amizade verdadeira. Valeu Paulete...(risos)

Aos meus professores da UFPI e UNESP pelos ensinamentos, confiança depositada e pelo incentivo durante toda minha caminhada acadêmica.

Ao professor Aristeu e a Dra. Lucineia pelas sugestões e contribuições dadas no exame de qualificação.

À polícia federal, em especial a juíza Caroline Scofield Amaral, pela disponibilização das amostras de esteroides anabolizante.

Aos meus amigos ZeroOito (UFPI) pela parceria e eterna amizade nesses dez anos, em especial a Mariane, Ana Kledna, Wiury, Cintia, Armenio, Raquel, Suyanne, Amanda e Rusbene.

Aos meus colegas de grupo de pesquisa e companheiros de jornada: Paulo, Eduardo, Maria Isabel, Luís, Tiago, João, Cintia, Dayanna, Michael e Mayara, pelos ensinamentos e amizade

À todos os amigos que fiz em Araraquara, principalmente: Luiz, Ronaldíneo, Tiago, Nerilson, Jader, João Carlos, Igor e Ronaldo. Vocês foram minha família em Araraquara.

Aos amigos de Teresina: Cláudio, Cesinha, Eduardo, Joel e Junior Soares, pelo carinho e amizade. Minhas visitas a Teresina não seriam iguais sem vocês.

Aos membros da banca examinadora por se disponibilizarem gentilmente para a avaliação desse trabalho.

Por fim, ao órgão de fomento à pesquisa CAPES pela bolsa de doutorado concedida.

O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.”

(José de Alencar)

RESUMO

A espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) é uma técnica analítica sofisticada e poderosa com uma variedade de aplicações em diferentes campos da pesquisa científica, principalmente na área farmacêutica e alimentícia. Tornou-se nos últimos anos uma das mais potentes e versáteis técnicas para a análise qualitativa e quantitativa tanto para os produtos naturais quanto para as misturas complexas. A autenticidade de alimentos e medicamentos tem sido uma preocupação constante em todo o mundo devido, principalmente, os potenciais riscos à saúde dos consumidores e danos econômicos significativos causados por fraudes e adulterações. O objetivo principal deste trabalho foi avaliar a autenticidade de cafés torrados, bebidas energéticas e medicamentos contendo esteroides anabolizantes, utilizando a RMN. As medidas espectroscópicas em RMN ^1H foram realizadas em um espectrômetro de 600 MHz. Para as análises de cafés torrados, os métodos desenvolvidos, permitiram a discriminação (origem geográfica e adulteração) de cada tipo de café analisado, além de apontar as principais diferenças em suas composições. Os modelos quimiométricos de análise de componentes principais (PCA) e análise discriminante (DA), foram utilizadas para a diferenciação das amostras analisadas. A rapidez com que os resultados puderam ser obtidos e a não exigência de um pré-tratamento da amostra, evitando alterações na composição da mesma, tornou essa ferramenta (RMN aliada a quimiometria), muito atrativa, apresentando resultados concordantes com os obtidos por metodologia oficial (microscopia óptica). Já para o estudo da autenticidade de esteroides anabolizante, foram avaliadas 52 amostras de diversos princípios ativos. Do total de amostras analisadas, 80% apresentou algum tipo de adulteração (incluindo a presença ou ausência de substâncias não declaradas no rótulo e percentual de ingrediente ativo abaixo do informado na embalagem). Todos os métodos desenvolvidos foram validados de acordo com os parâmetros da ANVISA, e apresentaram limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) variando entre 0,18-0,62 e 0,98-2,35 mg mL⁻¹, respectivamente. Nos ensaios de precisão, o desvio padrão relativo (DPR) intra-dia variou de 1,56 a 4,22% e o DPR inter-dia de 2,19 a 4,73%. Os valores de recuperação variaram de 95,2% a 104,0%. Para as medidas quantitativa foram avaliadas a determinação em RMNq via padrão interno (dimetil sulfona) e por calibração externa (via Electronic Reference to access in vivo Concentrations - ERECTIC 2). A comparação dos resultados obtidos pelo método desenvolvido com os métodos de referência (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência - CLAE), demonstram que ambos foram estatisticamente concordantes. Por fim, para as análises de bebidas enérgicas, a técnica de RMN foi utilizada para a quantificação simultânea de cafeína e taurina, a fim de verificar, se os níveis no produto final estavam de acordo com os limites legais e com o teor apresentado no rótulo do produto. Das 15 amostras analisadas, 6 apresentaram uma quantidade de taurina inferior a declarada no rótulo do produto, enquanto que para cafeína 5 amostras apresentaram quantidade inferior à declarada na embalagem, estando em desacordo com a legislação brasileira. Os métodos desenvolvidos para determinação de cafeína e taurina foram validados apresentando excelentes resultados e posteriormente foram comparados a métodos disponíveis na literatura.

Palavras-Chaves: RMN ^1H . Autenticidade. Validação. Café. Esteroides anabolizantes. Bebidas energéticas.

ABSTRACT

Nuclear Magnetic Resonance (NMR) spectroscopy is a sophisticated and powerful analytical technique with a variety of applications in different fields of scientific research, mainly in the pharmaceutical and food sciences. It has become in recent years one of the most powerful and versatile techniques for qualitative and quantitative analysis for both natural products and complex mixtures. The authenticity of food and medicines has been a worldwide concern, mainly due to the potential health risks to consumers and significant economic damage caused by fraud and adulteration. The authenticity of food and medicines has been a worldwide concern, mainly due to the potential health risks to consumers and significant economic damage caused by fraud and adulteration. The main objective of this work was to evaluate the authenticity of roasted coffees, energy drinks and drugs containing anabolic steroids, using the NMR. The ^1H NMR spectroscopic measurements were performed using a 600 MHz spectrometer. For the analysis of roasted coffee, the methods developed allowed the discrimination (geographical origin and adulteration) of each type of coffee analyzed, besides pointing out the main differences in their compositions. The principal component analysis (PCA) and discriminant analysis (DA) models were used to differentiate the analyzed samples. The rapidity with which the results could be obtained and the non-requirement of a pre-treatment of the sample, avoiding changes in the composition of the sample, made this tool (NMR with chemometrics) very attractive, presenting results consistent with those obtained by official methodology (optical microscopy). For the study of anabolic steroid authentication, 52 samples of several active principles were evaluated. Of the total samples analyzed, 80% showed some kind of adulteration (including the presence or absence of undeclared substances on the label and percentage of active ingredient below that reported on the package). All the methods developed were validated according to ANVISA parameters, and showed limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) ranging from 0.18-0.62 to 0.98-2.35 mg mL⁻¹, respectively. In the precision assays, the intra-day relative standard deviation (RSD) ranged from 1.56 to 4.22% and the inter-day RSD from 2.19 to 4.73%. Recovery values ranged from 95.2% to 104.0%. For the quantitative measurements the determination of the qNMR in the internal standard (dimethyl sulfone) and external calibration (by Electronic Reference to access in vivo Concentrations - ERECTIC 2). The comparison of the results obtained by the method developed with the reference methods (High Performance Liquid Chromatography - HPLC), show that both were statistically concordant. Finally, for the analysis of energetic drinks, NMR technique was used for the simultaneous quantification of caffeine and taurine in order to verify if the levels in the final product were in compliance with the legal limits and with the content presented on the label of product. Of the 15 samples analyzed, 6 presented a lower amount of taurine than the one declared on the product label, while for caffeine 5 samples presented less than the declared amount on the packaging, being in disagreement with the Brazilian legislation. The methods developed for determination of caffeine and taurine were validated with excellent results and later compared to methods available in the literature.

Keywords: ^1H NMR. Authenticity. Validation. Coffee. Anabolic steroids. Energy drinks

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Diagrama dos spins no estado degenerado e após a aplicação do campo B_0	25
Figura 2 -	Movimento de giro (spin) em torno do seu próprio eixo	26
Figura 3 -	Comportamento da magnetização resultando (M_0) durante aplicação do pulso B_1	26
Figura 4 -	Magnetização resultante (M_0): no eixo z, em equilíbrio e após o pulso de 90°	33
Figura 5 -	Sequência de pulsos da pré-saturação, $D1$ = tempo de espera da relaxação, $P1$ = largura do pulso e AQ = tempo de aquisição	35
Figura 6 -	Representação de um gráfico de <i>scores</i> e <i>loadings</i>	39
Figura 7 -	Principais regiões produtoras de cafés do Brasil	48
Figura 8 -	Impressão digital do espectro de RMN 1H (600 MHz) de café torrado brasileiro (<i>Gourmet</i>), em D_2O	60
Figura 9 -	Estruturas de alguns dos compostos identificados nos cafés	61
Figura 10 -	Principais funções discriminantes, com valores de centróide (Y_1 e Y_2)	64
Figura 11 -	<i>Fingerprints</i> em RMN 1H de café torrado (A), cevada (B), soja (C), milho (D) e cascas de café (E)	68
Figura 12 -	Principais sinais marcadores de adulterantes obtidos por sobreposição com o <i>fingerprint</i> de café torrado: cevada (A), soja (B), milho (C), e casca de café (D)	69
Figura 13 -	Intensidades de sinais marcadores de acordo com a porcentagem de adulterantes: cevada (A) e soja (B)	70
Figura 14 -	Sobreposição dos espectros de RMN 1H para o café puro torrado (A), milho (B), e uma amostra de café comercial (C)	71
Figura 15 -	Gráfico de <i>scores</i> obtidos pela $PC1$ X $PC2$	72
Figura 16 -	Gráficos de <i>loadings</i> obtidos pela $PC1$ e $PC2$	73
Figura 17 -	Estrutura das moléculas: (A) - ciclopentanoperhidrofenantreno, (B) – colesterol	78
Figura 18 -	Estrutura da molécula de testosterona	78
Figura 19 -	Espectro de RMN 1H , 600 MHz, do Propionato de testosterona (PRT), em $CDCl_3$	91
Figura 20 -	Espectro de RMN 1H , 600 MHz, da Metiltestosterona (MET), em $CDCl_3$...	91
Figura 21 -	Espectro de RMN 1H , 600 MHz, do Acetato de metenolona (MEL), em $CDCl_3$	92
Figura 22 -	Espectro de RMN 1H , 600 MHz, da Oxandrolona (OXA), em $CDCl_3$	93
Figura 23 -	Espectro de RMN 1H , 600 MHz, do Decanoato de Nandrolona (DEN), em $CDCl_3$	93
Figura 24 -	Espectro de RMN 1H , 600 MHz, do Estanozolol (ESZ), em $CDCl_3$	94
Figura 25 -	Espectros RMN 1H , 600 MHz, amostra PRT-1 e PRT padrão, em $CDCl_3$...	95

Figura 26 -	Espectros RMN ¹ H, 600 MHz, amostras: PRT-1, PRT-2, PRT-3, PRT-4, em CDCl ₃	96
Figura 27 -	Espectros RMN ¹ H, 600 MHz, amostras UNT (1, 2, 3 e 4), em CDCl ₃	97
Figura 28 -	Espectros RMN ¹ H, 600 MHz, amostra ENT-1 e padrão de PRT, em CDCl ₃	98
Figura 29 -	Espectros RMN ¹ H, 600 MHz, amostras OXA (1, 2, 3, 4, 5) e padrão de OXA, em CDCl ₃	99
Figura 30 -	Espectros RMN ¹ H, 600 MHz, amostras OXA (6, 7, 8, 9) e padrão de OXA, em CDCl ₃	101
Figura 31 -	Espectros RMN ¹ H, 600 MHz, amostras OXA (6, 7, 8, 9) e padrão de ESZ, em CDCl ₃	102
Figura 32 -	Espectros RMN ¹ H, 600 MHz, amostras TRA (1, 2, 3, 4), em CDCl ₃	103
Figura 33 -	Espectros RMN ¹ H, 600 MHz, amostras MDT (1, 2, 3, 4), em CDCl ₃	104
Figura 34 -	Espectros RMN ¹ H, 600 MHz, amostras DEN (1, 2), em CDCl ₃	105
Figura 35 -	Espectros RMN ¹ H, 600 MHz, amostras DEN-2, ENT-1 e óleo de amendoim, em CDCl ₃	106
Figura 36 -	Espectros RMN ¹ H, 600 MHz, amostras CIT (1, 2, 3, 4, 5), em CDCl ₃	108
Figura 37 -	Espectros RMN ¹ H, 600 MHz, amostras PRD (1, 2, 3, 4), em CDCl ₃	109
Figura 38 -	Espectros RMN ¹ H, 600 MHz, amostras OXI (1, 2, 3, 4), em CDCl ₃	110
Figura 39 -	Espectros RMN ¹ H, 600 MHz, amostra DURA-1, em CDCl ₃	111
Figura 40 -	Espectros RMN ¹ H, 600 MHz, amostra DURA-2, em CDCl ₃	112
Figura 41 -	Espectros RMN ¹ H, 600 MHz, amostras DURA (2, 3, 4 e 5), em CDCl ₃	113
Figura 42 -	Espectros RMN ¹ H, 600 MHz, amostras ESZ (1, 2, 3, 4, 5 e 6) e padrão de ESZ, em CDCl ₃	114
Figura 43 -	Espectros RMN ¹ H, 600 MHz, amostra ESZ-7 e padrão de ESZ, em CDCl ₃	115
Figura 44 -	Espectros RMN ¹ H, 600 MHz, amostras ESZ (7, 8, 9 e 10), em CDCl ₃	116
Figura 45 -	Espectro de RMN ¹ H DOSY 2D, 600 MHz, amostras ESZ (7, 8, 9 e 10), em CDCl ₃	117
Figura 46 -	Identificação em RMN ¹ H dos compostos encontrados nas amostras de ESZ (7, 8, 9 e 10)	118
Figura 47 -	Cromatograma obtido por CG-EM da amostra de ESZ-7	120
Figura 48 -	Cromatograma obtido por CG-EM da amostra de Viagra®	120
Figura 49 -	Espectro de massa da amostra de ESZ-7 (T _R =60,77) referente ao fenilpropionato de nandrolona.....	121
Figura 50 -	Espectro de massa da amostra de ESZ -7 (T _R =70,15) referente ao citrato de sildenafil.....	121
Figura 51 -	Espectros de RMN ¹ H, 600 MHz, das misturas de esteróides anabolizantes (padrões) e dimetil sulfona (padrão), CDCl ₃	123

Figura 52 -	Curvas analíticas para a determinação por CLAE: A) propionato de testosterona, B) oxandrolona, C) decanoato de nandrolona, D) estanozolol. Número de repetições para cada ponto da curva (n = 3)	131
Figura 53 -	Curvas analíticas para as determinações em RMN: A) estanozolol, B) oxandrolona, C) propionato de testosterona, D) decanoato de nandrolona. Número de repetições para cada ponto da curva (n = 3)	132
Figura 54 -	Cromatogramas das amostras por CLAE: A) OXA-1, B) OXA-6, C) ESZ-1, D) ESZ-2, E) PRT-1, F) DEN-1	133
Figura 55 -	Cromatogramas das amostras por CLAE: A) DURA-1 e B) DURA-2	134
Figura 56 -	Estrutura da molécula de cafeína	141
Figura 57 -	Estrutura da molécula de taurina	142
Figura 58 -	Perfil em RMN ¹ H, 600 MHz, da amostra 11 (energético), em D ₂ O	148
Figura 59 -	Perfil em RMN ¹ H, 600 MHz, das amostras 12 e 1 (energéticos), em D ₂ O, pH 11	149
Figura 60 -	Espectros em RMN ¹ H, 600 MHz, referentes a variação do sinal da taurina com o aumento do pH	150
Figura 61 -	Espectros em RMN ¹ H, 600 MHz, referentes a variação do sinal da cafeína com o aumento do pH	151
Figura 62 -	Espectros em RMN ¹ H, 600 MHz, amostra 1, D ₂ O, em pH 11	152
Figura 63 -	Curvas analíticas obtidas no ensaio de linearidade, A - taurina e B - cafeína. Número de repetições para cada ponto da curva (n = 3)	153
Figura 64 -	Curvas analíticas para a determinação por CLAE: A) Cafeína B) Taurina. Número de repetições para cada ponto da curva (n = 3)	158
Figura 65 -	Cromatogramas da amostra 4 por CLAE: A) Cafeína e B) Taurina	159

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	- Propriedades espectrais dos padrões internos em diferentes solventes	30
Tabela 2	- Lista das amostras (<i>Coffea arabica</i>) analisadas	55
Tabela 3	- Lista de amostras de cafés comerciais e adulterantes analisados	56
Tabela 4	- Coeficientes não padronizados das três funções discriminantes canônicas para classificação de origens geográficas	65
Tabela 5	- Desempenho da classificação geral (em %) do modelo DA, com e sem validação cruzada (VC), para estudo de diferenciação de quatro estados brasileiros (grandes produtores de café)	67
Tabela 6	- Comparação da metodologia ABIC com a metodologia proposta	74
Tabela 7	- Resumo das principais características dos esteroides anabolizantes amplamente utilizados no mercado nacional	77
Tabela 8	- Amostras de esteroides anabolizantes analisadas	84
Tabela 9	- Valores de deslocamento químico em RMN ¹ H dos compostos encontrados nas amostras de ESZ (7, 8, 9, 10)	118
Tabela 10	- Parâmetros analíticos de calibração para a quantificação dos analitos	125
Tabela 11	- Análise de precisão intra-dia e inter-dia para os métodos proposto	126
Tabela 12	- Resultados dos testes de exatidão para as amostras em três níveis de concentração (50, 100 e 150%)	127
Tabela 13	- Valores obtidos no estudo da robustez	128
Tabela 14	- Comparação do Método 1 (determinação direta), Método 2 (curva analítica) e Método 3 (métodos comparativos por CLAE)	130
Tabela 15	- Comparação entre métodos de determinação direta (Método 1) e pelo método via ERETIC 2 (Método 4)	136
Tabela 16	- Métodos da literatura para determinação de cafeína e taurina em bebidas energéticas	144
Tabela 17	- Amostras de bebidas energéticas analisadas	146
Tabela 18	- Análise de precisão intra-dia e inter-dia para o método proposto	154
Tabela 19	- Resultados dos testes de exatidão para as amostras de energéticos em três níveis de concentração (50, 100 e 150%)	155
Tabela 20	- Valores obtidos no estudo da robustez nas amostras de energéticos	156
Tabela 21	- Comparação dos métodos para a determinação de cafeína e taurina em bebidas energéticas	157

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ABIC** - Associação Brasileira da Indústria de Café
- ACQs** - Ácidos cafeoilíquicos
- AIDS** - Acquired Immunodeficiency Syndrome
- ANVISA** - Agência Brasileira de Vigilância Sanitária
- AQ** - Tempo de aquisição
- CAF** - Cafeína
- CDCl₃** - Clorofórmio deuterado
- CDPC** - Conselho Deliberativo de Política do Café
- CG-EM** - Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas
- CIT** - Cipionato de Testosterona
- CLAE** - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
- D₂O** - Água deuterada
- D1** - Tempo de espera da relaxação
- DA** - Discriminant Analysis
- DEN** - Decanoato de nandrolona
- DMSO** - Dimetilsulfóxido
- DMSO₂** - Dimetil Sulfona
- DNFB** - 2,4-dinitrofluorobenzeno
- DOC** - Denominação de Origem Controlada
- DOSY** - Diffusion Ordered Spectroscopy
- DPR** - Desvio padrão relativo
- DURA** - Sais de testosterona
- EAA** - Esteróide anabolizante androgênico
- ENT** - Enantato de testosterona
- ERETIC** - Electronic reference to access in vivo concentrations
- ESZ** - Estanozolol
- FID** - Free Induction Decay
- HIV** - Human Immunodeficiency Virus
- ICH** - International Conference on Harmonisation
- ICO** - International Coffee Organization
- IGP** - Indicação Geográfica Protegida

LB - Lorentzian broadening
MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MCR - Material de Referência Certificado
MDT - Metandrostenolona
MEL - Metenolona
MET – Metiltestosterona
NIST - National Institute of Standards and Technology
NS - Número de scans
OMS - Organização Mundial de Saúde
OXA - Oxandrolona
OXI - Oximetolona
P1- Largura do pulso
PCA - Principal Component Analysis
PDR - Propionato de drostonolona
PF - Polícia Federal
PQC - Programa de Qualidade do Café
PRT - Propionato de testosterona
PULCON - Pulse length based concentration determination
PVA - Preto, Verde e Ardido
PVDF - Fluoreto de polivinilideno
RDC - Resolução de Diretoria Colegiada
RG - Receiver Gain
RMN - Ressonância Magnética Nuclear
RMNq - Ressonância Magnética Nuclear Quantitativa
SW - Spectral Window
S/R - Sinal/Ruído
T1 - Tempo de relaxação longitudinal
T2 - Tempo de relaxação transversal
TAU - Taurina
TD - Número de pontos
TMS - Tetrametilsilano
TRA - Acetato de trembolona
TSP - Ácido 3-(trimetilsilil)-propiónico-d4 deuterado
UNT - Undecanoato de testosterona

SUMÁRIO

1. Introdução	22
2. Referencial Teórico	25
2.1 Fundamentos da Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	25
2.2 Determinação quantitativa por RMN (RMNq)	28
2.3 Parâmetros necessários para análises em RMNq	33
2.4 Quimiometria na análise de alimentos	38
2.5 Validação Analítica	40
3. Objetivos	45
3.2 Geral	45
3.3 Específicos	45
Capítulo I - Avaliação da autenticidade de cafés torrados	46
1. Introdução	47
1.1 Produção de café	47
1.2 Qualidade e autenticidade de cafés torrados	48
1.3 Adulteração de cafés torrados	50
1.4 Análise quimiométrica e RMN ¹ H	53
2. Objetivos	54
3. Parte Experimental	54
3.1 Amostras analisadas	54
3.2 Torrefação das amostras	57
3.3 Extração das Amostras	57
3.4 Análise por RMN ¹ H	58
3.5 Análise Estatística	58
4. Resultados e Discussão	59
4.1 Trabalho 1: Impressão digital de cafés torrados brasileiros	59
4.2 Trabalho 2: Avaliação da adulteração de cafés torrados	67
5. Conclusões	74
Capítulo II - Autenticidade de medicamentos contendo esteroides anabolizantes	75
1. Introdução	76
1.1 Anabolizantes	76
1.2 Aspectos químicos dos esteroides anabolizantes	78
1.3 Falsificação de medicamentos.....	80
1.4 Métodos de determinação de medicamentos falsificados	81
2. Objetivos	83
3. Parte Experimental	83
3.1 Padrões e reagentes	83

3.2 Amostras	83
3.3 Análises por RMN ¹ H.....	85
3.4 Preparação de amostras comerciais.....	85
3.5 Determinação quantitativa (RMNq) e validação analítica	86
3.6 Métodos Comparativos	88
4. Resultados e Discussão	90
4.1 Caracterização em RMN ¹ H dos analitos.....	90
4.2 Análise das amostras comerciais.....	94
4.3 Obtenção das figuras de mérito.....	122
4.4 Determinação Quantitativa.....	129
5. Conclusões	137
Capítulo III - Determinação quantitativa de cafeína e taurina em bebidas energéticas	138
1. Introdução	139
1.1 Bebidas Energéticas	139
1.2 Cafeína	141
1.3 Taurina	142
1.4 Métodos de determinação de taurina e cafeínas em bebidas energéticas	143
2. Objetivos	145
3. Procedimento Experimental	145
3.1 Reagentes e Padrões analíticos.....	145
3.2 Preparo das amostras para análises por RMN ¹ H.....	145
3.3 Amostras Analisadas.....	146
3.4 Análises por RMN ¹ H.....	146
3.5 Métodos Comparativos	147
3.6 Validação Analítica	147
4. Resultados e Discussão	148
4.1 Variação do deslocamento químico em função do pH.....	150
4.2 Validação Analítica.....	152
4.3 Métodos comparativos	157
5. Conclusão.....	160
4. Conclusões Gerais	161
5. Referências Bibliográficas	162

1. Introdução

Nos últimos anos, as indústrias farmacêuticas e alimentícias deram saltos gigantescos em seu faturamento, diariamente são lançados novos produtos no mercado, mas associado a esse grande aumento, um mercado cresce em paralelo, o das falsificações e/ou adulterações.

A abertura de fronteiras em mercados comuns, a globalização e os diversos acordos comerciais entre nações têm facilitado o comércio de produtos e serviços no mundo. Mas apesar dessas atividades apresentarem grande vantagens econômicas, a abertura de fronteiras também tem permitido o aumento da comercialização de medicamentos falsificados, gerando um problema que atinge tanto países desenvolvidos quanto países em desenvolvimento. Consequentemente, a falta de fiscalização e os desequilíbrios existentes na distribuição de renda e no acesso aos cuidados de saúde, contribuem para a expansão desse comércio ilícito (1,2).

A utilização de medicamentos falsificados ou de baixa qualidade pode afetar o tratamento de pacientes, como por exemplo, a utilização de medicamento sem o princípio ativo ou com a quantidade diferente do desejado, influenciando diretamente no controle de suas enfermidades (3). A situação pode se torna ainda pior, quando os produtos são adulterados ou deliberadamente formulados utilizando substâncias industriais tóxicas, que não podem ser usadas na fabricação de medicamentos, causando danos ainda mais sérios aos pacientes ou até mesmo leva-los à morte (1,4).

Desde 1948, com a criação da Organização Mundial da Saúde (OMS), existe a preocupação com a qualidade dos medicamentos no âmbito internacional. Em vários documentos, são expressas recomendações para prevenção e combate a medicamentos falsificados, incluindo a cooperação interinstitucional e internacional (4,5).

Segundo o relatório divulgado pela OMS em 2015, um em cada dez medicamentos comercializados em países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento é de qualidade inferior ou falsificado. Esse número é bastante alarmante e chama atenção para um mercado clandestino que movimenta cerca de US\$ 30 bilhões por ano no mundo (4). No Brasil, as apreensões de remédios irregulares são frequentes, mas nenhum órgão envolvido nessa questão, como a Polícia Federal (PF) e a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), sabe informar qual o tamanho do problema (6). O mesmo relatório, afirma ainda que 19% dos produtos farmacêuticos vendidos no país são ilegais: ou são falsos ou adulterados, ou seja, ineficazes, ou roubados, o que na maioria dos casos quer dizer que podem ter sido violados ou estão com

validade vencida, por exemplo (6). O uso de tais produtos pode agravar doenças e levar à morte. Além do fato de alguns componentes utilizados no preparo dessas formulações adulteradas, provocarem alergias graves (4).

No Brasil, esses medicamentos, são facilmente vendidos em feiras, bancas de ambulantes, pela internet e, inclusive, nas farmácias. Esses produtos chegam ao Brasil vindos do Paraguai, China e Índia. Podendo vir prontos para o consumo ou ainda na matéria-prima (princípio ativo), que é manipulada em estabelecimentos clandestinos, sem a menor condição de higiene e qualidade, geralmente elaborada na dose errada, ou até mesmo, misturados a outras substâncias (7).

Segundo a ANVISA, entre os principais medicamentos falsificados vendidos no Brasil estão os esteroides anabolizantes, os medicamentos para disfunção erétil e os remédios para emagrecer. Mas também são encontradas falsificações de medicamentos para doenças no coração, hipertensão, malária e antibióticos (3,7). Vale ressaltar, que a falsificação de medicamentos e sua comercialização, tem se tornado uma atividade extremamente lucrativa, com risco menor de repressão pelas autoridades policiais em comparação ao tráfico de drogas e estando ligadas diretamente a organizações criminosas internacionais (8).

No setor alimentício as preocupações com a qualidade dos produtos vêm associada ao aumento do consumo de alimentos industrializados, visto que esses produtos perdem suas características morfológicas originais, desde a sua produção até o consumo final, exigindo testes de identificação cada vez mais rápidos, confiáveis e reprodutíveis. A confirmação da autenticidade de um alimento é necessária para assegurar o valor do produto, o cumprimento dos regulamentos de rotulagem, e proteger o consumidor de fraudes, que criam competições desleais e distorções de mercado, podendo ter impacto na economia local ou global. Além disso as fraudes são prejudiciais aos consumidores por razões relacionadas a intolerância ou alergia, religião, objeções étnicas ou culturais e requerimentos legais (9).

As fraudes em alimentos ocorrem por atuação de fatores circunstanciais ou deliberadamente provocados sobre os alimentos descaracterizando-nos do seu ponto de vista comercial ou biológico, tornando-os passíveis de restrições legais quanto ao consumo. As alterações, adulterações e falsificações realizadas com a finalidade de obtenção de maiores lucros, tratam-se de artifícios usados sem o consentimento oficial, resultado da modificação de um produto, visando lucro ilícito e que não fazem parte de uma prática universalmente aceita. Estas operações procuram ocultar ou mascarar as más condições estruturais e sanitárias dos produtos e atribuir-lhes requisitos que não possuem (10,11).

As adulterações em produtos alimentícios podem ocorrer de diversas formas, dentre elas, enzimáticas, químicas e microbiológicas. Podendo ser resultado de negligência, ignorância, desleixo ou desobediência às normas estabelecidas para o setor durante a fase de processamento, conservação ou armazenamento dos produtos (11,12).

É perceptível que as adulterações e/ou falsificações estão ficando cada vez mais sofisticadas, de difícil percepção, principalmente para os consumidores que são os maiores prejudicados com essas práticas. Conseqüentemente, um controle de qualidade seguro e confiável em produtos e/ou matérias-primas provenientes das indústrias farmacêuticas e alimentícias, tornam as análises de seus ativos e constituintes extremamente importantes para os fabricantes, bem como para os usuários desses produtos. Além disso, antes da comercialização, esses produtos precisam adquirir seus devidos registros perante aos órgãos regulamentadores e, para isso, uma série de estudos físico-químicos e toxicológicos devem ser realizados. Dentre os ensaios necessários, encontra-se a determinação quali/quantitativa do teor do ativo e de seus constituintes, sejam na matéria-prima ou no produto final (13).

Neste contexto, o desenvolvimento de novos métodos analíticos, ganha uma enorme importância na indústria, com a visão sempre voltada para o aumento da produtividade analítica, mantendo máxima seletividade, exatidão, precisão e rapidez. Dentre as técnicas instrumentais, que ganham bastante espaço atualmente na pesquisa sobre a qualidade de medicamentos e produtos alimentícios se destaca a Ressonância Magnética Nuclear (RMN), já que se trata de uma ferramenta espectroscópica poderosa para investigação de propriedades químicas e físicas em misturas complexas, tendo aplicação tanto na elucidação estrutural de compostos orgânicos como na sua quantificação, permitindo o desenvolvimento de métodos, rápidos, simples e não destrutivos. O uso de técnicas de pulsos e artifícios instrumentais, como a supressão de sinais, têm sido utilizado para melhorar a resolução dos espectros por RMN e eliminar problemas de sobreposição de sinais nas análises que apresentem espectros complexos. (14,15).

Nesse trabalho é proposto o uso da espectroscopia de RMN nas análises da autenticidade de cafés, anabolizantes e bebidas energéticas. Devido à natureza diversificada das amostras analisadas, dividiu-se o trabalho em três capítulos, que serão abordados nos tópicos seguintes.

2. Referencial Teórico

2.1 Fundamentos da Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

A espectroscopia de RMN é uma das técnicas mais utilizadas para a determinação da estrutura de moléculas orgânicas, tanto aquelas de baixo peso molecular, quanto as de alto peso molecular, como por exemplo as proteínas. Embora amplamente consagrada como instrumento de elucidação estrutural e para analisar a pureza de substâncias, apenas nos últimos 20 anos essa técnica tem ganhado espaço como ferramenta analítica, principalmente no Brasil onde estudos voltados para esse fim ainda são escassos (16).

A RMN é baseada na aplicação de forte campo magnético e pulsos de radiofrequência ao núcleo dos átomos. Quando o número de prótons e de nêutrons são ambos pares, essa combinação resulta num spin nuclear nulo e os núcleos são inativos em RMN, como no caso dos isótopos ^{16}O e ^{12}C . Já para núcleos com número atômico ou massa atômica ímpar, como ^1H e ^{13}C respectivamente, a presença de um campo magnético externo fará com que estes núcleos possuam um spin nuclear diferentes de zero (17). Os spins são núcleos magnéticos que na ausência de campo magnético se encontram no estado degenerado, ou seja, sem separação dos níveis de energia. Na presença de um campo magnético B_0 , essa degenerescência é quebrada e os spins se alinham de acordo com a direção do campo, resultando na separação dos níveis de Zeeman em dois níveis de energia, α e β , onde α representa o nível de menor energia por estar a favor do campo e β o nível de maior energia por estar contra o campo magnético (Figura 1) (18,19).

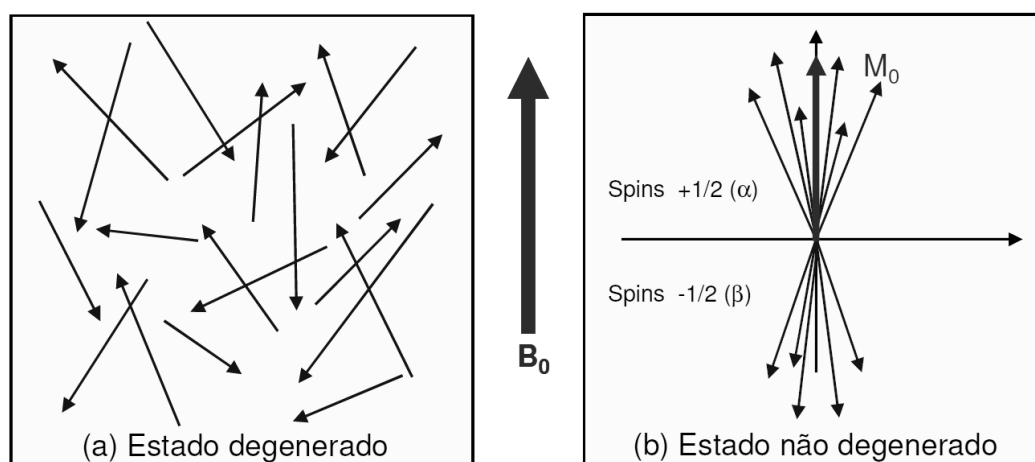


Figura 1 - Diagrama dos spins no estado degenerado e após a aplicação do campo B_0 .

Fonte: Adaptada de Silvia, 2007 (18).

Esse alinhamento dos spins é conhecido como magnetização. A Figura 1 mostra um diagrama com os spins degenerados (Figura 1a) e na presença de um campo magnético (Figura 1b). Neste último caso, pode-se observar claramente a separação dos níveis de Zeeman (α e β) (18).

Juntamente com o spin, o próton de hidrogênio possui outra propriedade chamada de momento magnético (μ), que faz com que o mesmo se comporte como um pequeno ímã ou um pequeno magneto (20). A Figura 2 apresenta o movimento giratório realizado pelo spin em torno do seu próprio eixo.

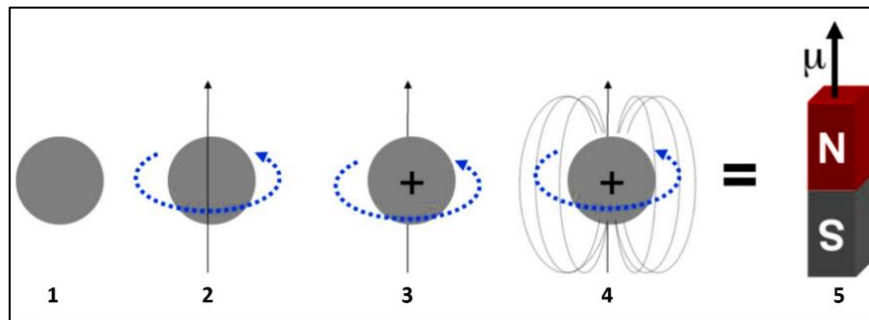


Figura 2 - Movimento de giro (spin) em torno do seu próprio eixo.

Fonte: Adaptada de Mazzola, 2018 (20).

Ao se submeter uma amostra em um campo magnético estático, o momento magnético nuclear (μ) adquire um movimento de precessão em torno de B_0 e esse movimento é análogo ao movimento de um pião ao redor do campo gravitacional da terra (Figura 3A). O fenômeno de RMN ocorre quando é incidido sobre a amostra um campo oscilante B_1 , com frequência igual à frequência de precessão, também conhecida como frequência de Larmor, fazendo com que os spins adquiram energia e mudem de estado (18,21) (Figura 3B).

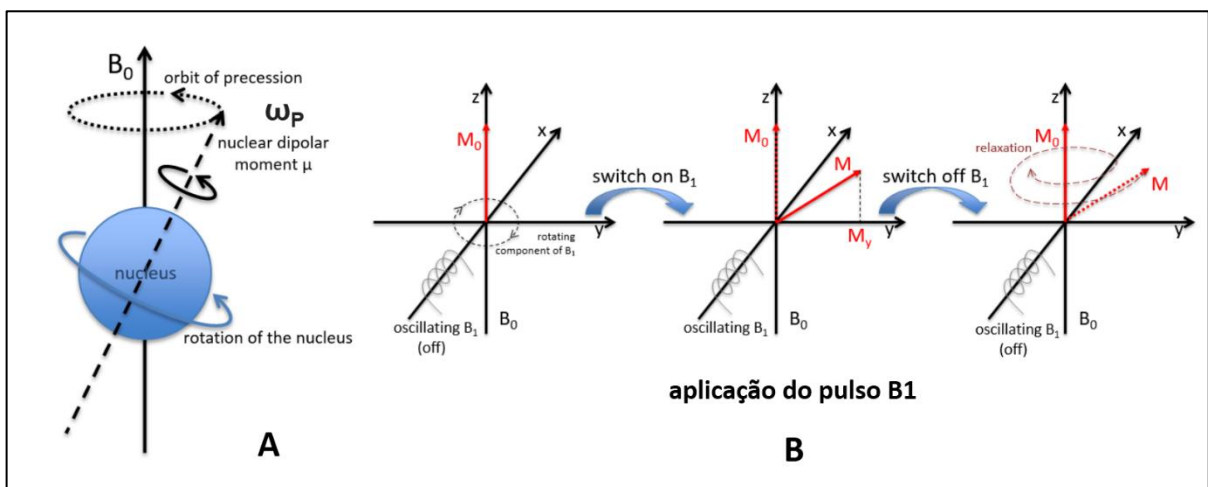


Figura 3 - Comportamento da magnetização resultante (M_0) durante aplicação do pulso B_1 .

Fonte: Adaptada de Gerard, 2018 (22).

Com a finalização da aplicação do campo magnético (B_1), a magnetização resultante (M_0) que foi alterada em módulo e orientação tende a voltar para o seu estado inicial de equilíbrio, passando a atuar no sistema o fenômeno da relaxação. Dois mecanismos distintos são envolvidos no processo de relaxação: relaxação spin-rede ou longitudinal, caracterizada por T_1 e a relaxação spin-spin ou transversal, caracterizada por T_2 (18). No entanto, mesmo falando em processos de relaxação distintos, T_1 e T_2 , é importante reconhecer que ambos os processos ocorrem simultaneamente, mas dependendo da amostra, em escalas de tempo diferentes (23)

O processo de relaxação longitudinal (T_1), consiste no restabelecimento da distribuição das populações dos níveis de energia Zeeman, ou seja, corresponde ao retorno das populações de spins ao equilíbrio inicial, por meio da perda de energia absorvida durante a excitação. Um tempo de relaxação longo significa que os núcleos interagem pouco com as vizinhanças e assim as trocas de energias ocorrem lentamente. No instante inicial ($t=0$) em que a amostra é colocada em um campo magnético estático B_0 , todos os níveis energéticos estão igualmente povoados e o sistema não se encontra em equilíbrio. Para atingir o equilíbrio, o sistema de spins diminui a intensidade e transfere o excesso de energia potencial magnética para a rede na forma de energia cinética molecular. Para que isso ocorra, é necessária uma interação entre o sistema de spins e a rede, sendo por isso que esse processo recebe esse nome. (18,21,24).

Já o processo de relaxação transversal (T_2) não está relacionado ao retorno da magnetização à condição de equilíbrio como no caso da longitudinal. Ele está relacionado com a perda de coerência da magnetização do plano xy devido à troca de energia entre os spins. A coerência de fase ocorre após a aplicação de B_1 e era de se esperar que o vetor M_0 retornasse coeso ao eixo Z , mas isto não ocorre pelo fato de M_0 ser constituído de vetores de núcleos individuais, que experimentam um campo magnético local ligeiramente diferente. Assim ocorre a perda de coerência de fase, após B_1 , que conduz a uma diminuição da magnetização resultante no plano transversal ($x-y$) (18,21,25).

O sinal resultante das relaxações, dos spins responsáveis por M_0 , gera o que se chama de FID (*Free Induction Decay*) que é o decaimento da magnetização detectado em função do tempo. É necessário um tratamento matemático, através da Transformada de Fourier, para que o FID seja convertido do domínio do tempo para o domínio da frequência gerando assim o espectro de RMN (18). Em análises quantitativas por RMN é primordial determinar o tempo de relaxação das substâncias que se desejam quantificar, para definir parâmetros experimentais, como o tempo de espera entre pulsos (*delay time*) e o correto valor de área de cada sinal (19,21,23).

2.2 Determinação quantitativa por RMN (RMNq)

Embora o emprego qualitativo das análises espectroscópicas por RMN seja mais difundido, seu uso para fins quantitativos, apesar da grande potencialidade, ainda é pouco explorado. A utilização da RMN como o propósito de quantificação, foi relatado pela primeira vez em 1963 por Jungnickel e Forbes (26), que demonstraram experimentalmente que a razão das áreas dos sinais de ^1H , em 26 substâncias orgânicas, correspondia à razão entre a quantidade de núcleos quimicamente diferentes. Simultaneamente, Hollis (27) analisou diferentes misturas conhecidas de aspirina, cafeína e fenacetina e observou uma relação quantitativa entre as áreas dos sinais de RMN ^1H e a porcentagem dessas substâncias nas misturas (13).

A relação fundamental mais importante das medidas de RMNq é que a área do sinal (A_S) de um espectro de RMN ^1H é diretamente proporcional ao número de hidrogênios (N_H) que absorvem energia na radiofrequência referente a este sinal, onde K_E é uma constante do espectrômetro (13,28,29):

$$A_S = K_E \times N_H$$

Para que essa relação seja verdadeira, é necessário que se respeitem certos parâmetros de aquisição e processamento dos espectros. Portanto, se um sinal de ressonância do analito de interesse não se sobrepõe aos sinais de outros constituintes da amostra, este pode ser usado para determinar a concentração do respectivo analito, desde que o número de prótons correspondente àquele sinal seja conhecido (30).

A quantificação por RMN, além de possibilitar uma fácil manipulação da amostra, traz como vantagens (15,16,31):

- Apresentar baixo tempo de análise, exigindo um mínimo de preparo de amostra, diferentemente dos outros métodos tradicionais;
- Funcionar como um detector universal para diversos compostos presentes na amostra, diferindo dos métodos cromatográficos convencionais que são otimizados para um determinado composto ou classe de compostos o que pode levar a omissão de substâncias cujas propriedades físico-químicas são bastante diferentes daquela para qual o método foi configurado;
- Ser uma técnica não destrutiva;
- Não requer derivatização da amostra antes;

- Dispensa isolamento do analito quando o mesmo estiver presente em mistura (desde que haja a seletividade necessária);
- Possibilita a quantificação de vários analitos em uma mesma análise na ausência de padrões caros do analito de interesse uma vez que a magnitude do sinal de ressonância é sempre diretamente proporcional ao número de hidrogênios que o geraram.

É importante destacar, que devido aos avanços tecnológicos relacionados à RMN, como campos magnéticos de alta intensidade e a utilização de probes criogênicos, o limite de detecção desta técnica tem sido considerado oportuno para análises de baixas concentrações de analitos (32).

A técnica de RMN permite o uso de padrões internos, externos ou eletrônicos de referência para a análise quantitativa que não precisam ser idênticos aos analitos alvo possibilitando a seleção de compostos de alta estabilidade química e pureza como padrões de calibração para fins quantitativos.

2.2.1 Determinação por RMNq via padrão interno

Nesse tipo de determinação, a quantificação dos constituintes de uma amostra é baseada na utilização de um padrão interno contendo pelo menos um sinal sem interferência no espectro. Assim, deve-se escolher um padrão interno cujo espectro de RMN seja simples, grau de pureza disponível, solúvel em diferentes solventes, facilmente pesável, baixo peso molecular, não-volátil, não-reativo, estável e cujos sinais não se sobreponham com as ressonâncias da amostra estudada (16). Na Tabela 1, podem ser verificados alguns exemplos de padrões internos, com seus respectivos deslocamentos químicos, nos diferentes solventes.

A quantificação é baseada na relação da área do sinal desejado comparada com a área do sinal de uma referência. Uma maneira de se quantificar é relacionar a massa da substância com a área do sinal e o número de núcleos correspondente a partir da equação abaixo (13,31):

$$\frac{n_X}{n_Y} = \frac{A_X}{A_Y} \times \frac{N_Y}{N_X}$$

Onde, n = quantidade de matéria de um composto; A = área referente à linha de ressonância; N = número de núcleos que absorvem na frequência da linha de ressonância.

Tabela 1 - Propriedades espectrais dos padrões internos em diferentes solventes.

Compostos	Massa Molar (g/mol)	Solventes			
		δ H (ppm); multiplicidade; n° de hidrogênios			
		D ₂ O	DMSO-d ₆	CD ₃ OD	CDCl ₃
3,4,5-tricloropiridina	182,44	8,44; (s); 2	8,77; (s); 2	8,61; (s); 2	8,53; (s); 2
1,4-dinitrobenzeno	168,11	8,36; (s); 4	8,46; (s); 4	8,47; (s); 4	8,44; (s); 4
1,3,5-tricloro-2-nitrobenzeno	226,45	insolúvel	8,12; (s); 2	7,80; (s); 2	7,47; (s); 2
tereftalato de dimetila	194,19	3,85; (s); 6	3,89; (s); 6	3,94; (s); 6	3,96; (s); 6
		8,02; (s); 4	8,09; (s); 4	8,11; (s); 4	8,11; (s); 4
ácido maleico	116,07	6,21; (s); 2	6,03; (s); 2	6,26; (s); 2	insolúvel
2,4,6-triodofenol	471,80	insolúvel	7,97; (s); 2	7,97; (s); 2	7,94; (s); 2
			9,72; (s); 1		5,77; (s); 1
ácido 2,3,5-triodobenzóico	499,81	7,41; (d); 1	7,72; (d); 1	7,75; (d); 1	7,94; (d); 1
		8,19; (d); 1	8,31; (d); 1	8,35; (d); 1	8,37; (d); 1
ácido fumárico	116,07	6,73; (s); 2	6,63; (s); 2	6,76; (s); 2	insolúvel
			13,12; (s); 2		
acetanilida	135,16	2,05; (s); 3	2,03; (s); 3	2,12; (s); 3	2,19; (s); 3
		7,15; (m); 1	7,01; (t); 1	7,10; (t); 1	7,12; (t); 1
		7,30; (m); 4	7,28; (t); 2	7,30; (t); 2	7,25; (s); 1
			7,56; (d); 2	7,53; (d); 2	7,33; (t); 2
			9,91; (s); 1		7,51; (d); 2
dimetil sulfona	94,13	3,03; (s); 6	2,99; (s); 6	3,01; (s); 6	2,99; (s); 6
3,4,5-trimetoxibenzaldeído	196,20	3,76; (s); 3	3,76; (s); 3	3,86; (s); 3	3,95; (m); 9
		3,82; (s); 6	3,86; (s); 6	3,92; (s); 6	7,14; (s); 2
		7,19; (s); 2	7,26; (s); 2	7,25; (s); 2	9,88; (s); 1
		9,67; (s); 1	9,88; (s); 1	9,85; (s); 1	
hexametilciclotrisiloxano	222,46	0,06; (s); 18	0,13; (s); 18	0,1	0,18; (s); 18
ácido 2,2-dimetilmalônico	132,11	1,32; (s); 6	1,27; (s); 6	1,39; (s); 6	insolúvel
			12,61; (s); 2		
2,4,5-tricloropirimidina	183,42	8,67; (s); 1	9,04; (s); 1	8,79; (s); 1	8,61; (s); 1
acetato de sódio	82,03	1,80; (s); 3	1,58; (s); 3	1,89; (s); 3	insolúvel

*Multiplicidade do sinal: (s) singlete, (d) dubleto, (t) triplete, (m) multiplete ou sobreposição.

Fonte: Adaptada de Rundlöf et al., 2010 (33).

Para a obtenção do teor de um analito em uma determinada matriz, uma abordagem diferente deve ser utilizada. Para isso é necessário o emprego de um padrão interno de pureza conhecida (PI) e, a partir da razão da área da linha de ressonância correspondente ao padrão interno e da área do analito, a determinação pode ser realizada usando a seguinte relação (13,28,29,34):

$$P_X = \frac{A_X}{I_{PI}} \frac{N_{PI}}{N_A} \frac{MM_x}{MM_{PI}} \frac{m_{PI}}{m} P_{PI}$$

Onde,

X = analito

P = pureza (% m/m)

PI = padrão interno

A = área da linha de ressonância

N = número de núcleo que absorvem na frequência da linha de ressonância

MM = massa molar

m = massa pesada

Os padrões internos são materiais de referência com massas ou concentrações estabelecidas previamente em um volume conhecido de solução, adicionado diretamente à uma solução a ser quantificada.

2.2.2 Determinação quantitativa por RMN ^1H via padrão externo e eletrônico

Apesar dos bons resultados que podem ser obtidos com a utilização do padrão interno, as análises quantitativas de algumas amostras podem ser inviáveis, devido à complexidade de seus espectros. Em certas amostras é difícil encontrar regiões livres (matrizes complexas), sem sinais, sendo impossível o uso de padrão interno, sem falar de possíveis interações que podem ocorrer entre o padrão interno e alguns componentes da amostra.

Uma alternativa à calibração de referência interna foi proposta por Akoka, 1999 (35). No método ERETIC 1 (*Electronic Reference to access in vivo Concentrations 1*) um sinal é gerado matematicamente que pode ser inserido num espectro após a sua aquisição e usado como referência quantitativa, permitindo que a magnitude do sinal inserido seja modificada de acordo com a intensidade das ressonâncias da amostra. Essa ferramenta já foi aplicada e teve seu desempenho comparado com a quantificação através da adição de um padrão interno (36). A vantagem em relação ao uso de padrão interno, é que nada é adicionado à amostra e a

frequência do sinal de referência pode ser escolhida livremente dentro de uma região transparente do espectro (ou seja, uma região onde não há sinais de matriz). Já as desvantagens do método são que o sinal artificial deve ser adequadamente e regularmente correlacionado e o próprio método requer a utilização de um *hardware* especializado adicional e modificações na configuração do espectrômetro (37).

Nos últimos anos a Bruker lançou a ERETIC 2, uma nova ferramenta de quantificação que substituiu a ERETIC 1. Esse novo instrumento é baseado na metodologia PULCON (*Pulse Length-based Concentration Determination*). A PULCON correlaciona as intensidades absolutas em dois espectros de RMN unidimensionais (1D) pelo princípio da reciprocidade que indica que os comprimentos de um pulso de 90° ou 360° são inversamente proporcionais à intensidade do sinal de RMN. Portanto, desde que a concentração de uma das amostras seja conhecida precisamente (C_P) e que o pulso de 90° de todas as amostras tenha sido bem calibrado, as concentrações desconhecidas (C_D) podem ser obtidas a partir da equação abaixo:

$$C_P = kC_D \frac{A_D T_D \theta_{90}^D n_P}{A_P T_P \theta_{90}^P n_D}$$

Onde: (A) indica a integral sobre a(s) linha(s) de ressonância, (T) a temperatura da amostra em Kelvin, θ_{90} o comprimento do pulso de 90° e (n) o número de transitórios (hidrogênio correspondente ao referido sinal), utilizados para a medição da referência (padrão) e a amostra desconhecida. O fator de correção (k) corresponde as variações experimentais, tais como: diferentes ganhos do receptor ou relaxamento incompleto, aplicado para a medição da referência ou a amostra de analito desconhecida. A equação é válida quando os experimentos são realizados com a mesma sonda de RMN, que está devidamente sintonizada e combinada (*tune/match*) (38,39).

A metodologia PULCON é facilmente aplicada a todos os espectrômetros de RMN. Mas apesar da vasta utilidade do método, apenas alguns estudos sobre RMNq PULCON foram relatados na literatura nos últimos anos (38–40).

Para a análise quantitativa por RMN, o ajuste dos parâmetros de aquisição e processamento são fatores importantes para garantir que os espectros sejam reproduzíveis e não apresentem distorções, mantendo assim a precisão e exatidão das integrações, que estão relacionadas com concentração de analito. Portanto é extremamente importante que o analista esteja bem familiarizado com os esses parâmetros de otimização do espectro obtido.

2.3 Parâmetros necessários para análises em RMNq

2.3.1 Parâmetro de aquisição

A aquisição de dados em experimentos de RMN segue a sequência: relaxação-excitação-aquisição. Onde cada uma dessas três partes atua como papel chave na técnica de RMNq.

Ajuste do Shimming

Ter um campo magnético altamente homogêneo é uma condição básica para quantificação de forma correta e exata. A falta de homogeneidade no campo magnético é corrigida por um procedimento denominado *shimming*, onde o campo magnético externo (B_0) é apropriadamente sintonizado e linhas de campo magnético com formas adequadas são obtidas com melhores razões sinal/ruído (S/R). O ajuste do *shimming* pode ser feito de forma manual ou automaticamente (25).

Pulso de 90°

Para a obtenção de espectros quantitativos por RMNq é recomendado que seja aplicado um pulso de radiofrequência por tempo suficiente para que a magnetização resultante apresente um ângulo de 90° (Figura 4), desta forma é obtido um espectro com o máximo de intensidade dos sinais. Entretanto, deve-se aguardar o completo retorno ao equilíbrio inicial da magnetização resultante. O uso de pulsos mais curtos, ou seja, ângulos menores que 90° necessitam de um tempo menor para o retorno ao equilíbrio, conseqüentemente são gerados FIDs com uma razão sinal/ruído (S/R) inferior, dificultando as análises (29,41,42).

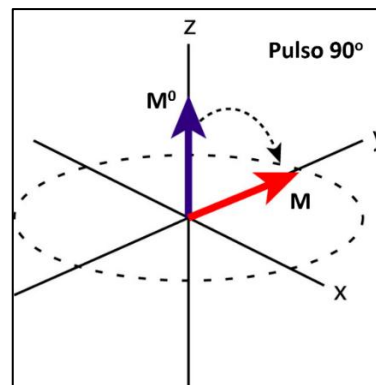


Figura 4 - Magnetização resultante (M_0): no eixo z, em equilíbrio e após o pulso de 90°.

Fonte: Adaptada de Brian, 2018 (43).

Ao pulsar muito rapidamente e usando tempos de repetição muito curtos relativos ao T1, logo uma diminuição substancial da intensidade do sinal ocorrerá. Em casos extremos a magnetização pode não ter tempo para se recuperar entre os pulsos e eventualmente nenhum sinal será observado. Esta condição é conhecida como saturação (25,29,44,45).

Tempo de relaxação (T1)

O tempo de relaxação corresponde ao tempo em que a magnetização necessita para retornar ao equilíbrio inicial. Esse tempo é decomposto em tempo de relaxação longitudinal (T1) e tempo de relaxação transversal (T2). Para a aquisição de espectros quantitativos, os tempos de relaxação longitudinal dos sinais selecionados devem ser determinados, incluindo o T1 do padrão interno (PI), no caso em que ele é utilizado. Os tempos de relaxação longitudinal (T1) dos sinais podem ser obtidos através de experimentos de inversão-recuperação (41). Para os spins relaxarem completamente após um pulso de 90°, é necessário esperar um período de pelo menos 5 x T1 do núcleo que relaxa mais lentamente onde a magnetização será recuperada em 99,33% (28,42,44).

Janela Espectral (SW)

A janela espectral (do inglês *spectral window* - SW) define o tamanho da janela contendo as frequências observadas. Este tamanho não pode ser tão estreito para assegurar que os filtros de recepção não interfiram na intensidade dos sinais nas bordas laterais do espectro. Recomenda-se um adicional de 2 ppm em ambas as laterais da janela espectral, uma vez que o pulso, que excita o espectro, é dado automaticamente no centro da janela espectral. Isto também levará a um melhor ajuste da linha base (25,31,44).

Supressão do sinal do solvente por técnica de pré-saturação

A técnica de pré-saturação baseia-se na aplicação de um pulso diferenciado a um núcleo com uma frequência específica. Um pulso fraco de radiofrequência é aplicado durante um tempo, longo suficiente, para que a relaxação dos núcleos excitados não seja total, gerando desta forma, uma igualdade no número de núcleos nos dois estados de energia (Figura 5). Como resultado, obtém-se o vetor componente M_0 nulo e nenhum sinal é observado no espectro de

RMN. No caso de amostras, em que há a presença de água (energéticos e cafés por exemplo), um sinal de grande intensidade é observado em 4,7 ppm, o que pode causar problemas de sobreposição e erros de integração para sinais próximos ao sinal do solvente, o que dificulta o ajuste de fase e linha base de sinais de baixa intensidade (23).

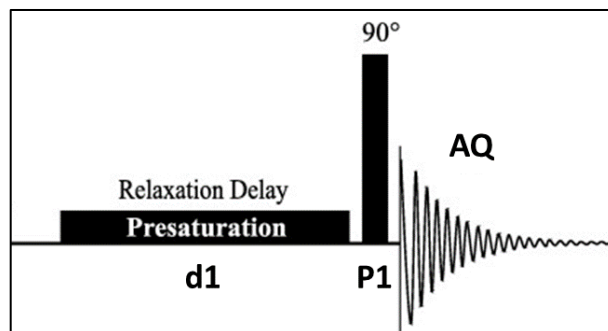


Figura 5 - Sequência de pulsos da pré-saturação, D1= tempo de espera da relaxação, P1= largura do pulso e AQ = tempo de aquisição.

Fonte: Adaptada de Bharti e Roy, 2012 (29).

Vale ressaltar, que além da saturação do sinal do solvente, os experimentos de pré-saturação podem ser utilizados para quantificação de analitos com grandes diferenças de concentração. Primeiramente, obtém-se um espectro para a quantificação do analito majoritário em que o ganho do receptor é definido automaticamente. Posteriormente, saturam-se os sinais de maior intensidade deste analito majoritário e quantifica-se o analito minoritário presente na amostra (29,42).

Temperatura

A temperatura também é um fator importante que afeta a reprodutibilidade dos resultados quantitativos. Variar a temperatura no processo de aquisição dos espectros, pode gerar melhorias ou problemas. O aumento da temperatura melhora a resolução dos espectros, porém é importante observar a estabilidade térmica do analito e o ponto de ebulição do solvente utilizado. Utilizar temperaturas mais altas pode deslocar o sinal de água residual (HOD) do solvente para valores menores de deslocamento químico e pode ser uma boa solução para a sobreposição deste sinal com os sinais de analitos de interesse. Caso sejam utilizados valores de temperatura diferentes da temperatura ambiente deve-se manter seu valor constante, pois

variações de temperatura afetam os tempos de relaxação, afetando diretamente as análises quantitativas. (16,29,42).

Ganho no receptor (RG)

O ganho no receptor (do inglês *receiver gain* - RG) deve ser definido para cada amostra a ser analisada, de modo que não ocorra truncamento do FID. O RG deve ser otimizado, pois uma alta configuração causa distorção da linha de base, enquanto uma configuração muito baixa provoca perda de sinal do analito ou uma diminuição da razão S/R. Isto é particularmente importante para a análise quantitativa. Para métodos quimiométricos e quantificação por calibração externa, deve ser assegurado que sempre seja utilizada a mesma amplificação de sinal (46).

2.3.2 Parâmetros de processamentos

Os parâmetros de processamento são fundamentais para determinações por RMNq. Existem diversos modos pelos quais pode-se melhorar os dados adquiridos antes da transformada de Fourier (do inglês *fourier transform* - FT). Dependendo do resultado desejado, a resolução, a relação S/R e a variação na linha de base podem ser melhoradas com funções matemáticas apropriadas. Essas funções, também chamadas funções janela podem melhorar o espectro (25). A primeira parte do FID é onde se encontra a informação dos sinais do espectro, conseqüentemente, multiplicar o FID por uma função exponencial negativa (*line broadening* - LB) nesta parte implica em melhorar a razão S/R. Entretanto, a utilização de altos valores para LB alarga os picos dificultando a integração para o caso de picos muito próximos. Recomenda-se para o processamento de espectros com fins quantitativos que os FIDs sejam multiplicados por valores de LB de 0,3 a 1,0 Hz (42).

Com a adição de zeros ao final do FID é possível aumentar ao máximo a relação S/R por um fator da raiz quadrada de dois, este processo é conhecido como *zero-filling* (32). A razão para a melhora da resolução se refere ao fato de que somente metade da informação do FID está em uso após a transformação de Fourier, uma vez que a parte imaginária é negligenciada. Todavia, a ferramenta de *zero-filling* pode somente interpolar pontos de dados e dar uma melhora artificial na resolução, uma vez que nenhuma informação nova é adquirida (25).

Correção da fase

A correção de fase pode ser realizada de forma automática ou manual. A correção automática pode não ser interessante para RMNq, já que pode apresentar desvios de absorção que modificam as formas dos sinais e reduzem a área integrada. A fase de um espectro é corrigida pela aplicação de uma correção de fase de ordem-zero ou primeira-ordem. Para determinações por RMNq esse parâmetro deve ser cuidadosamente otimizado para assegurar uma quantificação precisa (25,44–46).

Correção da linha base

A linha de base deve ser plana e tender a zero onde a área de um sinal isolado deverá ser facilmente determinada. Todavia existem diversas fontes de distorção da linha de base. Para RMNq, a correção da linha base é fundamental, e nos *softwares* de processamento dos dados, uma série de funções matemáticas estão disponíveis para esse fim (25,44,46).

Integração do Sinal

A determinação da área do sinal e a integração são partes importantes na RMNq. Os *softwares* oferecem uma ferramenta que pode fazer o trabalho com a exatidão adequada para a elucidação da estrutura. A integração clássica é feita pela medida da altura relativa de uma curva produzida durante o procedimento de integração. Erros nas áreas de sinais integrados podem ser causados por: ruído no espectro de RMN, erros na fase, aproximação da linha de base e descuido na correção da curva e das tendências na integração (25).

Para conseguir uma integração precisa dos sinais, nenhuma interferência do analito de interesse com outros sinais deve ocorrer, já que sinais sobrepostos dificultam a integração. A largura da integral deve ser escolhida para que as mesmas partes do analito e os sinais de referência sejam utilizados (46). Outro fator que interfere na quantificação são os sinais satélites de ^{13}C que podem aparecer sobrepostos ou bem próximos aos picos que serão utilizados na integração. Um modo para que não haja interferência seria a subtração dos sinais referentes aos satélites ou fazer um desacoplamento heteronuclear (24). Com relação à faixa de integração do sinal, geralmente o valor utilizado é obtido após multiplicar a largura do pico à meia altura por

um valor arbitrário. Alguns autores recomendam 64 vezes essa largura, outros indicam 20 vezes para ambos os lados e ainda há outros que indicam entre 20 e 30 vezes (42).

2.4 Quimiometria na análise de alimentos

A Quimiometria é uma ferramenta matemática e estatística frequentemente utilizada para maximizar as informações que podem ser extraídas de um conjunto de dados. Quando se pretende caracterizar diversas amostras com alto grau de semelhança, a consideração isolada de um único aspecto não possibilita obter resultados satisfatórios. Porém, se todas as informações obtidas a respeito de uma amostra, ou seja, se todas as variáveis forem consideradas simultaneamente provavelmente será possível caracterizar conjuntos de amostras (47). A quimiometria apresenta diversas aplicações na análise de alimentos, podendo citar: o controle e monitoramento de processos, determinação da origem geográfica, avaliação sensorial, determinação de fraude, entre outras (48,49).

A espectroscopia de RMN, é uma técnica muito empregada na análise de alimentos, já que seus espectros apresentam características importantes dos diversos compostos que compõem as amostras (50). Entretanto, matrizes alimentares apresentam uma grande complexidade de compostos, o que faz seus espectros de RMN no primeiro momento, parecerem confusos (51). Neste sentido, os métodos quimiométricos têm sido aplicados com sucesso em dados espectrais para reduzir a sua complexidade e evidenciar as informações mais relevantes (52–54). A grande vantagem da união entre a quimiometria e a RMN deve-se ao fato de que a primeira é uma ferramenta poderosa de análise de dados complexos, enquanto que a segunda possibilita a obtenção de um grande número de informações (variáveis) em uma única medida, de forma rápida e simples, o que torna a união das técnicas atrativa (52).

Os métodos quimiométricos usados para identificar as semelhanças e diferenças em diferentes tipos de amostras, agrupá-las e classificá-las, estão divididos em dois grupos: os métodos supervisionados e os não supervisionados de reconhecimento de padrões. Nos métodos supervisionados, cada amostra analisada provém de uma classe pré-estabelecida e esta informação é utilizada durante a construção dos modelos. Os métodos não supervisionados não fazem uso desta informação e, portanto, não requerem nenhum conhecimento prévio a respeito da classificação das amostras. Elas são agrupadas naturalmente com base nos dados experimentais obtidos (52,55).

2.4.1 Análise de componentes principais (PCA)

A PCA é um método de análise multivariada, que consiste em uma manipulação da matriz de dados com o objetivo de projetar dados n-dimensionais em um espaço com poucas dimensões, normalmente duas ou três, sendo obtidas por meio de combinações lineares das variáveis originais. Desta forma, o objetivo principal da análise por PCA é a redução da dimensionalidade dos dados, diminuindo a sua complexidade e ressaltando as informações mais relevantes (52,56).

Nesse modelo, os dados originais são representados por novas variáveis (ou eixos) que são chamadas de componentes principais (PCs), sendo ortogonais entre si e construídos de forma que as informações mais relevantes ficam contidas nas primeiras PCs, e as de menor importância, nas últimas. A primeira componente principal (PC1) é a combinação das variáveis que explicam a maior quantidade de variação dos dados. A segunda componente principal (PC2) contém o máximo da quantidade de variação não explicada pela primeira e é independente dela. O número de componentes principais que pode existir está relacionado ao número de variáveis do conjunto, não podendo ultrapassar esse número (47,52,55).

No gráfico de *scores* cada ponto vai corresponder às distâncias no espaço multivariado; fazendo com que grupos de amostras semelhantes possam ser detectados visualmente (Figura 6). Já no gráfico de *loadings* cada ponto corresponde a uma variável, e mostra as similaridades e as correlações entre as mesmas. Além disto, este gráfico evidencia quais variáveis são responsáveis pelas posições relativas das amostras no gráfico de *scores* (Figura 6). Variáveis com valores pequenos de *loadings* geralmente ficam localizadas perto da origem e têm em média pouca influência sobre a estrutura dos dados (56).

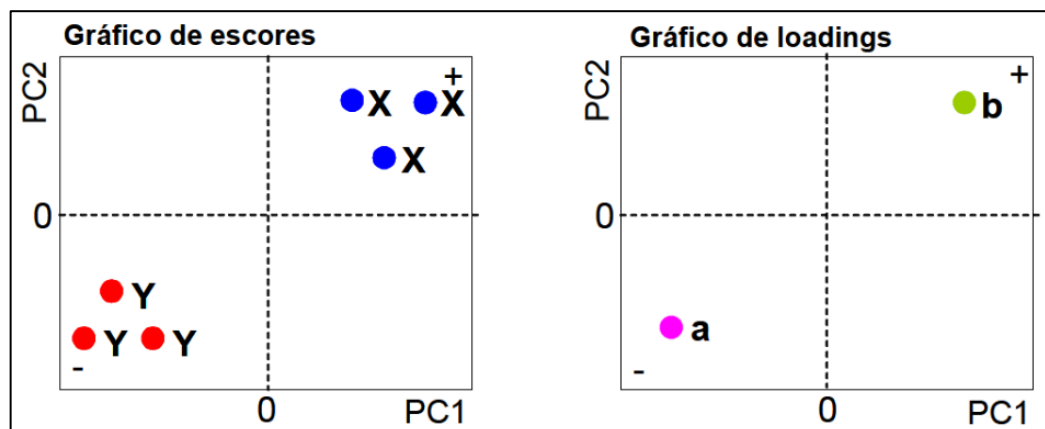


Figura 6 - Representação de um gráfico de *scores* e *loadings*.

Fonte: Adaptada de Fernandes, 2006 (55).

2.4.2 Análise discriminante (DA)

A análise discriminante (DA) é uma ferramenta estatística utilizada para classificação de um determinado elemento em um certo grupo de variáveis, ou seja, trata-se de um procedimento utilizado para ajudar a distinguir entre dois ou mais grupos, com base em um conjunto p de variáveis quantitativas observadas. Isso é feito construindo funções discriminantes que são combinações lineares das variáveis (57). O objetivo da DA é permitir a elaboração de uma função matemática chamada de regra de classificação ou discriminação, que é utilizada para classificar novos elementos amostrais nos grupos já existentes (57). Portanto, o número de grupos é conhecido *a priori*, assim como nos métodos não-hierárquicos de agrupamentos, mas a regra de classificação é elaborada utilizando-se procedimentos que, em geral, vão além do uso de distâncias matemáticas (58).

A DA permite um conhecimento das variáveis que mais se destacam na discriminação dos grupos. Para tanto, diversos *outputs* são gerados a partir de testes e estatísticas como o lambda de Wilks, a correlação canônica, e o autovalor. O lambda de Wilks, que varia de 0 a 1, propicia a avaliação da existência de diferenças de médias entre os grupos para cada variável. Valores elevados desta estatística indicam ausência de diferenças entre os grupos (58).

Na função discriminante, os valores das variáveis explicativas de uma observação são inseridos nas funções de classificação e, conseqüentemente, um escore de classificação é calculado para cada grupo, para aquela observação. Dadas p variáveis e g grupos, é possível estabelecer $m = (g - 1; p)$ funções discriminantes que são combinações lineares das p variáveis, de modo que a função linear seja dada por:

$$Z_n = W_1Y_1 + W_2Y_2 + \dots + W_nY_n$$

Em que W representa o vetor de pesos das variáveis para as funções discriminantes e são estimados de modo que a variabilidade dos escores da função o discriminante seja máxima entre os grupos e mínima dentro dos grupos (58).

2.5 Validação Analítica

Para demonstrar que um método é adequado e garantir a qualidade das medidas e a confiabilidade estatística dos cálculos envolvidos no seu processamento este deve ser

submetido ao processo de validação. A validação de um método analítico é parte do desenvolvimento do método em que as figuras de mérito são avaliadas para confirmar ou não a adequabilidade de todo o método desenvolvido. Dentre as figuras de mérito descritas na literatura especializada e que se aplicam à validação de análises químicas estão: linearidade, seletividade, precisão, exatidão, limites de detecção e quantificação e robustez (59,60).

2.5.1 Especificidade e Seletividade

É a capacidade que o método possui de medir exatamente um composto em presença de outros componentes, tais como: impurezas, componentes ativos, excipientes, produtos de degradação e etc. Outras figuras de mérito, como a linearidade, a exatidão e a precisão, dependem da garantia da seletividade, caso contrário seus resultados não são confiáveis. Por isso, a seletividade deve ser um dos primeiros passos no desenvolvimento e validação de um método analítico (59,61).

2.5.2 Intervalo e Linearidade

A linearidade de uma metodologia analítica é a capacidade de demonstrar que os resultados obtidos são proporcionais à concentração do analito dentro de um intervalo especificado, sendo este, a faixa entre os limites de quantificação superior e inferior de um método analítico (61,62). Uma das formas de demonstrar a linearidade de um método é pela construção de uma curva analítica, a partir da aplicação da regressão linear, determinada pelo método dos quadrados mínimos, em um gráfico da resposta do método pela concentração do analito. A partir da equação da reta obtida, calculam-se os resíduos, que devem apresentar perfil aleatório e não ter valores discrepantes, e o coeficiente de determinação (R^2) (30,60). A equação da reta que relaciona as duas variáveis é:

$$y = ax + b$$

sendo: y = resposta medida (absorbância, altura ou área do pico, etc.); x = concentração; b = interseção com o eixo y , quando $x = 0$; a = inclinação da curva analítica = sensibilidade (61).

O método é mais sensível quando pequenas variações de concentração resultam em maior variação na resposta, ou seja, maior inclinação (59,61). Quanto mais próximo de 1 estiver o R^2 , melhor será o grau de explicação da variação de y em termos da variável x (30).

2.5.3 Precisão

A precisão demonstra o grau de concordância entre os resultados de medições sucessivas. As três formas mais comuns de expressá-la são por meio da repetitividade, da precisão intermediária e da reprodutibilidade, que são avaliadas ao longo da faixa de trabalho. Ela pode ser calculada através da determinação do desvio-padrão, do intervalo de confiança da média ou pelo desvio-padrão relativo (ou coeficiente de variação) (61).

$$DPR = \frac{S}{\bar{X}} \times 100$$

Sendo: **DPR** = desvio padrão relativo, **s** = desvio padrão, **x** = valor médio das medidas. O resultado de DPR é dado em %.

A repetitividade avalia a dispersão dos resultados obtidos, em um curto período de tempo, sob as mesmas condições de medição. Já a precisão intermediária avalia a variabilidade dos resultados dentro de um laboratório. Nessa análise, algumas condições definidas são variadas e as análises podem ser divididas por ensaios, em que cada ensaio apresenta a variação de uma condição, como diferentes dias, equipamentos ou operadores (30).

2.5.4 Exatidão

A exatidão representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados e um valor aceito como referência, ou seja, mostra a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro. A avaliação da exatidão pode ser feita por diversos métodos, como pelo uso de material de referência certificado (MRC) ou padrão certificado, comparação entre métodos, ensaios de recuperação e adição de padrão (59,60,63).

Os processos mais utilizados para análise da exatidão do método são os ensaios de adição e recuperação de padrão, pois reflete a quantidade de determinado analito, recuperado no processo, em relação à quantidade real presente na amostra (64). Esse estudo consiste na "fortificação" da amostra, ou seja, na adição de soluções com diferentes concentrações do analito de interesse seguida pela determinação da concentração do analito adicionado (59,63). Calcula-se a quantidade percentual recuperada pelo processo usando a seguinte relação:

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{\text{Valor encontrado} - \text{Valor real}}{\text{Valor real}} \times 100$$

2.5.5 Limite de Detecção (LD)

É a menor concentração ou quantidade que um método pode detectar do analito para um dado procedimento analítico, sendo assim a menor concentração do analito que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, sob condições experimentais estabelecidas) (59,65). O LD pode ser calculado de três maneiras diferentes: método visual, método relação sinal:ruído, método baseado em parâmetros da curva analítica. Pelo método baseado no parâmetro da curva analítica, ele é calculado pela seguinte expressão:

$$LD = \frac{3,3 s}{IC}$$

onde s é a estimativa do desvio padrão do branco, da equação da linha de regressão ou do coeficiente linear da equação e IC é a inclinação (*slope*) ou coeficiente angular da curva analítica (59,60,64).

2.5.6 Limite de Quantificação (LQ)

É definido como a menor concentração do analito, que pode ser quantificada na amostra, com exatidão e precisão aceitáveis, sob as condições experimentais adotadas (59,64,65). Da mesma forma que o LD, o LQ pode ser calculado de diferentes maneiras. Para o método baseado em parâmetros da curva analítica, ele pode ser calculado pela seguinte expressão:

$$LQ = \frac{10s}{IC}$$

sendo s é a estimativa do desvio padrão do branco, da equação da linha de regressão ou do coeficiente linear da equação e IC é a inclinação (*slope*) ou coeficiente angular da curva analítica (59,60,64).

Em RMNq para se garantir uma quantificação exata do analito, a relação sinal/ruído deve ser de pelo menos 150 para uma incerteza de 1%, de 30 para uma precisão de aproximadamente 3% ou de 10 para uma precisão de cerca de 10% (28,31,33).

2.5.7 Robustez

Mede a sensibilidade que o método apresenta frente a pequenas variações. Diz-se que um método é robusto quando ele não é afetado por uma modificação pequena e deliberada em seus parâmetros (64). Esse parâmetro pode ser avaliado tomando como base a estabilidade da amostra, alterações no pH, alterações na temperatura, dentre outros. No caso de experimento por RMNq, pode-se ainda avaliar a diferença do tipo de tubos, o volume da amostra, tratamentos dos dados, variações nos parâmetros de aquisição, dentre outros (16).

3. Objetivos

3.2 Geral

Utilizar a espectroscopia de RMN ^1H na avaliação da autenticidade de cafés torrados, medicamentos anabolizantes e bebidas energéticas.

3.3 Específicos

- Verificar a autenticidade de cafés brasileiros, utilizando a RMN ^1H acoplada à estatística multivariada, através da averiguação de possíveis fraudes e falsificações por origem geográfica, grãos defeituosos e adulterantes.
- Desenvolver uma metodologia rápida e abrangente para determinar a autenticidade de medicamentos contendo esteróides anabolizantes, amplamente consumidos pela população, vendidos comercialmente em formas de comprimidos, cápsulas e soluções injetáveis. Realizar testes quantitativos afim de avaliar o desempenho desta metodologia como alternativa aos métodos existentes descritos na literatura.
- Avaliar a qualidade de bebidas energéticas, amplamente consumidas no Brasil, através da quantificação simultânea de taurina e cafeína em amostras comerciais.

Capítulo I

Avaliação da autenticidade de cafés torrados

O presente capítulo resultou nas seguintes publicações:

Toci, A.T.; Ribeiro, M.V.M.; Toledo, P.R.A.B.; Boralle, N.; Pezza, H.R.; Pezza, L. Fingerprint and authenticity of Brazilian roasted coffees by ^1H NMR. *Food Science and Biotechnology*, v. 27 (1), p. 19-26, 2018.

Ribeiro, M. V. M.; Boralle, N.; Pezza, H. R.; Pezza, L.; Toci, A. T. Authenticity of roasted coffee using ^1H NMR spectroscopy. *Journal of Food Composition and Analysis*, v. 57, p. 24-30, 2017.

1. Introdução

1.1 Produção de café

O café é o produto alimentício mais comercializado no mundo, possuindo um papel importante economicamente, principalmente em países produtores e exportadores. O Brasil é o maior produtor e exportador mundial e também o segundo maior consumidor deste produto, perdendo somente para os Estados Unidos (66). O país também é responsável por mais de 30% da produção do mercado internacional de café, volume equivalente à soma da produção dos outros quatro maiores países produtores, Vietnã, Colômbia, Indonésia e Etiópia (67). Vale ressaltar que o cultivo e a industrialização do café, geram um grande número de empregos e divisas para o país, sendo extremamente importante para a economia brasileira (68).

Nos últimos anos, o consumo de café tem aumentado consideravelmente, sendo este aumento relacionado aos avanços na busca por um produto de melhor qualidade. Estima-se que cada habitante consuma, em média, 4,9 kg de café torrado por ano, o que seria equivalente a cerca de 81 litros da bebida pronta anualmente (69). De acordo com a *International Coffee Organization* (ICO) (70), a produção mundial de café do ano-safra 2016/2017, que compreende ao período de outubro a setembro, contabilizou um volume de 153,869 milhões de sacas de 60 kg. Tal volume representou um acréscimo de 1,5% em relação ao ano-safra anterior, que foi de 151,656 milhões de sacas. Nesse mesmo período, o consumo global foi de 155,061 milhões de sacas, superior à produção, em torno de 0,8% (71).

Existem atualmente, cerca de 60 espécies de café, entretanto, apenas duas apresentam valor comercial, que são as espécies arábica (*Coffea arabica*) e a robusta ou conilon (*Coffea canephora*). Dentre essas, a espécie arábica representa cerca de 75% da produção e possui maior valor comercial por apresentar uma superioridade aromática, já o café robusta, com 25% da produção, possui menor valor comercial agregado, porém, é de mais fácil cultivo que o arábica (72). Devido às diferentes propriedades das espécies, é cada vez mais comum, a incorporação de café robusta nos chamados *blends* com o café arábica, o que barateia o custo do produto. Muitos produtos rotulados no mercado como 100% arábica, são encontrados com a presença de café robusta (73).

No Brasil, as principais regiões produtoras de café estão concentradas nas regiões sudeste e sul, sendo os estados de São Paulo, Minas Gerais, Paraná e Espírito Santo são os que mais se destacam. A produção de café arábica se concentra nos estados de São Paulo, Minas

Gerais, Paraná, Bahia e parte do Espírito Santo (66). Já a produção de café robusta (conilon) está concentrada, principalmente, no Espírito Santo e em Rondônia (Figura 7).



Figura 7 - Principais regiões produtoras de cafés do Brasil.

Fonte: Adaptada de Nasser, 2018 (74).

1.2 Qualidade e autenticidade de cafés torrados

Em tempos de globalização, a abertura dos mercados disponibilizou uma grande variedade de alimentos, permitindo a todos provar o sabor dos alimentos e aromas de diferentes nações. Não obstante esta oportunidade, os países tentam preservar seus mercados adotando políticas de proteção de mercado. Alguns países têm adotado denominações diferentes para rotular seus alimentos como “produto típico”, “IGP - Indicação Geográfica Protegida”, “DOC - Denominação de Origem Controlada”, entre outras, a fim de dar-lhes valor adicional. Os termos “típico”, “geográfico” e “origem” são utilizados e atrelados às tradições locais é feito com matérias-primas originais. O mais importante é que esses produtos possuem características organolépticas particulares, que não são reproduzíveis quando produzidas em outros lugares. Com relação ao café, somente na última década, o Brasil tenta adotar programas de qualidade através de parcerias privadas. Em 2004, a ABIC (Associação Brasileira das Indústrias de Café) (66), juntamente com Conselho Deliberativo de Política do Café (CDPC), criou o “Programa de Qualidade do Café” (PQC) de certificação, além de seu já estabelecido “Selo de Pureza”.

Este programa certifica a pureza dos cafés torrados, que é imprescindível e regulamentada pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Todavia, estes ainda estão longe de atingirem todo o mercado nacional, pois, por se tratar de uma iniciativa privada ainda não possui adesão por parte das indústrias torrefadoras, principalmente pelas marcas líderes de mercado, que não precisam de certificados para se reafirmarem. Nesta visão, além das denominações geográficas, é cada vez mais importante identificar a introdução no mercado nacional e internacional de produtos fraudulentamente rotulados, quer por razões econômicas, quer por razões de saúde pública (75,76). Atualmente, o Brasil é referência na produção e exportação de café cru, com a famosa marca “Cafés do Brasil”. Porém, este reconhecimento não se estende aos cafés torrados, que muitas vezes, perdem a denominação de origem quando torrados.

No Brasil, a qualidade do café é avaliada de acordo com a classificação por tipo ou a quantidade de defeitos, as características de qualidade do produto e o tipo de bebida. A classificação oficial da bebida do café é realizada por provadores treinados e credenciados pelo Ministério da Agricultura que degustam a amostra, através de um teste chamado de “prova da xícara” (77). A classificação dessas amostras é feita de acordo com seus atributos sensoriais, e podem ser enquadradas em classes superiores, como: estritamente mole, mole e apenas mole; classe intermediária como a bebida dura; ou classes inferiores, como: riada, rio e rio zona (78). A classificação da bebida tem como objetivos fundamentais, conhecer a qualidade do café a ser comercializado e definir as ligas ou *blends* que valorizem determinados lotes de café (77).

A qualidade do café é bastante influenciada pelo solo e conseqüentemente pela origem geográfica. No Brasil, as regiões que possuem os cafés mais bem rotulados são o Sul de Minas e o Norte de São Paulo. Neste contexto, o termo “origem geográfica” parece muito amplo. Porém, apesar disso, alguns estudos reportam a distinção de cafés através da composição aromática e de minerais em macro (países) e microrregiões (dentro do mesmo estado) (72,79–81). Desta forma, este aspecto não pode, em nenhuma hipótese, ser negligenciado na proposta de uma metodologia que vise criar uma metodologia ampla no estudo de autenticidade.

O café de boa qualidade requer cuidados especiais durante as fases da pré-colheita, colheita e pós-colheita, pois diversos fatores podem ocasionar alterações que influenciam a qualidade do produto (82,83), dentre eles, está a adição de grãos defeituosos, que são oriundos de imperfeições ocorridas principalmente no processo de colheita e beneficiamento dos grãos, e são classificados por órgãos do governo brasileiro e pela ABIC como extrínsecos e intrínsecos. Os defeitos extrínsecos são pedras, gravetos, ou folhas, que podem ser incorporados

durante a colheita e podem continuar presentes devido à má condução da etapa de beneficiamento (84). Os defeitos intrínsecos, considerados de maior relevância para a depreciação da qualidade do café, são os grãos provenientes de estágios de maturação inadequados e/ou de fermentação ou oxidação ocorridas na planta, no chão ou após a colheita (85). Os principais defeitos intrínsecos do café são os grãos pretos, verdes e ardidos, conhecidos como a mistura PVA. A Instrução Normativa nº 16, de 24/5/2010 (86), visa a garantia da qualidade para o café torrado e moído, e estabelece como 1% o percentual máximo permitido em conjunto de impurezas (cascas e paus), sedimento (pedras, torrões e areia) e matérias estranhas (milho, centeio, açúcar, cevada, sementes de açaí, entre outras). O PQC também estabelece a qualidade dos cafés, classificando-os quanto à qualidade: tradicional, superior ou *gourmet* (87). Esta classificação além de considerar as características sensoriais da bebida, limita a quantidade de grãos defeituosos de café em até 40%.

Alguns estudos relatam a diferenciação química e físico-química dos grãos defeituosos e saudáveis relacionando a composição de ácidos clorogênicos, cafeína, trigonelina, sacarose e a composição volátil dos mesmos, demonstrando significativas diferenças com relação a qualidade (88–92). Além do prejuízo à qualidade da bebida, as implicações desses grãos defeituosos à saúde não são completamente conhecidas, mas sabe-se que vários grãos defeituosos podem estar contaminados com micro-organismos produtores de toxinas como a ocratoxina A (93–95). Por esta razão, existe um consenso geral pela diminuição da incorporação de grãos PVA nos *blends* de café torrados comerciais. Em decorrência, nos últimos anos, houve um crescente interesse na caracterização química desses grãos e na identificação de compostos que possam ser usados futuramente como marcadores da presença de defeitos no café (88,89).

1.3 Adulteração de cafés torrados

As fraudes no setor alimentício ocorrem, principalmente, em produtos com alto valor agregado e com características físicas que favoreçam as adulterações (96,97). As adulterações no café prejudicam sua qualidade sensorial, podendo também causar danos ao consumidor, sejam eles de ordem econômica ou, até mesmo, de saúde (66). A presença dessas impurezas afeta a qualidade do café moído e torrado, causando efeitos indesejáveis para o sabor, aroma, acidez e etc., afetando diretamente as características sensoriais da bebida (82,98). Geralmente, os materiais utilizados para adulterar o café são de baixo custo, disponíveis em grande quantidade e semelhantes ao café após a torrefação e moagem.

A detecção de impurezas em misturas de cafés torrados e moídos é uma preocupação constante, principalmente, no que diz respeito, à certificação da qualidade do produto, tratando-se de uma difícil tarefa das autoridades reguladoras. Métodos de laboratório satisfatórios para este propósito são requeridos pela indústria de alimentos para monitorar a qualidade de seus produtos, como também por agências de governo que desejam inspecionar, se os produtos que chegam ao consumidor, estão de acordo com os parâmetros legais (68).

As adulterações em cafés torrados são relativamente frequentes e diversificadas, sendo uma estratégia utilizada para reduzir custos. Elas podem envolver a qualidade dos grãos (espécies, origem geográfica e grãos defeituosos), bem como a adição de outras substâncias (cascas de café, milho, cevada, chicória, farelo de trigo, açúcar mascavo, soja, centeio, açai e etc.), a fim de torná-los mais barato (87,99).

Na literatura são relatados vários trabalhos, a respeito da análise dos diversos tipos de contaminantes do café, pelas mais variadas técnicas analíticas (87). A adulteração de café "100% arábica" com a variedade robusta, que apresenta menor valor comercial, já foi estudada e determinada por RMN ^1H (73,100), cromatografia líquida (101,102), espectrometria de massas (103), espectroscopia de infravermelho (104,105), eletroforese capilar (106), espectroscopia Raman (107), entre outros. Vale ressaltar que a adulteração de café arábica com a espécie robusta não desqualifica o produto de receber o "Selo de Pureza" da ABIC, uma vez que há somente café nas amostras, porém, diminui a qualidade da bebida. A presença de grãos defeituosos, que representam 20% da produção brasileira, também não desqualificam a pureza, mas afetam a qualidade da bebida, como mencionado anteriormente (66).

Um dos principais problemas encontrados na detecção e identificação dessas substâncias refere-se aos métodos analíticos empregados, pois são demorados, subjetivos e apresentam resultados muitas vezes discordantes (108). O processo convencional mais utilizado pelos laboratórios credenciados pela ABIC, para identificação de adulterações em café torrado e moído, consiste na análise de lâminas microscópicas preparadas com reagentes químicos, sendo a quantificação baseada na comparação do percentual do extrato aquoso da amostra com o extrato aquoso do café puro (109). Entretanto, esse método exige do analista bom conhecimento sobre os aspectos do café em suas diferentes formas: café de baixa qualidade, cafés demasiadamente torrados ou pouco torrados, moagem em moinho tradicional ou de rolos etc. Vale ressaltar, para a detecção de fraudes no café pela simples observação microscópica, geralmente é necessária a utilização de tratamentos preliminares, como desengorduramento e tamisação, além da necessidade de se confirmar os resultados através de análises físico-

químicas complementares, tais como teor de umidade, resíduo mineral fixo, extrato etéreo e cafeína (87,110).

O desenvolvimento e a aplicação de métodos rápidos e precisos para detecção e quantificação dos adulterantes contribuem de forma relevante para a minimização ou, mesmo, a eliminação das fraudes em café. Por estas razões, muitas outras técnicas têm sido estudadas com o intuito de fornecer análises mais seguras, reprodutíveis e abrangentes no que diz respeito aos inúmeros tipos de adulterações existentes. Dentre as técnicas analíticas estudadas para emprego na identificação das adulterações em café torrado e moído destacam-se, em ordem de abundância, as análises cromatográficas (83,97,111,112) e a espectroscopia no infravermelho (113–116).

A RMN é uma das mais poderosas ferramentas espectroscópicas para investigação de propriedades químicas e físicas em misturas complexas, podendo ser aplicada tanto na elucidação estrutural de compostos orgânicos como na quantificação desses compostos (14,54). Neste contexto a RMN acoplada às estatísticas multivariadas têm mostrado ser uma boa alternativa para a determinação de adulterantes em diferentes matrizes alimentares, tendo sido utilizada na detecção de adulteração em mel, leite, azeite e produtos cárneos (49,51,53,117,118). Além de bons resultados em outras matrizes alimentares, a técnica tem a vantagem de utilizar pequenas quantidades de amostra sem pré-tratamento, diminuindo a geração de resíduos tóxicos, além de ser uma técnica não destrutiva e gerar várias informações em um único espectro.

A RMN tem demonstrado grande capacidade de distinção de amostras e identificação de adulterações em várias matrizes alimentícias (54,119). Todavia, poucos artigos foram publicados utilizando as técnicas de RMN como instrumento de autenticação para o café, principalmente no que se refere à utilização destas técnicas sem a associação prévia com técnicas de separação, que prolongam o tempo de análise. Um dos primeiros trabalhos a utilizar a técnica de RMN em café foi o de Tavares e Ferreira (2006) (14). Neste estudo, os autores identificaram os compostos majoritários encontrados na bebida de café, como cafeína, trigonelina, N-metilpiridina, catecol, ácido fórmico e os ácidos quínico, caféico, ferúlico e clorogênicos, e também validaram o método para quantificação da cafeína, o que demonstra a viabilidade da técnica para aplicações discriminatórias. Consonni e colaboradores (2012) (48), propuseram a diferenciação de cafés de diferentes continentes (Ásia, América e África), utilizando espectros de RMN ¹H. Todavia, como mencionado, para a criação de uma impressão digital (*fingerprint*) dos cafés brasileiros, necessita-se de uma grande amostragem e

correlacionar os principais fatores ligados à qualidade, como origem, tipos de grãos e grau de torrefação. Até o presente momento, no melhor de nosso conhecimento, nenhum estudo apresentou uma metodologia abrangente e robusta, no que diz respeito aos diversos fatores que possam interferir nos resultados (88).

1.4 Análise quimiométrica e RMN ¹H

A espectroscopia de RMN, apresenta a vantagem de mostrar, em um único espectro, todas as possíveis classes de substâncias presentes e em quantidades detectáveis (52,120,121). Entretanto, a grande quantidade de informações obtidas em um espectro de RMN ¹H pode dificultar a interpretação dos dados quando se analisa um número elevado de amostras. A quimiometria utiliza métodos matemáticos e estatísticos para maximizar as informações que podem ser extraídas de um conjunto de dados, apresentando-as de forma mais simplificada. Neste sentido, os métodos quimiométricos têm sido aplicados com sucesso em dados espectrais para reduzir a sua complexidade e evidenciar as informações mais relevantes (52,122). Dentre os métodos quimiométricos mais populares para a análise de dados de RMN estão: Análise de Componentes Principais (PCA) e Análise Discriminante (DA).

A PCA é uma técnica da estatística multivariada que consiste em transformar um conjunto de variáveis originais em outro conjunto de variáveis de mesma dimensão denominadas de componentes principais. Os componentes principais apresentam propriedades importantes: cada componente principal é uma combinação linear de todas as variáveis originais, são independentes entre si e estimados com o propósito de reter, em ordem de estimação, o máximo de informação, em termos da variação total contida nos dados. A análise de componentes principais é associada à ideia de redução de massa de dados, com menor perda possível da informação. Neste sentido, a PCA é bastante adequada para a análise exploratória de dados multidimensionais onde as correlações cruzadas (redundâncias) podem estar presentes (14).

A DA é uma técnica multivariada utilizada para identificar as variáveis que discriminam os grupos e, assim, elaborar previsões a respeito de uma nova observação, identificando o grupo mais adequado a que ela deverá pertencer, em função de suas características. Para alcançar esse objetivo, a DA gera funções discriminantes (combinações lineares das variáveis) que ampliam a discriminação dos grupos descritos pelas variáveis dependentes. Do mesmo modo que a PCA, este método é capaz de reduzir a redundância de dados através da geração de funções

discriminantes que classificam a distribuição de cada ponto de dados no interior do agrupamento escolhido (classes). Assim, na abordagem de DA, o processo de transformação é dito ser *human guided* e dependente de classes, que fornece modelos que podem não ser o melhor absoluto considerando outras soluções de agrupamento, mas são aqueles que melhor correspondem as expectativas do usuário. No entanto, ao permitir que o usuário esteja presente nos cálculos matemáticos, melhores desempenhos de classificação podem ser alcançados através da DA.

2. Objetivos

- Criar a “impressão digital” (*fingerprint*) dos cafés brasileiros de boa qualidade, através da técnica RMN ^1H acoplada à estatística multivariada, para visualizar possíveis fraudes e adulterações por origem e grãos defeituosos, visando ajudar o país na adoção de medidas de proteção de mercado e agregação de valor ao produto.
- Traçar o perfil espectral em RMN ^1H de cafés puros e adulterados, identificando sinais marcadores dos principais adulterantes encontrados em amostras de café torrados e moídos, tais como: cascas de café, cevada, milho e soja;
- Aplicar métodos quimiométricos, afim de melhorar a resolução dos resultados obtidos, observando tendências de agrupamentos entre as amostras analisadas;
- Comparar os resultados obtidos com o método de referência, via microscopia eletrônica, utilizado pela ABIC.

3. Parte Experimental

Para um melhor entendimento do trabalho, resolve-se separar o procedimento em Trabalho 1 e 2.

3.1 Amostras analisadas

3.1.1 Trabalho 1: Impressão digital de cafés torrados brasileiros

Foram utilizadas dezenove amostras, de diferentes cafés (*Coffea arabica*), dos estados de Minas Gerais, Bahia, São Paulo e Paraná, certificados por cooperativas regionais. Cinco,

dessas amostras consistiam em grãos defeituosos, classificados como: "Riado/Rio", "Descarte", "Varreção", "Rio" e "Riado". As outras quatorze amostras foram grãos de boa qualidade, para a produção de bebidas classificadas pela ABIC como: *gourmet*, estritamente mole e suaves (Tabela 2).

Tabela 2 - Lista das amostras (*Coffea arabica*) analisadas.

nº	Código (Amostra)	Estado de Origem	Qualidade da Bebida
1	SP1	São Paulo (Norte)	Estritamente mole
2	SP2	São Paulo (Norte)	Estritamente mole
3	SP3	São Paulo (Norte)	Estritamente mole
4	SP7	São Paulo (Norte)	Estritamente mole
5	SP4	São Paulo (Norte)	Varreção
6	SP5	São Paulo (Norte)	Riado/Rio
7	SP6	São Paulo (Norte)	Descarte
8	MG1	Minas Gerais (Sul)	<i>Gourmet</i>
9	MG2	Minas Gerais (Monte Santo - Sul)	<i>Gourmet</i>
10	MG3	Minas Gerais (Sul)	<i>Gourmet</i>
11	MG4	Minas Gerais (Cerrado - Sul)	<i>Gourmet</i>
12	MG5	Minas Gerais (Sul)	Riado
13	MG6	Minas Gerais (Sul)	Rio
14	PR1	Paraná (Tomazina - Norte)	Suave
15	PR2	Paraná (Ribeirão Claro - Norte)	Suave
16	PR3	Paraná (Ribeirão Claro - Norte)	Suave
17	BA1	Bahia (Barra da Choça - Sul)	Suave
18	BA2	Bahia (Poções - Sul)	Suave
19	BA3	Bahia (Vitória da Conquista - Sul)	Suave

Fonte: Elaborada pelo autor.

3.1.2 Trabalho 2: Avaliação da adulteração de cafés torrados

Foi analisado um total de trinta e duas amostras de *blends* de cafés arábica comerciais de várias regiões do Brasil e dezesseis amostras de diferentes tipos de adulterantes (milho, cascas de café, cevada e soja). Desse total, quarenta e uma amostras (cafés e adulterantes) foram adquiridas no mercado local. Já as demais foram fornecidas pela ABIC. Na Tabela 3, são apresentadas as características das amostras analisadas.

Tabela 3 - Lista de amostras de cafés comerciais e adulterantes analisados.

Codificação	Amostra	Origem (Cidade/Estado)
1	Café Comercial	Santa Luzia - MG
2	Café Comercial	Varginha - MG
3	Café Comercial	Campos - RJ
4	Café Comercial	Piraí - RJ
5	Café Comercial	Inhaúma - RJ
6	Café Comercial	Arapongas - PR
7	Café Comercial	Teresina - PI
8	Café Comercial	Araraquara - SP
9	Café Comercial	Guaxupé - MG
10	Café Comercial	Araraquara - SP
11	Café Comercial	Rolândia - PR
12	Café Comercial	Mossoró - RN
13	Café Comercial	D'Ajuda - SE
14	Café Comercial	Jundiaí - SP
15	Café Comercial	Rolândia - PR
16	Café Comercial	Jundiaí - SP
17	Café Comercial	Santa Luzia - MG
18	Café Comercial	Guaxupé - MG
19	Café Comercial	Ribeirão Bonito - SP
20	Café Comercial	Cabedelo - PB
21	Café Comercial	Vargem Grande do Sul - SP
22	Café Comercial	Arapongas - PR
23	Café Comercial	Imperatriz - MA
24	Café Comercial	Guaxupé - MG
25	Café Comercial	Guaxupé - MG
26	Café ABIC	Ervália - MG
27	Café ABIC	Brusque - SC
28	Café ABIC	Tijucas - SC
29	Café ABIC	Jardim Limoeiro - ES
30	Café ABIC	Itanhém - BA

31	Café ABIC	Medina - MG
32	Café ABIC	Uberaba - MG
33	Casca de Café	Guaxupé - MG
34	Casca de Café	Jaú - SP
35	Casca de Café	Araraquara - SP
36	Casca de Café	Araraquara - SP
37	Cevada	São Carlos - SP
38	Cevada	São Carlos - SP
39	Cevada	Araraquara - SP
40	Cevada	Araraquara - SP
41	Milho	Matão - SP
42	Milho	Matão - SP
43	Milho	Araraquara - SP
44	Milho	Araraquara - SP
45	Soja	Araraquara - SP
46	Soja	São Carlos - SP
47	Soja	Jaú - SP
48	Soja	Jaú - SP

Fonte: Elaborada pelo autor.

3.2 Torrefação das amostras

Uma porção correspondente a 100 g de cada amostra, foram submetidas a torrefação por 5 min em um torrador de leito de jorro (IRoast, Gurnee, IL, USA) com programação de temperatura de 196 °C (3 min) a 235 °C (2 min), para obtenção de torra do tipo médio-leve, de acordo com o sistema de classificação de torra (Agtron-SCAA)(123). Posteriormente as amostras foram moídas e peneiradas em peneiras granulométricas (abertura de Ø 300 µm) e armazenadas para as etapas seguintes. A torrefação de todas as amostras, foi realizada em duplicata.

3.3 Extração das Amostras

Pesaram-se aproximadamente 150 mg das amostras torradas e moídas (cafés, milhos, cascas de cafés, cevadas e sojas), posteriormente foram submetidas a extração com 1000 µL de água deuterada (com 0,05% de TSP) e agitação em vórtex durante 1 min à temperatura

ambiente. Por fim, as soluções foram centrifugadas a 14.000 rpm durante 10 min e os sobrenadantes com volumes de 650 μ L foram transferidos para tubos de RMN de 5 mm e submetidos às análises. As extrações foram realizadas em triplicata.

3.4 Análise por RMN ^1H

As medidas espectroscópicas foram obtidas, em um espectrômetro de RMN Bruker de 14,1 Tesla (600,13 MHz para ^1H), modelo: Avance III HD 600, usando uma sonda BBFO-Z plus de 5 mm a 298 K. A sequência de pulsos utilizada na aquisição dos espectros de RMN ^1H com supressão do sinal do solvente foi a ZGCPFR. Os espectros foram adquiridos com 128 FIDs (NS), largura de pulso de 8,5 μ s (P1), janela espectral de 20,0276 ppm (SW), tempo de aquisição de 3,6 s (AQ), tempo de espera entre cada aquisição de 2 s (D1), número de pontos (TD) 64K, LB = 0,3 Hz, fator de ganho do receptor (RG) de 18 e atenuação da potência para supressão do sinal da água de 48,05 dB (PL9). A fase e a linha de base foram ajustadas usando o *software* TopSpin versão 3.2.7 (Bruker Biospin). Os espectros foram alinhados para integração, com base no sinal do ácido 3-(trimetilsilil)-propiónico- d_4 deuterado (TSP) sendo a ele atribuído o valor de 0,0 ppm. Por fim, os espectros resultantes foram salvos como arquivos ASCII e transferidos para um PC para análise dos dados.

3.5 Análise Estatística

3.5.1 Trabalho 1: Impressão digital de cafés torrados brasileiros

Para esse trabalho, a matriz de dados foi reduzida por integração em 30 regiões (compostos identificados) de 0,15 a 10 ppm (Figura 8). Os sinais de RMN para a cafeína e a trigonelina, juntamente com ácidos caféico, ferúlico, cumárico, quínico e 3-, 4- e 5-cafeoilíquicos (ACQs), foram confirmados usando padrões comerciais (Sigma-Aldrich). Outros sinais foram atribuídos de acordo com dados relatados na literatura (14,48). Durante as análises foi observada uma pequena variação de δ , tipicamente 0,02-0,05 ppm, nos sinais de N-metilpiridina e ácidos clorogênicos. A análise discriminante (DA) foi adotada para a modelagem estatística. Para superar a desvantagem estabelecida na abordagem DA, como escolhas tendenciosas e dependência de classe, o modelo foi validado por meio de *cross validation* das amostras de café entre os subconjuntos de treinamento e validação, com o objetivo de verificar a confiabilidade e dependência dos modelos discriminantes para os

conjuntos de dados de treinamento. A matriz de dados foi composta de 19 amostras e 30 variáveis (integrais de área dos sinais identificados). A modelagem estatística foi realizada usando o *software* SPSSv.23.

3.5.2 Trabalho 2: Avaliação da adulteração de cafés torrados

A matriz de dados foi construída utilizando todos os pontos do espectro (0 a 10 ppm), já que nesse trabalho, o objetivo era encontrar um sinal marcador que indicasse a presença de um dos adulterantes analisados nas amostras de cafés torrados. A composição da matriz de dados foi representada por 48 amostras e 64.000 variáveis (valores de intensidades dos sinais em RMN ^1H). Posteriormente, os dados foram tratados e submetidos a análise exploratória usando reconhecimento de padrões não supervisionados, empregando análise de componentes principais (PCA). As análises estatísticas foram realizadas com o *software* Pirouette v. 4.5.

4. Resultados e Discussão

4.1 Trabalho 1: Impressão digital de cafés torrados brasileiros

As análises das características singulares de produtos de café, de diferentes regiões de origens, são abordadas com diferentes técnicas analíticas, bem como por RMN. A variabilidade dos cafés nas macrorregiões (países diferentes) tem sido frequentemente relatada na literatura (48,92,124–126). No entanto, a diferenciação de cafés do mesmo país (microrregião) não é descrita. Para o melhor do nosso conhecimento, o presente trabalho proposto é o primeiro a descrever a diferenciação microrregional de cafés usando espectros de RMN ^1H .

No presente trabalho, foram selecionadas cinco amostras de baixa qualidade, a fim de poder diferenciar os cafés de acordo com a região, independentemente da presença de grãos defeituosos, que são quimicamente bastante distintos (88,127). A Figura 8 mostra o espectro de RMN ^1H da solução obtida após a extração com água deuterada (D_2O), proposto aqui como a impressão digital do café. O espectro apresenta um padrão de ressonância complexo, devido aos numerosos compostos presentes no café.

O café cru apresenta a seguinte composição (na base da matéria seca): 40-50% de polissacarídeos, com 6-9% de sacarose; 15% de lipídios, dos quais 75% estão relacionados a triglicerídeos; 9-10% de proteínas e aminoácidos; 6-12% de ácidos clorogênicos (ácidos

cafeoil-feruloil-quínico - ACQs) e derivados; 0,6-1,5% de alcaloides, principalmente cafeína e trigonelina (72,85).

A torrefação é um processo extremamente complexo no qual o café é exposto a temperaturas até 340 ° C. Durante este procedimento, ocorrem uma série de mudanças físicas e químicas, envolvendo reações de Maillard e Strecker, hidrólise, pirólise e outras degradações que geram compostos responsáveis pela cor (como as melanoidinas) e o aroma. No entanto, estes compostos precursores não são completamente degradados, restando em parte da composição de café torrado (128,129). O grau de torrefação aplicado às amostras (cor médio-leve) foi o grau mais amplamente utilizado para cafés *gourmet* e enfatiza as características aromáticas. As estruturas químicas de vários compostos identificados nos cafés são mostradas na Figura 8.

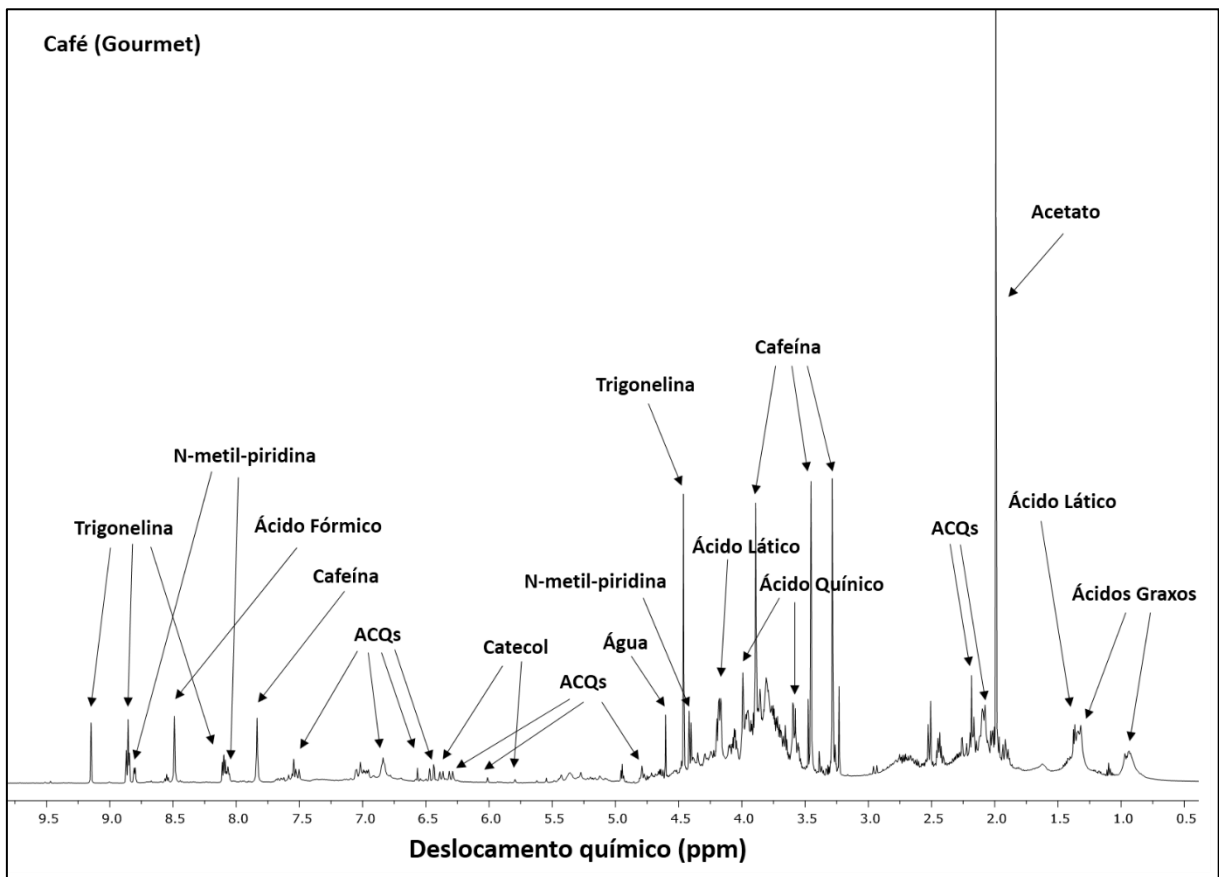


Figura 8 - Impressão digital do espectro de RMN ^1H (600 MHz) de café torrado brasileiro (*Gourmet*), em D_2O .

Fonte: Elaborada pelo autor.

Nos espectros de RMN ^1H , os sinais de água foram suprimidos para melhorar a sensibilidade dos outros sinais e os valores integrados foram utilizados na análise discriminante.

A identificação dos principais metabólitos foi realizada em comparação com moléculas de referência e valores de deslocamentos químicos relatados na literatura (14,48,130). Em geral, apesar da complexidade das amostras em termos dos compostos presentes, a região de 0 a cerca de 3,8 ppm (Figura 8) foi dominada pelas ressonâncias da cafeína (singletos de N-metila, δ 3,13; 3,30 e 3,73 ppm), acetato (δ 2,04 ppm), ácido láctico (δ 1,21 e 4,03 ppm), ácidos graxos (δ 0,87 e 1,27 ppm) e ACQs (δ 1,80; 2,16; 3,31 e 3,84). A região entre 4,2 e 9,1 ppm (Figura 8) apresentou menor complexidade, apesar do grande número de sinais, com dominância de trigonelina (δ 4,51; 7,95; 8,55; 8,68 e 8,99 ppm), N-metilpiridina (δ 4,35; 7,92, 8,40 e 8,65 ppm), catecol (δ 5,65 e 6,22 ppm), ACQs (δ 5,12; 5,88; 6,21; 6,28; 6,41 e 7,40 ppm) e com menor abundância a cafeína (δ 7,68 ppm). A região anomérica de 3,2 a 5,5 ppm incluiu os sinais de ressonância de oligo e polissacarídeos. Estes sinais foram altamente sobrepostos, provavelmente devido às grandes quantidades de polissacarídeos presentes. No entanto, ainda foi possível distinguir sinais com maior intensidade, como a cafeína, ácido quínico e ácido láctico. Os compostos identificados neste estudo são discutidos individualmente a seguir.

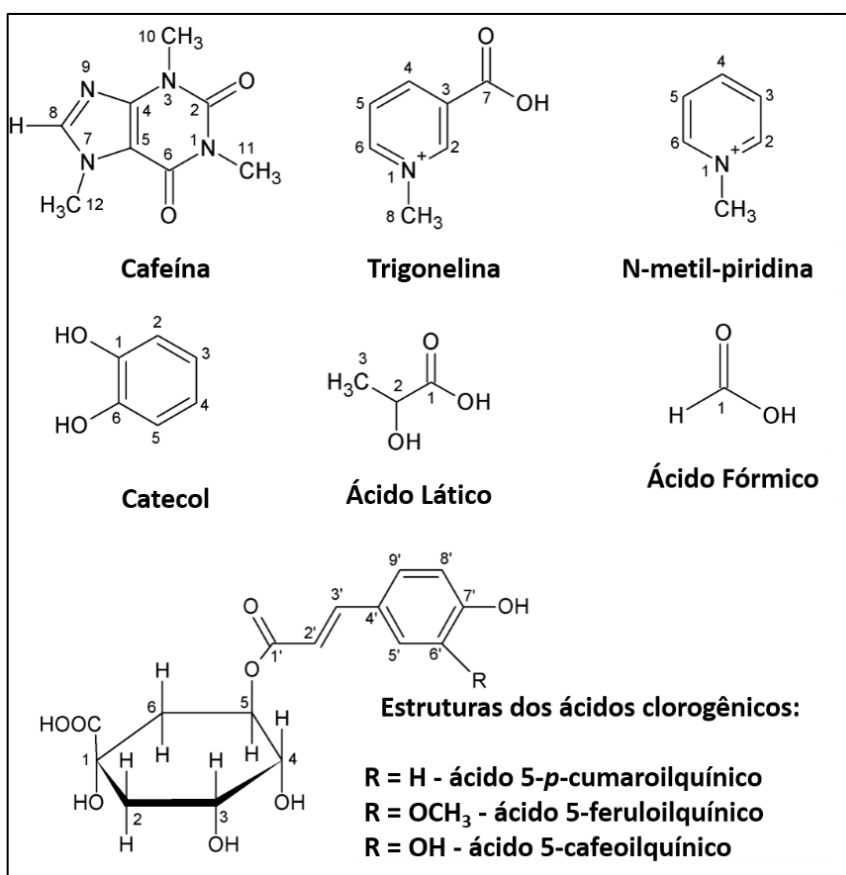


Figura 9 - Estruturas de alguns dos compostos identificados nos cafés.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Cafeína

A molécula de cafeína foi claramente identificada a partir de seus sinais intensos, principalmente três sinais de N-metila a 3,13; 3,30 e 3,73 ppm, bem como o sinal a 7,68 ppm referente ao próton aromático (Figura 9). A cafeína é termicamente bastante estável (128), resistindo a altas temperaturas durante o processo de torrefação, portanto, é um excelente marcador quantitativo para cafés, como demonstrado por Tavares e Ferreira (14) e Wei et al. (130).

Trigonelina e N-metilpiridina

A trigonelina foi identificada por um sinal a δ 4,51 ppm, juntamente com ressonâncias a δ 7,95; 8,55; 8,68 e 8,99 ppm (Figura 8). A trigonelina é fortemente degradada durante o processo de torrefação e é um precursor de N-metilpiridina e niacina (Figura 9)(128,131). Quanto maior o grau de torrefação, menor será o sinal da trigonelina e maior serão os sinais correspondentes aos seus produtos (128). Devido à semelhança entre as moléculas, e a presença de diversos sinais no espectro em RMN ^1H do café torrado, o sinal do hidrogênio da metila (a δ 4,35 ppm) da N-metilpiridina sofreu sobreposição (Figura 8). Outras ressonâncias da N-metilpiridina foram identificadas, com sinais em δ 7,92, 8,40 e 8,65 ppm (Figura 8). Os deslocamentos na região aromática foram devidos à presença do grupamento carboxílico na molécula de trigonelina, com uma menor blindagem dos hidrogênios atuando para aumentar a mudança. Pequenas diferenças nos sinais dos hidrogênios H3, H4 e H1 podem ser usadas para determinar o grau de torrefação do café, nas amostras analisadas, uma vez que existe uma relação direta com as moléculas presentes. Esta é uma descoberta útil, porque os métodos que empregam procedimentos de perda de peso e baseados em cores para determinar o grau de torra, mostraram ser ineficazes (92,132). Para o grau de torra utilizado no presente estudo, observou-se que a intensidade do sinal de trigonelina foi maior do que a N-metilpiridina, correspondente a uma torra média, como esperado para amostras *gourmet*.

Considerando a relação da integral da área da do sinal de trigonelina/N-metilpiridina (δ 8,99 e 7,92, respectivamente), as amostras de baixa qualidade de São Paulo (amostras SP05 e SP06) apresentaram índices menores (0,65 a 0,70), em comparação com amostras de boa qualidade (0,86 e 1,00). Isso demonstrou que houve uma menor degradação de trigonelina nas amostras de baixa qualidade, em comparação com as amostras de boa qualidade, apesar do fato de que ambos os tipos foram torradas pelo mesmo período de tempo e nas mesmas condições.

Essas descobertas estavam de acordo com um estudo preliminar que mostrava que, para um grau de torra médio-leve, as menores perdas de trigonelina ocorreram em grãos pretos defeituosos (10-12%), enquanto os grãos saudáveis apresentavam perdas de 26-61% (91). No entanto, neste estudo, as amostras de baixa qualidade foram compostas por uma mistura de grãos defeituoso. Conseqüentemente, seriam necessárias mais análises, antes que este parâmetro possa ser adotado.

Compostos Fenólicos

A maioria dos compostos fenólicos no café são conhecidos como ácidos clorogênicos (Figura 9). Esta família de compostos é derivada da esterificação do ácido quínico com derivados do ácido cinâmico, tais como, ácidos cafeico, ferúlico e *p*-cumárico. Os subgrupos principais são os isômeros de ácido cafeoilquínico, feruloilquínico e ácidos dicafeoilquínico, juntamente com menores quantidades de ácidos *p*-coumaroilquínico (72).

Os espectros apresentaram sinais com deslocamento químico, na faixa de δ 5,18-8,03 ppm que correspondem à sinais de hidrogênios ligados a carbonos insaturados de derivados do cafeoil (Figura 9). Dois sistemas de spins foram identificados nas regiões δ 6,28-7,47 ppm e δ 6,21-7,42 ppm, e os sinais a δ 1,80, 2,16, 3,31, 3,81 e 4,65 ppm foram atribuídos aos prótons do anel quínico. O catecol também foi identificado por sinais com deslocamentos químicos de δ 7,25 e 6,22 ppm, associado a prótons ligados diretamente ao anel aromático (Figura 9).

Lipídios

Os lipídios individuais presentes no café são degradados em diferentes extensões durante o processo de torrefação, resultando em maior complexidade na composição química do café em graus superiores de torra, devido à degradação de outros constituintes (128,133). Apesar do fato de que a extração foi realizada com óxido de deutério, os sinais referentes aos lipídios no café, estavam presentes em δ 0,87 e 1,27 ppm (Figura 8). Consonni et al. (48) associou esses sinais com prótons de metil e metileno de cadeias de ácidos graxos, respectivamente.

Outros compostos

O espectro também mostrou os sinais de outros compostos orgânicos incluindo acetato (a δ 2,16 ppm) e ácido láctico (a δ 1,21 e 4,03 ppm), conforme identificado anteriormente por Tavares e Ferreira (14), Wei et al. (130) e Consonni et al. (48).

4.1.2 Discriminação de cafés brasileiros de acordo com a região

Os sinais dos metabolitos identificados foram divididos em 30 regiões espectrais e cada área foi utilizada na análise discriminante. Esta abordagem foi adotada porque estudos anteriores mostraram que a RMN pode ser usada para análises quantitativas (14,134). A qualidade espectral foi reforçada pela acumulação de vários espectros, conforme descrito na Seção 3.1.5 deste capítulo. Este método de otimização permitiu a utilização de todo o espectro das amostras, o que é importante nas análises de rotina. Usando a técnica de Análise Discriminante (DA), as equações lineares combinadas aos compostos estatisticamente relevantes (fatores), foram gerados a partir dos dados experimentais, conforme descrito na equação a seguir.

$$Y = \beta_0 + \beta_1 V_1 + \beta_2 V_2 + \beta_3 V_3 + \dots + \beta_n V_n$$

Onde Y é a função discriminante, β_0 , β_1 , β_2 , β_3 e β_n são os coeficientes discriminantes lineares, e V_1 , V_2 , V_3 e V_n são a abundância dos compostos que correspondem aos coeficientes β .

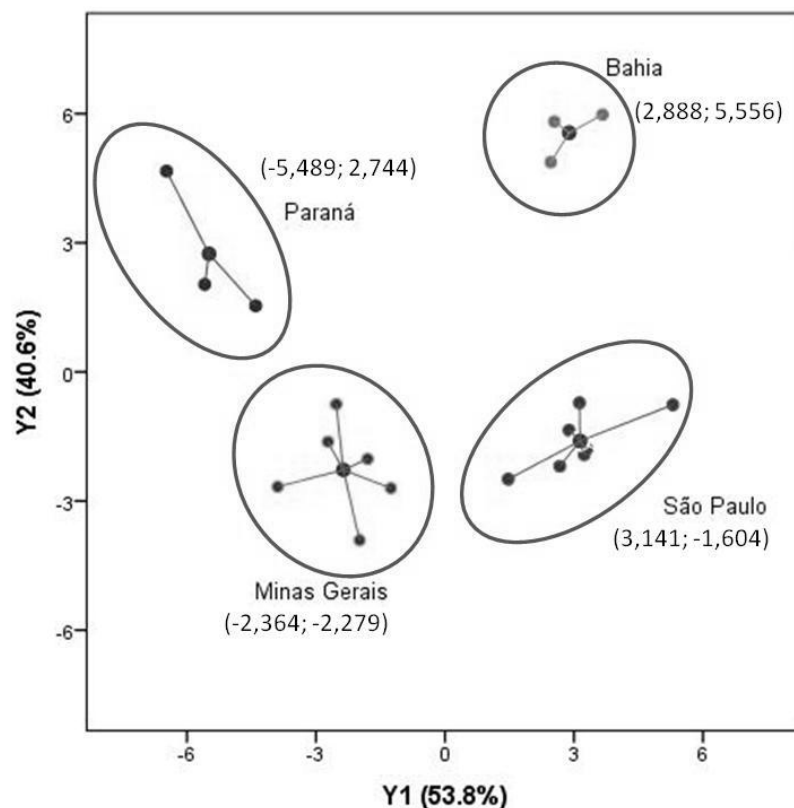


Figura 10 - Principais funções discriminantes, com valores de centróide (Y_1 e Y_2).

Fonte: Elaborada pelo autor.

A discriminação das amostras de café de acordo com as suas origens geográficas é indicada na Figura 10, utilizando apenas Y1 e Y2 (Tabela 4). Para cada grupo geográfico, os centroides são plotados usando símbolos preenchidos, enquanto os pontos de dados para cada grupo são plotados de acordo com suas coordenadas de posição (símbolos não preenchidos) e estão conectados com linhas para a centroide do grupo correspondente. As áreas associadas com os diferentes grupos geográficos são mostradas usando círculos.

As variáveis de discriminação mais importantes ($p < 0,05$) com seus respectivos valores de p foram: trigonelina₁ (0,018), trigonelina₂ (0,016), ácido fórmico₄ (0,042), trigonelina₅ (0,036), cafeína₆ (0,039), N-metilpiridina₇ (0,023), ACQs₈ (0,030), catecol₁₅ (0,022), catecol₁₆ (0,019) e cafeína₂₅ (0,014) (Tabela 4). A aplicação do tratamento DA resultou em três funções discriminantes (Y). De acordo com o teste lambda de Wilk (57), Y1 explicou 53,8% e Y2 explicou 40,6% da variância total, totalizando 94,4% da variância geral. Os resultados da Tabela 4 mostram os coeficientes lineares obtidos.

Tabela 4 - Coeficientes não padronizados das três funções discriminantes canônicas para classificação de origens geográficas.

Compostos (V _i)	Coeficientes de Função (β _i)		
	Y ₁	Y ₂	Y ₃
Trigonelina ₁	$-2,18 \times 10^{-8}$	$5,64 \times 10^{-9}$	$-1,06 \times 10^{-8}$
Trigonelina ₂	$6,12 \times 10^{-9}$	$-2,81 \times 10^{-8}$	$-1,27 \times 10^{-8}$
N-metil-piridina ₃	$-5,27 \times 10^{-8}$	$4,62 \times 10^{-9}$	$7,92 \times 10^{-9}$
Ácido Fórmico ₄	$-3,63 \times 10^{-8}$	$2,99 \times 10^{-8}$	$2,23 \times 10^{-8}$
Trigonelina ₅	$2,34 \times 10^{-8}$	$1,47 \times 10^{-8}$	$2,62 \times 10^{-8}$
Cafeína ₆	$3,82 \times 10^{-8}$	$-1,19 \times 10^{-8}$	$-8,58 \times 10^{-10}$
N-metil-piridina ₇	$3,50 \times 10^{-10}$	$-1,44 \times 10^{-8}$	$-1,38 \times 10^{-8}$
ACQs ₈	$-5,70 \times 10^{-9}$	$8,55 \times 10^{-9}$	$2,73 \times 10^{-9}$
ACQs ₁₀	$-4,97 \times 10^{-8}$	$-2,78 \times 10^{-8}$	$3,58 \times 10^{-8}$
ACQs ₁₁	$1,37 \times 10^{-7}$	$8,08 \times 10^{-8}$	$4,73 \times 10^{-8}$
Catecol ₁₂	$-5,36 \times 10^{-10}$	$-2,32 \times 10^{-7}$	$-1,90 \times 10^{-7}$
Catecol ₁₅	$-3,92 \times 10^{-9}$	$1,30 \times 10^{-8}$	$2,26 \times 10^{-8}$
Catecol ₁₆	$-2,24 \times 10^{-9}$	$3,65 \times 10^{-8}$	$-5,81 \times 10^{-9}$
Cafeína ₂₅	$2,98 \times 10^{-9}$	$-2,55 \times 10^{-9}$	$1,39 \times 10^{-9}$
(Constante)	-12,024	11,995	5,180

Fonte: Elaborada pelo autor.

Um dos aspectos da diferenciação obtida usando DA é a dispersão de pontos de dados dentro de um determinado grupo. A respeito disso, deve-se prestar atenção à categoria Minas Gerais, onde foi observada a maior dispersão relativa entre as amostras, seguidas das amostras do Paraná e de São Paulo (Figura 10). Os perfis dados pelas amostras de São Paulo e Minas Gerais eram altamente similares, que só eram discriminados pela função Y1. De acordo com a análise DA, os cafés dessas regiões parecem ter composição intermediária, em termos de compostos discriminantes, em relação aos demais grupos. Esse comportamento, pode ser explicado pela proximidade das regiões de produção nos estados de São Paulo e Minas Gerais.

A comparação entre os grupos de amostras indicou que duas funções eram necessárias para discriminar os cafés de São Paulo e Bahia, enquanto a baixa dispersão em torno do centróide foi notada para as amostras da Bahia, em comparação com os outros grupos (Figura 10).

As amostras com as maiores distâncias quadradas para os centroides do grupo (distâncias de Mahalanobis) foram as de São Paulo: SP1 (6,29) e SP2 (3,58); Minas Gerais: MG3 e MG5 (distâncias de 3,48 e 8,63, respectivamente) e Paraná, PR2 (4,84). Uma maior distância para o centróide é um indicador de uma forte diferença na probabilidade de perfil da amostra e na possível classificação cruzada. A amostra de MG5 era a de menor qualidade (Tabela 2), fornecendo uma explicação para sua maior dispersão, já que os cafés de menor qualidade possuem composição química diferente. Por outro lado, o fato de que as amostras de boa e baixa qualidade da mesma região não foram diferenciadas pelo modelo, demonstraram o bom desempenho do método e confirmaram a capacidade das funções discriminantes para classificar as amostras, seguindo as seleções dos compostos utilizados neste procedimento.

A Tabela 5 resume o desempenho dos modelos discriminantes em relação à classificação das amostras do banco de dados de treinamento. Consequentemente, uma classificação totalmente correta foi alcançada sem validação cruzada (usando todas as amostras de café), o que pode ser atribuído à adequação dos compostos da base de dados a serem usados como fatores discriminantes. No entanto, a aplicação de uma validação cruzada expôs algumas classificações incorretas envolvendo amostras de São Paulo e Bahia. Nesses testes, o sucesso das classificações foi reduzido para 33,3% (Bahia) e 57,1% (São Paulo) após validação cruzada. No caso das amostras de Minas Gerais e Paraná, obteve-se 66,7% de sucesso.

A aplicação de DA neste trabalho teve como objetivo identificar os compostos mais relevantes, cujas variações de concentração entre amostras de café de diferentes origens geográficas são evidentes o suficiente para serem usadas para julgar/confirmar essas origens,

permitindo assim um procedimento de controle de qualidade. Em resumo, o DA forneceu uma boa precisão, permitindo a diferenciação química de amostras de café de acordo com suas origens. Os compostos mais adequados para este fim foram trigonelina, N-metilpiridina, catecol e cafeína.

A utilização da impressão digital em RMN ^1H de cafés torrados, proporcionou um método simples e eficaz para distinguir os produtos de acordo com as regiões de origem, apesar dos padrões de ressonância complexa devido aos numerosos compostos presentes no café. Os cafés foram claramente diferenciados, mesmo considerando a proximidade de regiões produtoras como São Paulo e o sul de Minas Gerais e seus climas e altitudes similares. A metodologia desenvolvida oferece potencial para ser usada no controle de qualidade relacionado ao grau de torra de cafés.

Tabela 5 - Desempenho da classificação geral (em %) do modelo DA, com e sem validação cruzada (VC), para estudo de diferenciação de quatro estados brasileiros (grandes produtores de café).

Classe Original	Predição de Classes (Modelo DA)							
	São Paulo		Bahia		Minas Gerais		Paraná	
	Sem VC	Com VC	Sem VC	Com VC	Sem VC	Com VC	Sem VC	Com VC
São Paulo	7 (100%)	4 (57,1%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	2 (28,6%)	0 (0%)	1 (14,3%)
Bahia	0 (0%)	1 (33,3%)	3 (100%)	1 (33,3%)	0 (0%)	1 (33,3%)	0 (0%)	0 (0%)
Minas Gerais	0 (0%)	1 (16,6%)	0 (0%)	1 (16,6%)	6 (100%)	4 (66,7%)	0 (0%)	0 (0%)
Paraná	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (33,3%)	0 (0%)	0 (0%)	3 (100%)	2 (66,7%)

Fonte: Elaborada pelo autor.

4.2 Trabalho 2: Avaliação da adulteração de cafés torrados

Neste trabalho, os espectros de RMN ^1H (Figura 11) propostos como “*fingerprints*” mostraram que a composição química do café torrado diferiu significativamente das composições das amostras de cevada, soja, milho, e de casca de café. Alguns dos compostos identificados no café por Ribeiro et al. (2015)(135) são observados na Figura 11A, entre os

quais se destacam compostos aromáticos (ácidos clorogênicos, cafeína, trigonelina, N-metilpiridina) e ácido fórmico, na região de 6,0 a 9,3 ppm e compostos lipídicos, aminoácidos e ácidos alifáticos, na região de 0,7 a 3,0 ppm. Os adulterantes estudados (soja, milho e cevada) tratam-se de sementes em que os principais componentes são carboidratos. Esta característica foi mantida, mesmo depois do processo de torrefação, como pode ser visto no espectro mostrado nas Figuras 11B-11E (região de deslocamento químico 5,0-3,0 ppm).

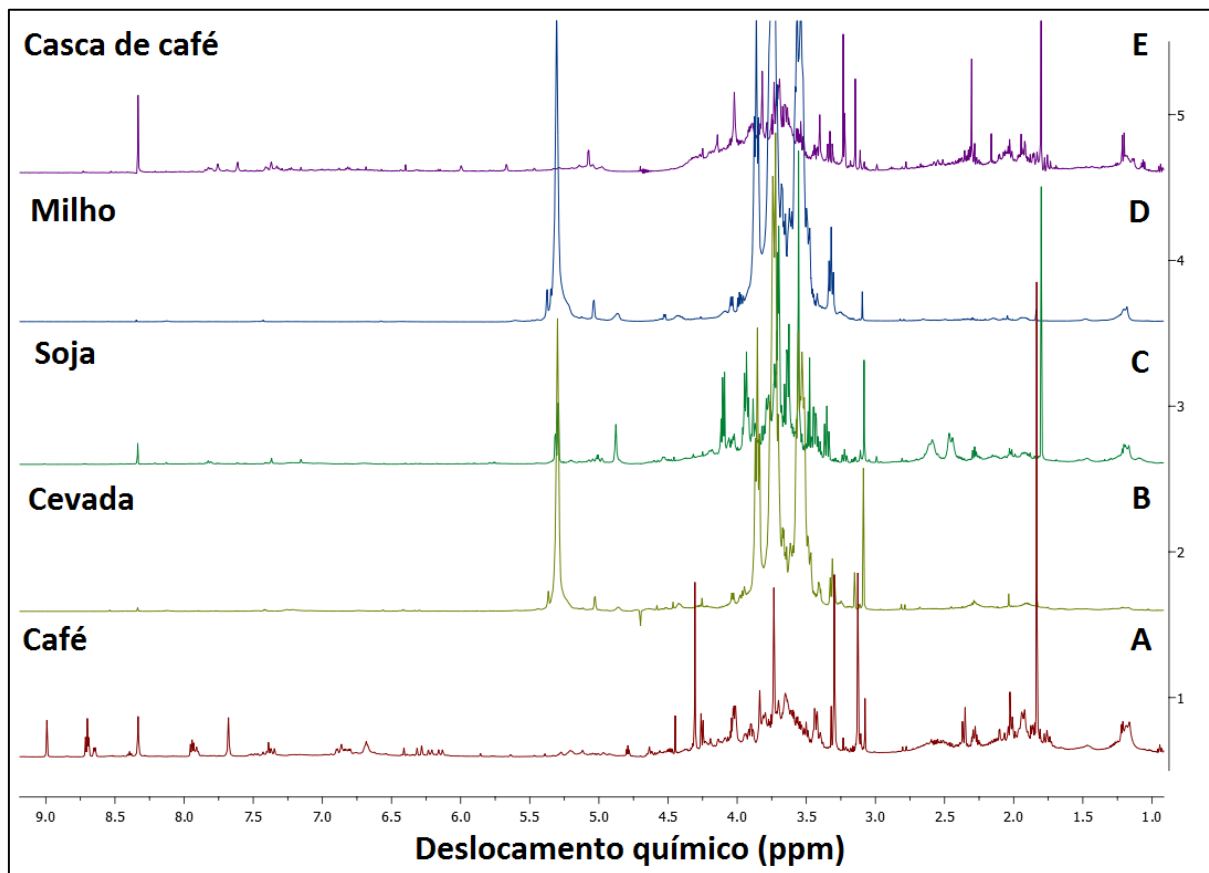


Figura 11 - Fingerprints em RMN ^1H de café torrado (A), cevada (B), soja (C), milho (D) e cascas de café (E).

Fonte: Elaborada pelo autor.

Para a identificação de um adulterante usando esta técnica, foi necessário encontrar sinais que estavam presentes nos espectros dos adulterantes e que não apareciam no espectro de café. A seleção desses sinais marcadores, considerou dois parâmetros: intensidade e localização (deslocamento químico), já que era preferível a utilização de sinais que estavam livres de interferências dos demais sinais das amostras. Após a sobreposição dos espectros do adulterantes com o espectro de café torrado, vários sinais foram identificados e puderam ser

utilizados como marcadores (Figura 12). Para a indicação da presença de milho, foi selecionado um sinal singlete de alta intensidade com deslocamento químico em δ 5,30 (s) ppm, correspondente ao sinal de hidrogênio ligado ao carbono anomérico da molécula de amido (carboidrato), e outro sinal em 5,03 (d, $J = 3,7$ Hz) ppm. Já os sinais com deslocamento químico em δ 5,30 (s), 5,03 (d, $J = 3,7$ Hz) e 3,15 (s) ppm, foram escolhidos para indicar a presença de cevada. Para a soja, os sinais marcadores foram aqueles que apresentaram deslocamento químicos em: δ 5,30 (dd, $J = 12,5, 3,8$ Hz) e 4,88 (t, $J = 3,1$ Hz) ppm. Os espectros de café e casca de café apresentaram similaridade considerável, já que vários compostos presentes no café, também puderam ser observados na casca. Mas os sinais a δ 5,08 (d, $J = 4,0$ Hz) e 4,98 (s) ppm, foram identificadas como marcadores para a presença de casca de café nas análises das amostras comerciais.

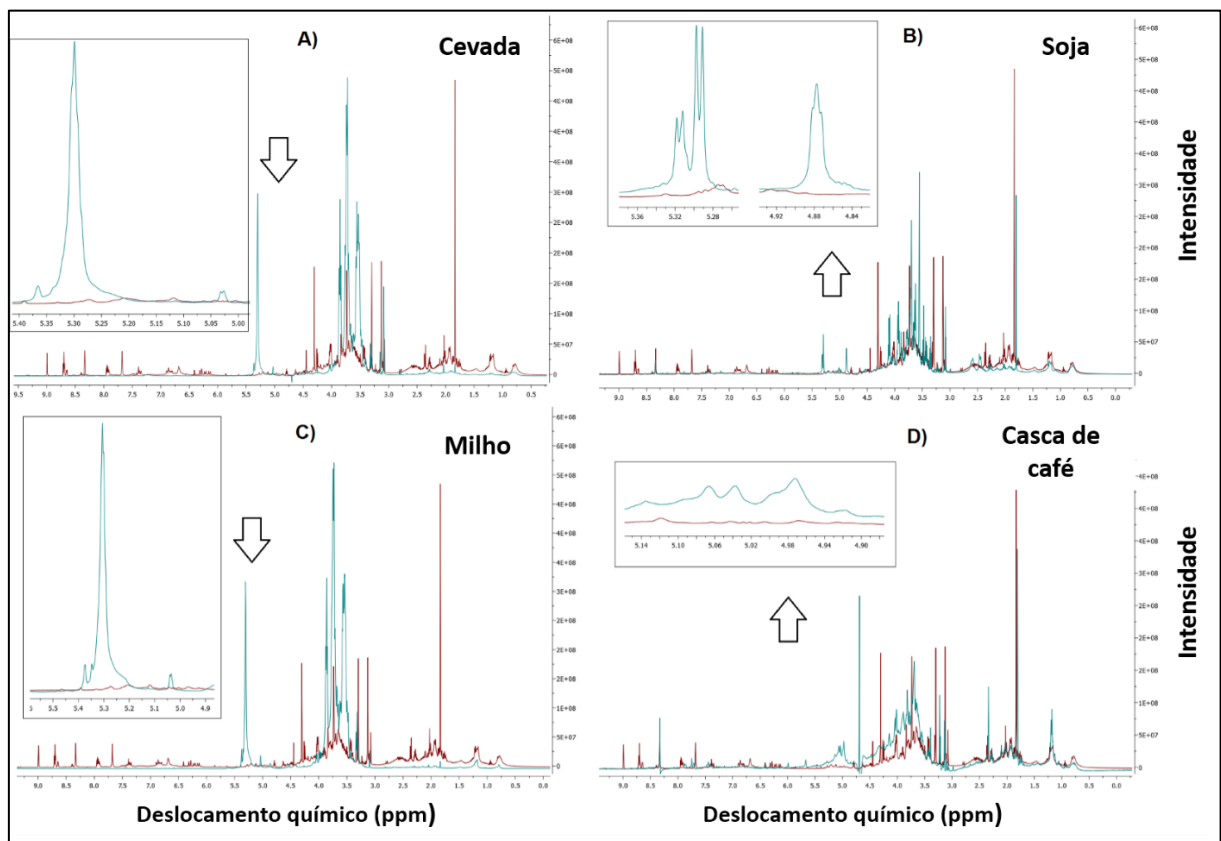


Figura 12 - Principais sinais marcadores de adulterantes obtidos por sobreposição com o *fingerprint* de café torrado: cevada (A), soja (B), milho (C), e casca de café (D).

Fonte: Elaborada pelo autor.

A avaliação quantitativa de adulterantes foi realizada utilizando-se misturas de adulterantes e café torrado. Usando diferentes sinais marcadores, observou-se que com o

aumento dos percentuais (30, 50, e 70%) de adulteradores em misturas de café, resultou no aumento da intensidade dos sinais dos compostos marcadores (Figura 13), assegurando o potencial quantitativo das análises.

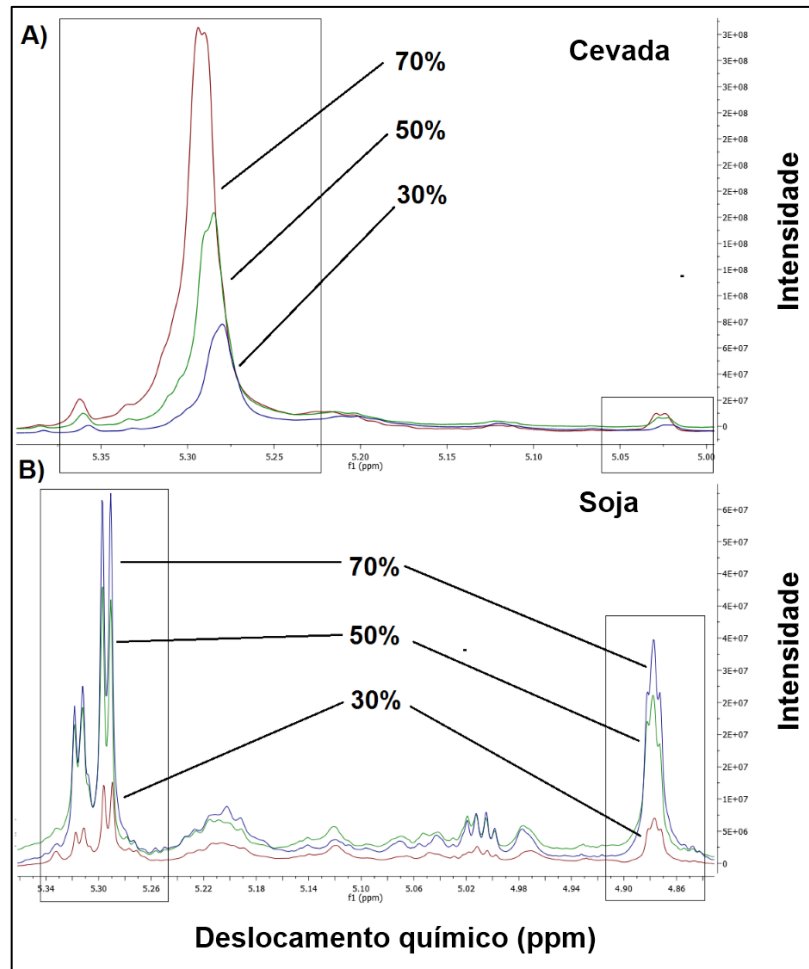


Figura 13 - Intensidades de sinais marcadores de acordo com a porcentagem de adulterantes: cevada (A) e soja (B).

Fonte: Elaborada pelo autor.

Cinco das 48 amostras analisadas apresentaram adulteração, devido à presença de milho, cevada, ou casca de café. A Figura 14 fornece uma sobreposição dos espectros de amostras de café puro, milho, e café comercial, mostrando claramente a adulteração da amostra de café comercial por milho, indicada pelo sinal em 5,30 ppm de milho no espectro RMN ^1H . Vale ressaltar que a maioria dos trabalhos envolvendo a RMN no estudo de cafés tem utilizado essa técnica para identificação de substâncias isoladas ou que constituem um pequeno grupo de substâncias numa fração extraída do café, nesse trabalho a abordagem é feita no espectro em sua totalidade.

Com a identificação da fraude no café comercializado a nível nacional, essa metodologia deve ajudar a facilitar a agregação de valor aos produtos através da certificação de qualidade. Podendo ser utilizada na adoção de medidas mais eficazes para a detecção de adulterantes (autenticidade), bem como na certificação de origem (rastreabilidade). No Brasil, essas questões são atualmente objeto de incentivos governamentais e comerciais.

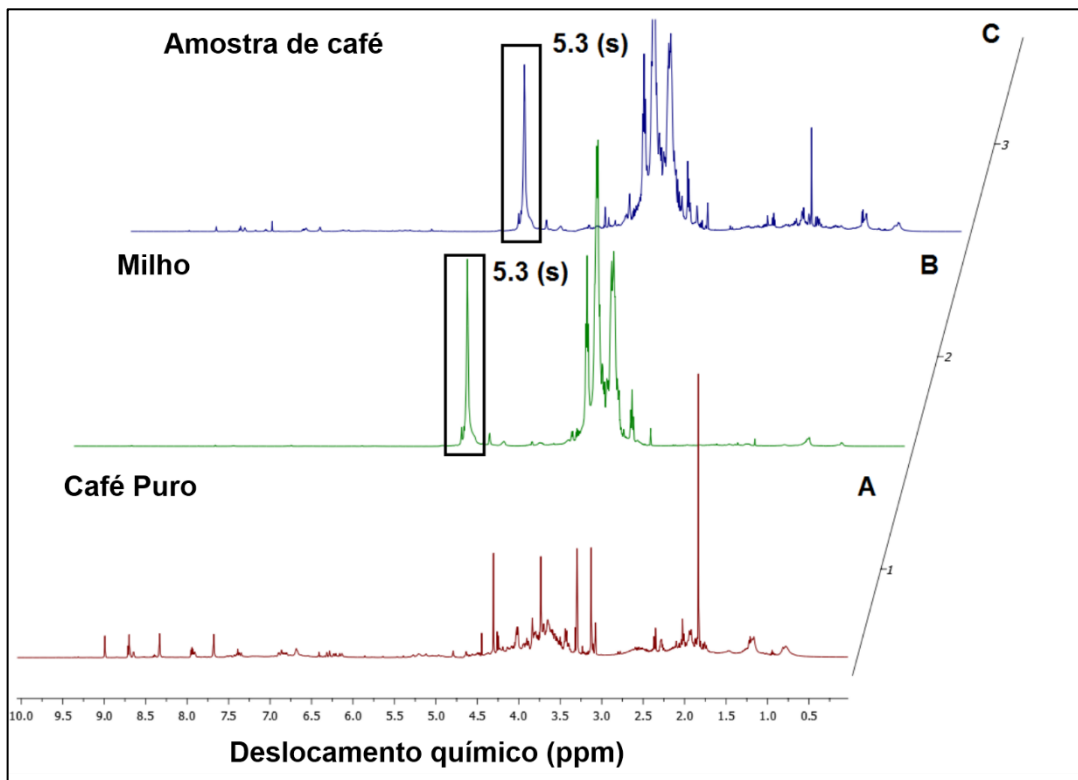


Figura 14 - Sobreposição dos espectros de RMN ^1H para o café puro torrado (A), milho (B), e uma amostra de café comercial (C).

Fonte: Elaborada pelo autor.

4.2.1 Análise Quimiométrica dos dados

Antes de executar a análise quimiométrica foi realizada a análise visual dos dados, com o objetivo de verificar as diferenças entre os espectros. Quando se trabalha com dados de RMN é importante fazer essa análise, pois, é necessário verificar se as diferenças espectrais são originadas realmente das diferenças entre as composições das amostras ou se são relacionadas com problemas nas medidas espectroscópicas tais como, *shimming*, eficiência da supressão do sinal de $\text{H}_2\text{O}/\text{HDO}$, correções de fase e linha de base etc. É preciso tomar cuidado para que variações nesses parâmetros não levem a erros nas análises, pois quando existem diferenças

entre os espectros, sejam elas devido às diferenças nas composições das amostras ou outros fatores, a análise quimiométrica fará distinção entre elas, classificando-as em grupos diferentes. Entretanto, no conjunto de dados em questão nenhuma amostra apresentou problemas visíveis.

Inicialmente, antes da plotagem dos dados, os espectros foram alinhados e realizadas as devidas correções de fase e linha base. A análise foi realizada em todo espectro, exceto na região dos sinais dos hidrogênios referentes ao TSP e da água (H₂O/HDO). Foram analisadas 32 amostras de cafés comerciais e 16 adulterantes. Para a análise de PCA, foram avaliados diversos pré-processamentos dos dados, dentre eles, normalizado e centrado na média, associada ainda a aplicação das transformações matemáticas, tais como, primeira e segunda derivada e logarítimo. Tais procedimentos foram realizados, afim de encontrar o tratamento que melhor se adequava para explicar o modelo. Três fatores explicaram 62,01% da variância total.

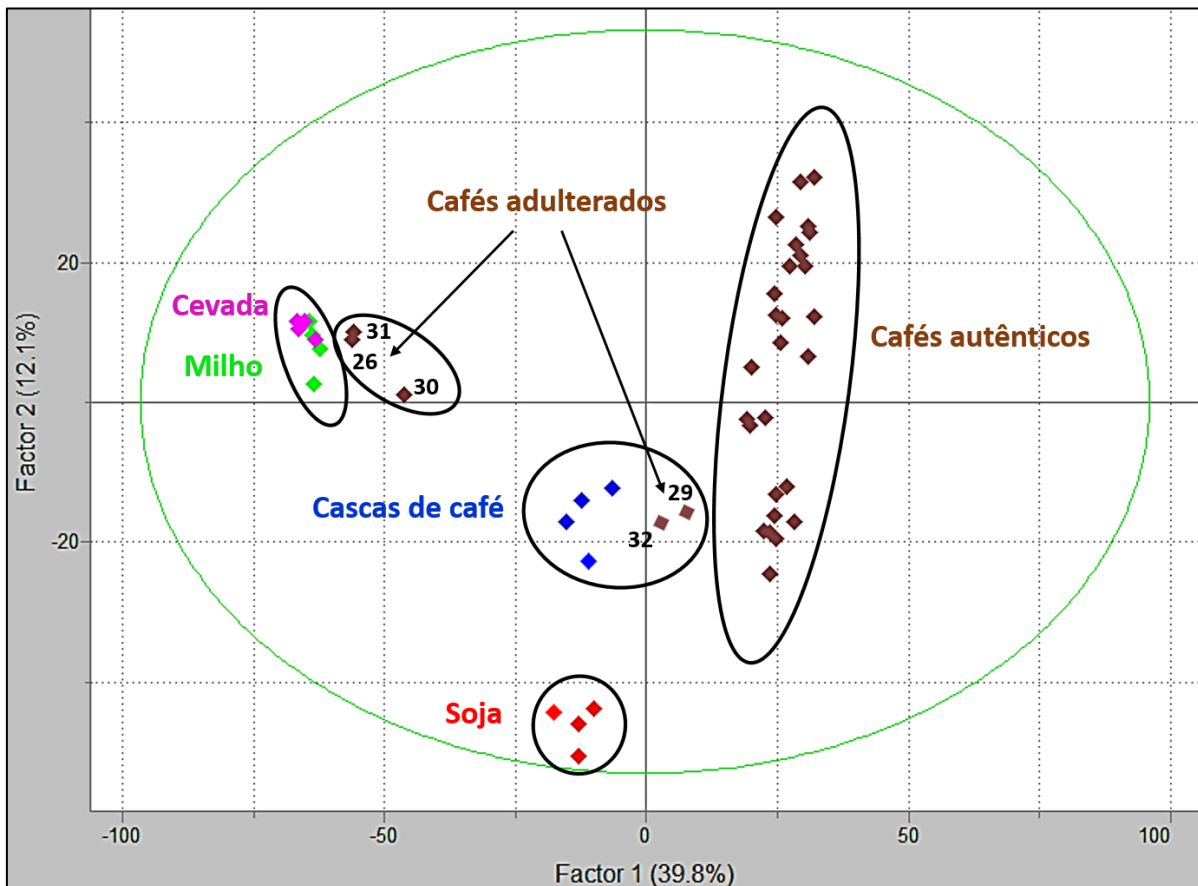


Figura 15 - Gráfico de *scores* obtidos pela PC1 X PC2.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Na análise por PCA, a interpretação dos resultados é facilitada por gráficos bidimensionais. Os gráficos de *scores* representam as amostras projetadas no novo sistema de

eixos das componentes principais, sendo possível verificar o agrupamento daquelas que são semelhantes entre si, e a discriminação em classes daquelas diferentes. Os gráficos de *loadings* indicam quais variáveis do conjunto original contribuem para a discriminação observada nos gráficos de *scores*, evidenciando as diferenças na composição química das amostras. Analisando o gráfico de *scores* (Figura 15) das amostras com o pré-processamento, centrado na média e aplicação da primeira derivada, observou-se uma boa separação pelas componentes principais 1 e 2 (PC1 x PC2). As amostras de cafés (31, 26 e 30) apareceram agrupadas aos adulterantes (milho e cevada). Já as amostras 29 e 32 demonstraram tendência a se agruparem ao adulterante casca de café. As demais amostras de café comerciais, apareceram agrupadas em grupos diferentes dos adulterantes.

Através do gráfico de *loadings*, observou-se que a discriminação entre as amostras foi obtida pelos sinais na região de δ 3,0 a 5,5 ppm, devido a melhor distinção de substâncias observadas entre as amostras de cafés e seus adulterantes nessa região do espectro (Figura 16).

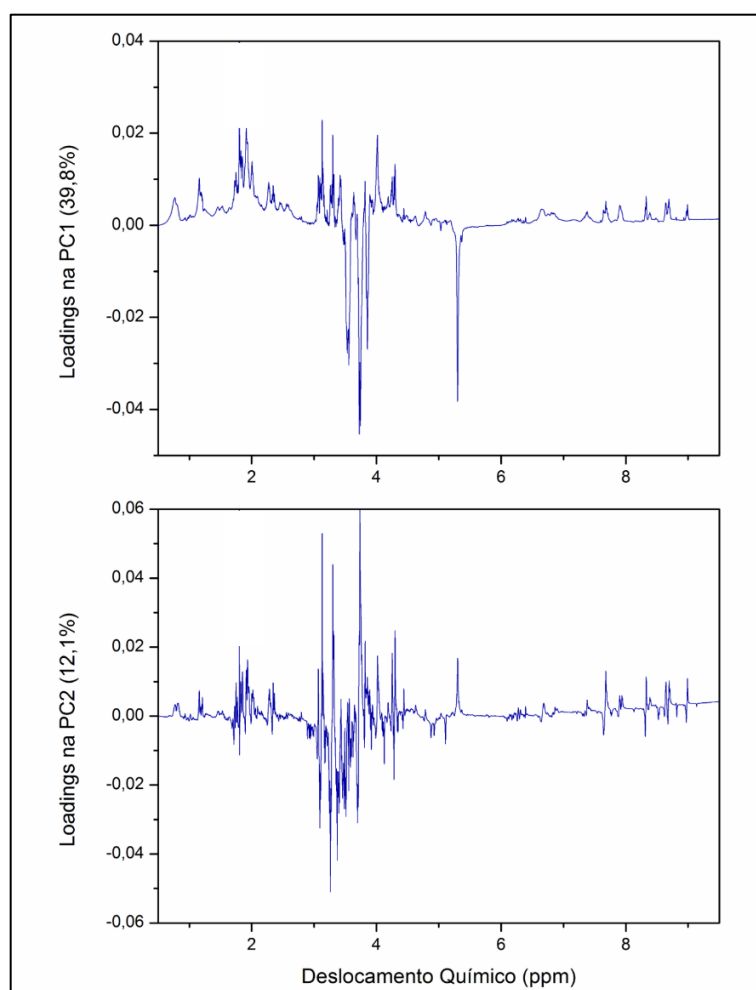


Figura 16 - Gráficos de *loadings* obtidos pela PC1 e PC2.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Por fim, os resultados obtidos pelo método proposto por RMN ^1H (Tabela 6) foram comparados com os resultados obtidos pela ABIC (microscopia óptica), nos quais mostraram ser excelentes, pois corroboram entre si. Vale ressaltar que a metodologia desenvolvida pode ser aplicada em um número maior de adulterantes, sendo uma análise rápida e não subjetiva.

Tabela 6 - Comparação da metodologia ABIC com a metodologia proposta.

Amostra	Método ABIC	Método Proposto
31	0,62% casca de café; 6,75 % cevada	Adulterada com cevada
30	2,39% milho	Adulterada com milho
28	Puro	Amostra pura
27	Puro	Amostra pura
32	7,35% casca de café	Adulteradas com casca de café
26	3,69% casca de café; 10,16% cevada	Adulterada com cevada
29	2,60% casca de café	Adulteradas com casca de café

Fonte: Elaborada pelo Autor.

5. Conclusões

Pelos resultados expostos, os trabalhos apresentados mostraram a relevância e o potencial da técnica de RMN ^1H na obtenção das informações necessárias para a análise do controle de qualidade de amostras de café. A rapidez com que os resultados podem ser obtidos e a não exigência por um pré-tratamento da amostra, evitando alterações na composição da mesma, torna-se essa ferramenta, muito atrativa, podendo ser estendida no estudo da autenticidade e controle de qualidade de muitos outros alimentos. Nesse trabalho, os métodos desenvolvidos, permitiram a discriminação (origem geográfica e adulteração) de cada tipo de café analisado, além de apontar as principais diferenças em suas composições. Entretanto, acredita-se que esse estudo não deva ser tomado como um resultado definitivo e sim como um indicativo das diferenças e semelhanças químicas entre as amostras e sua relação com a qualidade da bebida. Para se obter um método que possa ser aplicado em sistemas reais de avaliação com fins comerciais é sugerido incluir um número maior de amostras, avaliando outros parâmetros relevantes (graus de torras, tipos de colheitas e etc.).

Capítulo II

Autenticidade de medicamentos contendo esteroides anabolizantes

O presente capítulo resultou nas seguintes publicações:

Ribeiro, M.V.M.; Boralle, N.; Felipe, L. G.; Pezza, H.R.; Pezza, L. ¹H NMR determination of adulteration of anabolic steroids in seized drugs. *Steroids* (Submetido).

Ribeiro, M.V.M.; Boralle, N.; Pezza, H.R.; Pezza, L. Authenticity assessment of anabolic androgenic steroids in counterfeit drugs by ¹H NMR. *Analytical Methods*, v. 10, p. 1140-1150, 2018.

1. Introdução

1.1 Anabolizantes

O uso de esteroides anabolizantes para fins terapêuticos surgiu no início dos anos 1950 e a partir da década de 1960 passou a ser utilizado por homens e mulheres atletas até os tempos atuais. Os esteroides anabolizantes são hormônios sintéticos fabricados a partir de testosterona, um hormônio sexual masculino (136,137). Eles levam ao crescimento da musculatura, o que caracteriza o seu efeito anabólico e o desenvolvimento das características sexuais masculinas, responsável pelo efeito androgênico; daí também chamado de esteroides anabolizantes androgênicos (EAA). Possuem diversos usos clínicos, sendo sua principal função a reposição de testosterona, nos casos em que, por algum motivo de doença, a pessoa esteja com um déficit (138,139).

Dentre os efeitos físicos do uso inadequado desses esteroides, pode-se citar a feminilização em homens, queda do número de espermatozoides e atrofia dos testículos. Já que o excesso de testosterona provoca aromatização, que corresponde a conversão do excesso de testosterona em estrógeno. Em mulheres provoca a masculinização, indução da acne, engrossamento da voz, hipertrofia do clitóris e distribuição capilar masculina. O uso indiscriminado destes esteroides pode causar também o desenvolvimento de doenças coronarianas, disfunções hepáticas e renais e dentre os efeitos psiquiátricos, estão agressão, violência e até mesmo, psicoses e suicídios (140,141).

Apesar do seu uso indiscriminado, os EAA são largamente utilizados na medicina clínica para o tratamento de diversas doenças, dentre elas, as deficiências androgênicas como o hipogonadismo, atrasos na puberdade e crescimento, retardo no crescimento do pênis em neonatais, no tratamento da osteoporose, anemia causada por falha na medula óssea ou nos rins, câncer de mama quando avançado e até mesmo em situações de obesidade. Os EAA também são utilizados no tratamento de pessoas com doenças debilitantes como câncer, síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) quando em estágios avançados (condições crônica e desgastante) e estados pós-cirúrgicos ou queimaduras extensas (139,142,143).

Os esteroides anabolizantes podem ser ingeridos nas formas de comprimidos, cápsulas ou injeções intramusculares, e seu uso ilícito é iniciado com uma dose menor, aumentada com o tempo, levando os indivíduos a utilizar centenas de doses a mais do que aquela normalmente recomendada em caso de deficiência de testosterona. Uma prática bastante utilizada por

usuários de anabolizantes está na combinação de diferentes esteroides, onde se supõe que a interação de vários anabolizantes produzirá um aumento maior da musculatura. Outra forma de uso dessas drogas é tomá-las durante ciclos de 6 a 12 semanas ou mais e, depois, parar por um tempo semelhante e começar novamente. Esse período sem droga faz com que o usuário acredite que o seu sistema hormonal irá se recuperar (140).

No Brasil, os principais medicamentos à base dessas drogas e em muitos casos utilizados para fins ilícitos são: Androxon®, Deca-Durabolin®, Deposteron®, Durateston®, Hemogenin®, Proviron®, Winstrol®. Além destes, existem vários outros produtos que entram ilegalmente no país e são vendidos em farmácias, sites da internet e academias (140). Na Tabela 7, são apresentados os principais tipos de esteroides anabolizantes utilizados no Brasil e seus efeitos no organismo.

Tabela 7 - Resumo das principais características dos esteroides anabolizantes amplamente utilizados no mercado nacional.

Nome genérico	Nome comercial	Formulação	Aromatização	Anabólico	Androgênico	Hepatotoxicidade
Boldenona	Equipoise, Parenabol	Injetável (50 mg/mL)	Pouca	Bastante	Médio	Pouca
Etilestrenol	Durabolin-o, Maxibolin, Orabolin	Oral (2 mg)	Pouca	Pouco	Pouco	Bastante
Mesterolona	Androviron, Proviron	Oral (25 mg/mL)	Não	Bastante	Médio	Pouca
Metandienona	Danabol, Dianabol	Oral (5 mg)	Pouca	Bastante	Pouco	Bastante
Metenolona	Primobolan, Primonabol	Oral (5 mg), Injetável	Não	Bastante	Pouco	Pouca
Nandrolona	Deca-durabolin	Injetável	Pouco	Bastante	Pouco	Pouca
Oxandrolona	Anavar, Lipidex	Oral (2,5 mg)	Pouco	Pouco	Pouco	Bastante
Oximetolona	Hemogenin	Oral (5 e 50 mg)	Pouco	Bastante	Pouco	Bastante
Estanozolol	Winstrol, Stromba-jet	Oral (2 e 5 mg), Injetável (25 mg/mL)	Pouca	Bastante	Pouco	Bastante
Testosterona cristalina	Durateston	Injetável	Média	Bastante	Bastante	Não
Trembolona	Parabolan	Injetável	Pouco	Bastante	Pouco	Pouca

Fonte: Adaptada de Sendo, 2018 (144).

1.2 Aspectos químicos dos esteroides anabolizantes

Compostos esteroidais são facilmente reconhecidos pelo núcleo de quatro anéis de carbono fundidos, chamados de ciclopentanoperhidrofenantreno, sendo três anéis de seis carbonos e um anel de cinco carbonos, apresentando variações com relação aos grupos funcionais e suas posições, ao grau de saturação e à extensão da cadeia lateral ligada ao anel de cinco carbonos (Figura 17). Todos os compostos esteroidais, tanto naturais como os sintéticos, são derivados desse núcleo. Variações na estrutura e nos ligantes das moléculas alteram a relação entre os efeitos anabolizante e androgênico. Atualmente, a síntese de esteroides anabolizantes visa aumentar os efeitos anabólicos e minimizar os efeitos androgênicos (145).

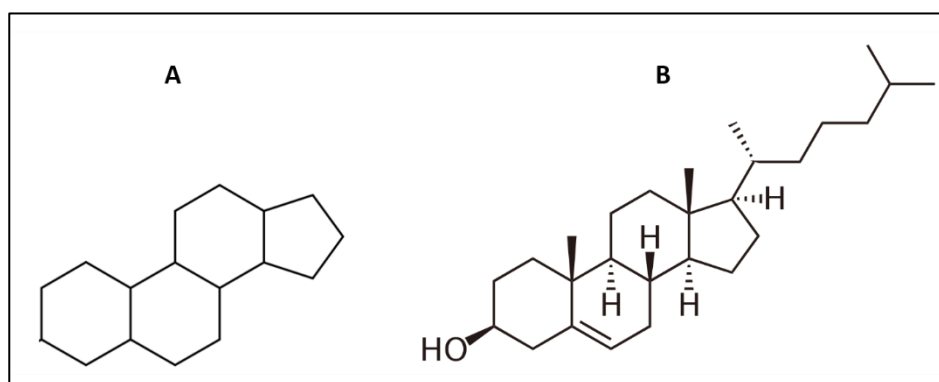


Figura 17 - Estrutura das moléculas: (A) - ciclopentanoperhidrofenantreno, (B) - colesterol.

Fonte: Elaborada pelo autor

Os esteroides naturais mais importantes são o colesterol e seus derivados, como os hormônios sexuais feminino e masculino, o estradiol e a testosterona, respectivamente. A testosterona é um esteroide do tipo 17-beta-hidrolizado, classe C-19, conhecido clinicamente como 17-beta-hidroxi-4-androstene-3-ona ($C_{19}H_{28}O_2$) (Figura 18).

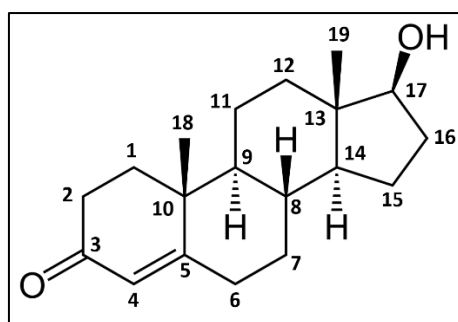


Figura 18 - Estrutura da molécula de testosterona.

Fonte: Elaborada pelo autor

A testosterona é responsável pelo desenvolvimento e manutenção das características masculinas normais, desempenhando um papel fundamental no desenvolvimento de tecidos reprodutores masculinos, como testículos e próstata, bem como a promoção de características sexuais secundárias, como o aumento da massa muscular, crescimento e maturação dos ossos (146). A testosterona foi sintetizada pela primeira vez, em 1935, e, desde então, os andrógenos, tornaram-se disponíveis para utilização com fins terapêuticos e experimentais (145).

Diversos derivados da testosterona já foram sintetizados nos últimos anos, visando a diminuição dos efeitos androgênicos ou evitar a detecção em testes antidoping. No entanto, até hoje não há um esteroide anabolizante que seja 100% anabólico, todos ainda possuem efeitos androgênicos. Três tipos de modificações na molécula de testosterona podem ser encontradas a fim de aumentar sua efetividade:

- Alquilação na posição 17- α ;
- Esterificação do grupo 17- β hidroxil;
- Modificação na estrutura do anel esteroidal.

A alquilação da testosterona na posição 17- α , com grupos metila ou etila, retarda a inativação hepática da substância, resultando em substâncias bastante ativas por via oral e proporcionando aumento na duração de seus efeitos (Figura 18). Já a esterificação do grupo 17- β hidroxil com ácidos carboxílicos, diminui a polaridade da molécula, tornando-a mais solúvel nos veículos lipídicos para as preparações injetáveis de liberação lenta do esteroide na circulação sanguínea. Quanto mais longa a cadeia do éster, maior a lipossolubilidade e mais demorada a absorção e a depuração (142,147,148). É importante ressaltar que, a alquilação e a alteração do anel esteroide são usadas preferencialmente nas preparações via oral, tais como etinilestradiol, fluoximenterona, metandrostenolona, oximetolona, metiltestosterona, estanozolol e etc.). Já esterificação é útil nas preparações parenterais (injetáveis), dentre elas: cipionato, decanoato, undecanoato ou propionato de testosterona, nandrolona e etc.) (149).

A ingestão de anabolizantes, na sua forma oral, pode aumentar os efeitos hepatotóxicos, uma vez que o princípio ativo da droga é metabolizado no fígado. Já por via parenteral, os riscos vão além, pois os consumidores costumam compartilhar as seringas, o que aumenta a possibilidade de contaminação pelos vírus HIV e causadores das hepatites B e C. O consumo injetável da droga, também, gera o risco de contaminação por bactérias, que podem ocasionar infecções generalizadas (sepsis). As aplicações, muitas vezes, são feitas sem o respeito às mínimas condições de higiene, e realizadas por leigos (150).

1.3 Falsificação de medicamentos

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), um medicamento falsificado é um produto que está incorretamente embalado e rotulado, de forma deliberada e fraudulenta, com a sua fonte ou identidade não sendo respeitada, e que pode exibir alterações e adulterações, em comparação com a sua fórmula original (4). A falsificação e comercialização ilícita de medicamentos é uma atividade extremamente lucrativa, com menor risco de repressão pelas autoridades policiais, em relação ao tráfico de drogas, e está diretamente ligada a organizações criminosas internacionais (8,151).

O consumo global de medicamentos falsificadas aumentou bastante nos últimos anos, inclusive no Brasil (4,152,153). Isso pode representar um grande perigo, especialmente porque os clientes geralmente acreditam que estão comprando produtos genuínos. Os medicamentos falsificados, em geral, são produtos que não provêm de um fabricante original ou que sofreram alterações ilegais antes de chegarem ao consumidor. Esses produtos podem conter o ingrediente ativo correto, mas em uma dose mais alta ou mais baixa. Existem também aqueles que não contêm um determinado ingrediente ativo, ou que contenham outro ingrediente (não declarado). Eles também podem ser drogas cuja data de validade foi alterada ou que são vendidos em falsas embalagens (4,154). É importante ressaltar que produtos farmacêuticos falsificados podem conduzir à perda do efeito terapêutico desejado, podendo em alguns casos desencadear resistências a algumas classes de medicamentos, provocar reações adversas severas e em casos mais graves causar a morte dos pacientes (155).

Diversos fatores podem contribuir para a falsificação de medicamento. Segundo a OMS, o elevado preços dos medicamentos compromete grande parte da renda familiar de pessoas mais pobres, conseqüentemente, a compra de medicamentos é feita em lugares mais baratos, em pontos de venda que nem sempre são regulamentados, e isso aumenta as chances de que o medicamento comercializado seja falsificado. Outro fator que contribui para o aumento da falsificação é o crescimento do comércio internacional de ingredientes farmacêuticos e medicamentos, dificultando sua rastreabilidade até a origem. É comum a prática de reembalar medicamentos com novos rótulos antes de chegar ao seu destino para esconder o país de origem do laboratório clandestino (156).

As principais vítimas do mercado de falsificação, são as pessoas que possuem menos recursos financeiros para comprar os medicamentos de que necessitam, ou que têm dificuldades

de acesso a bons serviços de saúde. Por outro lado, as populações são também afetadas pelo acesso fácil a internet, devido à tentação de comprar medicamentos mais baratos, influenciadas por “dicas” de familiares e amigos (155).

No Brasil, as drogas mais amplamente falsificadas são as mais procuradas pela população e que exigem preços mais altos no mercado legal. Estes incluem disfunção erétil, esteroides anabolizantes, perda de peso e pílulas de combate ao câncer. Estes tipos de medicamentos são facilmente adquiridos através da internet, feiras livres e farmácias clandestinas (8,157). É importante ressaltar que a produção ilegal de medicamentos, com a cópia de seus ingredientes ativos (ou simplesmente omitindo) não requer instalações ou procedimentos caros. Os lucros são consideráveis, mesmo quando os produtos são vendidos a preços muito inferiores aos dos medicamentos originais (158).

Os esteroides anabolizantes aparecem no topo da lista de substâncias falsificadas. As pessoas que desejam um rápido aumento de peso e ganhos musculares, afim de conseguir um corpo atlético em pouco tempo, usam esteroides anabolizantes que geralmente são prescritos por instrutores, médicos inescrupulosos e professores de educação física sem conhecimento na área. Isto ocorre devido à facilidade de obtenção dessas substâncias, uma vez que elas podem ser compradas no mercado negro, através da internet ou através das fronteiras, sem receita médica. Tais substâncias são fabricadas/falsificadas em laboratórios clandestinos e são embaladas em ampolas, muitas vezes não esterilizadas ou misturadas com outras drogas (159–161). É comum ainda que casas agropecuárias repassem anabolizantes veterinários a pessoas, sem a menor preocupação com o destino do seu uso, fazendo com que os usuários tomem esses produtos, para os quais não há informações disponíveis sobre os riscos prováveis para os seres humanos (162).

1.4 Métodos de determinação de medicamentos falsificados

A determinação de adulterações em medicamentos requer técnicas analíticas que possam detectar com segurança os adulterantes, com identificação e (se necessário) quantificação de substâncias ativas, excipientes e impurezas. A espectroscopia de RMN ^1H é uma técnica de primeira linha capazes de satisfazer esses requisitos (163). Nos últimos anos, diversos métodos analíticos foram relatados na literatura, a fim de avaliar a autenticidade e adulteração de drogas usando as mais variadas técnicas, como por exemplo, a cromatografia

líquida (153,161,164–168), métodos colorimétricos (169–171), espectroscopia Raman (172,173) e RMN (15,32,174).

Para a determinação da autenticidade e quantificação de esteróides anabolizantes em diferentes formulações farmacêuticas, os métodos cromatográficos incluindo cromatografia gasosa (153,159,175,176) e cromatografia líquida (161,177–179) apresentam destaque. No entanto, embora essas técnicas estejam bem estabelecidas para este tipo de análise, com bons limites de detecção, apresentam uma série de desvantagens do ponto de vista operacional, como a necessidade de colunas cromatográficas específicas, etapas laboriosas de preparação de amostras e às vezes o uso de reações de derivatização e solventes tóxicos. Já os métodos oficiais encontrados nas farmacopeias, para a análise de esteróides anabolizantes, incluem espectrofotometria de absorção ultravioleta e cromatografia em camada delgada (180,181). Essas técnicas requerem etapas demoradas de preparação de amostras, tais como processos de extração de analitos, funcionalização pré ou pós-química, baixa seletividade, e em casos de adulteração por substância desconhecida, possui limitações na identificação do composto em questão.

Ao contrário de outras técnicas, a RMN geralmente não requer etapas de separação para determinar quantitativamente o analito de interesse. Portanto, solventes, excipientes, produtos degradados e outras impurezas em drogas podem ser identificados e posteriormente quantificados. No caso de falsificações onde existe a adição intencional de impurezas ou adulterantes, a qualidade do medicamento pode ser facilmente verificada porque os componentes orgânicos adicionados mostrarão sinais característicos nos espectros de RMN ^1H . A capacidade da RMN para detectar impurezas orgânicas desconhecidas significa que pode ser considerado um detector universal capaz de identificar medicamentos falsificados (41). A RMN também se destaca por ser uma técnica não destrutiva que usa uma pequena quantidade de solvente, onde o analito de interesse pode ser recuperado pelo processo de secagem do solvente. É importante ressaltar que o potencial desta técnica para a análise de drogas se reflete no fato de que os métodos de análise quantitativa de drogas que usam RMN já foram oficializados e estão listados em farmacopeias internacionais, como as Farmacopeias Americana e Europeias (180–183). Outra vantagem da RMN é que a determinação quantitativa do analito pode ser realizada sem a utilização da substância alvo para a calibração externa, facilitando assim as análises. No Brasil, pesquisas envolvendo RMN para fins quantitativos são bastante escassos

quando comparados a produção internacional, sendo, portanto, uma abordagem que ainda necessita ser explorada no âmbito local.

2. Objetivos

- Desenvolver um método rápido e abrangente para a determinação da autenticidade de esteroides anabolizantes vendidos comercialmente, nas formas de comprimidos, cápsulas e injetáveis, utilizando a espectroscopia de RMN ^1H .
- Realizar ensaios quantitativos, por diferentes métodos, visando a utilização dessa metodologia como uma alternativa aos métodos já existentes na literatura.
- Comparar os resultados obtidos com métodos de referência e oficiais.

3. Parte Experimental

3.1 Padrões e reagentes

Foram utilizados os padrões analíticos de seis esteroides anabolizantes: propionato de testosterona (PRT; 99,88%), metiltestosterona (MET; 98,69%), acetato de metenolona (MEL; 99,00%), oxandrolona (OXA; 99,87%), decanoato de nandrolona (DEN; 98,71%) e estanozolol (ESZ; 99,21%). Todas as amostras foram solubilizadas utilizando clorofórmio deuterado (CDCl_3 ; 99,8%; Sigma-Aldrich®) contendo 0,03% de tetrametilsilano (TMS). Os excipientes estudados foram o óleo de amendoim (99,0%, All Chemistry®) e álcool benzílico (99,8%, Sigma-Aldrich®). Os perfis espectrais dos analitos foram obtidos utilizando soluções padrões a uma concentração de 5 mg mL^{-1} .

Para as análises cromatográficas, foram utilizados os seguintes solventes: Metanol (99,97%; J.T.Baker®), Acetonitrila (99,98%; J.T.Baker®), Clorofórmio (99,90%; J.T.Baker®), Álcool etílico (99,90%; J.T.Baker®) e Acetato de etila (99,60 %; Mallinckrodt®).

3.2 Amostras

Foram avaliadas um total de 52 amostras de esteroides anabolizantes (Tabela 8), de diferentes formas farmacêuticas, sendo: 30 injetáveis, 16 cápsulas e 6 comprimidos. Todas amostras foram frutos de apreensões policiais, obtidas através de parceria com a Polícia Federal (5ª Vara Federal de Guarulhos - SP) com o nº processo (00067103120164036119).

Tabela 8 - Amostras de esteroides anabolizantes analisadas.

Codificação (Amostras)	Forma	Princípio Ativo	Concentração (rotulada)	Resposta Qualitativa	Codificação (Amostras)	Forma	Princípio Ativo	Concentração (rotulada)	Resposta Qualitativa
PRT-1	Injetável	Propionato de Testosterona	100 mg mL ⁻¹	Autêntica	CIT-1	Injetável	Cipionato de Testosterona	250 mg mL ⁻¹	Autêntica
PRT-2	Injetável	Propionato de Testosterona	100 mg mL ⁻¹	Autêntica	CIT-2	Injetável	Cipionato de Testosterona	250 mg mL ⁻¹	Autêntica
PRT-3	Injetável	Propionato de Testosterona	100 mg mL ⁻¹	Autêntica	CIT-3	Injetável	Cipionato de Testosterona	250 mg mL ⁻¹	Autêntica
PRT-4	Injetável	Propionato de Testosterona	100 mg mL ⁻¹	Autêntica	CIT-4	Injetável	Cipionato de Testosterona	250 mg mL ⁻¹	Autêntica
UNT-1	Cápsula	Undecanoato de Testosterona	50 mg/cápsula	Autêntica	CIT-5	Injetável	Cipionato de Testosterona	250 mg mL ⁻¹	Autêntica
UNT-2	Cápsula	Undecanoato de Testosterona	50 mg/cápsula	Autêntica	PDR-1	Injetável	Propionato de Drostonolona	100 mg mL ⁻¹	Autêntica
UNT-3	Cápsula	Undecanoato de Testosterona	50 mg/cápsula	Autêntica	PDR-2	Injetável	Propionato de Drostonolona	100 mg mL ⁻¹	Autêntica
UNT-4	Cápsula	Undecanoato de Testosterona	50 mg/cápsula	Autêntica	PDR-3	Injetável	Propionato de Drostonolona	100 mg mL ⁻¹	Autêntica
ENT-1	Injetável	Enantato de Testosterona	300 mg mL ⁻¹	Adulterada	PDR-4	Injetável	Propionato de Drostonolona	100 mg mL ⁻¹	Autêntica
OXA-1	Comprimido	Oxandrolona	5 mg/comprimido	Autêntica	OXI-1	Cápsula	Oximetolona	50 mg/cápsula	Autêntica
OXA-2	Comprimido	Oxandrolona	5 mg/comprimido	Autêntica	OXI-2	Cápsula	Oximetolona	50 mg/cápsula	Autêntica
OXA-3	Comprimido	Oxandrolona	5 mg/comprimido	Autêntica	OXI-3	Cápsula	Oximetolona	50 mg/cápsula	Autêntica
OXA-4	Comprimido	Oxandrolona	5 mg/comprimido	Autêntica	OXI-4	Cápsula	Oximetolona	50 mg/cápsula	Autêntica
OXA-5	Comprimido	Oxandrolona	5 mg/comprimido	Autêntica	DUR-1	Injetável	Sais de testosterona*	100 mg mL ⁻¹	Autêntica
OXA-6	Cápsula	Oxandrolona	10 mg/cápsula	Adulterada	DUR-2	Injetável	Sais de testosterona*	250 mg mL ⁻¹	Adulterada
OXA-7	Cápsula	Oxandrolona	10 mg/cápsula	Adulterada	DUR-3	Injetável	Sais de testosterona*	250 mg mL ⁻¹	Adulterada
OXA-8	Cápsula	Oxandrolona	10 mg/cápsula	Adulterada	DUR-4	Injetável	Sais de testosterona*	250 mg mL ⁻¹	Adulterada
OXA-9	Cápsula	Oxandrolona	10 mg/cápsula	Adulterada	DUR-5	Injetável	Sais de testosterona*	250 mg mL ⁻¹	Adulterada
TRA-1	Injetável	Acetato de Trembolona	75 mg mL ⁻¹	Autêntica	ESZ-1	Comprimido	Estanozolol	10 mg/comprimido	Autêntica
TRA-2	Injetável	Acetato de Trembolona	75 mg mL ⁻¹	Autêntica	ESZ-2	Injetável	Estanozolol	50 mg mL ⁻¹	Autêntica
TRA-3	Injetável	Acetato de Trembolona	75 mg mL ⁻¹	Autêntica	ESZ-3	Injetável	Estanozolol	100 mg mL ⁻¹	Autêntica
TRA-4	Injetável	Acetato de Trembolona	75 mg mL ⁻¹	Autêntica	ESZ-4	Injetável	Estanozolol	100 mg mL ⁻¹	Autêntica
MDT-1	Cápsula	Metandrostebolona	10 mg/cápsula	Autêntica	ESZ-5	Injetável	Estanozolol	100 mg mL ⁻¹	Autêntica
MDT-2	Cápsula	Metandrostebolona	10 mg/cápsula	Autêntica	ESZ-6	Injetável	Estanozolol	100 mg mL ⁻¹	Autêntica
MDT-3	Cápsula	Metandrostebolona	10 mg/cápsula	Autêntica	ESZ-7	Cápsula	Estanozolol	10 mg/cápsula	Adulterada
MDT-4	Cápsula	Metandrostebolona	10 mg/cápsula	Autêntica	ESZ-8	Cápsula	Estanozolol	10 mg/cápsula	Adulterada
DEN-1	Injetável	Decanoato de Nandrolona	200 mg/mL	Autêntica	ESZ-9	Cápsula	Estanozolol	10 mg/cápsula	Adulterada
DEN-2	Injetável	Decanoato de Nandrolona	50 mg mL ⁻¹	Adulterada	ESZ-10	Cápsula	Estanozolol	10 mg/cápsula	Adulterada

*sais de testosterona correspondem aos compostos: propionato de testosterona, fenilpropionato de testosterona, isocaproato de testosterona e decanoato de testosterona.

3.3 Análises por RMN ^1H

3.3.1 Parâmetros de aquisição

As medições espectroscópicas em RMN ^1H foram realizadas a temperatura ambiente (298 K) com uma sonda multinuclear de observação direta de 5 mm (BBFO-Z plus SmartProbe Broadband Observe), usando um espectrômetro Bruker, modelo: Avance III HD 600, operando a 14,1 Tesla (600,13 MHz para ^1H). Foi obtido um tempo de 17,15 ms para um pulso de 90° . Posteriormente, o tempo de relaxamento longitudinal (T1) foi estimado utilizando a sequência de pulsos de inversão e recuperação; o T1 obtido para o sinal de interesse mais lento foi de 3,5s. Considerando o tempo estimado nesta experiência e um tempo de aquisição (AQ) igual a 6,7 s, o tempo de reciclo estabelecido foi de 25 s. Os espectros foram adquiridos com 128 FIDs (NS), janela espectral (SW) de 12,0276 ppm, número de pontos (TD) 64K, tempo de espera entre cada aquisição (D1) de 2 s, LB = 0,3 Hz e fator de ganho do receptor (RG) de 2,5. O tempo de análise para cada amostra variou de 9 a 12 min.

3.3.2 Parâmetros de processamento

Os espectros foram alinhados para integração, com base no sinal do tetrametilsilano (TMS) sendo a ele atribuído o valor de 0,0 ppm. Foram realizadas correções automáticas da linha de base e correção manual da fase. A região de integração ao redor de cada sinal foi selecionada manualmente, fora dos respectivos sinais satélites de ^{13}C para garantir a máxima recuperação da área. A análises de dados e integrações de sinais foram processadas com o *software* TopSpin 3.2.7 (Bruker Biospin).

3.4 Preparação de amostras comerciais

As soluções de todas as amostras comerciais foram preparadas na concentração de 5 mg mL^{-1}

3.4.1 Amostras injetáveis

Para as amostras injetáveis, alíquotas de 16,0-80 μL dos fármacos (o volume utilizado dependia da concentração indicada no rótulo) foram transferidos para tubos Eppendorf de 2 mL, seguido de adição de CDCl_3 (com 0,03% de TMS) até um volume de 650 μL , com agitação manual até a solubilização se completar. Posteriormente, alíquotas (600 μL) das soluções recém preparadas foram transferidas para tubos de RMN de 5 mm.

3.4.2 Amostras em comprimidos/cápsulas

Para a preparação das amostras de comprimidos e cápsulas, um total de 3 cápsulas/comprimido foram inicialmente pesados, pulverizados e a massa correspondente a 5,0 mg do princípio ativo foi dissolvida em 1 ml de CDCl_3 (com 0,03% de TMS). As soluções foram submetidas à agitação por vórtex durante 1 min para garantir uma boa extração do ingrediente ativo no solvente. Posteriormente, as soluções foram centrifugadas a 14.000 rpm durante 10 min e filtradas através de filtros de seringa de membrana de fluoreto de polivinilideno (PVDF) de 0,45 μm (Millipore, Milford, MA, EUA). Finalmente, alíquotas de 600 μL das soluções recém preparadas foram transferidas para tubos de RMN de 5 mm e analisadas por RMN ^1H .

3.5 Determinação quantitativa (RMNq) e validação analítica

3.5.1 Padrão Interno

Baseado na premissa de que a intensidade integrada do sinal no espectro de RMN ^1H é proporcional ao número de núcleos responsáveis por essa ressonância em particular, como também à concentração molar da substância geradora daquele sinal (29,31), foi realizada a determinação quantitativa dos analitos nas diferentes matrizes, utilizando-se a seguinte relação:

$$P_X = \frac{A_X}{I_{PI}} \frac{N_{PI}}{N_X} \frac{MM_X}{MM_{PI}} \frac{m_{PI}}{m} P_{PI}$$

Onde,

X = analito

P = pureza (% m/m)

PI = padrão interno

A = área da linha de ressonância

N = número de núcleo que absorvem na frequência da linha de ressonância

MM = massa molar

m = massa pesada

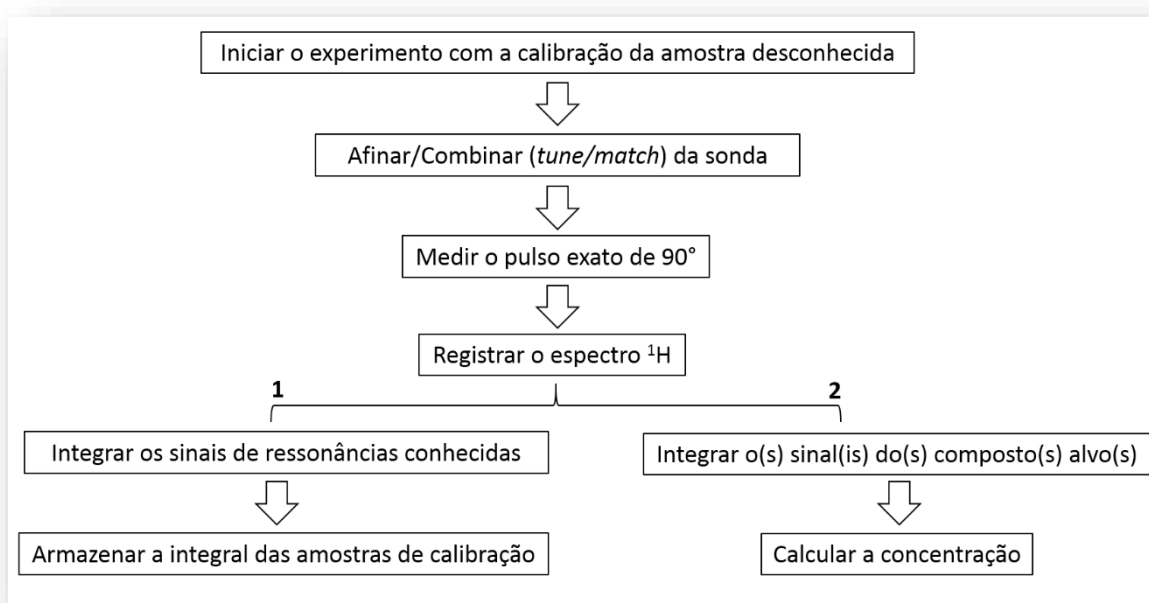
Como padrão interno de referência foi utilizado a Dimetil Sulfona (DMSO_2) - 99,65% \pm 0,08% (Sigma Aldrich). Todas as pesagens foram realizadas em uma balança analítica, modelo AG 245, da *Metther Toledo* (capacidade de 210 g e precisão 0,01 mg). Para as

transferências de volumes utilizaram-se micropipetas automáticas, modelo Research®, da Eppendorf, de volumes variáveis 10-100 e 100-1000 μL , previamente aferidas (erro < 1,0%).

3.5.2 Padrão Externo (via ERETIC 2)

Para a quantificação dos esteroides anabolizantes nas amostras em que não se poderia fazer testes com metodologias de referência, devido à falta de padrão analíticos, fez-se a determinação por calibração externa via ERETIC 2 (*Electronic REference To access In vivo Concentrations 2*) baseado na metodologia PULCON (*PULSE length based CONcentration determination*) (38,39).

O procedimento foi realizado, seguindo o procedimento a seguir:



Como padrões externos para o cálculo da concentração, utilizaram-se duas amostras padrões com concentração conhecidas: nicotina (12,13 mmol L^{-1}) e propionato de testosterona (39,00 mmol L^{-1}). Ambas as soluções padrões foram preparadas e analisadas nas mesmas condições das amostras comerciais.

Para a validação analítica foram realizados os seguintes ensaios: especificidade, linearidade, intervalo, precisão (repetitividade e intermediária), exatidão e robustez. Todos esses parâmetros foram validados de acordo com as diretrizes do ICH (60) e ANVISA (59).

3.6 Métodos Comparativos

3.6.1 Determinação por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Foram utilizados 3 trabalhos da literatura como métodos de referência. Todas as análises foram realizadas em um HPLC Shimadzu, modelo: UFLC-20, com detecção DAD, utilizando uma coluna chromosil C18 (250mm x 4,6mm x 5µm).

3.6.1.1 Quantificação de DEN e PRT

Para determinação de DEN e PRT, foi utilizado o método proposto por Satzger e Mesmer, 1997 (184). Nesse método, as amostras foram solubilizadas em uma solução de metanol/água 25% (v/v). A fase móvel foi constituída por acetonitrila e água no modo gradiente de eluição, inicialmente com 60% (acetonitrila/água), aumentando para 90% aos 20 min e para 95% em 22 min, com um tempo de equilíbrio de 7 min entre corridas. Utilizou-se um fluxo de vazão de 1,2 mL min⁻¹ e volume de injeção de 20 µL. O tempo para cada corrida foi de 45 min. Os cromatogramas foram obtidos a 30°C. A determinação dos analitos foi realizada no comprimento de onda de 243 nm.

3.6.1.2 Quantificação de ESZ

Para a determinação de ESZ utilizou-se um trabalho proposto por Nagendrakumar e Rao, 2011 (185). Nesse método, as amostras foram solubilizadas em uma solução de metanol/água 90% (v/v). A fase móvel foi constituída por metanol e água com eluição no modo isocrático, na proporção de 90:10 (v/v) (metanol/água). Utilizou-se um fluxo de vazão de 1,0 mL min⁻¹ e volume de injeção de 20 µL. O tempo de cada corrida correspondeu a 8 min. Os cromatogramas foram obtidos a 30°C. A determinação do ESZ foi realizada no comprimento de onda de 225 nm.

3.6.1.3 Quantificação de OXA

Por fim, para determinação de OXA utilizou o método proposto pela Farmacopeia Americana (USP). Nesse método, a fase móvel foi constituída por acetonitrila e água com eluição no modo isocrático, na proporção de 50:50 (v/v) (acetonitrila/água). Utilizou-se um

fluxo de vazão de $0,7 \text{ mL min}^{-1}$ e volume de injeção de $40 \text{ }\mu\text{L}$. Os cromatogramas foram obtidos a 40°C . O tempo de cada correspondeu a 8 min. A determinação da OXA foi realizada no comprimento de onda de 210 nm.

Pelo melhor do nosso conhecimento não existe nenhum método na literatura que faça a determinação de todos os medicamentos (esteroides anabolizantes) utilizando as mesmas condições para todos os analitos.

3.6.2 Determinação por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM)

Para as análises por CG-EM utilizou-se um cromatógrafo a gás Shimadzu QP-2010 equipado com injetor automático AOC-5000 Shimadzu acoplado a um espectrômetro de massas. A coluna foi uma Phenomenex ZB-5MS ($30 \text{ m} \times 0,25 \text{ mm} \times 0,25 \text{ }\mu\text{m}$), e o *software* utilizado para análise dos espectros foi GC/MS solutions v. 2.5. Os parâmetros de operação do cromatógrafo foram os seguintes: temperatura do forno de 140°C mantida durante 3 min, seguida de um aumento a 3°C min^{-1} a 320°C (mantido durante 10 min); temperatura do injetor de 260°C ; injeção em modo *split* (1/50); gás de arraste hélio (99,999%) a um fluxo constante de $1,3 \text{ mL min}^{-1}$; volume de injeção de amostra de $1 \text{ }\mu\text{L}$; pressão de $114,9 \text{ kPa}$; velocidade linear de $43,1 \text{ cm s}^{-1}$. O tempo de corrida cromatográfico foi de 73 min. Condições EM: temperatura da fonte de íons e interface de 250°C ; modo de impacto de elétrons a 70 eV ; faixa da massas de aquisição de m/z 40-650 Daltons. Os metabólitos foram identificados utilizando o *software* Lab Solutions GSMS analysis (Shimadzu), onde foram comparando os espectros de massas de cada pico cromatográfico com os espectros disponíveis nas bases de dados NIST 2014 (*National Institute of Standards and Technology*). Para este estudo, foram admitidos valores de similaridade acima de 90% para cada metabólito. Para solubilização das amostras foi utilizado clorofórmio com solvente, o mesmo solvente utilizado nas análises por RMN ^1H .

4. Resultados e Discussão

4.1 Caracterização em RMN ^1H dos analitos

Primeiramente foi traçado o perfil espectral dos esteroides anabolizantes utilizando-se as técnicas de RMN unidimensionais (^1H , ^{13}C , DEPT 90, DEPT 135 e TOCSY 1D) e bidimensionais (HMBC, HSQC, COSY e HSQC-TOCSY). Tal procedimento foi realizado para obtenção e escolha de sinais marcadores de presença, de cada um dos compostos analisados.

Para o PRT foram observados os sinais com deslocamento químico em: δ 5,73 (s, 1H) e δ 4,61 (t, $J = 7,8$ Hz, 1H), que correspondem aos hidrogênios H4 e H17, respectivamente, e aparecem em uma região mais desblindada do espectro. Já os sinais em δ 0,84 (s, 3H); δ 1,21 (s, 3H) e δ 1,14 (t, $J = 7,6$ Hz, 3H) são referentes aos hidrogênios: H18, H19 e H22, respectivamente (Figura 19), que correspondem as metilas presentes na estrutura e aparecem em uma região menos desblindada do espectro. Devido a algumas características desses sinais, tais como: alta resolução espectral, sem sobreposições e boa intensidade, eles foram escolhidos para serem utilizados como marcadores de presença de PRT (Figura 19) nas amostras e posteriormente utilizados para a determinação quantitativa.

Para a confirmação dos sinais obtidos por RMN ^1H , foram determinados os espectros de RMN ^{13}C de todos os analitos analisados, identificando assim todos os sinais referentes aos carbonos das estruturas. Para auxiliar nessa confirmação utilizou-se das técnicas DEPT 90 e DEPT 135 que mostraram a distinção entre os diferentes tipos de carbono presentes na molécula (CH_3 , CH_2 e CH). Uma vez feita a identificação desses sinais, eles foram utilizados para verificar a confiabilidade dos padrões de referência e traçar os seus perfis espectrais. Por fim, foram obtidos os espectros bidimensional dos analitos para observar as correlações existentes entre C-H e H-H presentes nas moléculas, elucidando de forma bem precisa as estruturas dos padrões analisados.

Analisando o espectro de RMN ^1H da MET foram observados sinais com deslocamento químicos em: δ 5,73 (s, 1H); δ 0,91 (s, 3H); δ 1,20 (s, 3H) e δ 1,21 (s, 3H), que correspondem aos hidrogênios: H4, H18, H19 e H20, respectivamente. Tais sinais foram usados como marcadores indicativos de presença, autenticidade e para determinação quantitativa de MET nas amostras (Figura 20).

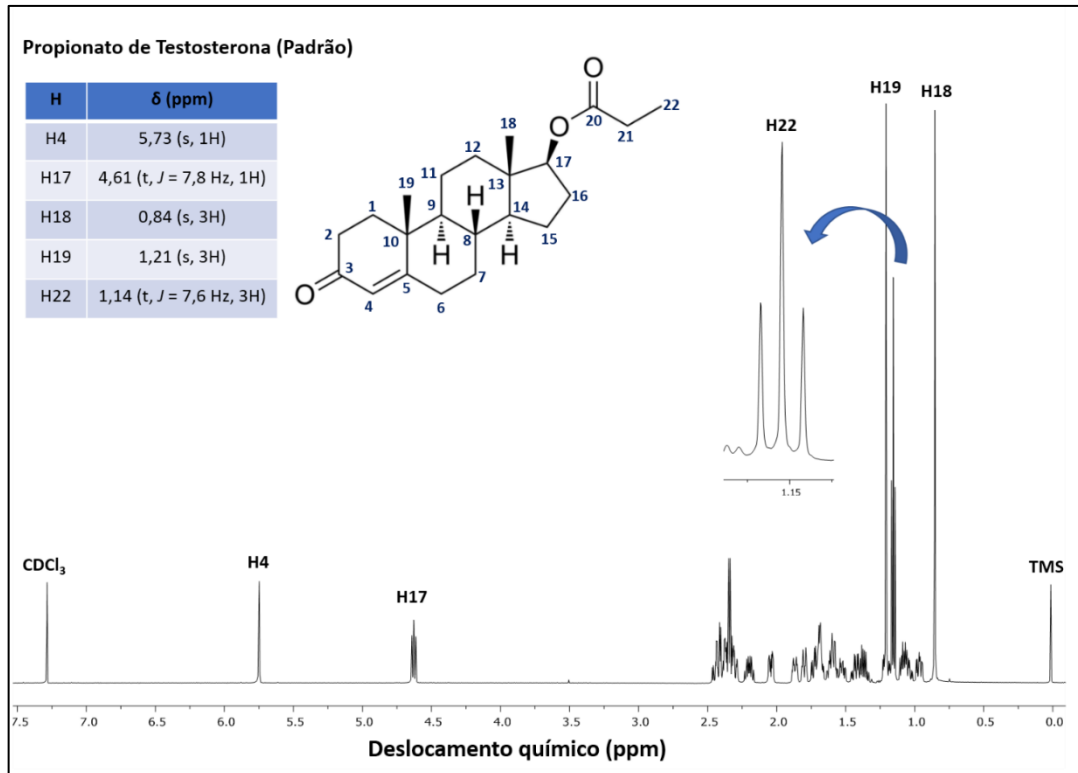


Figura 19 - Espectro de RMN ^1H , 600 MHz, do Propionato de testosterona (PRT), em CDCl_3 .

Fonte: Elaborada pelo autor.

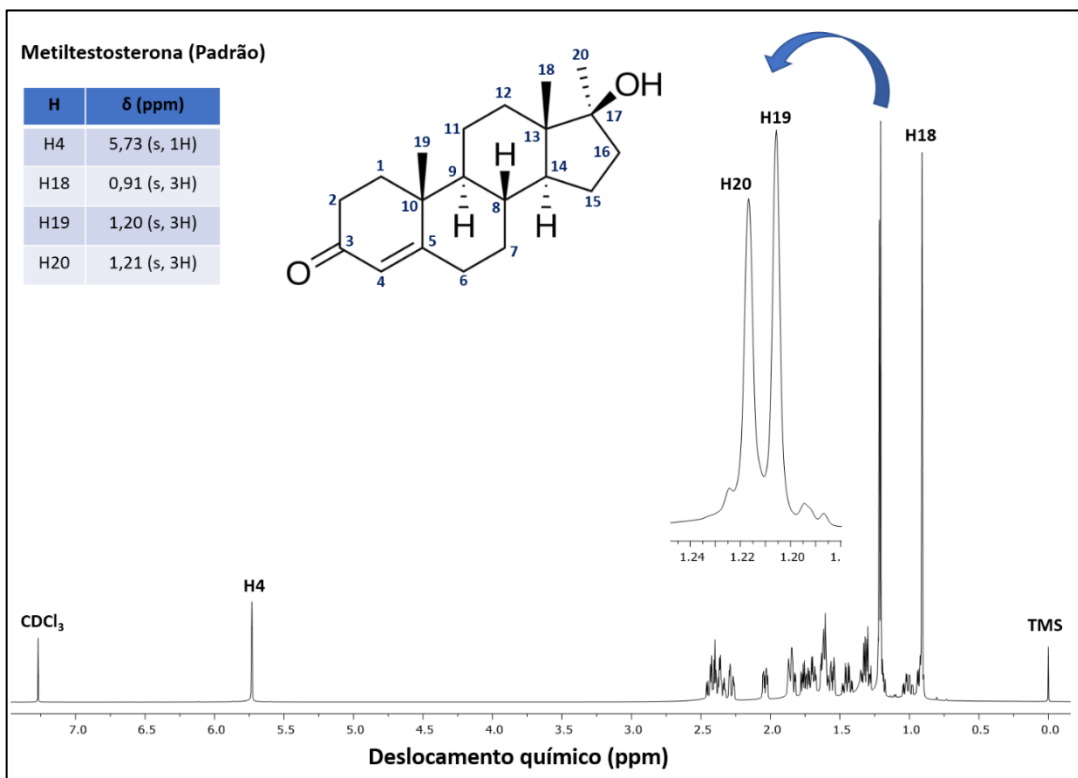


Figura 20 - Espectro de RMN ^1H , 600 MHz, da Metiltestosterona (MET), em CDCl_3 .

Fonte: Elaborada pelo autor.

Verificando-se o espectro de RMN ^1H da molécula de MEL foram identificados os hidrogênios: H2, H17, H20, H22, H19, H18, que apresentaram sinais com deslocamentos químicos em: δ 5,74 (s, 1H); δ 4,64 (t, $J = 7,7$ Hz, 1H); δ 2,09 (s, 3H); δ 2,07 (s, 3H); δ 1,07 (s, 3H) e δ 0,87 (s, 3H), respectivamente. Tais valores foram utilizados como sinais marcadores para a presença de MEL nas amostras (Figura 21).

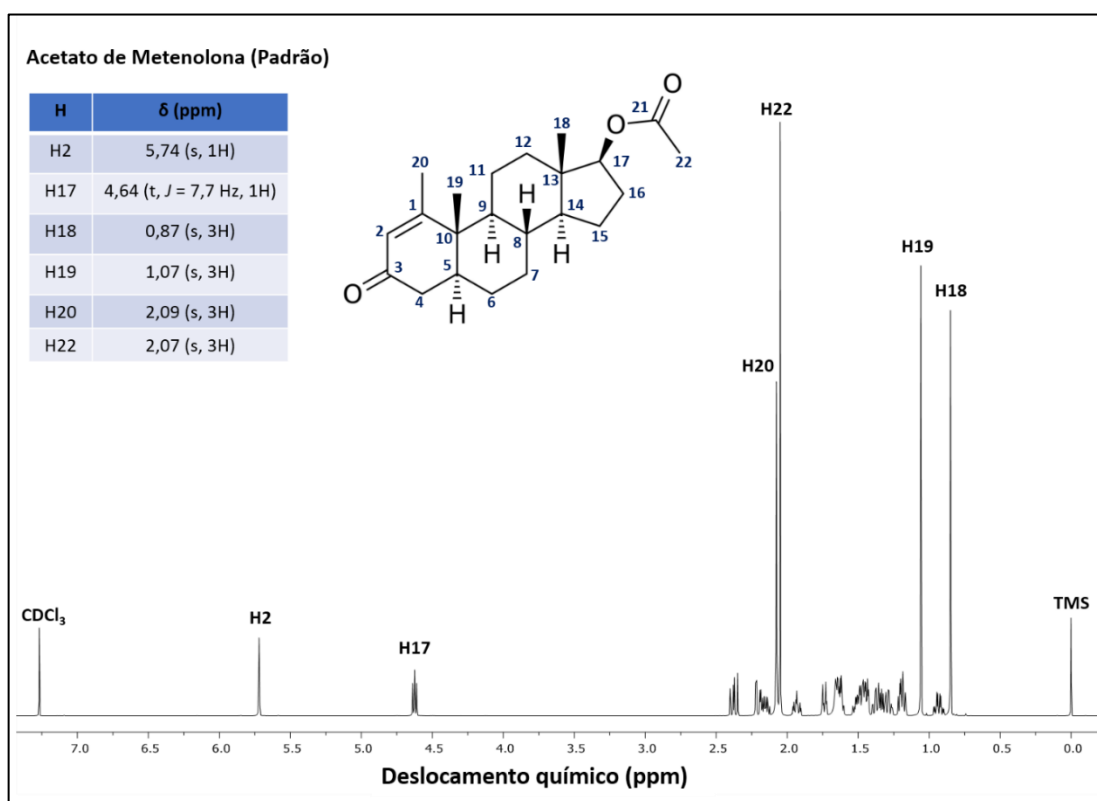


Figura 21 - Espectro de RMN ^1H , 600 MHz, do Acetato de metenolona (MEL), em CDCl_3 .

Fonte: Elaborada pelo autor.

Já para a OXA os sinais escolhidos foram os que apresentaram deslocamento químico em: δ 4,25 (d, $J = 10,7$ Hz, 1H); δ 3,94 (d, $J = 10,7$ Hz, 1H); δ 1,23 (s, 3H); 1,02 (s, 3H) e δ 0,88 (s, 3H) que correspondem aos hidrogênios: H1, H1', H19, H18 e H17, respectivamente (Figura 22). No espectro de RMN ^1H do DEN, os sinais observados foram: δ 5,87 (s, 1H); δ 4,63 (t, $J = 7,8$ Hz, 1H); δ 0,99 (t, $J = 6,9$ Hz, 3H) e δ 0,86 (s, 3H) responsáveis pelos hidrogênios: H4, H17, H28 e H18 (Figura 23). Por fim, analisando-se o espectro de RMN ^1H da molécula de ESZ, foram observados sinal com deslocamentos químicos em: δ 7,31 (s, 1H); δ 1,25 (s, 3H); δ 0,90 (s, 3H) e δ 0,78 (s, 3H), referentes aos hidrogênios: H21, H20, H18 e H19, respectivamente (Figura 24).

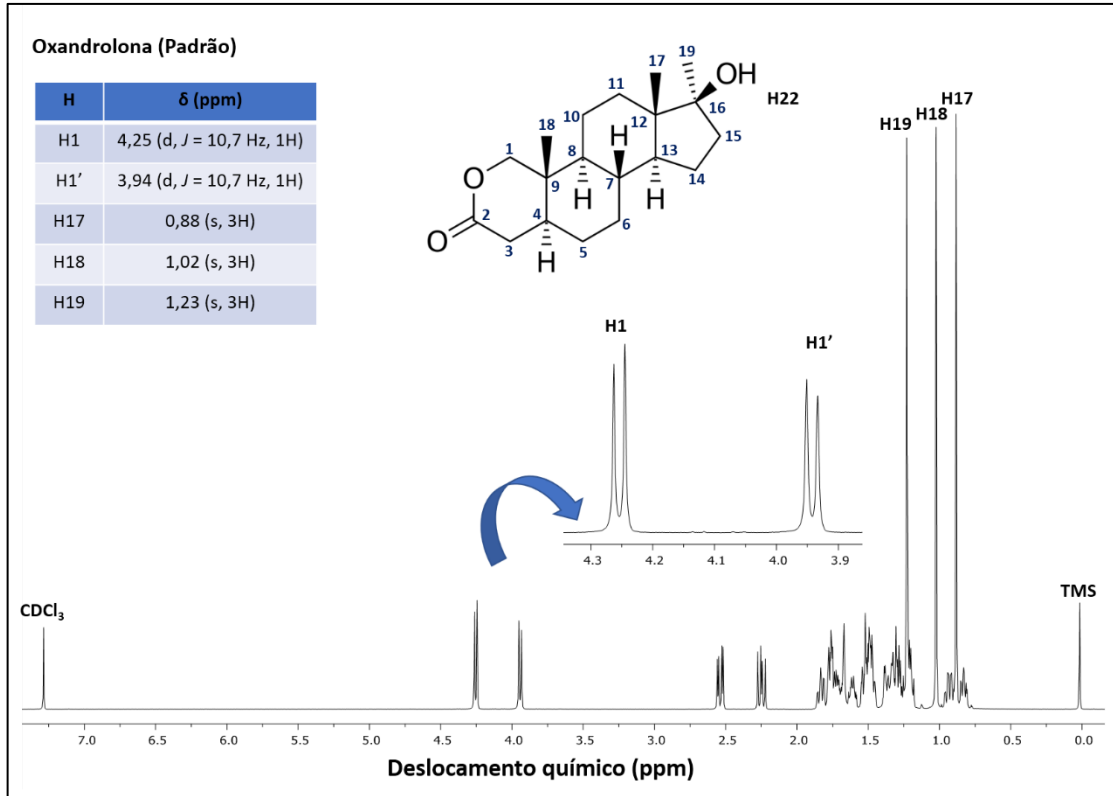


Figura 22 - Espectro de RMN ^1H , 600 MHz, da Oxandrolona (OXA), em CDCl_3 .

Fonte: Elaborada pelo autor.

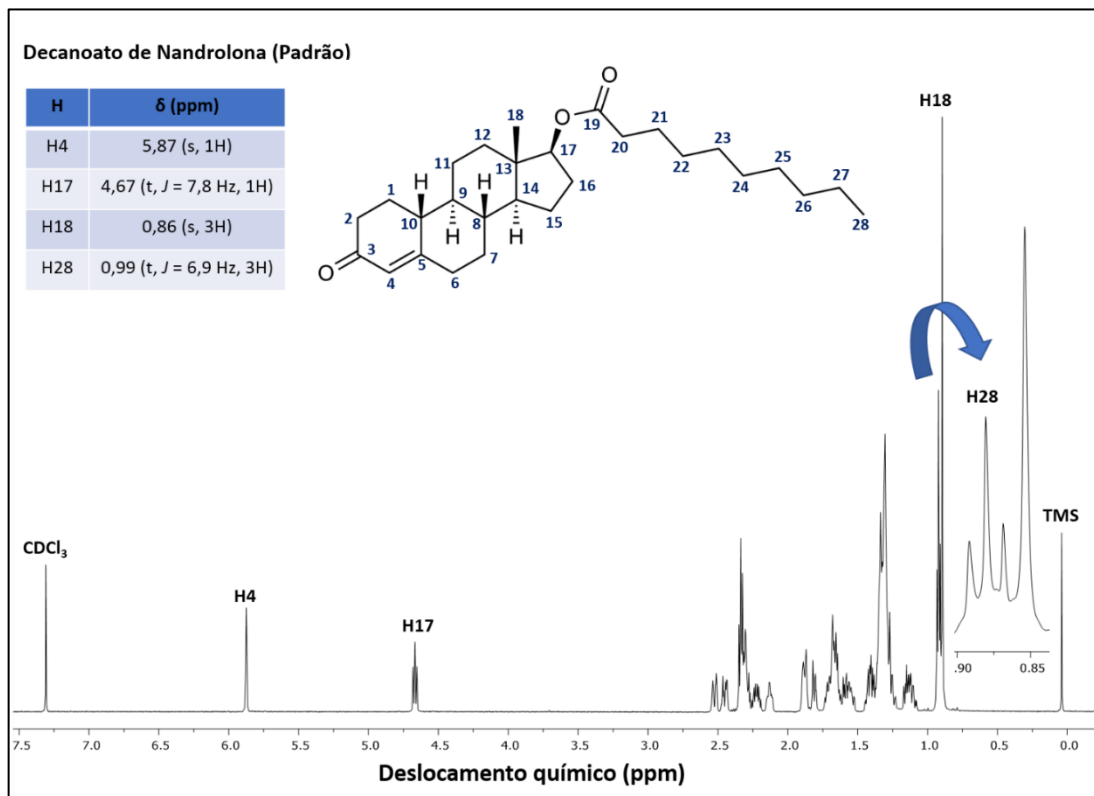


Figura 23 - Espectro de RMN ^1H , 600 MHz, do Decanoato de Nandrolona (DEN), em CDCl_3 .

Fonte: Elaborada pelo autor.

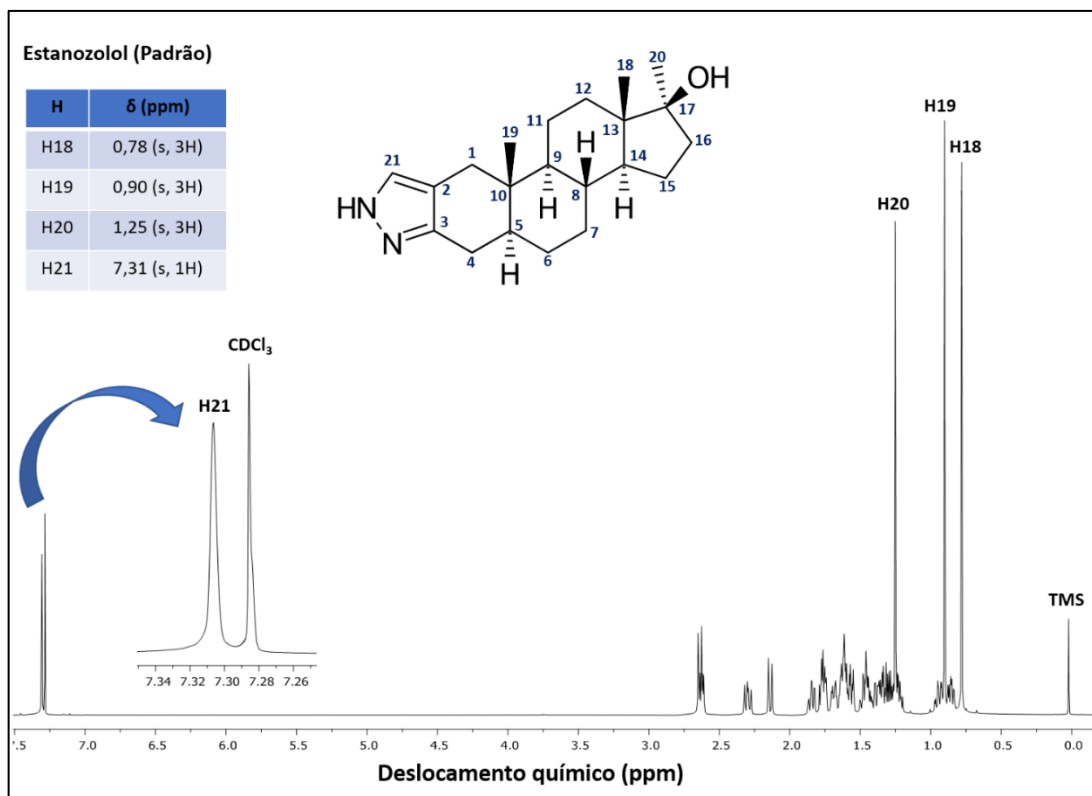


Figura 24 - Espectro de RMN ^1H , 600 MHz, do Estanozolol (ESZ), em CDCl_3 .

Fonte: Elaborada pelo autor.

Devido a boa resolução e a maior facilidade de integração desses sinais, eles foram escolhidos para serem marcadores indicativos da presença desses analitos nas amostras analisadas. Diversos sinais, referentes a outros hidrogênios, também foram identificados, mas devido à falta de resolução e sobreposição com sinais de outras substâncias presentes nas amostras, eles foram descartados. Vale ressaltar que o uso de um sistema de RMN com um campo magnético mais forte (600 MHz para ^1H) proporcionou sinais de RMN mais intensos, melhorando a resolução e a separação dos sinais presentes no espectro.

4.2 Análise das amostras comerciais

Após ser encontrado o perfil espectral de todos os analitos, partiu-se para a análise das amostras. Todas as condições anteriores pré-estabelecidas na análise dos padrões de referência foram mantidas, para que não houvesse erros na identificação da autenticidade das amostras. Os resultados qualitativos podem ser observados na Tabela 8, onde os mesmos são indicados na forma de (adulterado ou autêntico), referentes a presença ou ausência do analito indicado na embalagem de cada medicamento.

Das 52 amostras analisadas, 14 não apresentaram os princípios ativos indicados na embalagem. Esses resultados mostraram que a metodologia desenvolvida é eficiente na análise da autenticidade dessas amostras. Na Figura 25, é apresentada a comparação entre os espectros da amostra PRT-1 e de propionato de testosterona padrão, mostrando que se trata de uma amostra autêntica, já que os sinais marcadores com deslocamento químico em: δ 5,73 (s, 1H); δ 4,61 (t, $J = 7,8$ Hz, 1H); δ 1,21 (s, 3H); δ 1,14 (t, $J = 7,6$ Hz, 3H) e δ 0,84 (s, 3H), referentes aos H (4, 17, 19, 22 e 18) do padrão, são identificados na amostra analisada.

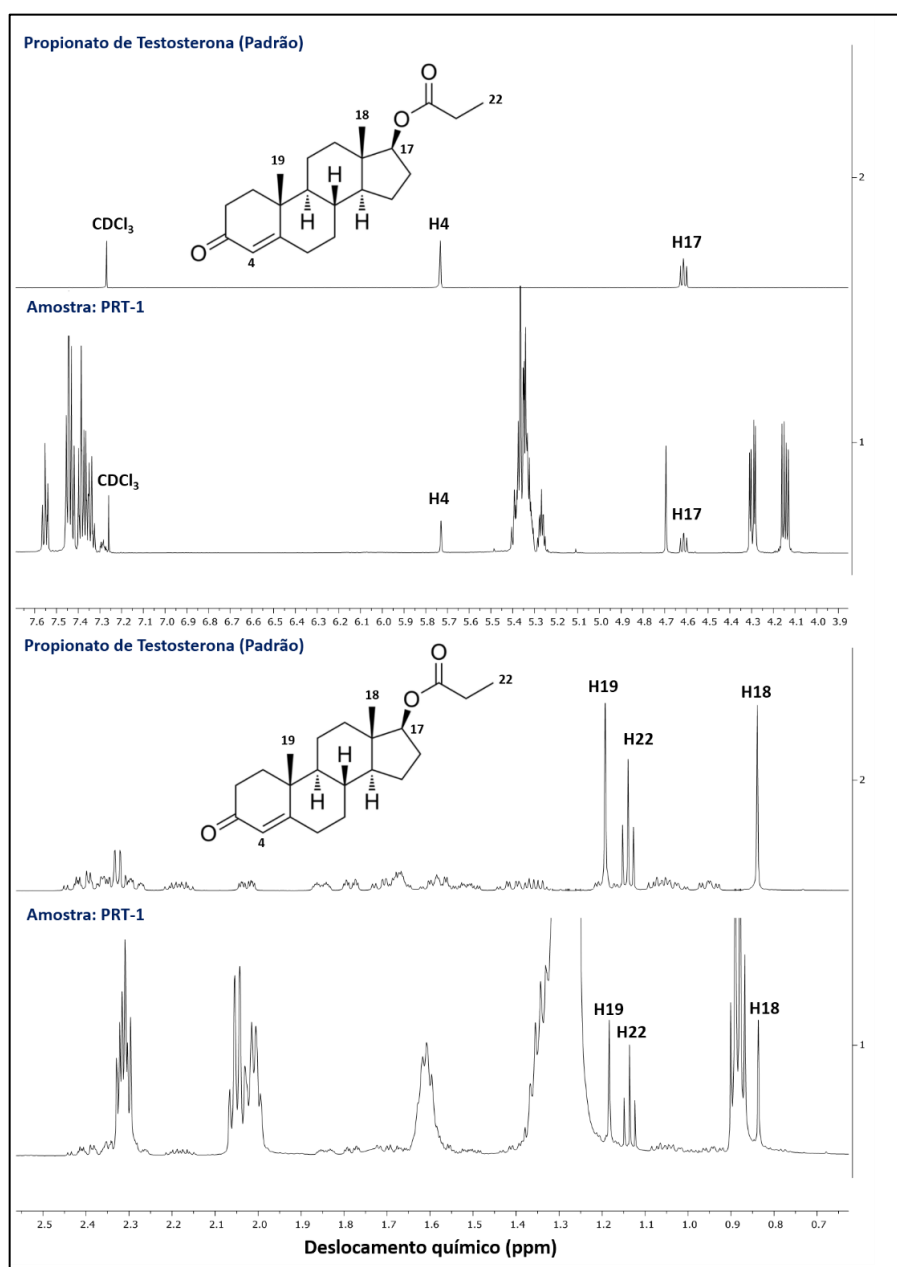


Figura 25 - Espectros RMN ^1H , 600 MHz, amostra PRT-1 e PRT padrão, em CDCl_3 .

Fonte: Elaborada pelo autor.

O mesmo comportamento foi observado para as amostras: PRT (2, 3, 4) (Figura 26). Por se tratarem de amostras injetáveis, além dos sinais do padrão, também foram identificados sinais referentes a óleo de amendoim e álcool benzílico, já que esse compostos (excipientes) são utilizados na preparação desse tipo de formulação.

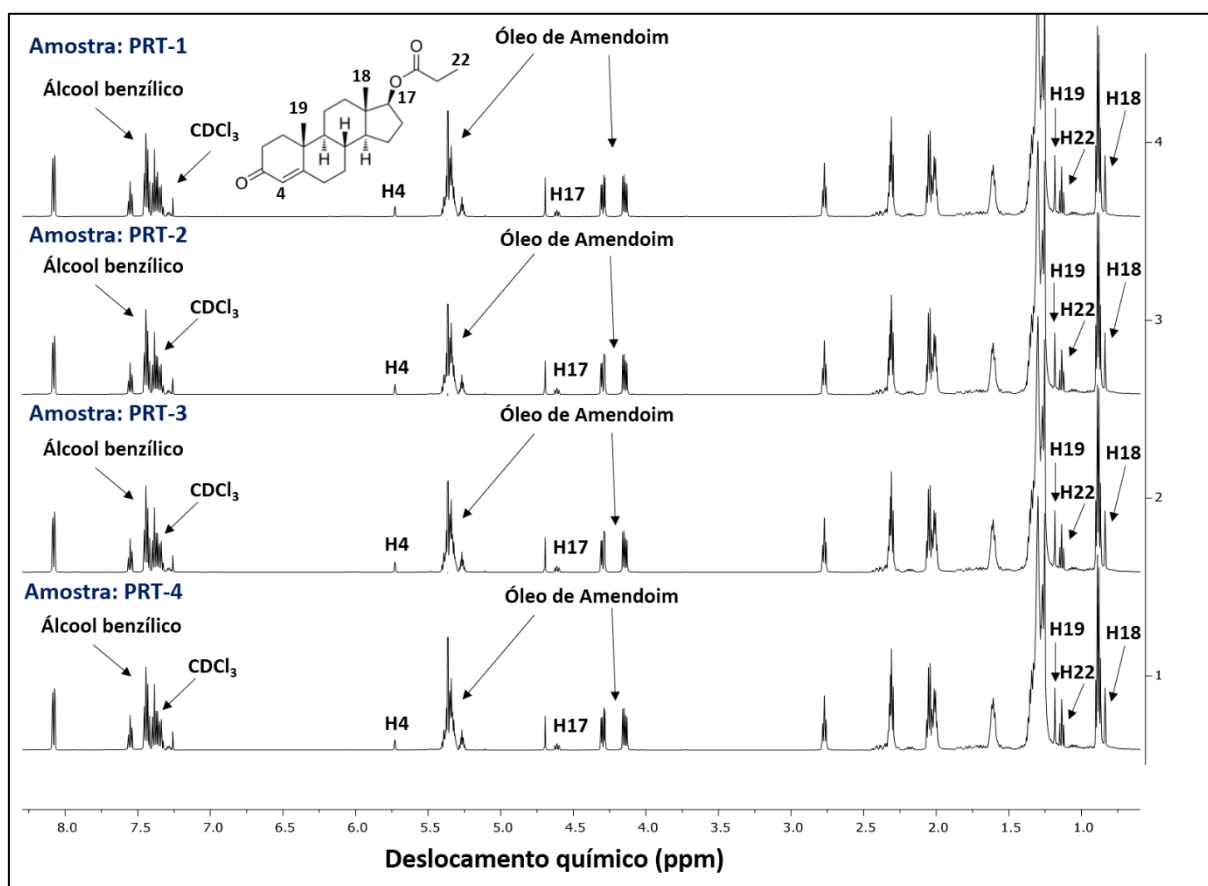


Figura 26 - Espectros RMN ^1H , 600 MHz, amostras: PRT-1, PRT-2, PRT-3, PRT-4, em CDCl_3 .

Fonte: Elaborada pelo autor.

O propionato de testosterona é um éster, derivado sintético da testosterona com a presença de um grupo propionato na posição 17- β . Essa modificação faz com que a molécula de PRT apresente um tempo de meia-vida maior do que a testosterona base. Quando um composto de propionato de testosterona entra na corrente sanguínea, ele sofre a atuação de enzimas que tentam quebrar a ligação éster do propionato de testosterona. Esta ruptura de ligação leva tempo, e resulta em uma liberação mais lenta e controlada de testosterona no sistema. Dentre os benefícios do uso de PRT, pode-se citar a diminuição da gordura corporal, aumento de massa magra e força muscular. Já como efeito colateral, devido o processo de aromatização, parte dessa testosterona é convertida em estrogênio, causando uma maior retenção de líquido, ginecomastia e elevação da pressão arterial e colesterol (145).

Analisando as amostras de UNT (1, 2, 3, 4) (cápsulas) percebeu-se que se tratavam de amostras autênticas, já que os sinais encontrados em RMN ^1H com deslocamento químico em: δ 5,74 (s, 1H); δ 4,63 (t, $J = 7,9$ Hz, 1H); δ 1,19 (s, 3H); δ 0,88 (s, $J = 7,0$ Hz, 3H) e δ 0,84 (s, 3H), referentes aos H (4, 17, 19, 30, 18), correspondiam ao princípio ativo indicado no rótulo desses medicamentos (Figura 27). Em relação aos demais ésteres, derivados da testosterona, o undecanoato de testosterona tem a vantagem de poder ser tomado por via oral e apresentar uma duração bem maior quando administrada na forma injetável, devido à presença de uma longa cadeia de carbonos saturados em sua estrutura. Seus efeitos no organismo são parecidos com o do PRT.

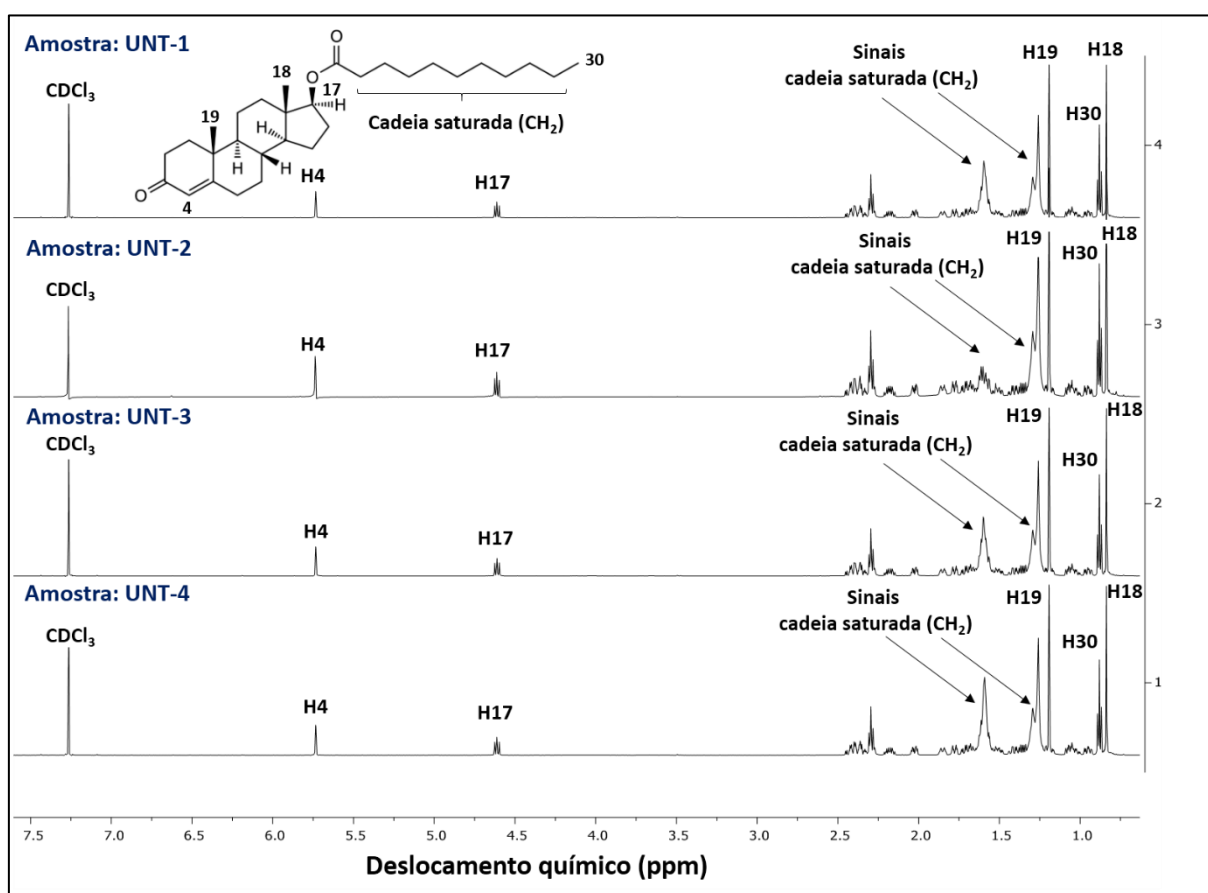


Figura 27 - Espectros RMN ^1H , 600 MHz, amostras UNT (1, 2, 3 e 4), em CDCl_3 .

Fonte: Elaborada pelo autor.

A amostra de ENT-1 (injetável) apresentou resultado negativo para a presença do analito indicado no rótulo, pois o espectro de RMN ^1H do medicamento se mostrou completamente diferente do padrão de referência, tratando-se claramente ser outra substância (Figura 28). Fazendo uma comparação entre os espectros do padrão de PRT e da amostra de ENT-1, não foi

possível identificar os sinais em: δ 5,73 (s, 1H); δ 4,61 (t, $J = 7,8$ Hz, 1H); δ 1,21 (s, 3H) e δ 0,84 (s, 3H), referentes aos H4, H7, H19 e H18, respectivamente.

No Brasil, o enantato de testosterona não é comercializado em farmácias e tampouco associados a outros compostos químicos, como o PRT, conseqüentemente as drogas que circulam no país a base de enantato de testosterona provem de fontes não seguras, como o contrabando.

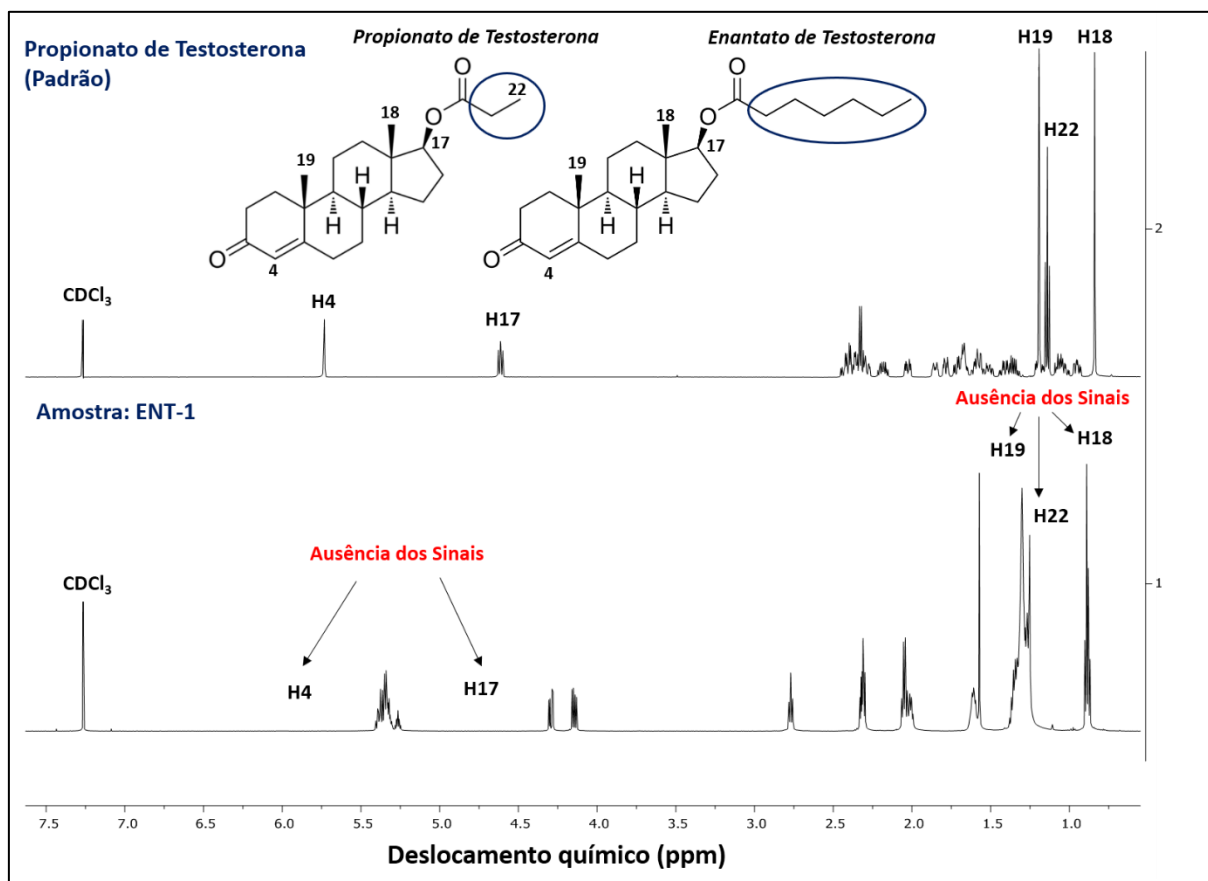


Figura 28 - Espectros RMN ^1H , 600 MHz, amostra ENT-1 e padrão de PRT, em CDCl_3 .

Fonte: Elaborada pelo autor.

As amostras de OXA (1, 2, 3, 4, 5) (comprimido) apresentaram resultado positivo para a presença do analito (oxandrolona), que pode ser verificado na Figura 29. Os espectros dos medicamentos apresentaram excelente concordância com o padrão, não sendo percebido a presença de outras substâncias. Como essas amostras eram comprimidos, os seus excipientes foram eliminados no processo de centrifugação, já que não se dissolviam no solvente utilizado, CDCl_3 . A Oxandrolona é medicamento utilizado para ajuda pessoas a recuperar o peso perdido devido a complicações de saúde, tais como infecções, trauma e cirurgias. Mas são altamente utilizadas por frequentadores de academias, principalmente mulheres, já que oferecerem baixo

efeito anabólico, não provoca retenção de líquidos e quando comparada a outros esteroides, oferece menos efeitos colaterais (186).

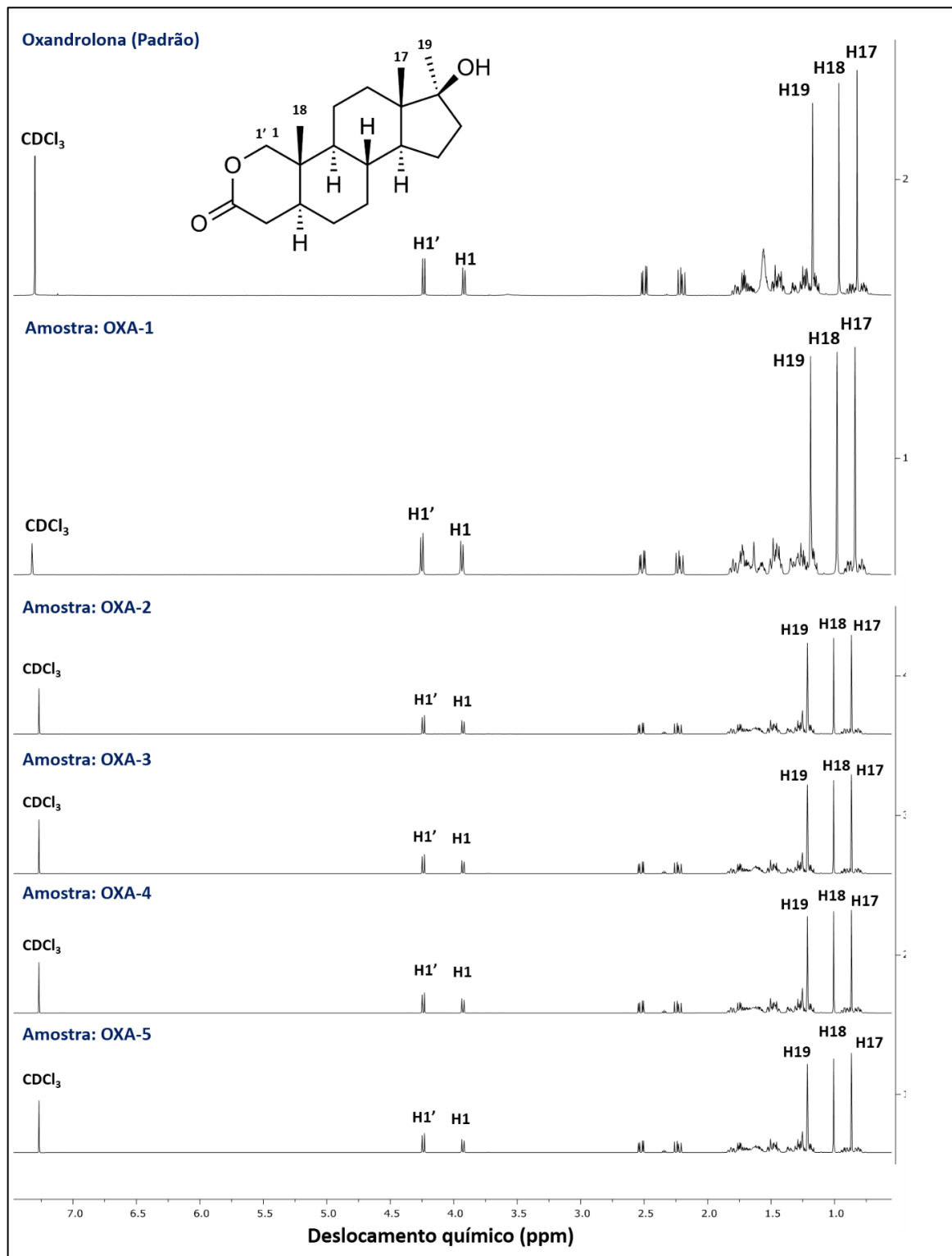


Figura 29 - Espectros RMN ^1H , 600 MHz, amostras OXA (1, 2, 3, 4, 5) e padrão de OXA, em CDCl_3 .

Fonte: Elaborada pelo autor.

O consumo indiscriminado de oxandrolona pode ocasionar diversas consequências, como o aumento de probabilidade de doenças cardíacas, acidente vascular cerebral, ruptura de tendões e ligamentos, doença hepática, desenvolvimento ósseo inadequado em adolescentes e outros efeitos secundários. O consumo do medicamento ainda pode ocasionar náuseas, vômitos, dores de cabeça, diminuição de libido e até queda de cabelo (187).

As amostras de OXA (6, 7, 8 e 9) (cápsulas), apresentaram um perfil espectral completamente diferente do padrão (Figura 30), confirmado pela ausência dos sinais com deslocamentos químicos em: δ 4,25 (d, $J = 10,7$ Hz, 1H); δ 3,94 (d, $J = 10,7$ Hz, 1H); δ 1,23 (s, 3H); δ 1,02 (s, 3H) e δ 0,88 (s, 3H) correspondentes aos hidrogênios: H1, H1', H19, H18 e H17, respectivamente. Concluindo que se tratavam de amostras adulteradas.

Fazendo uma análise mais minuciosa dos espectros, percebeu-se que as amostras de OXA (6, 7, 8 e 9) apresentavam um espectro bastante semelhante ao padrão de ESZ, confirmado pela presença dos sinais com deslocamento químico em: 7,31 (s, 1H); δ 1,25 (s, 3H); δ 0,90 (s, 3H) e δ 0,78 (s, 3H), referentes aos hidrogênios: H21, H20, H18 e H19, respectivamente (Figura 31).

Os resultados mostraram o quanto esses medicamentos apresentam falhas no seu processo de produção, já que a causa mais provável seria erros durante o envasamento ou rotulagem, sendo uma atividade extremamente perigosa para as pessoas que fazem uso desses medicamentos. E por se tratarem de drogas com efeitos bastante danosos ao organismo, esse tipo de erro pode causar problemas sérios à saúde de seus usuários.

É importante ressaltar que além de problemas de saúde ocasionados por esse tipo de adulteração, os medicamentos falsificados podem minar a confiança pública nos sistemas e nos profissionais de saúde, nos estabelecimentos que fazem a distribuição/dispensação e comercialização de medicamentos genuínos, na indústria farmacêutica e na autoridade regulatória de medicamentos. A rotulagem incorreta, no que diz respeito à fonte, também pode ser prejudicial à reputação e posição financeira do fabricante original e/ou atual, cujo nome está sendo usado de forma fraudulenta (5).

Nos últimos anos a indústria farmacêutica tem apresentado diversas soluções para tentar coibir a disseminação de produtos falsificados, dentre eles, a utilização de lacres especiais não falsificáveis em seus produtos (funcionando como papel moeda), permitindo o consumidor

reconhecer e diferenciar um produto falsificado de um autêntico. Em consonância, a indústria de falsificação vem sofisticando cada vez mais suas táticas fraudulentas.

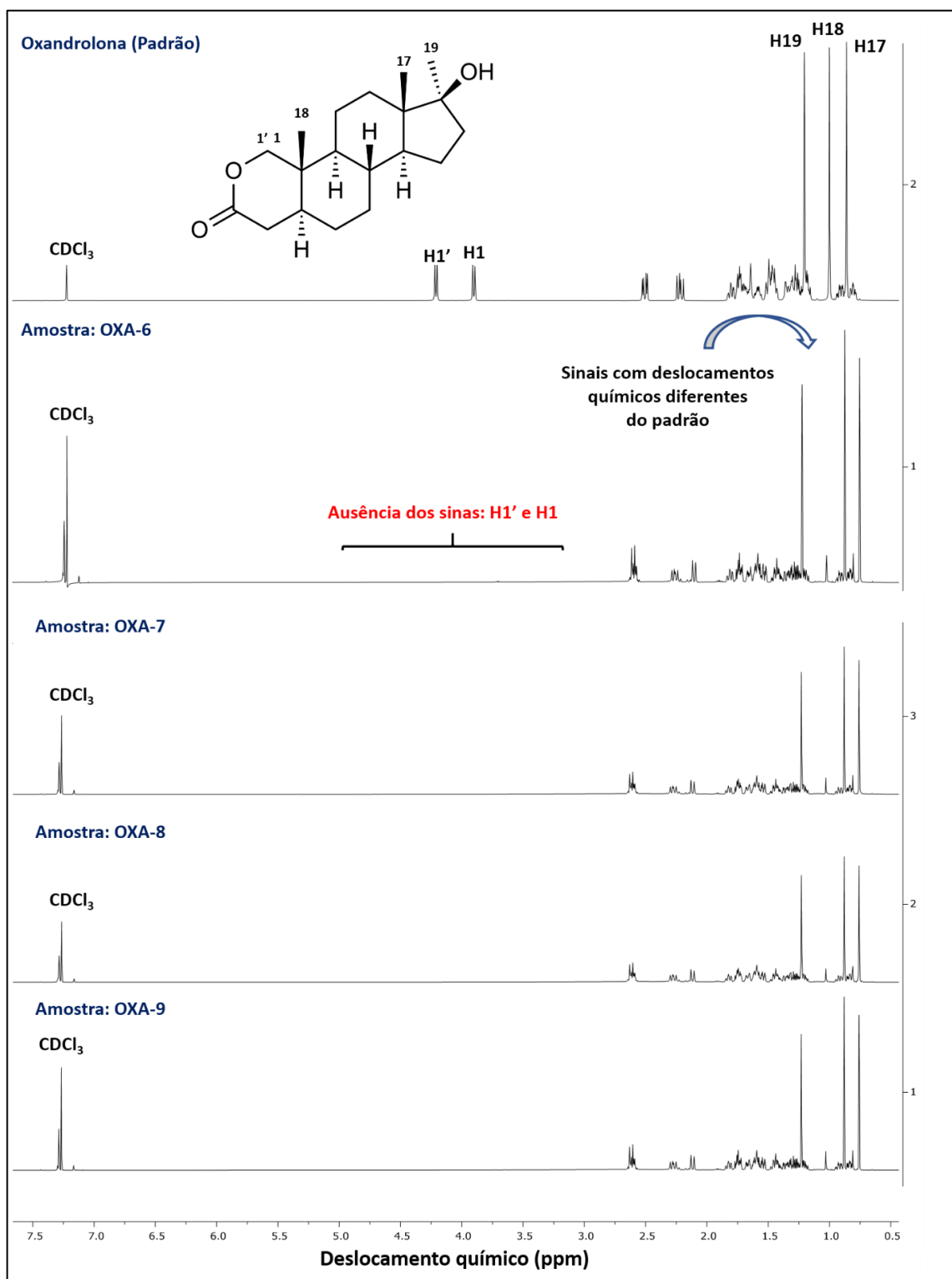


Figura 30 - Espectros RMN ^1H , 600 MHz, amostras OXA (6, 7, 8, 9) e padrão de OXA, em CDCl_3 .

Fonte: Elaborada pelo autor.

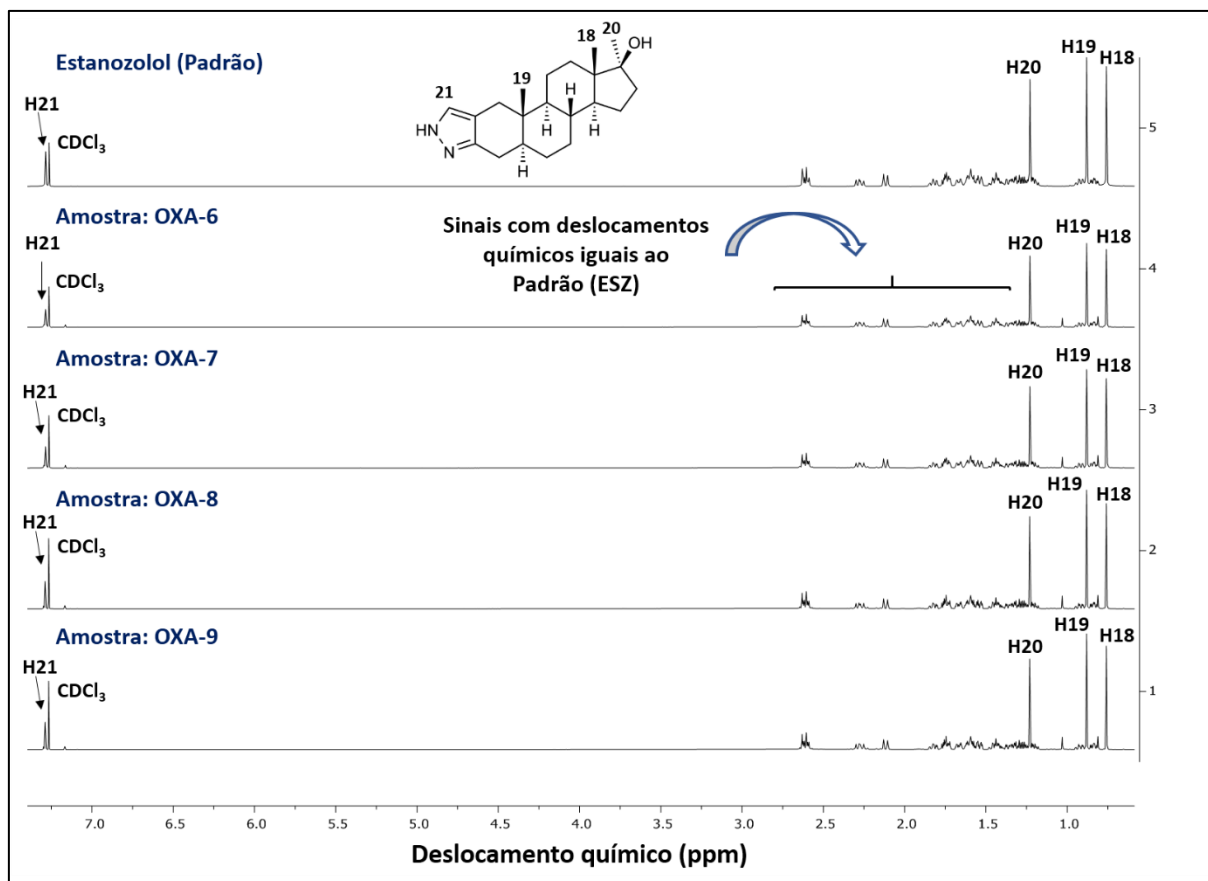


Figura 31 - Espectros RMN ^1H , 600 MHz, amostras OXA (6, 7, 8, 9) e padrão de ESZ, em CDCl_3 .

Fonte: Elaborada pelo autor.

A análise das amostras de TRA (1, 2, 3, 4) (injetáveis) mostraram que os medicamentos correspondiam ao princípio ativo indicado no rótulo, pois seus espectros apresentaram sinais em RMN ^1H com deslocamento químico em: δ 6,43 (d, $J = 9,9$ Hz, 1H); δ 6,37 (d, $J = 9,9$ Hz, 1H); δ 5,78 (s, 1H); δ 4,81 (t, $J = 9,3$ Hz, 1H); δ 2,08 (s, 3H); δ 0,94 (s, 3H) correspondente os H (12, 11, 4, 17, 20 e 18), respectivamente (Figura 32). Vale ressaltar que a identificação dos sinais referentes ao analito dessas amostras (acetato de trembolona), foi realizada através da simulação do seu espectro em RMN ^1H teoricamente e posteriormente a sua verificação no espectro do medicamento. A trembolona é uma das drogas mais utilizadas e vendidas ilegalmente no mundo, principalmente para preparações veterinárias. A estrutura química da trembolona a torna resistente à enzima aromatase (que faz a conversão para estrogênio), consequentemente não irá promover efeitos colaterais referentes ao estrogênio, tais como o crescimento tecido mamário em homens (ginecomastia) ganhos de gordura e retenção de água (188).

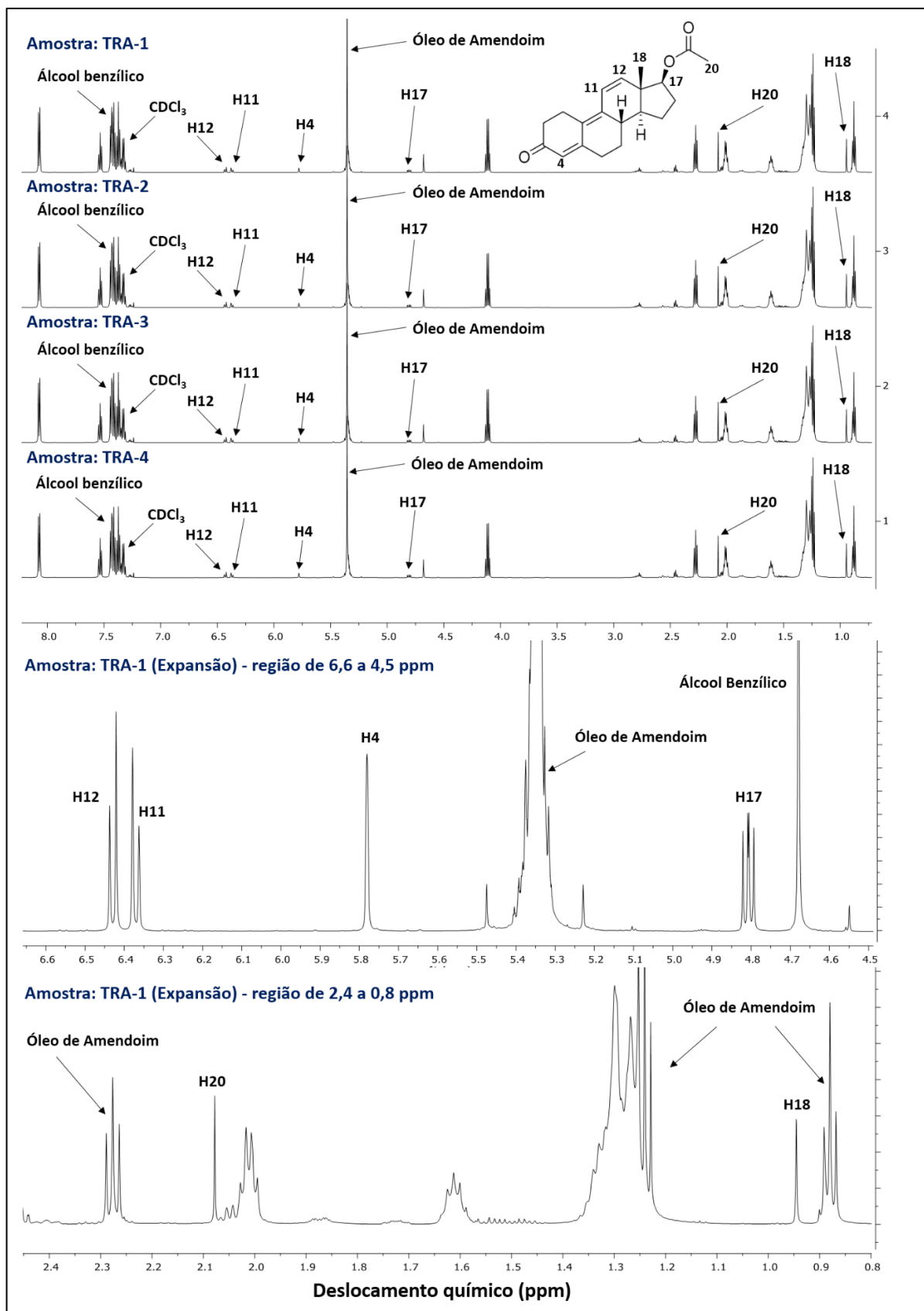


Figura 32 - Espectros RMN ¹H, 600 MHz, amostras TRA (1, 2, 3, 4), em CDCl₃.

Fonte: Elaborada pelo autor.

A análise das amostras de MDT (1, 2, 3 e 4) (cápsulas) apresentaram resultados positivos para a presença do analito indicado no rótulo, onde foi constatado que se tratavam de amostras autênticas, já que os espectros em RMN ^1H apresentaram sinais com deslocamentos químicos em: δ 7,07 (d, $J = 10,1$ Hz, 1H); δ 6,24 (d, $J = 10,1$ Hz, 1H); δ 6,08 (s, 1H); δ 1,25 (s, 3H); δ 1,20 (s, 3H) e δ 0,94 (s, 3H); referentes aos H (2, 1, 4, 20, 19 e 18), respectivamente (Figura 33). Da mesma forma que nas amostras de TRA, a identificação se deu através da comparação dos resultados obtidos com dados referentes ao MDT padrão, disponíveis na literatura e por simulação do seu espectro obtido teoricamente. A metandrostebolona apresenta duas diferenças estruturais em sua molécula em relação a testosterona, a presença de uma ligação dupla a mais entre os carbonos 1 e 2 e a adição de um grupo metil no carbono 17- α , chamado de carbono 17- α -alquilado. Essas mudanças estruturais conferem uma melhor absorção da molécula pelo organismo, protegendo a droga de ser desativada pelo fígado (permitindo que quase toda a droga entre na corrente sanguínea) (189,190).

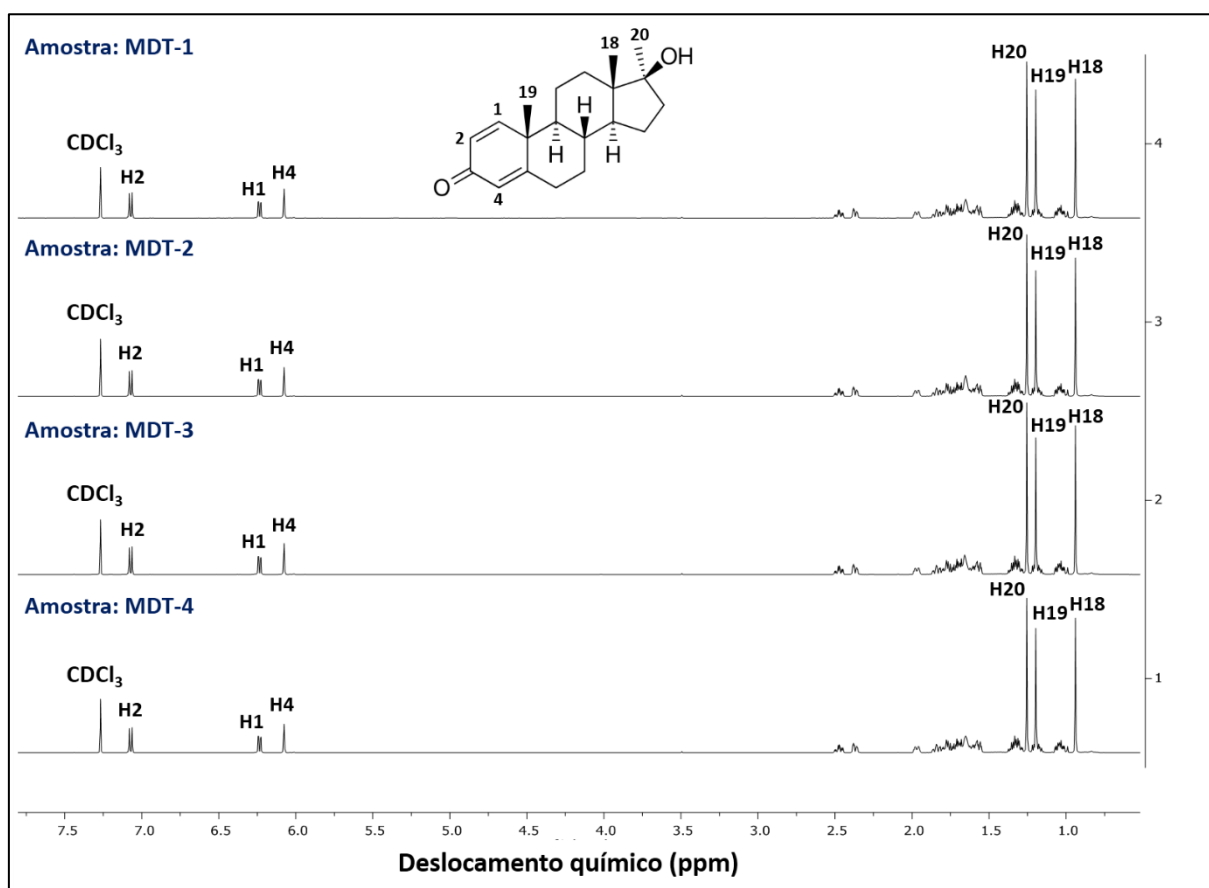


Figura 33 - Espectros RMN ^1H , 600 MHz, amostras MDT (1, 2, 3, 4), em CDCl_3 .

Fonte: Elaborada pelo autor.

Analisando-se a amostra DEN-1 (Figura 34), verificou-se que se tratava de uma amostra autêntica, já que seu perfil espectral apresentou bastante concordância o do padrão de DEN.

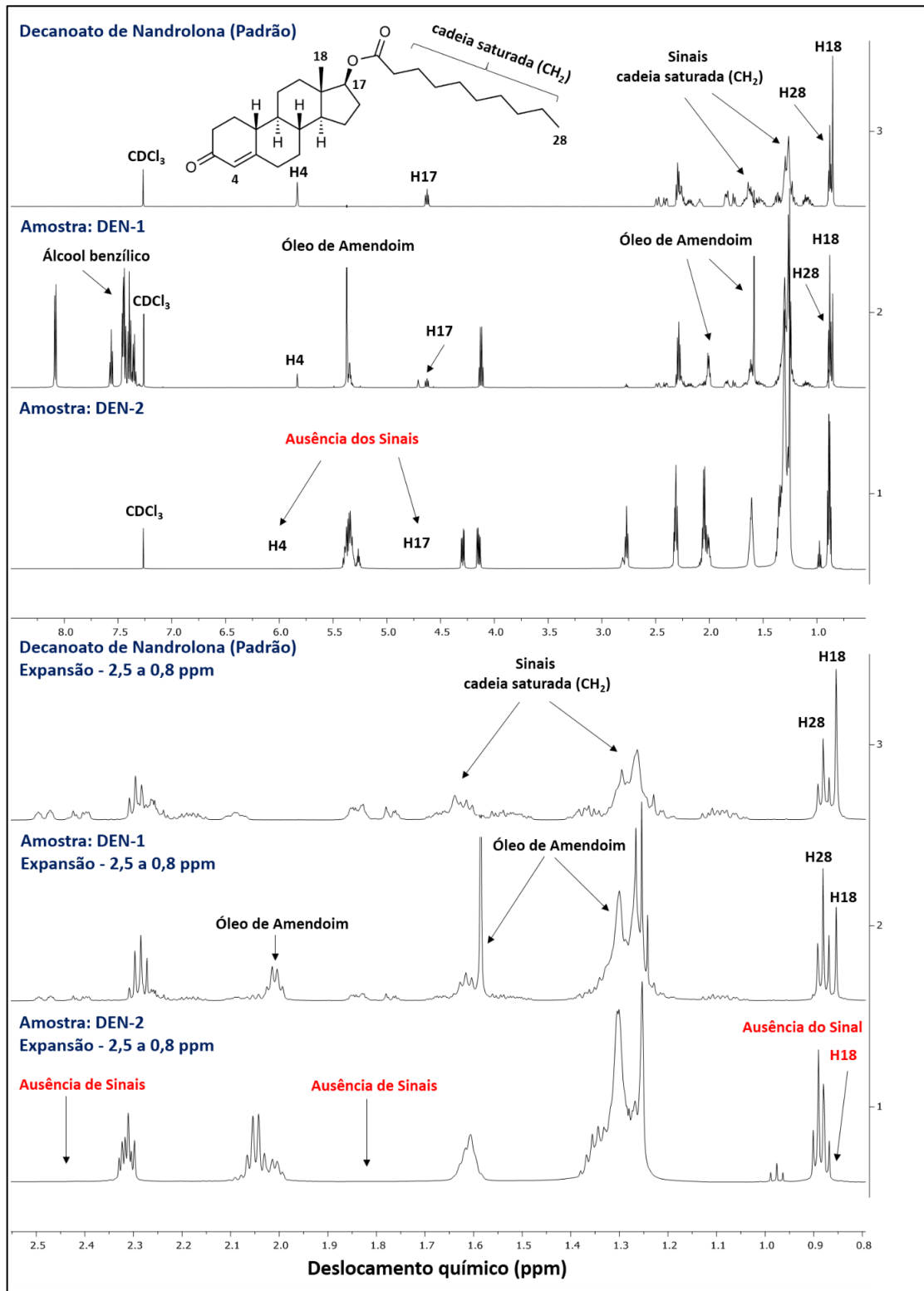


Figura 34 - Espectros RMN ¹H, 600 MHz, amostras DEN (1, 2), em CDCl₃.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Nessas amostras foram identificados os sinais em RMN ^1H referentes ao padrão, com deslocamento químico em: δ 5,87 (s, 1H); δ 4,63 (t, $J = 7,8$ Hz, 1H); δ 0,99 (t, $J = 6,9$ Hz, 3H) e δ 0,86 (s, 3H) referentes aos hidrogênios: H4, H17, H28 e H18. Contrariamente, a amostra DEN-2 (Figura 34) mostrou-se claramente se tratar de uma adulteração, já que nenhum dos sinais indicativos para a presença de DEN foram encontrados no espectro da amostra. Por se tratarem de medicamentos injetáveis, sinais referentes ao álcool benzílico e óleo de amendoim também puderam ser identificados.

Fazendo uma análise mais detalhada das amostras DEN-2 e ENT-1 que deram resultados negativo para presença do analito, observou-se que as mesmas se tratavam apenas da substância óleo de amendoim (excipiente), já que os espectros de RMN ^1H das suas substâncias se sobrepunham (Figura 35). A ausência do princípio ativo, mostra o quanto esses medicamentos falsificados são duvidosos, pois além de não fornecerem os efeitos desejados, acabam lesando financeiramente seus consumidores.

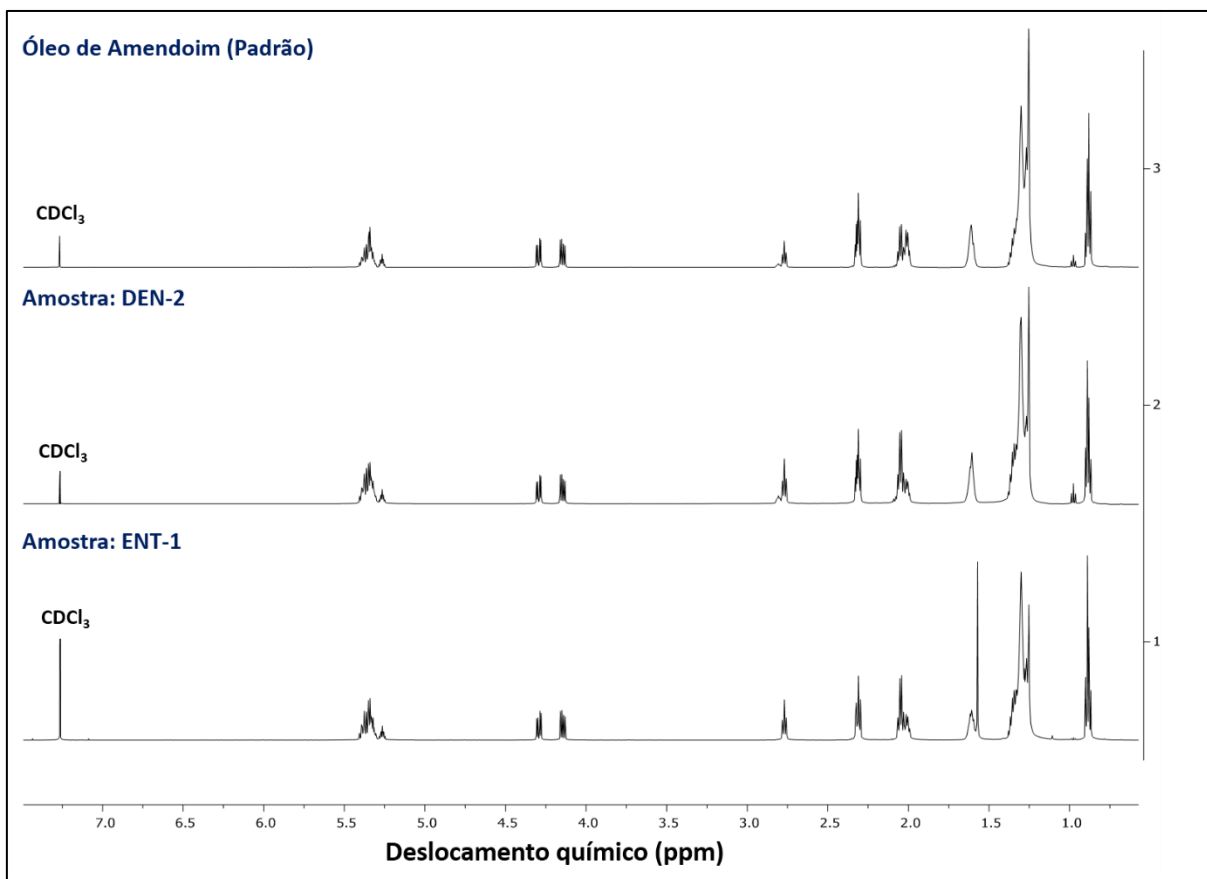


Figura 35 - Espectros RMN ^1H , 600 MHz, amostras DEN-2, ENT-1 e óleo de amendoim, em CDCl_3 .

Fonte: Elaborada pelo autor.

O decanoato de nandrolona (DEN) é oficialmente classificado como um 19-nortestosterona (19-nor), devido a sua estrutura química apresentar a falta de um átomo de carbono na posição 19, em relação a estrutura da testosterona (Figura 23). A presença de uma longa estrutura de decanoato (ligado ao éster), faz com que esse esteroide seja liberado de forma lenta no organismo, permitindo que o indivíduo faça uso do anabolizante sem a necessidade de injeções frequentes. Em dosagem terapêutica o DEN pode ser utilizado clinicamente no tratamento de anemia em crianças e adultos, e no tratamento de osteoporose em mulheres e em idosos (191).

As amostras CIT (1, 2, 3, 4, 5) (injetáveis) deram resultado positivo para a presença do princípio ativo que estava indicado no rótulo, já que foram identificados os sinais com deslocamento químico em: δ 5,73 (s, 1H); δ 4,61 (t, $J = 7,8$ Hz, 1H); δ 1,19 (s, 3H) e δ 0,84 (s, 3H), referentes aos H4, H17, H19 e H18, respectivamente (Figura 36). O cipionato de testosterona é a segunda versão sintética da testosterona mais popular entre os consumidores, ficando atrás apenas do enantato de testosterona. Trata-se basicamente de uma testosterona esterificada, por isso tem uma maior solubilidade lipídica do que a testosterona base. É um medicamento facilmente encontrado nas farmácias, já que é usado com bastante frequência no tratamento de pessoas com déficit de testosterona. Seu uso indevido pode acarretar em consequências graves como a atrofia dos testículos de forma precoce (192).

A análise das amostras de PRD (1, 2, 3, 4) (injetáveis) também evidenciou a autenticidade desses medicamentos, já que foram verificados a presença dos sinais marcados em RMN ^1H com deslocamentos químicos em: δ 4,61 (t, $J = 7,8$ Hz, 1H); δ 1,13 (t, $J = 7,6$ Hz, 3H); δ 1,06 (s, 3H), δ 1,00 (d, $J = 6,5$ Hz, 3H) e δ 0,81 (s, 3H), referentes aos H17, H22, H19, H23 e H18, respectivamente (Figura 37). O Propionato de Drostanolona é um esteroide injetável derivado da DHT (di-hidrottestosterona), e é raramente utilizado para o ganho de peso. Seu maior uso é feito por atletas em fases de pré competição, *cutting* ou simplesmente para evitar a retenção de líquidos e picos de estrogênio. Por muitos anos, sua principal indicação clínica foi no tratamento de câncer de mama avançado e inoperável. Entre os efeitos colaterais ocasionados pelo seu uso indiscriminado, está a queda de cabelo, aparição de espinhas, alargamento da próstata, além do aumento da agressividade do usuário (193).

Vale ressaltar que a identificação dos sinais referentes aos analitos das amostras de CIT e PRD, foram realizadas através da simulação dos seus espectros em RMN ^1H teoricamente e posteriormente a sua verificação no espectro do medicamento.

Através dos resultados obtidos nas amostras de CIT e PRD, pode-se perceber que a análise da autenticidade de um medicamento por RMN não precisa necessariamente do padrão de referência do analito a ser analisado, necessita-se apenas do conhecimento dos sinais referentes ao analito e constatar sua presença na amostra.

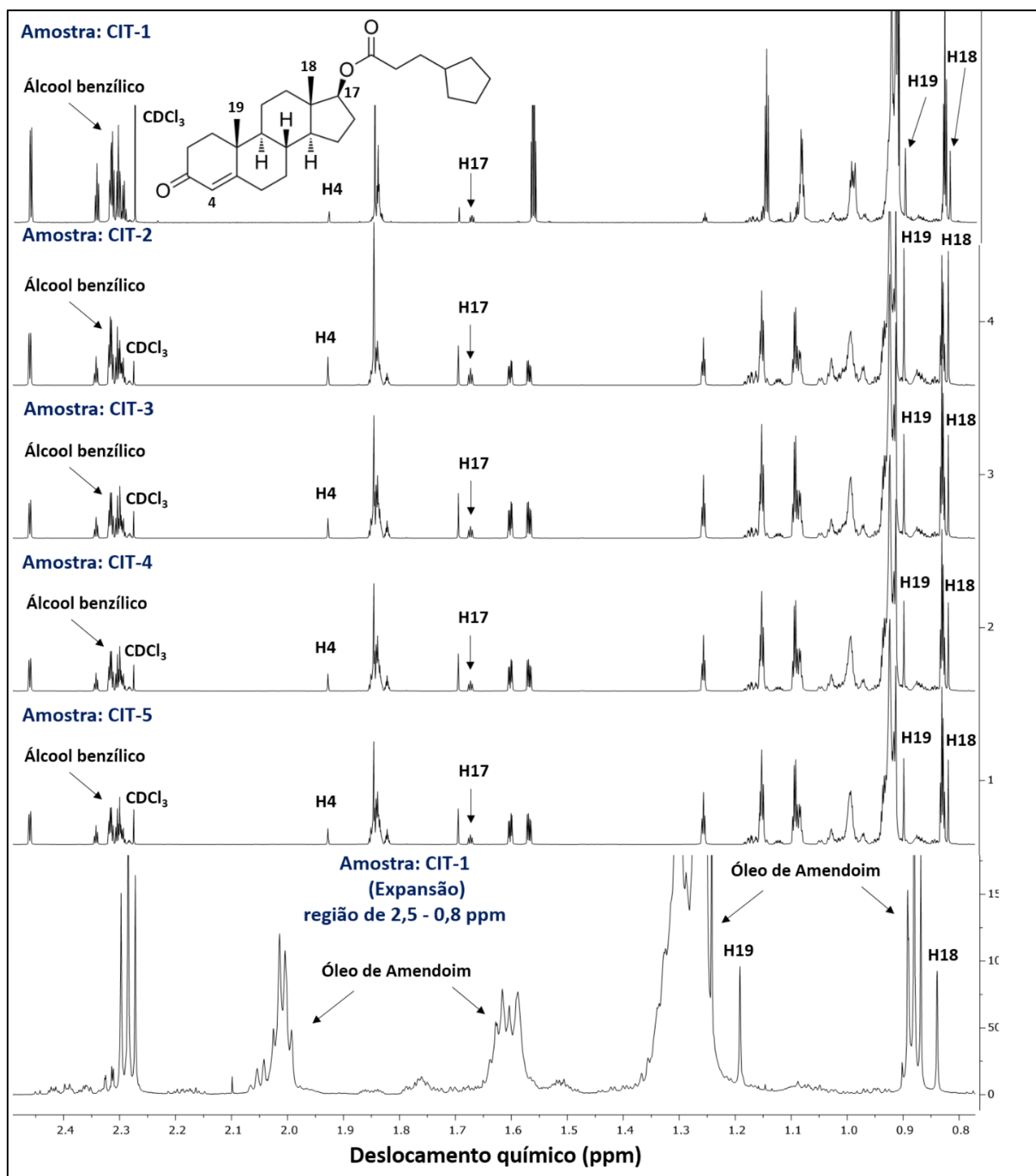


Figura 36 - Espectros RMN ^1H , 600 MHz, amostras CIT (1, 2, 3, 4, 5), em CDCl_3 .

Fonte: Elaborada pelo autor.

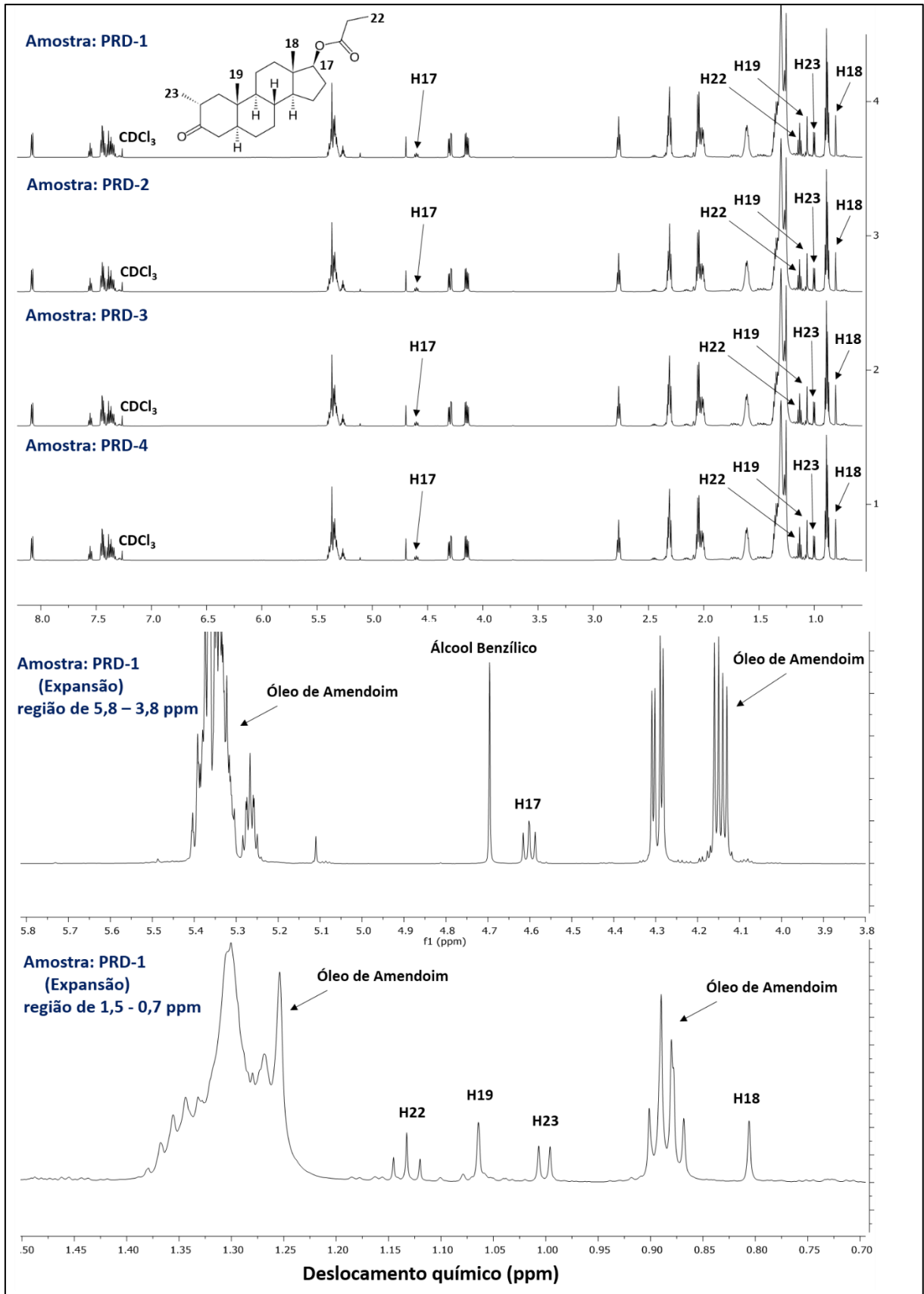


Figura 37 - Espectros RMN ^1H , 600 MHz, amostras PRD (1, 2, 3, 4), em CDCl_3 .

Fonte: Elaborada pelo autor.

A análise das amostras de OXI (1, 2, 3, 4) (cápsulas) mostraram que os medicamentos correspondiam ao princípio ativo indicado no rótulo, pois seus espectros apresentaram sinais em RMN ^1H com deslocamento químico em: δ 8,64 (d, $J = 1,5$ Hz, 1H); δ 1,22 (s, 3H); δ 0,87 (s, 3H) e δ 0,79 (s, 3H) correspondentes aos H (21, 20, 19 e 18), respectivamente (Figura 38). A oximetolona é um dos esteroides anabolizantes orais mais potentes que existem. Seu uso terapêutico é para tratar doenças como anemia, osteoporose e problemas crônicos que causem perda de tecido muscular (como HIV/AIDS) (194).

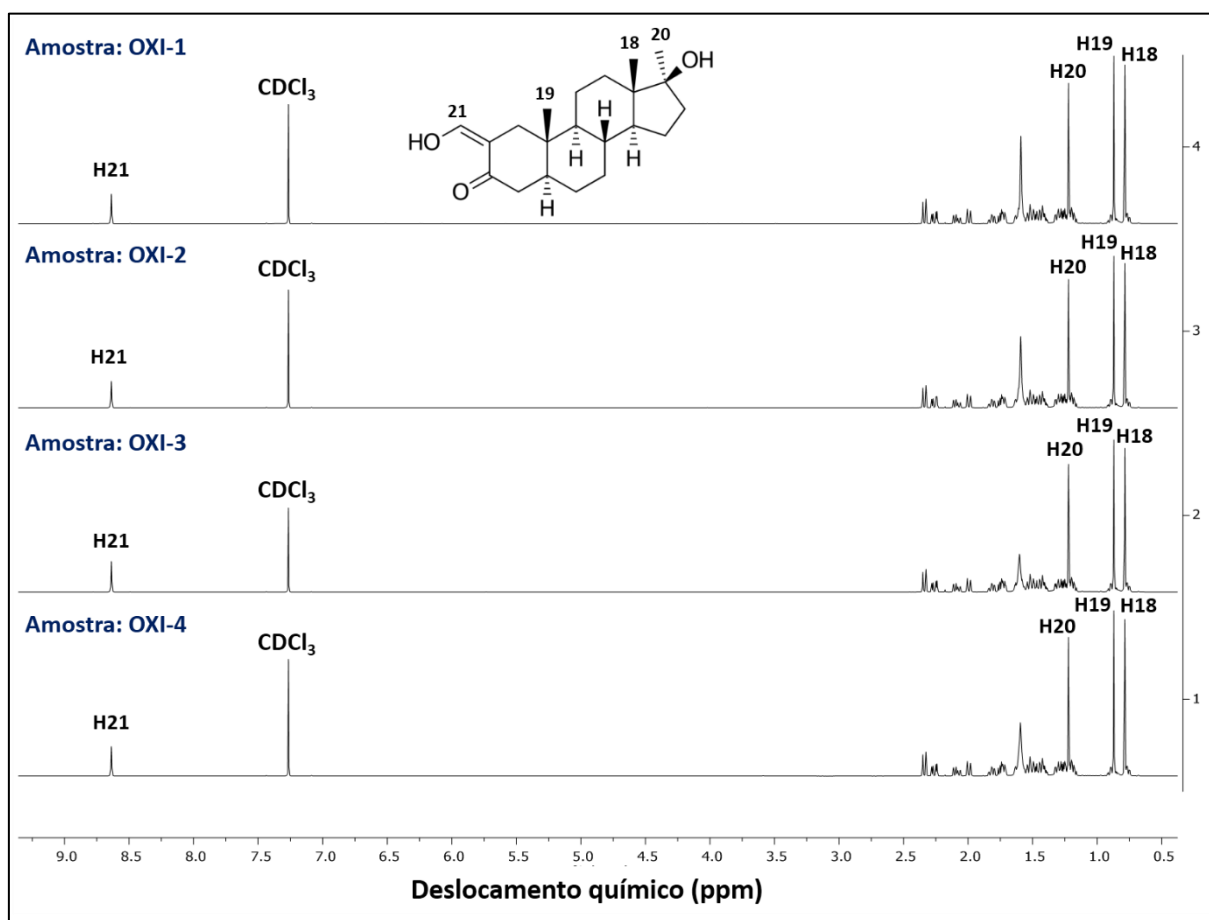


Figura 38 - Espectros RMN ^1H , 600 MHz, amostras OXI (1, 2, 3, 4), em CDCl_3 .

Fonte: Elaborada pelo autor.

As amostras DURA (1, 2, 3, 4 e 5) tratavam-se de medicamentos constituídos por 4 princípios ativos: propionato de testosterona, fenilpropionato de testosterona, isocaproato de testosterona e decanoato de testosterona. Percebeu-se que a amostra DURA-1 se tratava de uma amostra autêntica, já que apresentou os sinais marcadores de seus analitos na amostra (Figura 39). O mesmo comportamento não foi observado nas amostras de DURA (2, 3, 4 e 5) (Figuras 40 e 41), pois verificou-se a ausência do sinal marcador com deslocamento químico em δ 1,14

(t, $J = 7,6$ Hz, 3H), referente ao H22 (Figuras 40 e 41) que correspondia a molécula de PRT. Esses resultados foram confirmados, posteriormente, com os dados obtidos por CLAE.

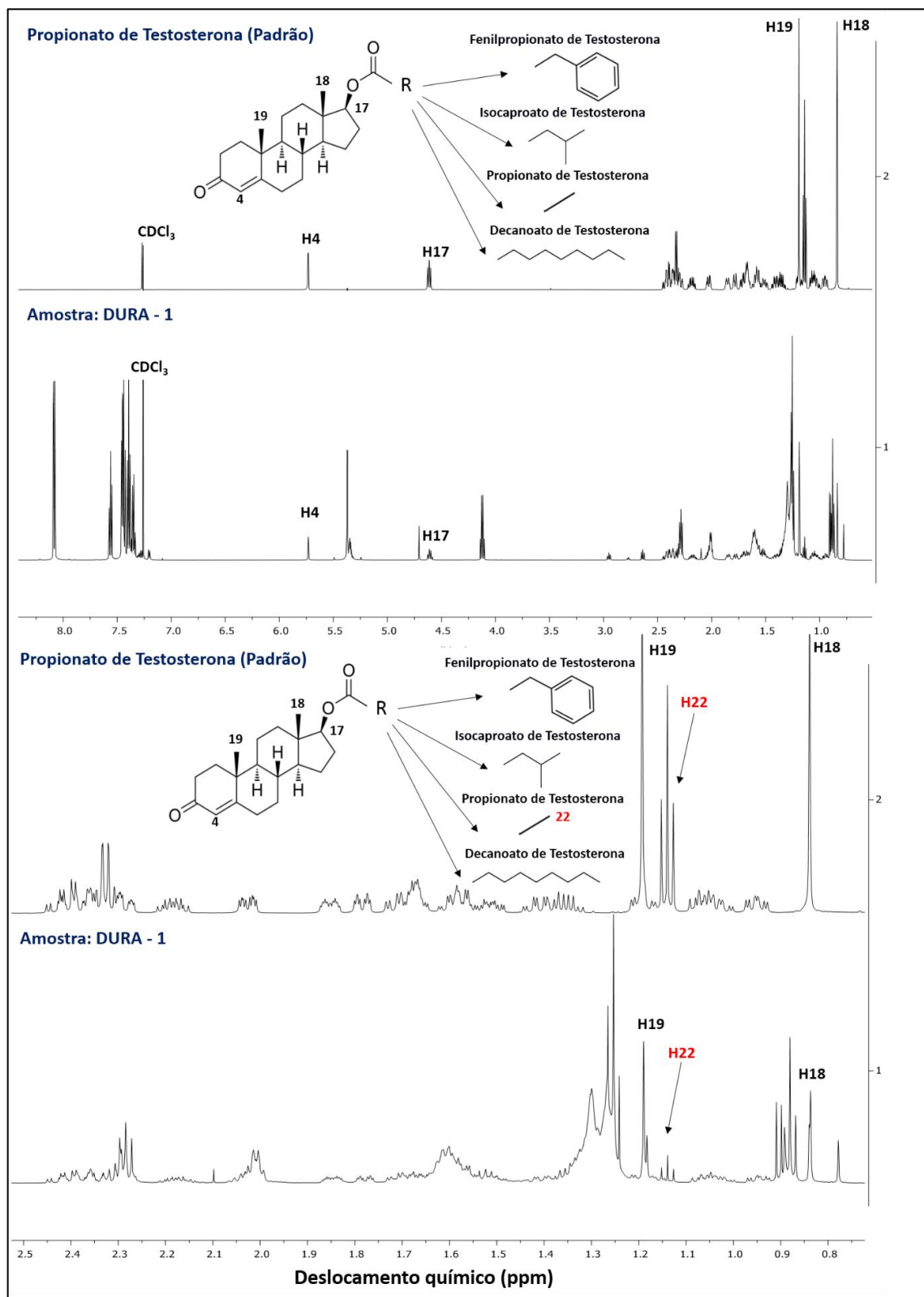


Figura 39 - Espectros RMN ^1H , 600 MHz, amostra DURA-1, em CDCl_3 .

Fonte: Elaborada pelo autor.

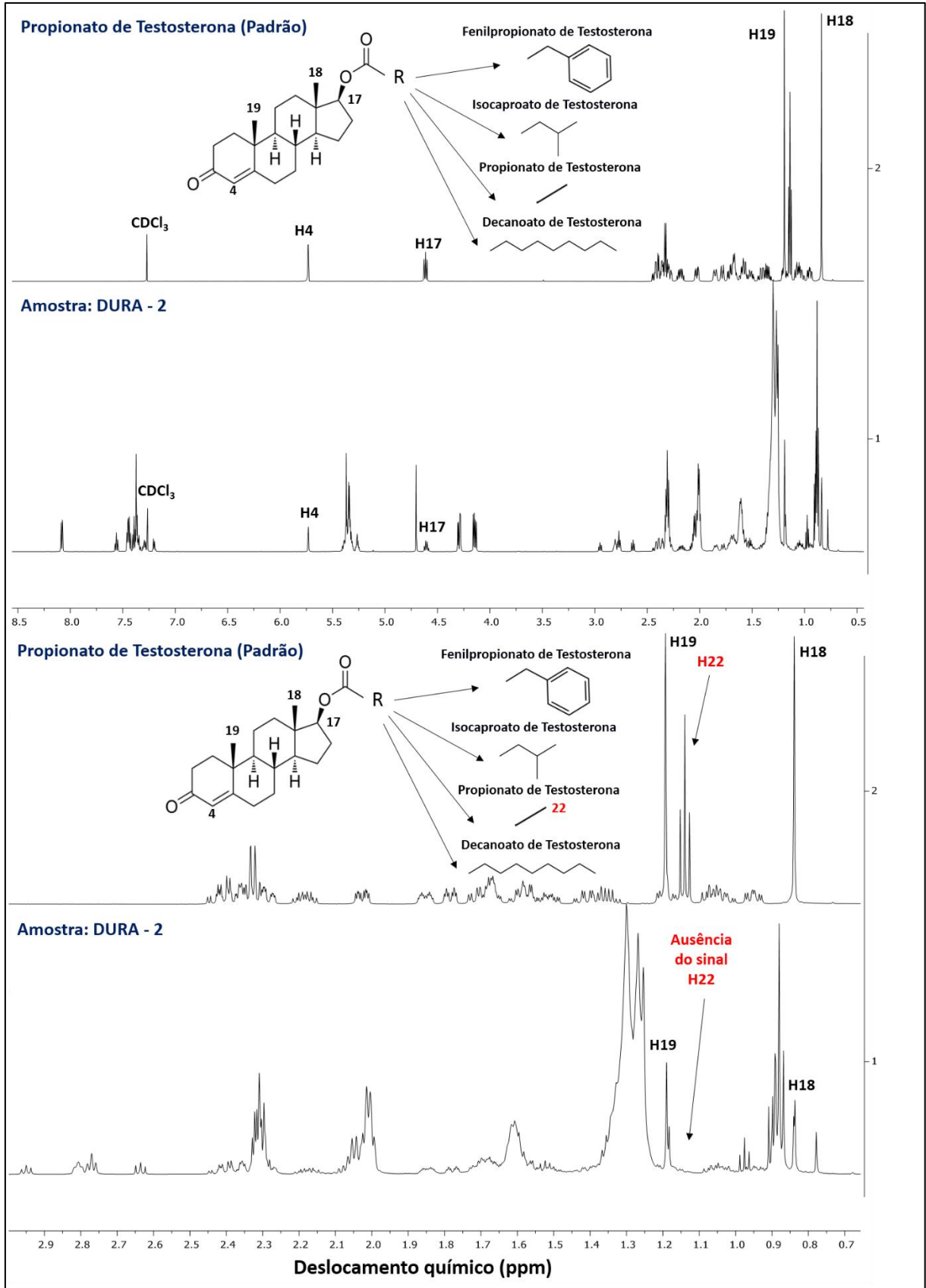


Figura 40 - Espectros RMN ¹H, 600 MHz, amostra DURA-2, em CDCl₃.

Fonte: Elaborada pelo autor.

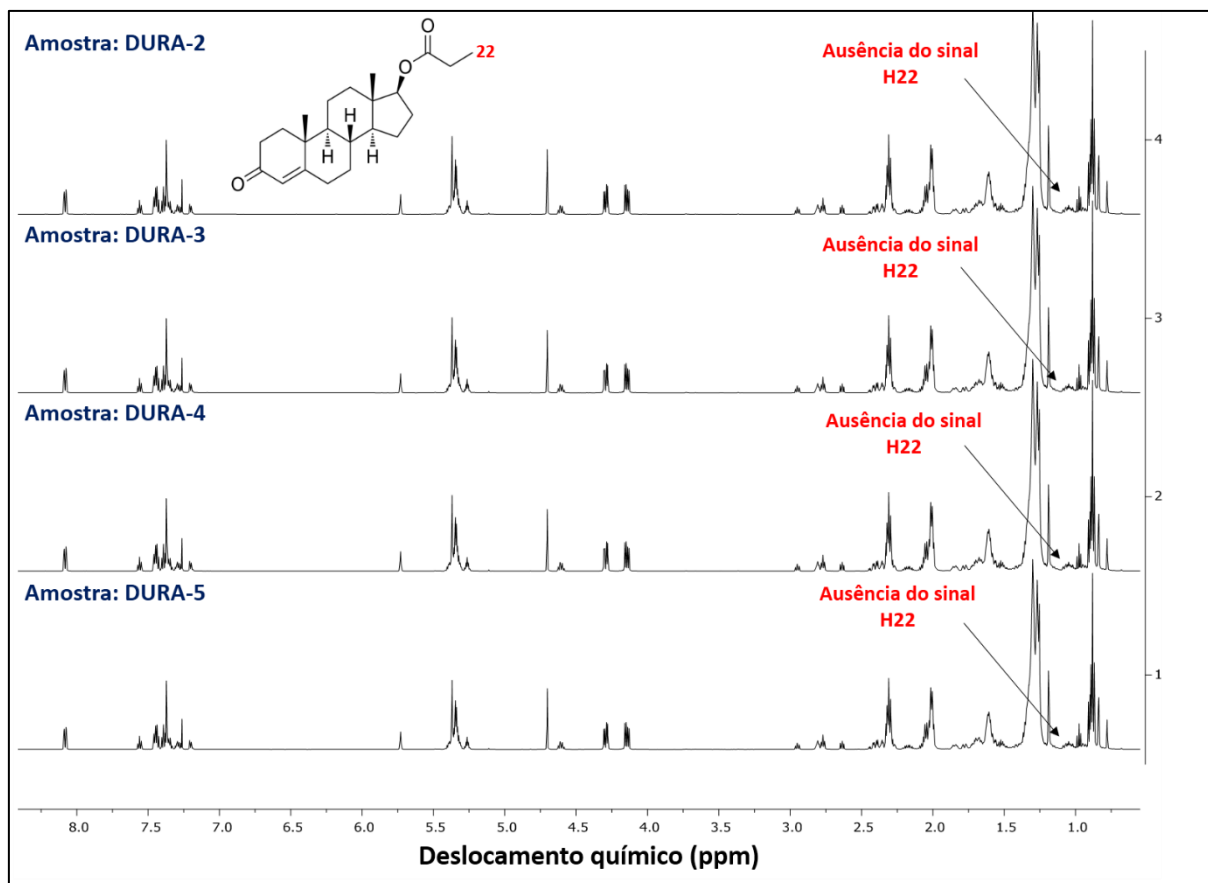


Figura 41 - Espectros RMN ¹H, 600 MHz, amostras DURA (2, 3, 4 e 5), em CDCl₃.

Fonte: Elaborada pelo autor

As amostras de DURA são bastante conhecidas no mercado como Durateston®, servem para aumentar a força física, acelerar a síntese de proteínas e diminuir a taxa de gordura corporal. Por ser formada por uma mistura de 4 derivados da testosterona, ela possui um efeito prolongado no organismo. Enquanto o propionato tem ação imediata (que se inicia no mesmo dia da aplicação), o fenilpropionato e o isocaproato demoram um pouco mais para surtir efeito. Logo, o casamento dos quatro tipos de esteroides, resulta em uma liberação de testosterona ao mesmo tempo ininterrupta e quase sem variações. Na prática, essa propriedade retarda a necessidade de outra aplicação do medicamento, já que a testosterona ainda permanece ativa por 3 a 4 semanas no organismo (195).

As amostras de ESZ-1 (comprimido) e ESZ (2, 3, 4, 5, 6) (injetáveis) apresentaram resultados positivo para a presença do analito, pois os espectros dos medicamentos apresentaram excelente concordância com o padrão ESZ (Figura 42), sendo possível a verificação dos sinais em RMN ¹H com deslocamento químico em: δ 7,31 (s, 1H); δ 1,25 (s, 3H); δ 0,90 (s, 3H) e δ 0,78 (s, 3H), referentes aos H (21, 20, 19 e 18), respectivamente.

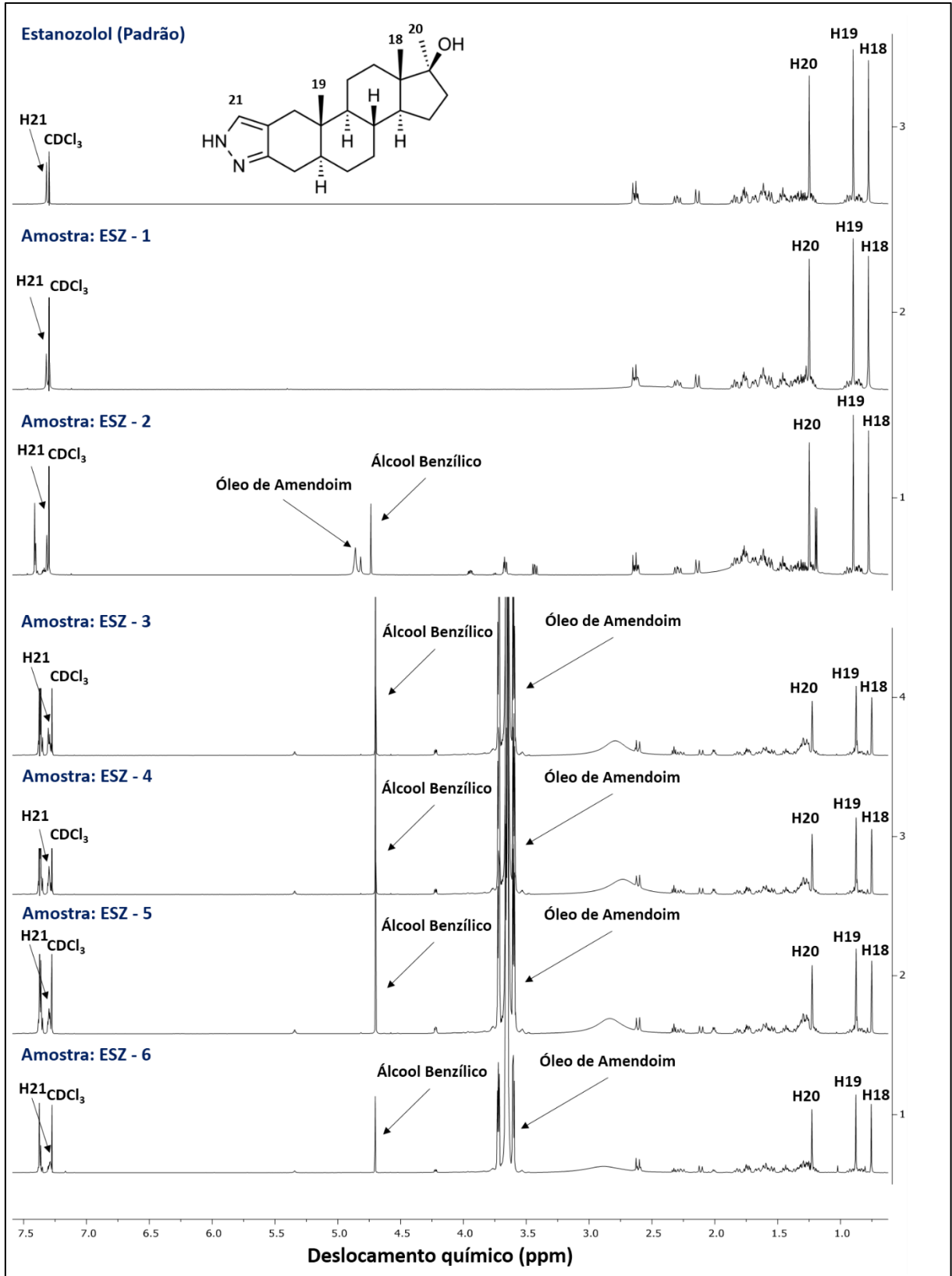


Figura 42 - Espectros RMN ^1H , 600 MHz, amostras ESZ (1, 2, 3, 4, 5 e 6) e padrão de ESZ, em CDCl_3 .

Fonte: Elaborada pelo autor.

Já a análise das amostras de ESZ (7, 8, 9 e 10) (cápsulas), apresentaram um perfil espectral bastante discordante do padrão de ESZ, concluindo que se tratavam de amostras adulteradas (Figura 43 e 44).

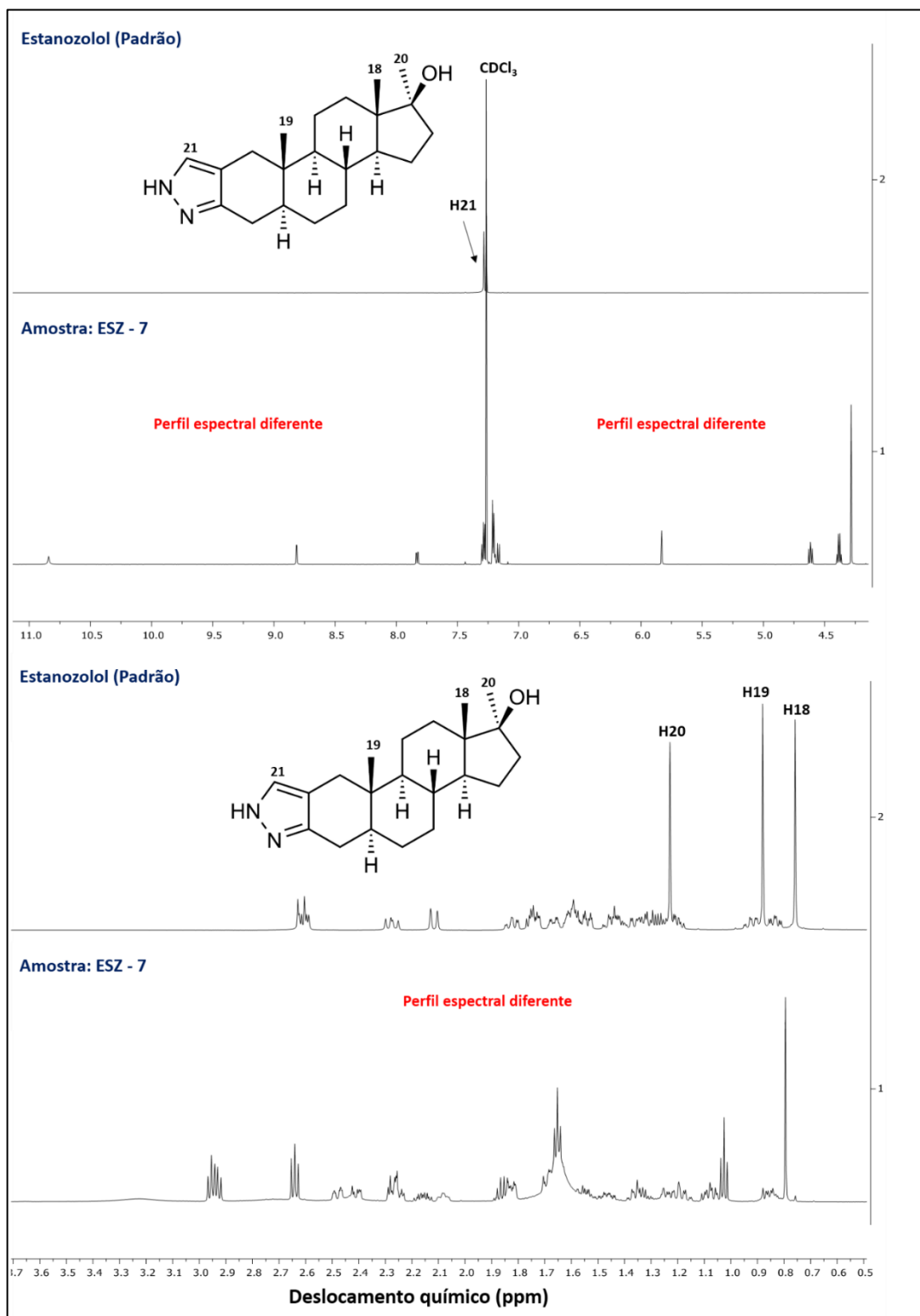


Figura 43 - Espectros RMN ^1H , 600 MHz, amostras ESZ-7 e padrão de ESZ, em CDCl_3 .

Fonte: Elaborada pelo autor.

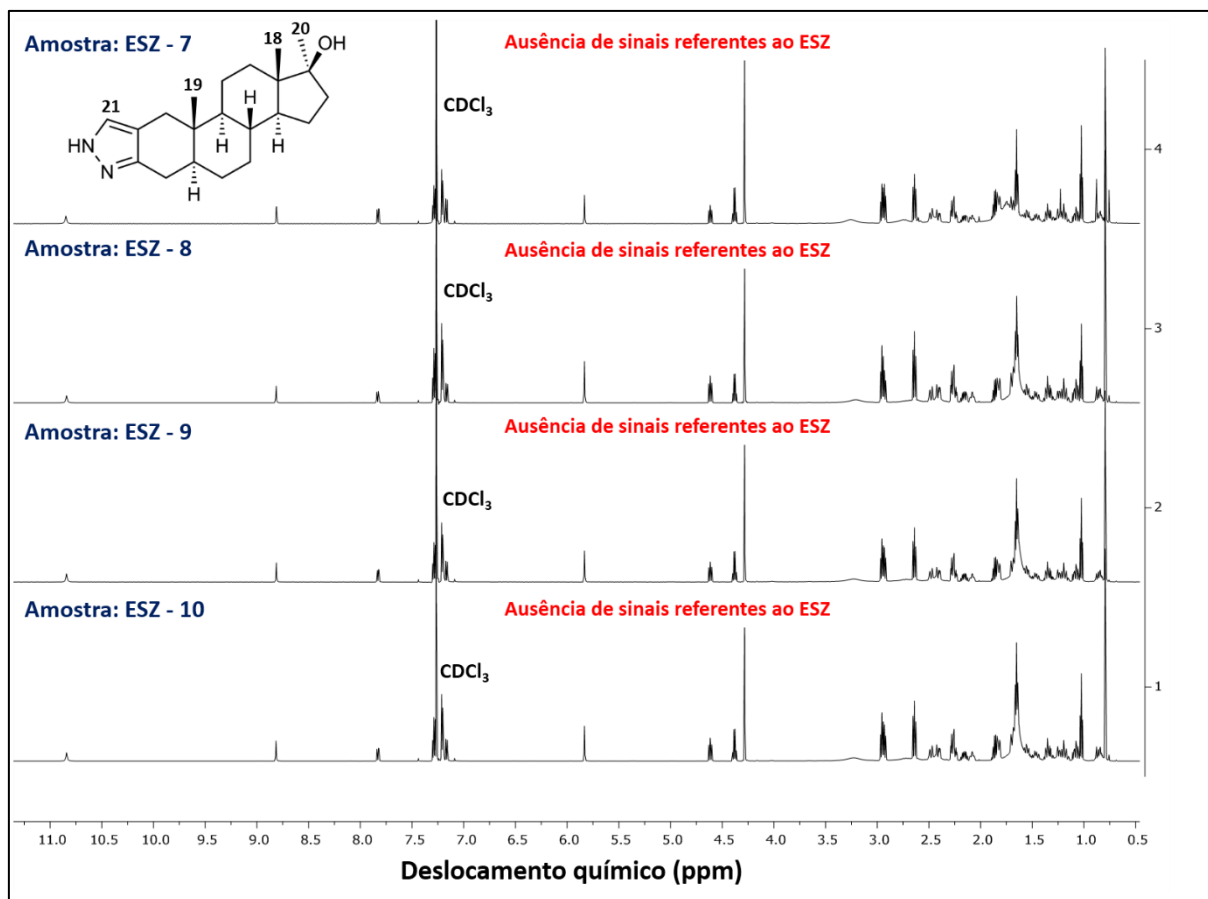


Figura 44 - Espectros RMN ^1H , 600 MHz, amostra ESZ (7, 8, 9 e 10), em CDCl_3 .

Fonte: Elaborada pelo autor.

Ao contrário da maioria dos esteróides anabólicos, utilizados na forma injetável, o stanozolol não é esterificado e é vendido em uma suspensão aquosa, ou em comprimidos e cápsulas na forma oral. Ele apresenta uma grande biodisponibilidade no organismo, devido à C17 α -alquilação que permite ao hormônio a sua sobrevivência ao passar pelo metabolismo do fígado quando é ingerido. O estanozolol tem sido bastante utilizado em pacientes humanos e animais para diversas condições. Em humanos foi demonstrado seu sucesso no tratamento da anemia e angioedema hereditárias. Já o seu uso veterinário é prescrito para melhorar o crescimento muscular, produção de células vermelhas do sangue, aumentar a densidade óssea e estimular o apetite de animais fracos ou debilitados. O estanozolol exibe baixo efeito colateral, em comparação a outros anabolizantes, mas seu uso indiscriminado pode ocasionar uma sobrecarga do fígado, causando vários problemas incluindo hepatotoxicidade (196). Vale ressaltar que a venda de estanozolol falsificado, vem crescendo nos últimos anos, sendo o principal anabolizante encontrado em apreensões policiais.

Com os resultados obtidos por RMN ^1H percebeu-se que os espectros das amostras de ESZ (7, 8, 9 e 10) apresentavam diversos sinais e com sistemas de *spins* diferentes, o que poderia se tratar de uma substância bem complexa ou uma mistura, com isso foi realizada uma análise de RMN ^1H por DOSY e se constatou de fato que se tratavam de duas substâncias, retratadas na Figura 45 como A e B. A presença das duas substâncias podem ser claramente observadas pelos sinais com diferentes valores de coeficiente de difusão (Figura 45).

A técnica DOSY (*Diffusion Ordered Spectroscopy*) foi desenvolvida em 1992 por Morris e Johnson, e trata-se de uma técnica não invasiva baseada na metodologia de ecos de *spin* com gradiente de campo magnético pulsado (PFGSE), que permite discriminar e caracterizar os diversos componentes de uma mistura, através da diferença dos coeficientes de difusão das substâncias (197). A maior vantagem deste método é a sua capacidade de proporcionar uma visão global da dinâmica translacional dos constituintes de uma mistura, sejam eles moléculas pequenas, macromoléculas, complexos ou agregados moleculares. As limitações da técnica DOSY são aquelas inerentes à RMN, como por exemplo, a baixa sensibilidade (198).

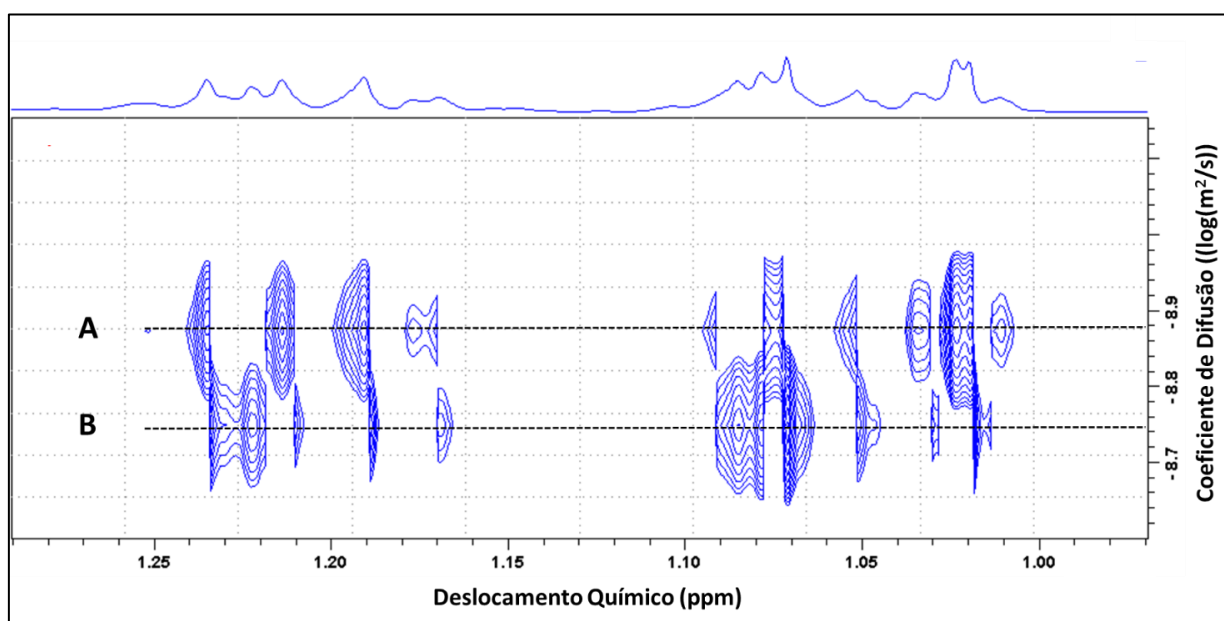


Figura 45 - Espectro de RMN ^1H DOSY 2D, 600 MHz, amostras ESZ (7, 8, 9 e 10), em CDCl_3 .

Fonte: Elaborada pelo autor.

Após os resultados obtidos pelo espectro de DOSY partiu-se para a elucidação estrutural dos compostos presentes na amostra de ESZ (7, 8, 9 e 10), com isso identificou-se a presença

dos compostos fenilpropionato de nandrolona e citrato de sildenafil. Os sinais foram identificados com a ajuda de espectros de decanoato de nandrolona (padrão) e um comprimido de Viagra[®] obtidos nas mesmas condições experimentais das amostras de ESZ (7, 8, 9 e 10). Os sinais então foram identificados e podem ser observados na Tabela 9 e Figura 46.

Tabela 9 - Valores de deslocamento químico em RMN ¹H dos compostos encontrados nas amostras de ESZ (7, 8, 9, 10).

Citrato de Sildenafil				Fenilpropionato de Nandrolona	
H	Sinal	H	Sinal	H	Sinal
10	4,28 (s, 3H)	17	7,83 (dd, $J=8,8, 2,4$ Hz, 1H)	4	5,83 (s, 1H)
11	2,93 (t, 2H) **	18	7,16 (d, $J=8,8$ Hz, 1H)	17	4,62 (t, $J=9,2$ Hz, 1H)
12	1,84 (m, 2H) **	20	4,38 (q, $J=6,9$ Hz, 2H)	18	0,79 (s, 3H)
13	1,03 (t, $J=7,4$ Hz, 3H)	21	1,65 (t, $J=7,0$ Hz, 3H)	20	2,64 (t, $J=8,3$ Hz, 2H)
15	8,84 (d, $J=2,4$ Hz, 1H)	-	-	-	-

*s-singlete, d-dublete, dd-duplo-dublete, t-triplete, q-quarteto, m-multiplete.

** sinais com sobreposição.

Fonte: Elaborada pelo autor.

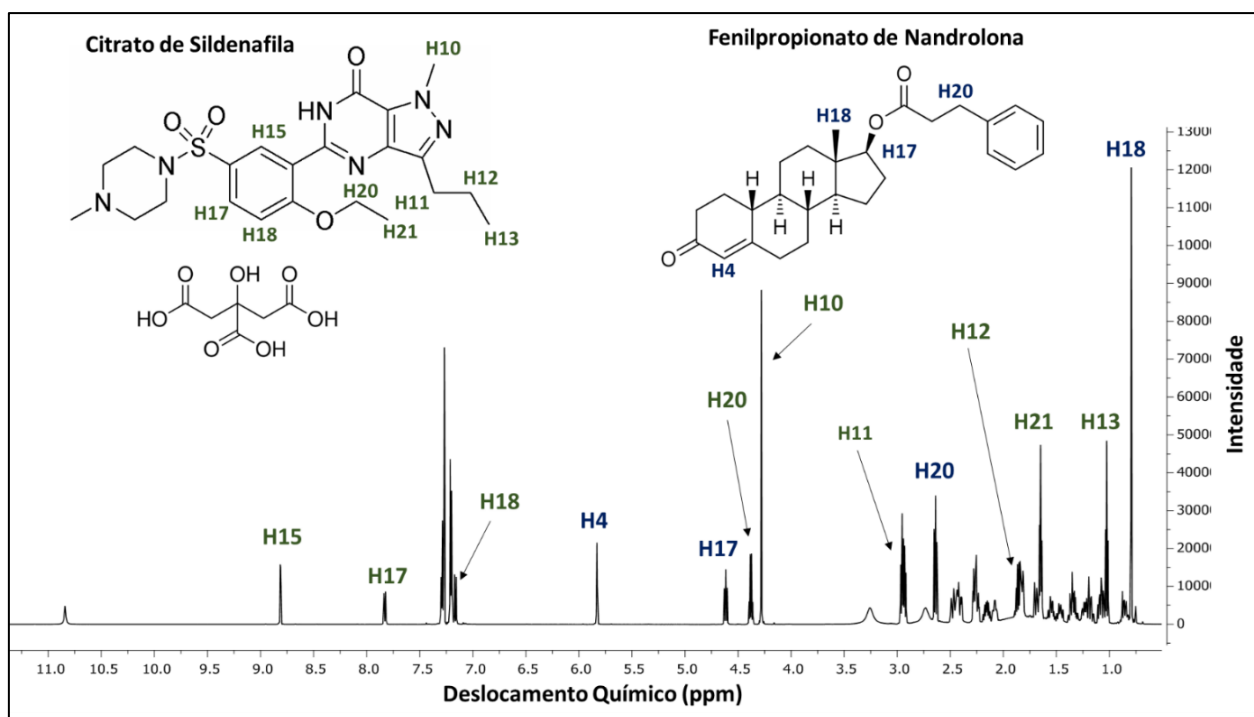


Figura 46 - Identificação em RMN ¹H dos compostos encontrados nas amostras de ESZ (7, 8, 9 e 10).

Fonte: Elaborada pelo autor.

A descoberta de citrato de sildenafil nas amostras de esteróides anabolizantes foi uma surpresa, já que o composto não é um esteroide anabolizante, ao contrário do fenilpropionato de nandrolona. A presença de citrato de sildenafil pode ser atribuída a dois fatores. O primeiro é a falta de controle de qualidade adequado na preparação dessas formulações, uma vez que os medicamentos falsificados para disfunção erétil e esteróides anabolizantes estão amplamente disponíveis no mercado negro (8), e essas substâncias podem ter sido produzidas no mesmo laboratório, levando a contaminação durante o processo de fabricação. A segunda hipótese é a adição intencional, porque o citrato de sildenafil é um medicamento usado para combater os efeitos colaterais causados pelo uso de esteróides anabolizantes, incluindo diminuição da libido nos homens e dificuldade de ereção. A associação destes dois fármacos em uma única formulação é bastante preocupante, uma vez que as substâncias podem causar danos irreversíveis ao corpo dos usuários, além do risco de desenvolver novas doenças que às vezes podem levar à morte.

Esses resultados demonstram que é cada vez mais necessário o desenvolvimento de metodologias analíticas efetivas para a detecção de adulterações em medicamentos, alertando a população e as agências de saúde para o uso indiscriminado dessas substâncias. Além de serem proibidos, esses medicamentos (anabolizantes) são frequentemente produzidos sem as mínimas condições de higiene e controle de qualidade.

Para atestar a veracidade dos resultados obtidos por RMN ^1H fez-se as análises utilizando a técnica de CG-EM e verificou que os resultados foram bastante concordantes. Pode-se perceber através do cromatograma (Figura 47) da amostra de ESZ-7 que foram identificados sinais das substâncias: fenilpropionato de nandrolona ($T_R=62,77$ min) e citrato de sildenafil ($T_R=70,15$ min). Os espectros de massa dos compostos identificados foram comparados com os da biblioteca NIST 2014, apresentando um grau de similaridade superior a 90% (Figura 49 e 50).

O sinal referente ao citrato de sildenafil em ($T_R=70,14$) foi confirmado através da análise de um comprimido com o mesmo princípio ativo, pode-observar que além dos sinais do analito foram identificados outros sinais, referentes aos excipientes utilizados no preparo desse tipo de medicamento (Figura 48). Vale ressaltar que a técnica de RMN ^1H apresenta vantagens em relação as análises por GC-MS, tais como: menor consumo de reagentes e tempo de análise.

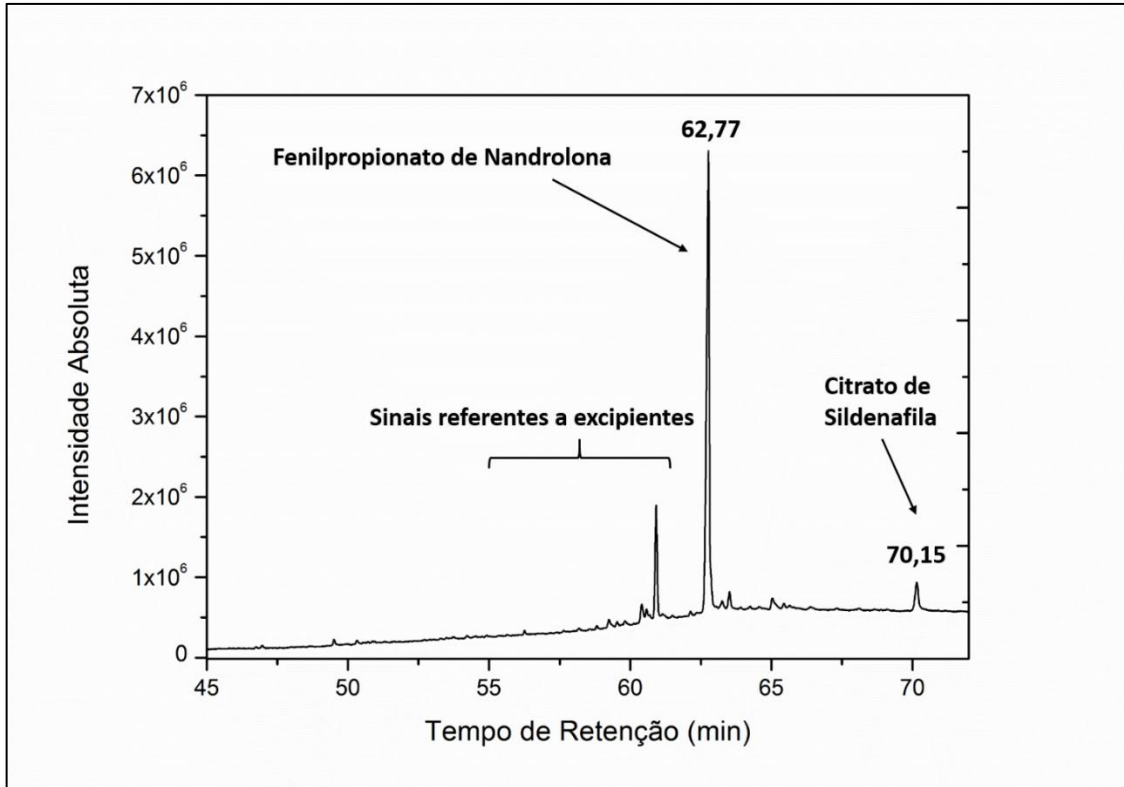


Figura 47 - Cromatograma obtido por CG-EM da amostra de ESZ-7.

Fonte: Elaborada pelo autor.

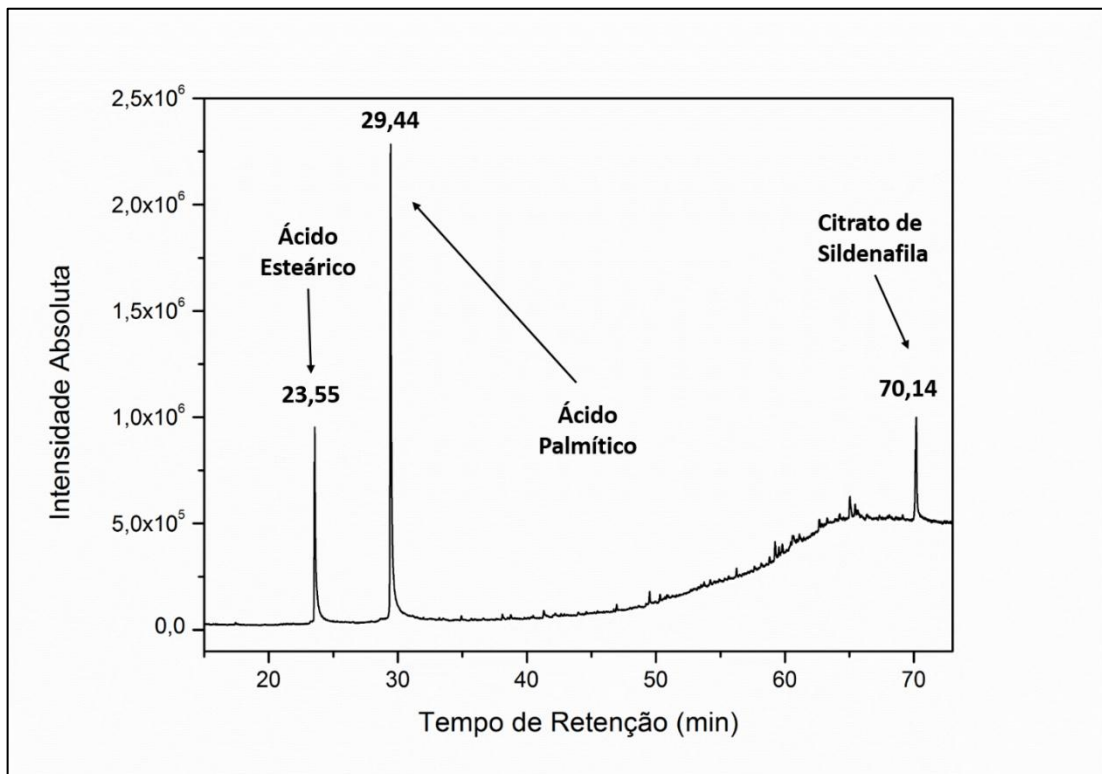


Figura 48 - Cromatograma obtido por CG-EM da amostra de Viagra®.

Fonte: Elaborada pelo autor.

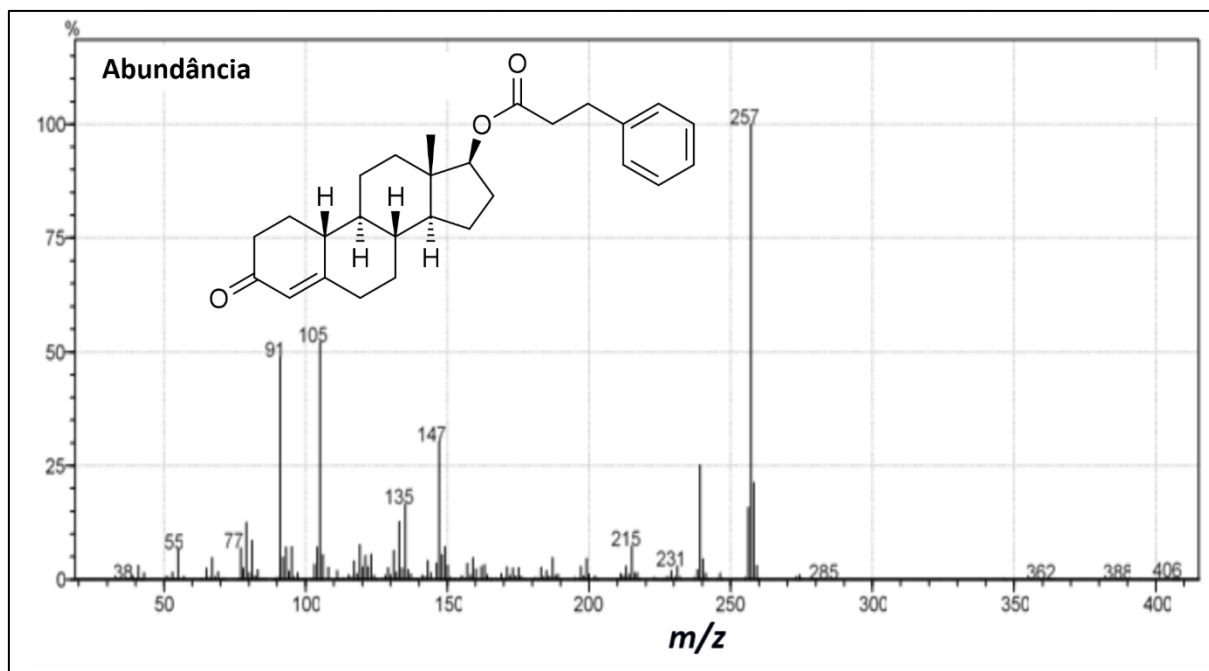


Figura 49 - Espectro de massa da amostra de ESZ-7 ($T_R=60,77$) referente ao fenilpropionato de nandrolona.

Fonte: Elaborada pelo autor.

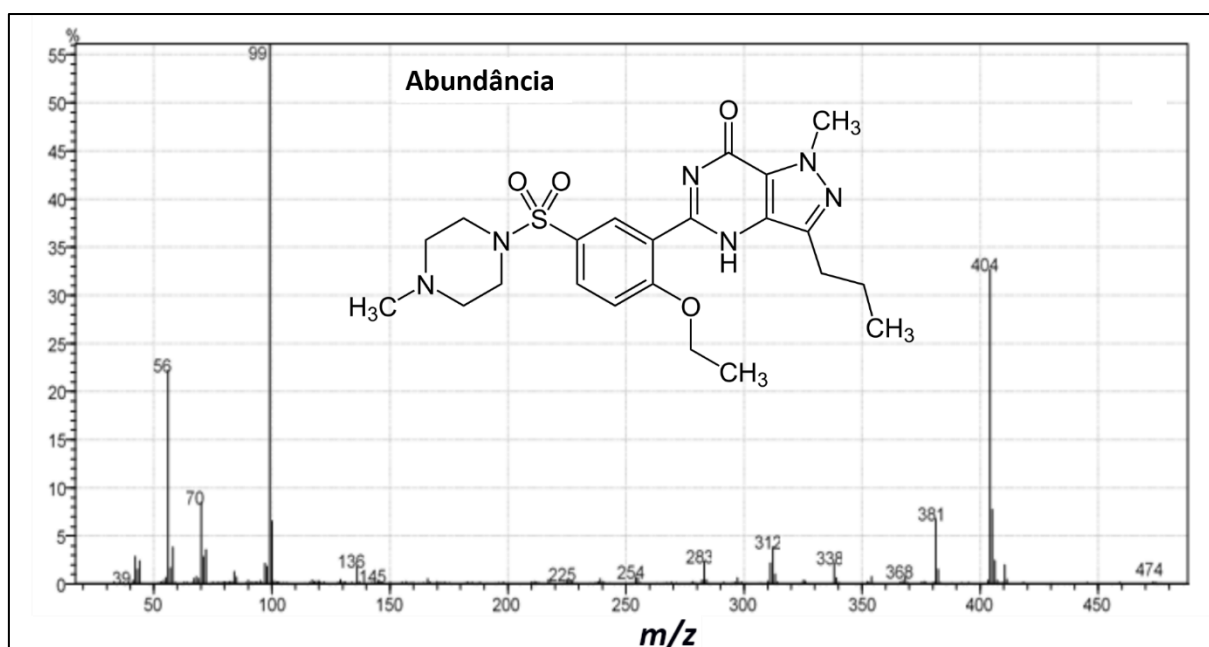


Figura 50 - Espectro de massa da amostra de ESZ -7 ($T_R=70,15$) referente ao citrato de sildenafil.

Fonte: Elaborada pelo autor.

4.3 Obtenção das figuras de mérito

Para as análises quantitativas, escolheu-se a dimetil sulfona (DMSO_2) como padrão interno de referência, por apresentar um único sinal com deslocamento químico em: δ 3,00 (s, 6H) de grande intensidade, responsável pelos hidrogênios das metilas, e que não se sobrepôs com os sinais dos analitos nas amostras analisadas. Para essas análises, manteve-se uma concentração fixa de 2 mg mL^{-1} de DMSO_2 em todas os ensaios. Os espectros podem ser observados na Figura 51.

Vale ressaltar que para a quantificação exata a partir de um espectro de RMN é necessário evitar saturação de ressonâncias causadas por um sinal demasiado rápido e isto requer o equilíbrio completo da magnetização entre cada transiente. Os tempos de recuperação são ditados pelas constantes de tempo de relaxamento longitudinal (T_1) dos núcleos RMN e intervalos de pelo menos $5T_1$ são necessários para reestabelecer uma recuperação praticamente completa ($> 99\%$), após excitação da amostra (46). Nestes experimentos, foi utilizado um tempo de relaxação de 25 s.

Há requisitos adicionais que devem ser obedecidos para uma otimização da análise quantitativa, alguns deles são: pureza do sinal de RMN considerado para a quantificação e o efeito da rotação sobre o aparecimento das *side bands* (principalmente ^{13}C), sendo preferível uma medição sem rotação do tubo de amostra. Um outro requisito adicional, porém, não obrigatório, é que o sinal selecionado para fins quantitativos deve ser tão simples quanto possível, assim, um singlete é preferível a um multiplete. Todos os requisitos para melhor obtenção dos dados foram levados em consideração nas análises.

É importante destacar que em amostras mais complexas com um maior número de ingredientes ativos e/ou adulterantes, a seleção de sinais marcadores (isolados) pode ser difícil. Isso deve-se ao fato de que alguns adulterantes nem sempre são conhecidos, podendo variar consideravelmente sua estrutura química, e em certos casos sobrepor-se com sinais marcadores da molécula de interesse. Neste trabalho, foi possível realizar ensaios quantitativos em todas as amostras que apresentaram resultados positivo para a presença do analito.

Para atestar a confiabilidade dos resultados obtidos, os métodos desenvolvidos foram validados de acordo com os parâmetros do ICH (60) e ANVISA (59), órgãos normativos e de fiscalização, que estabelecem os requisitos específicos para determinação quali e quantitativa nesse tipo de amostra (medicamentos).

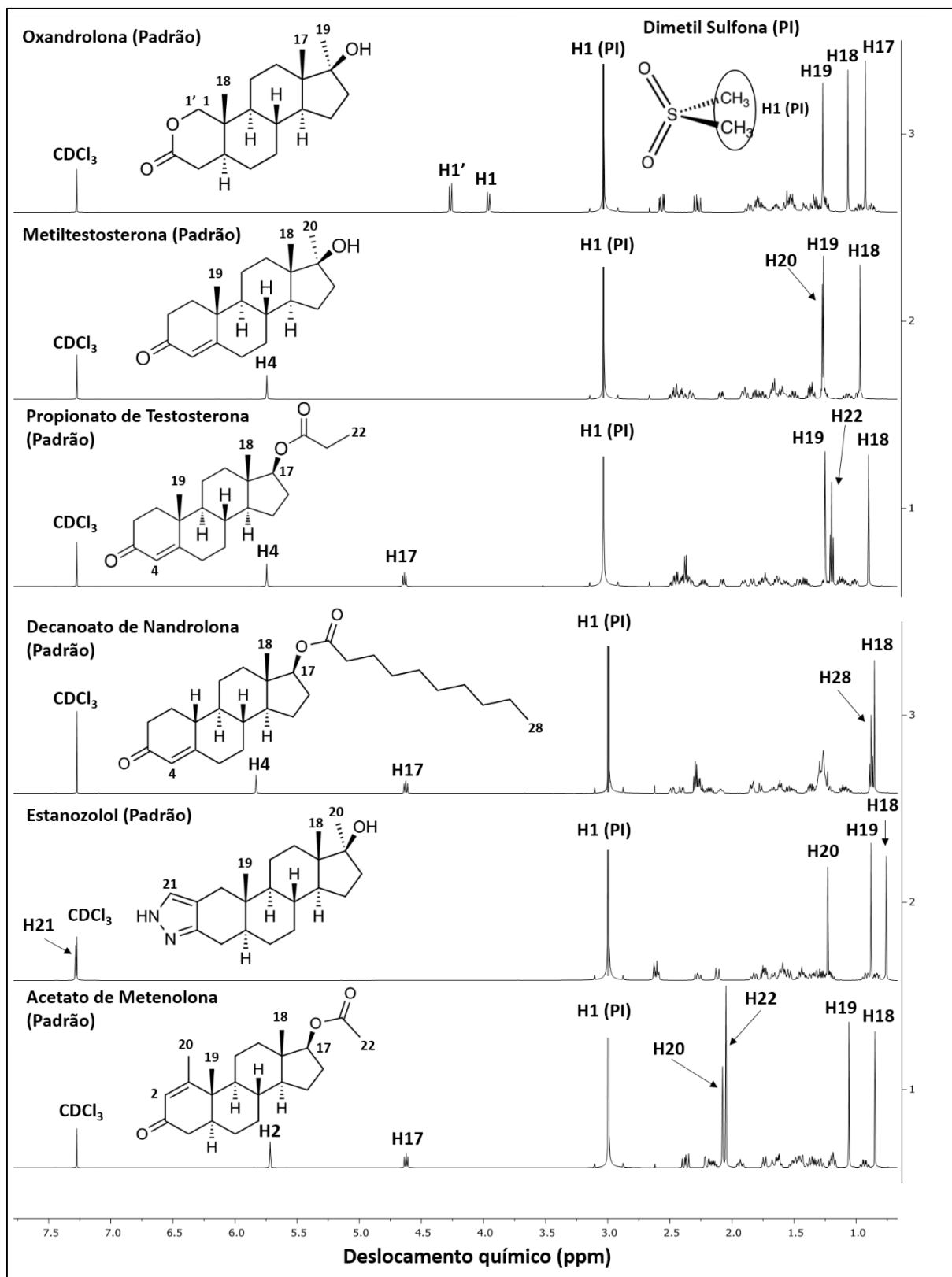


Figura 51 - Espectros de RMN ^1H , 600 MHz, das misturas de esteróides anabolizantes (padrões) e dimetil sulfona (padrão), CDCl_3 .

Fonte: Elaborada pelo autor.

4.3.1 Parâmetros analíticos de calibração para a quantificação dos analitos

Todas as curvas analíticas foram obtidas no intervalo de concentração de 1,0-16,0 mg mL⁻¹. Os resultados (Tabela 10) mostraram que os métodos propostos apresentaram boas inclinações, interceptações próximas a zero e coeficientes de correlação maiores do que os valores recomendados pela ANVISA e ICH ($r = 0,99$) (59,60). Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram determinados de acordo com as recomendações da IUPAC (65): $LD = 3 \times S/b$ e $LQ = 10 \times S/b$, onde S é o desvio padrão da curva analítica e b é coeficiente angular (inclinação) da curva analítica. Os valores de limite de detecção e quantificação variaram entre: 0,18-0,62 e 0,98-2,35 mg mL⁻¹, respectivamente (Tabela 10). Os valores encontrados para os limites de quantificação foram avaliados considerando as relações sinal-ruído (S/R) para todas as amostras analisadas. A menor relação S/R observada foi de 314, superando o intervalo considerado satisfatório de acordo com a literatura, o que, para uma incerteza de 1% o valor de S/R, deve ser maior que 150 (28,31,199). Os resultados confirmaram que os métodos desenvolvidos são adequados para fazer a determinação quantitativa dos analitos, nas amostras analisadas.

4.3.2 Estudos de Precisão Intra e Inter-dia

Foram realizados ensaios a fim de verificar a repetibilidade do método dentro de um mesmo dia (Intra-dia) e entre dias diferentes (Inter-dia). Para tal, foram realizados três experimentos repetindo alguns pontos da curva analítica, sendo dois desses experimentos realizados num mesmo dia em períodos diferentes e o terceiro, no dia subsequente a fim de se calcular o desvio padrão relativo (DPR). Onde o DPR intra-dia variou de 1,56 a 4,22% e o DPR inter-dia de 2,19 a 4,73% (Tabela 11). Esses resultados, juntamente com os coeficientes obtidos para as curvas analíticas, mostraram que a precisão das medidas foi satisfatória.

4.3.3 Adição de padrão e recuperação (Exatidão)

O estudo de recuperação consistiu na fortificação das amostras de medicamentos (esteroides anabolizantes), adicionando soluções padrão contendo o analito de interesse em proporções de 50, 100 e 150%, em relação à concentração do princípio ativo da amostra, seguido pela determinação da concentração de analito adicionada, expressa em porcentagem. As amostras contendo PRT, OXA e DEN foram fortificadas com concentrações de 2,5, 5,0 e 7,5 mg mL⁻¹, enquanto as que contêm ESZ foram fortificadas com concentrações de 2,0, 4,0 e 6,0 mg mL⁻¹, utilizando as soluções padrões dos analitos. Todas as análises foram realizadas

em triplicata (n=3). Os resultados (Tabela 12) mostraram que as recuperações variaram de 95,2% a 104,0%, que estavam dentro dos limites estipulados pela ANVISA e ICH (59,60).

Tabela 10 - Parâmetros analíticos de calibração para a quantificação dos analitos.

Analito	Sinal (ppm)	Curva Analítica	R	LD (mg/mL)	LQ (mg/mL)
PRT	5,73	$I_A = 0,0104 * C - 0,0070$	0,9998	0,18	1,19
	4,61	$I_A = 0,0102 * C - 0,0070$	0,9992	0,35	1,26
	1,14	$I_A = 0,0316 * C - 0,0236$	0,9974	0,66	2,17
	0,84	$I_A = 0,0310 * C - 0,0222$	0,9969	0,70	2,35
MET	5,73	$I_A = 0,0108 * C - 0,0026$	0,9995	0,36	1,22
	1,22	$I_A = 0,0323 * C - 0,0085$	0,9995	0,39	1,31
	1,21	$I_A = 0,0323 * C - 0,0086$	0,9995	0,42	1,41
	0,91	$I_A = 0,0323 * C - 0,0084$	0,9995	0,39	1,30
MEL	5,72	$I_A = 0,0084 * C + 0,0047$	0,9991	0,48	1,60
	4,62	$I_A = 0,0084 * C + 0,0047$	0,9991	0,47	1,58
	1,07	$I_A = 0,0251 * C + 0,0146$	0,9989	0,54	1,79
	0,87	$I_A = 0,0249 * C + 0,0146$	0,9994	0,41	1,38
OXA	4,25	$I_A = 0,0111 * C - 0,0052$	0,9942	0,53	1,74
	3,94	$I_A = 0,0110 * C - 0,0049$	0,9949	0,61	1,99
	1,02	$I_A = 0,0325 * C - 0,0149$	0,9941	0,62	2,11
	0,88	$I_A = 0,0336 * C - 0,0151$	0,9943	0,58	1,90
DEN	5,87	$I_A = 0,0073 * C + 0,0045$	0,9995	0,54	1,79
	4,67	$I_A = 0,0072 * C + 0,0045$	0,9996	0,51	1,69
	0,99	$I_A = 0,0263 * C + 0,0191$	0,9998	0,33	1,12
	0,86	$I_A = 0,0246 * C + 0,0121$	0,9999	0,29	0,98
ESZ	7,31	$I_A = 0,0112 * C + 0,0065$	0,9975	0,48	1,59
	1,25	$I_A = 0,0359 * C + 0,0063$	0,9985	0,37	1,24
	0,90	$I_A = 0,0370 * C + 0,0061$	0,9980	0,43	1,42
	0,78	$I_A = 0,0364 * C + 0,0048$	0,9967	0,55	1,84

*PRT - Propionato de testosterona; MET - Metiltestosterona; MEL - Acetato de Metenolona; OXA - Oxandrolona; DEN - Decanoato de nandrolona; ESZ - Estanazolol; I_A - Integral da área; R - Coeficiente de correlação; LD - Limite de detecção; LQ - Limite de quantificação.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela 11 - Análise de precisão intra-dia e inter-dia para os métodos proposto.

Analito	Sinal (ppm)	Concentração (mg mL⁻¹)	Intra-dia DPR (%)	Inter-dia DPR (%)
PRT	5,73	6,00	3,32	3,84
		12,00	2,85	3,11
	4,61	6,00	3,26	3,64
		12,00	2,19	2,77
	1,14	6,00	3,51	3,89
		12,00	2,66	2,93
	0,84	6,00	3,08	3,29
		12,00	2,11	2,75
MET	5,73	10,00	2,98	3,62
		12,00	1,64	2,83
	1,20	10,00	3,04	3,61
		12,00	2,34	2,99
	1,21	10,00	3,39	3,86
		12,00	2,83	3,54
	0,91	10,00	3,02	3,21
		12,00	1,56	2,42
MEL	5,74	6,00	3,08	3,44
		8,00	2,11	2,69
	4,64	6,00	2,90	3,21
		8,00	1,83	2,18
	1,07	6,00	3,12	3,66
		8,00	2,77	3,04
	0,87	6,00	2,99	3,55
		8,00	1,92	2,19
OXA	4,25	8,00	3,20	3,45
		12,00	3,11	3,87
	3,94	8,00	3,23	3,91
		12,00	2,99	3,27
	1,02	8,00	3,40	3,91
		12,00	3,12	3,48
	0,88	8,00	3,57	3,89
		12,00	2,94	3,03
DEN	5,87	6,00	3,07	3,66
		10,00	2,88	3,14
	4,67	6,00	3,12	3,83
		10,00	2,95	3,22
	0,99	6,00	3,77	4,06
		10,00	3,02	3,56
	0,86	6,00	3,65	3,99
		10,00	2,88	3,11
ESZ	7,31	6,00	4,22	4,85
		8,00	3,86	4,04
	1,25	6,00	4,03	4,66
		8,00	3,81	3,91
	0,90	6,00	4,11	4,73
		8,00	3,98	4,08
	0,78	6,00	3,93	4,16
		8,00	3,45	3,88

*PRT - Propionato de testosterona; MET - Metiltestosterona; MEL - Acetato de Metenolona; OXA - Oxandrolona; DEN - Decanoato de nandrolona; ESZ - Estanazolol.

Fonte: Elaborada pelo autor.

A quantidade percentual recuperada foi calculada, usando a seguinte fórmula:

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{\text{Concentração encontrada} - \text{Concentração real}}{\text{Concentração real}} \times 100$$

Tabela 12 - Resultados dos testes de exatidão para as amostras em três níveis de concentração (50, 100 e 150%).

Analito	Amostra	Sinal (ppm)	Nível (%)	Adicionado (mg mL ⁻¹)	Recuperado (mg mL ⁻¹)	Recuperação (%)
ESZ	ESZ-1 (comprimido)		50	2,0	6,1	101,7
		7,31	100	4,0	7,9	98,7
			150	6,0	10,2	102,0
			50	2,0	5,9	98,3
		0,78	100	4,0	8,1	101,3
			150	6,0	9,8	98,0
OXA	OXA-2 (comprimido)		50	2,5	7,6	101,3
		4,25	100	5,0	10,2	102,0
			150	7,5	12,6	100,8
			50	2,5	7,6	101,3
		3,94	100	5,0	10,4	104,0
			150	7,5	12,6	100,8
PRT	PRT-1 (injetável)		50	2,5	7,8	104,0
		5,73	100	5,0	10,3	103,0
			150	7,5	12,8	102,4
			50	2,5	7,7	102,7
		1,14	100	5,0	10,3	103,0
			150	7,5	12,4	99,2
DEN	DEN-1 (injetável)		50	2,5	7,2	96,0
		5,87	100	5,0	9,7	97,0
			150	7,5	11,9	95,2
			50	2,5	7,3	97,3
		4,67	100	5,0	9,8	98,0
			150	7,5	12,1	96,8

*PRT - Propionato de testosterona; OXA - Oxandrolona; DEN - Decanoato de nandrolona; ESZ - Estanozolol.

Fonte: Elaborada pelo autor.

4.3.4 Teste de Robustez

A robustez de um método analítico é a medida de sua capacidade em resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos. Indica sua confiança durante o uso normal, constatando a susceptibilidade do método à variações nas condições analíticas, estas deverão ser controladas e precauções devem ser incluídas no procedimento (59,60,200). Para verificar a robustez, avaliou-se as diferenças obtidas nos resultados, através da utilização de diferentes tubos de RMN (3 e 5 mm) nas análises, mudança no número de *scans* e processamento dos dados por diferentes analistas. O teste foi realizado nas amostras ESZ-2, PRT-1 e OXA-1. A análise estatística dos dados mostrou valores de desvio padrão relativo menores que 2% entre os resultados comparados (Tabela 13), concluindo que o método é robusto para pequenas variações operacionais.

Tabela 13 - Valores obtidos no estudo da robustez.

Amostra	Parâmetros	Modificação	DPR (%) n=3
ESZ-1	Tipo de tubo (RMN)	3 mm	1,22
		5 mm	
	Processamento dos dados	Analista 1 Analista 2	1,87
	Número de scans (NS)	64	1,64
		128	
PRT-1	Tipo de tubo (RMN)	3 mm	1,49
		5 mm	
	Processamento dos dados	Analista 1 Analista 2	1,03
	Número de scans (NS)	64	1,54
		128	
OXA-2	Tipo de tubo (RMN)	3 mm	1,09
		5 mm	
	Processamento dos dados	Analista 1 Analista 2	1,77
	Número de scans (NS)	64	1,25
		128	

Fonte: Elaborada pelo autor.

4.4 Determinação Quantitativa

Foram avaliadas a determinação quantitativa, utilizando diferentes métodos:

- Método 1 - Determinação direta (absoluta) via padrão interno;
- Método 2 - Determinação a partir da preparação de curvas analíticas dos padrões de referências;
- Método 3 - Determinação por CLAE, usando métodos comparativos da literatura;
- Método 4 - Determinação por ERECTIC 2 via padrão externo.

4.4.1 Comparação entre o método de determinação direto (Método 1) e por curva analítica (Método 2)

Comparando os valores encontrados na determinação quantitativa dos analitos pelo método tradicional (usando curvas analíticas) com o método de determinação direta (sem a utilização de padrões do analito), os resultados obtidos foram estatisticamente concordantes, já que os valores de test t , com nível de confiança de 95%, não excederam o valor crítico ($t=4,303$) mostrando que não existe diferença significativa entre as duas metodologias em termos de precisão e exatidão (Tabela 14). É importante ressaltar que a determinação pelo método direto (Método 1) teve a vantagem de não exigir o uso de padrões analíticos para os esteróides anabolizantes, que na maioria dos casos são caros e de difícil acesso, por se tratarem de substâncias proibidas.

4.4.2 Comparação entre métodos de determinação direta (Método 1) e os métodos por CLAE (Método 3)

Para a realização dos métodos comparativos, utilizaram-se métodos CLAE, os quais exigiram etapas laboriosas de preparação da amostra. Outra desvantagem, dos métodos por CLAE, foi a necessidade de condições cromatográficas distintas, para a determinação dos diferentes analitos. Já as determinações por RMN, além de terem sido mais práticas e rápidas, exigiram uma menor quantidade de solvente, permitindo ainda a quantificação de todos os analitos usando as mesmas condições. As análises por RMN, forneceram simultaneamente informações qualitativas que puderam ser usadas nos testes para identificação dos princípios ativos e os excipientes, o que eliminou várias etapas analíticas.

Em alguns casos, a presença de outras substâncias (adulterantes e excipientes) pode atrapalhar a análise de RMN devido à sobreposição de sinais com o analito de interesse. Essas dificuldades podem ser minimizadas ou mesmo resolvidas, variando o tipo de solvente ou usando uma mistura de diferentes solventes e alterando o pH da solução. Dependendo da molécula a ser analisada, o seu espectro de RMN pode fornecer diferentes sinais, com deslocamentos químicos em diferentes regiões, conseqüentemente o analista pode escolher o sinal que apresente melhores condições de integração, buscando uma melhor seletividade.

Tabela 14 - Comparação do Método 1 (determinação direta), Método 2 (curva analítica) e Método 3 (métodos comparativos por CLAE).

Amostra	Analito	Rotulado	Sinal (ppm)	Método 1 ^d (direto)	Método 2 ^d (curva analítica)	Teste ^e <i>t</i>	Método 3 ^d (comparativo)	Teste ^e <i>t</i>
ESZ-1	ESZ	5,0 ^a	7,31	5,27(±0,10)	5,37 (±0,15)	3,04	5,44 (±0,18)	3,40
			0,78	5,39 (±0,23)	5,52 (±0,20)	3,43		2,30
ESZ-2	ESZ	10,0 ^b	7,31	11,02 (±0,20)	11,20 (±0,22)	1,82	11,07 (±0,12)	1,12
			0,78	11,31 (±0,17)	11,42 (±0,09)	1,97		3,29
OXA-1	OXA	5,0 ^b	4,25	6,03 (±0,11)	6,16 (±0,16)	4,25	5,97 (±0,16)	2,05
			3,94	6,08 (±0,06)	6,13 (±0,05)	2,46		1,68
OXA-2	OXA	5,0 ^c	4,25	4,62 (±0,09)	4,54 (±0,07)	3,17	4,77 (±0,08)	2,14
			3,94	4,85 (±0,07)	4,79 (±0,08)	1,05		2,70
PRT-1	PRT	10,0 ^a	5,73	6,32 (±0,03)	6,46 (±0,06)	3,61	6,44 (±0,15)	3,40
			1,14	6,31 (±0,12)	6,40 (±0,18)	1,71		2,30
DURA-1	PRT	3,0 ^a	1,14	2,24 (±0,13)	2,45 (±0,08)	3,42	2,33 (±0,17)	2,88
DEN-1	DEN	20,0 ^a	5,87	18,24 (±0,19)	18,59 (±0,16)	1,78	18,39 (±0,13)	3,56
			4,67	18,38 (±0,24)	18,84 (±0,45)	2,79		1,45

^a g em 100 mL; ^b mg em 150 mg; ^c mg em 250 mg; ^d média ± desvio padrão (DP), n=3; ^e valores de *t* a um nível de confiança 95% (*t* crítico = 4,303).

Fonte: Elaborada pelo autor.

Assim como na comparação do item (3.4.1), os valores de teste t (Tabela 14), mostraram que os resultados obtidos para ambos os métodos são estaticamente iguais, validando assim os valores obtidos pelo método proposto. Para melhor clareza dos resultados, os cromatogramas e as curvas analíticas, obtidos pelos métodos 2 e 3, podem ser observados nas Figuras (52, 53 e 54).

É importante ressaltar que independentemente do custo atrelado à manutenção do equipamento, a utilização de espectroscopia de RMN para identificar um grande número de amostra de fármacos pode ser comercialmente mais viável que a identificação por CLAE, devido ao baixo custo na obtenção de um único espectro de hidrogênio, considerando os gastos com consumíveis e o curto tempo de aquisição requerido para registrar um espectro. Também vale a pena destacar que a RMN é uma técnica não destrutiva.

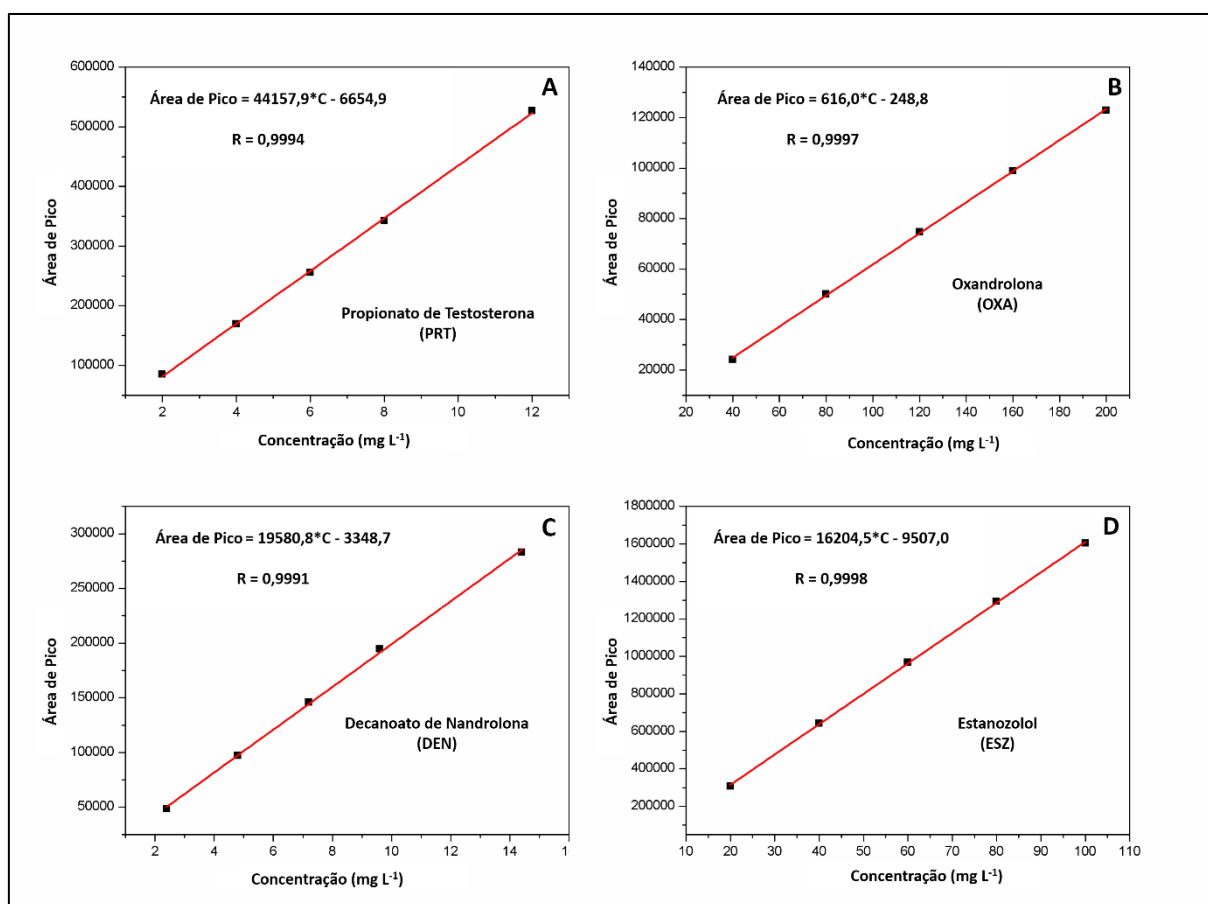


Figura 52 - Curvas analíticas para a determinação por CLAE: A) propionato de testosterona, B) oxandrolona, C) decanoato de nandrolona, D) estanozolol. Número de repetições para cada ponto da curva ($n = 3$).

Fonte: Elaborada pelo autor.

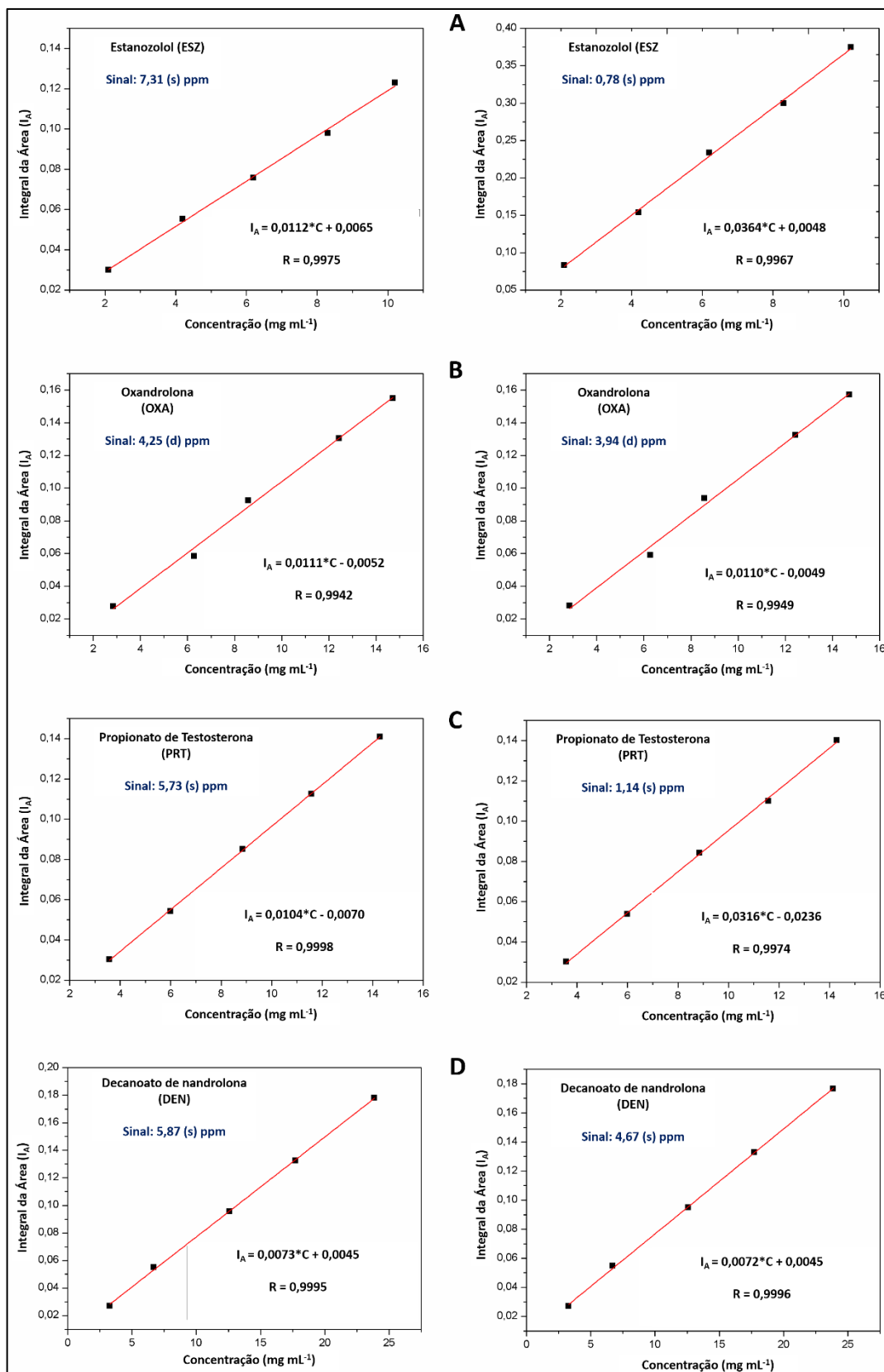


Figura 53 - Curvas analíticas para as determinações em RMN: A) estanozolol, B) oxandrolona, C) propionato de testosterona, D) decanoato de nandrolona. Número de repetições para cada ponto da curva ($n = 3$)

Fonte: Elaborada pelo autor

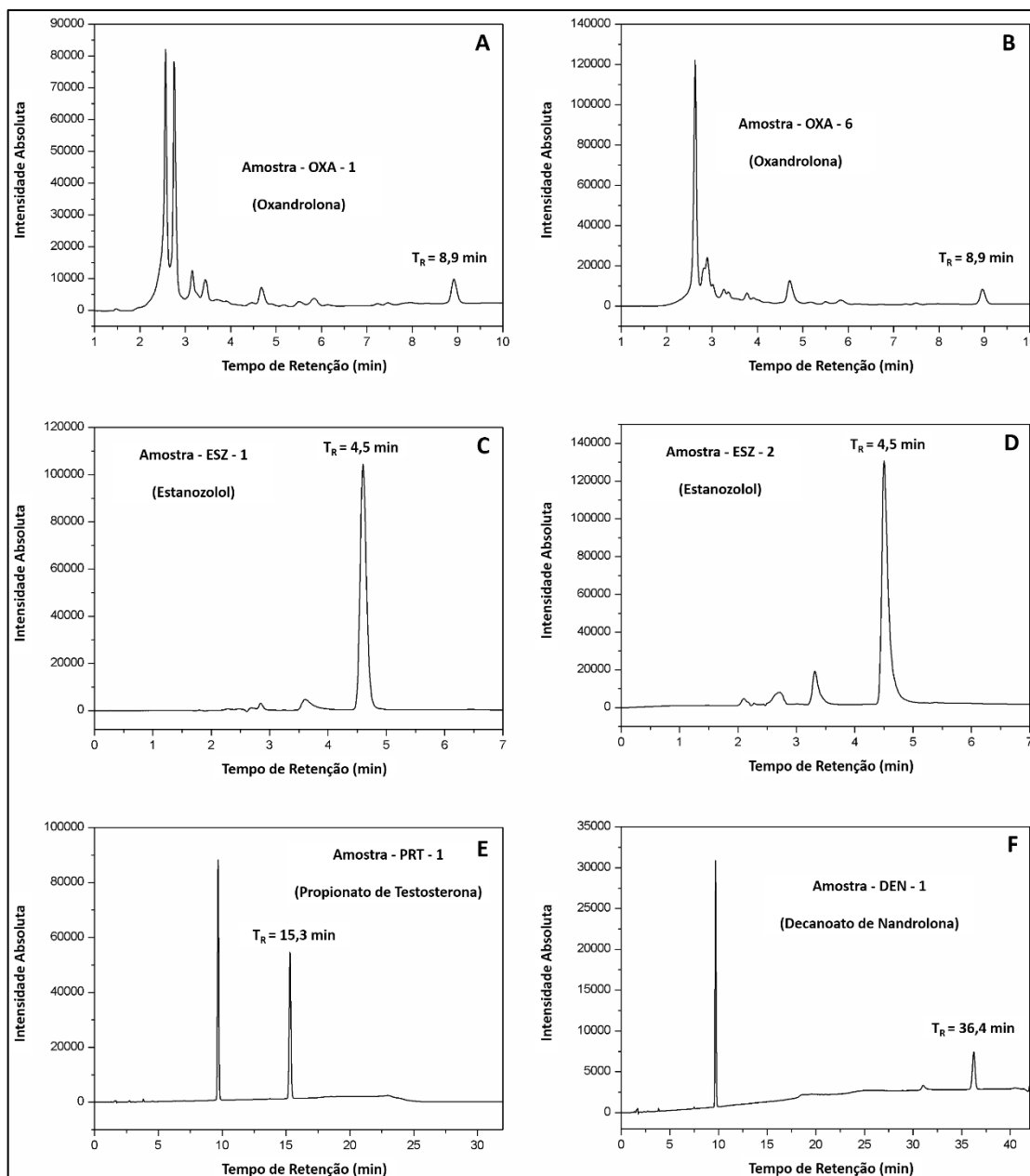


Figura 54 - Cromatogramas das amostras por CLAE: A) OXA-1, B) OXA-6, C) ESZ-1, D) ESZ-2, E) PRT-1, F) DEN-1.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Através dos resultados obtidos por CLAE, pode-se ainda confirmar os resultados obtidos por RMN nas análises das amostras DURA-1 e DURA-2. É possível notar claramente a ausência do propionato de testosterona na amostra de DURA-2, já que na amostra de DURA-1 o pico referente ao analito aparece no tempo de retenção de 15,3 min, que pode ser observado na Figura 55.

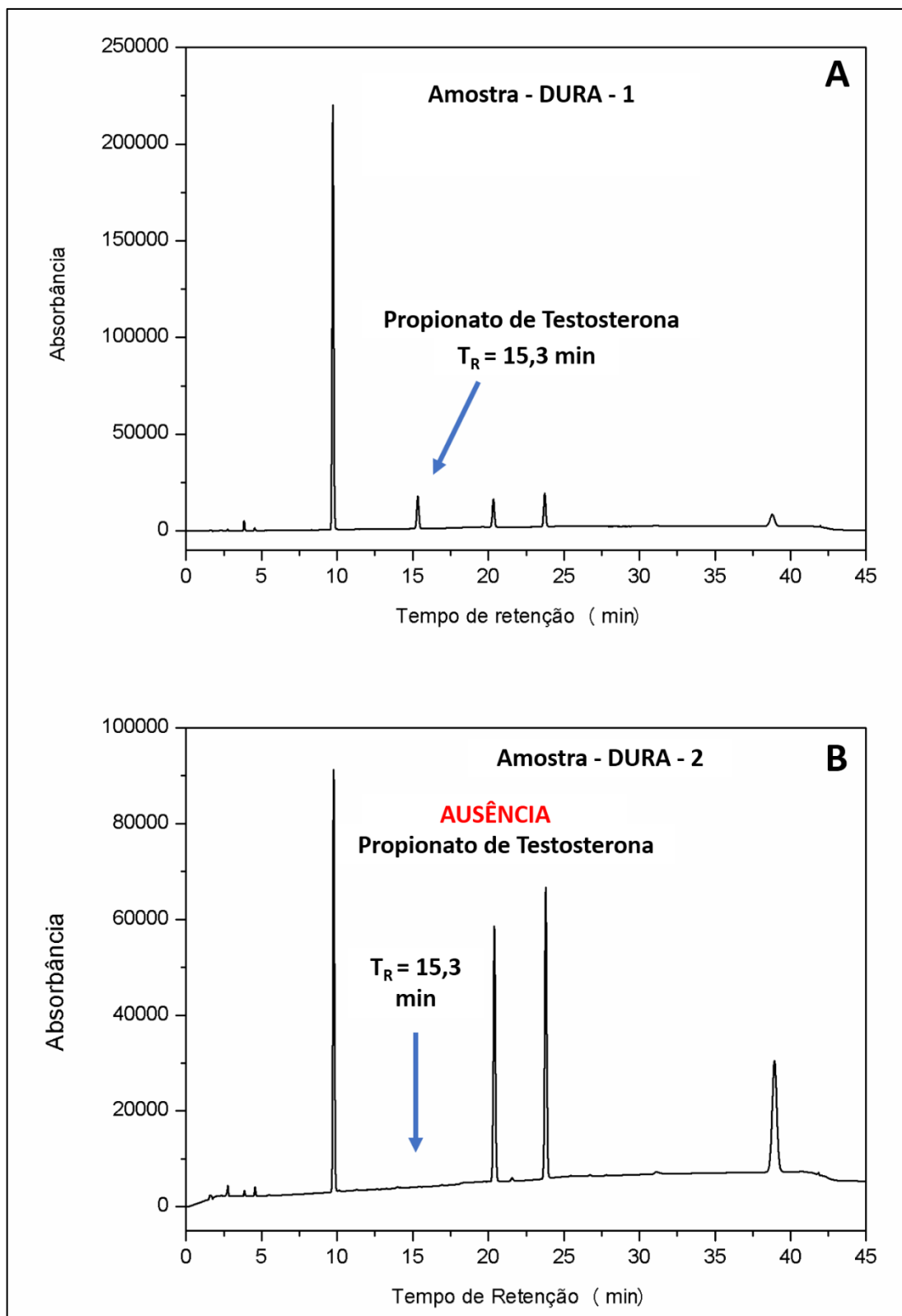


Figura 55 - Cromatogramas das amostras por CLAE: A) DURA-1 e B) DURA-2

Fonte: Elaborada pelo autor.

4.4.3 Comparação entre métodos de determinação direta (Método 1) e via ERETIC 2 (Método 4)

Para a análise quantitativa das amostras em que não foi possível fazer a determinação pelos métodos 2 e 3, devido a falta de padrão dos analitos, utilizou-se a técnica de RMNq via ERETIC 2 e comparou os resultados obtidos com o método 1 (via padrão interno). Para esses testes, foram analisadas as amostras de: Cipionato de Testosterona, Undecanoato de testosterona, Propionato de drostonolona, Acetato de trembolona, Oximetolona, Metandrostenolona.

O principal requisito para a determinação quantitativa pelo método padrão interno é usar um padrão que apresenta um sinal de deslocamento químico em RMN ^1H que não se sobrepõe aos sinais da amostra a ser analisada e que seja de fácil de integração, evitando erros na determinação. Já a determinação por ERETIC 2 é realizada, a partir de um sinal de padrão externo (com a concentração exatamente conhecida), que foi obtido nas mesmas condições das amostras analisadas. Os valores de concentração, foram calculados automaticamente, utilizando o *software* Top Spin v 3.2.7

A Tabela 15 mostra os resultados obtidos pelo método via padrão interno e os métodos via ERETIC 2. Os valores do teste t (a um nível de confiança de 95%) ficaram menores que o ($t_{\text{crítico}} = 4,303$), mostrando que os resultados encontrados para os dois métodos não foram estatisticamente diferentes, validando os valores obtidos. Observou-se que na maior parte dos medicamentos analisados, os valores de concentração foram bem menores do que o indicado no rótulo, evidenciando ainda mais a natureza duvidosa desse tipo de medicação

Deve-se ressaltar que o uso de um padrão interno, é uma desvantagem em relação ao método ERETIC 2, pois, para algumas matrizes, é muito difícil encontrar regiões em que não contenham sinais em RMN ^1H dos componentes da amostra. Na determinação utilizando ERETIC 2, nenhum padrão é adicionado as amostras, evitando ainda possíveis reações entre o padrão e alguns compostos da matriz.

Tabela 15 - Comparação entre métodos de determinação direta (Método 1) e pelo método via ERETIC 2 (Método 4).

Analito	Amostras	Rotulado	Sinal (ppm)	Método 1 ^c (Padrão Interno) n=3	Método 4 ^c (ERETIC 2) n=3	Test ^d <i>t</i>
CIT	CIT-1 (Injetável)	250 ^a	5,74	204,73 (±0,09)	202,15 (±0,02)	2,45
			4,63	203,96 (±0,07)	203,08 (±0,03)	1,10
CIT	CIT-2 (Injetável)	250 ^a	5,73	204,55 (±0,11)	202,99 (±0,02)	3,05
			4,61	204,01 (±0,09)	203,82 (±0,04)	2,13
TRA	TRA-1 (Injetável)	75 ^a	6,37	74,25 (±0,18)	74,04 (±0,03)	2,02
			5,78	73,88 (±0,12)	74,36 (±0,08)	1,88
TRA	TRA-2 (Injetável)	75 ^a	6,37	74,17 (±0,15)	74,81 (±0,07)	2,30
			5,78	73,64 (±0,13)	74,90 (±0,09)	1,97
PDR	PDR-1 (Injetável)	100 ^a	4,61	81,45 (±0,08)	83,05 (±0,04)	2,70
			0,81	82,10 (±0,11)	83,11 (±0,07)	1,64
PDR	PDR-2 (Injetável)	100 ^a	4,61	81,09 (±0,14)	82,01 (±0,02)	3,16
			0,81	81,72 (±0,16)	82,46 (±0,05)	2,92
UNT	UNT-1 (Cápsula)	50,0 ^b	5,73	44,21 (±0,08)	45,18 (±0,09)	3,22
			0,84	44,79 (±0,06)	46,01 (±0,04)	2,28
UNT	UNT-2 (Cápsula)	50,0 ^b	5,73	45,03 (±0,06)	45,64 (±0,06)	2,72
			0,84	44,88 (±0,09)	45,12 (±0,03)	1,79
OXI	OXI-1 (Cápsula)	50,0 ^b	8,64	29,01 (±0,15)	30,25 (±0,05)	2,59
			0,87	28,75 (±0,13)	29,72 (±0,04)	3,16
OXI	OXI-2 (Cápsula)	50,0 ^b	8,64	29,29 (±0,10)	30,41 (±0,08)	2,89
			0,87	28,66 (±0,07)	29,02 (±0,04)	2,11
MDT	MDT-1 (Cápsula)	10,0 ^b	6,08	9,33 (±0,07)	9,75 (±0,01)	1,39
			0,94	9,52 (±0,10)	9,81 (±0,02)	2,17
MDT	MDT-2 (Cápsula)	10,0 ^b	6,08	9,41 (±0,09)	9,70 (±0,03)	2,02
			0,94	9,67 (±0,11)	9,87 (±0,02)	1,99

^a g em 100 mL; ^b mg em 150 mg; ^c mg em 250 mg; média ± desvio padrão (DP), n=3; ^d valores de *t* a um nível de confiança 95% (*t* crítico = 4,303).

Fonte: Elaborada pelo autor.

5. Conclusões

A falsificação de medicamentos é uma ameaça que cresce a cada dia em todo mundo. Este mercado ilegal é muito lucrativo, contudo, ao contrário dos outros tipos de falsificações, esse tipo de adulteração pode causar risco à saúde da população. O uso irracional de esteroides anabolizantes pode ocasionar diversos efeitos colaterais e acarretar danos ao organismo, muitas vezes irreparáveis; logo, é fundamental uma atenção especial para a conscientização sobre riscos dessas drogas, mostrando a qualidade desse tipo de medicamento.

O presente estudo demonstrou a viabilidade da aplicação da técnica de RMN ^1H para análises qualitativa e quantitativas de esteroides anabolizantes em formulações farmacêuticas. Das 52 amostras analisadas, 80% apresentou algum tipo de adulteração (incluindo a presença ou ausência de substâncias não declaradas no rótulo e percentual de ingrediente ativo abaixo do informado na embalagem). Esses resultados confirmam a importância do desenvolvimento de novas metodologias analíticas para esse tipo de aplicação. Nesse contexto, concluiu-se que uma única medida de RMN ^1H pode fornecer informações estruturais significativas sobre ativos, adulterantes e excipientes, além das informações quantitativas desses compostos, o que contribui para um controle de qualidade eficiente, simples e rápido.

Capítulo III

Determinação quantitativa de cafeína e taurina em bebidas energéticas

1. Introdução

1.1 Bebidas Energéticas

Bebidas energéticas ou *energy drinks* são denominações dadas pela ANVISA para compostos líquidos pronto para o consumo, os quais podem conter como ingrediente(s) principal(is): inositol e/ou glucoronolactona, e/ou taurina, e/ou cafeína, podendo ser adicionados vitaminas e/ou minerais até 100% da Ingestão Diária Recomendada (IDR) na porção do produto. Podem ser adicionado(s) de outro(s) ingrediente(s), desde que não haja descaracterização do produto (201,202).

As bebidas energéticas, foram lançadas no mercado em 1987 e desde então, seu crescimento em todo mundo tem sido enorme (201). No Brasil tanto a produção como o consumo dessas bebidas têm crescido de forma acelerada, registrando um aumento de 325% nos últimos cinco anos. O aumento do poder de compra da população e a disposição da nova classe média brasileira de incluir a bebida em sua cesta de compras são os dois motivos que ajudam a explicar o crescimento (203). Outro motivo que levou ao aumento do consumo e da produção desse segmento foi a inclusão de versões maiores do produto em garrafas PET (Polietileno Tereftalato). O lançamento desse tipo de embalagem contribuiu para a chegada de um perfil de consumidor que até então não estava habituado à bebida. Essa inovação resultou na redução do preço final no varejo e trouxe novos consumidores para essa categoria que anteriormente eram desencorajados pelos preços elevados dos produtos vendidos em lata de alumínio (203). Além disso, sabe-se que nos últimos anos o número de marcas de bebidas energéticas tem aumentado, especialmente devido ao apelo comercial e de marketing de ser uma bebida responsável pelo fornecimento de energia para atividades diversas ou até mesmo podendo ser utilizada como um suplemento alimentar (204).

As bebidas energéticas são comercializadas e promovidas pelo efeito de aumentar a capacidade de desempenho, proporcionar reações mais rápidas e maior concentração, aumentar o estado de alerta mental e promover uma sensação de bem-estar, são esses fatores que influenciam o seu uso. A expectativa desses efeitos, no entanto não é compensada com o conhecimento adequado dos potenciais riscos de saúde associados. Essas bebidas são conhecidas pelas suas propriedades estimulantes, podendo aumentar a frequência cardíaca e a pressão arterial, desidratar o corpo, agravar efeitos de outros estimulantes e prejudicar o sono (205).

A composição das bebidas energéticas varia com as marcas existentes, mas geralmente são constituídas por cafeína, taurina, vitaminas B, derivados de açúcar, como glucoronolactona, algumas plantas, incluindo guaraná (201). Atualmente, o grande diferencial em um energético é a presença de dois tipos de carboidratos: a sacarose e a dextrose. A dextrose é um carboidrato simples de rápida absorção intestinal, responsável em prover a energia inicial que o organismo precisará para praticar uma atividade física, por exemplo. A sacarose não é um carboidrato simples, pois é constituída por dois tipos diferentes de carboidrato, a glicose e a frutose. Nesse último caso, a digestão não é tão rápida quanto a primeira, resultando em dois tempos absorptivos, um imediato e outro em um tempo posterior. A presença desses dois tempos faz com que a utilização do carboidrato não ocorra de uma vez e sim de forma gradual, o que resulta na utilização do carboidrato por um tempo maior (206).

Os limites máximos para alguns componentes presentes nas bebidas energéticas são estabelecidos pela Resolução de Diretoria Colegiada RDC Nº 273, de 22 de setembro de 2005 (ANVISA). São eles: inositol (máximo 20 mg/100 mL), glucoronolactona (máximo 250 mg/100 mL), taurina (máximo 400 mg/100 mL), cafeína (máximo 35 mg/100 mL) e álcool etílico (máximo 0,5 mL/100 mL) (202).

Hoje em dia, os jovens têm livre acesso a estas bebidas nos locais onde se reúnem para dançar, clubes, bares, academias e centros esportivos, e estas são vendidas separadamente ou junto com bebidas alcoólicas. No Brasil, 76% dos usuários de energéticos o consomem com bebidas de alto teor alcoólico, tais como uísque e vodca. Esta associação é bastante popular e pode ser perigosa, pois mostra a capacidade de reduzir os sintomas adversos da alcoolemia, incluindo seus efeitos depressores. Tais fatores podem levar o sujeito que consome a não perceber sinais de intoxicação alcoólica, aumentar riscos de acidentes, assim como ao abuso e dependência do álcool. Dessa forma, é importante que a população esteja atenta aos riscos do consumo indiscriminado de energéticos, sobretudo quando associados ao álcool (207,208).

O uso de bebidas energéticas antes da prática de atividades físicas deve ser moderado, eles são geralmente usados para repor carboidratos, minerais e eletrólitos perdidos através do suor durante uma atividade física, e seu uso excessivo pode levar ao aumento de peso. Segundo os pesquisadores, esse tipo de bebida só deve ser consumido por adultos após a prática de exercícios intensos, já que contém uma quantidade elevada de açúcares. Ingeridas em grandes doses, essas bebidas podem ainda afetar o coração e provocar distúrbios no sono, doenças gastrointestinais, ansiedade e depressão (201,208).

Os perigos associados ao consumo de bebidas energéticas encontram-se relacionados a alta ingestão dos ingredientes que compõem essa bebida, os mais comuns são a cafeína, a taurina e a glucoronolactona. A determinação de cafeína e taurina é de extrema importância para avaliar se as bebidas energéticas apresentam os teores declarados nos rótulos sem que ocorram superdosagens ao consumidor, ou, até mesmo, que o teor esteja abaixo do declarado no rótulo, indicando fraude. Além disso, a análise é de extrema importância para avaliar se as bebidas apresentam teor de acordo com os limites legais permitidos pela legislação brasileira (204,209).

1.2 Cafeína

A cafeína (1,3,7-trimetil-3,7-dihidro-1H-purina-2,6-diona) é alcaloide purínico da classe das metilxantinas, encontrado em muitos produtos naturais como grãos de café, folhas de chá, nozes de cola e grãos de cacau. Seu consumo pela população é em grande parte na forma de bebidas, a outra parte é consumida na forma de fármacos (ex: analgésicos) (201). Quimicamente, as metilxantinas apresentam características interessantes, pois são compostos provenientes de bases purínicas e que são de carácter anfótero, possuindo em sua estrutura molecular a presença de nitrogênio heterocíclico (210) (Figura 56).

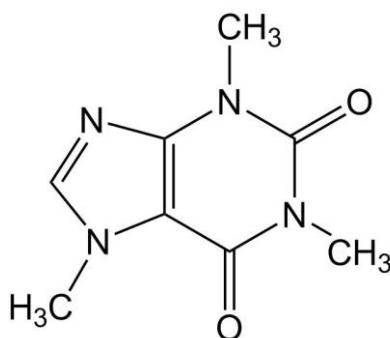


Figura 56 - Estrutura da molécula de cafeína.

Fonte: Elaborada pelo autor.

As xantinas, são os estimulantes mais antigos conhecidos, sendo chamadas também de trimetilxantina. Ela atua como um estimulante da parte central do sistema nervoso, diminuindo a sensação de fadiga e deixando a pessoa mais concentrada e alerta. É por isso que muitos estudantes e profissionais que precisam ficar mais tempo acordados tomam várias doses de café (211).

A cafeína é a substância psicoativa mais amplamente ingerida no mundo e exerce efeitos inotrópicos no sistema cardiovascular, prolongando e intensificando o estado ativo das fibras musculares, aumentando sua força e frequência de contração, resultando no aumento do rendimento cardíaco. A contração muscular é fortalecida pela ação da cafeína e outras xantinas, pois aumenta a capacidade de trabalho, relacionada com o estímulo celular, principalmente pelo aumento da glicogenólise e lipólise (206). Quando consumida através das bebidas energéticas é um recurso ergogênico utilizado a fim de potencializar o desempenho de resistência. Estudos recentes têm apontado a cafeína como um poderoso agente modulador do desempenho físico em atividades físicas de diferentes naturezas (212).

O uso cada vez maior da cafeína em produtos alimentícios, especialmente em bebidas energéticas, tem se tornado um dos motivos dos estudos quanto aos seus riscos e benefícios a saúde. Sabe-se que o consumo regular de cafeína pode levar a dependência, contribuindo com o aparecimento de doenças cardíacas (213), podendo levar inclusive ao aumento da pressão arterial. Por outro lado, existem estudos que mostram que o consumo habitual de cafeína resulta em efeitos positivos a saúde, promovendo a queda nos riscos de desenvolvimento de depressão e da doença de Parkinson, efeitos positivos comportamentais, incluindo melhoria no desempenho cognitivo e no humor (204,214).

A cafeína, em comparação com a taurina, está presente em menores quantidades no produto final, sendo que o limite máximo de adição desse componente estabelecido pela ANVISA é de 35 mg/100 mL (202).

1.3 Taurina

A taurina ou ácido 2-aminoetanossulfônico é um aminoácido derivado dos aminoácidos sulfurados (metionina e cisteína), obtido através de reações de oxidação e transulfuração, reguladas por enzimas (215). Difere dos demais aminoácidos por apresentar um grupamento sulfônico (-SO₃) ao invés do grupamento carboxílico (COOH) (Figura 57).

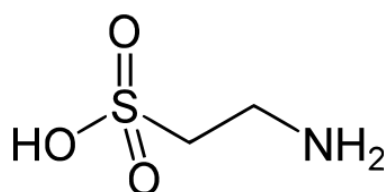


Figura 57 - Estrutura da molécula de taurina.

Fonte: Elaborada pelo autor.

A taurina é o principal aminoácido intracelular livre da maior parte dos tecidos dos mamíferos. Em seres humanos, é biossintetizada e ingerida como parte da dieta normal. Estudos demonstraram que as maiores concentrações intracelulares de taurina são encontradas no coração, leucócitos, músculo esquelético, retina e sistema nervoso central, sendo o fígado o local de maior variação nas concentrações de taurina, onde estas são dependentes da dieta ingerida (206). Além das bebidas energéticas, a taurina também pode ser encontrada em alimentos ricos em proteínas, como peixes, frutos do mar, aves e carne e alguns alimentos de origem vegetal, como beterraba, nozes e feijão (216).

Uma das principais funções da taurina é agir como transmissor metabólico e fortalecer as contrações cardíacas. Porém, ela é bastante utilizada como suplemento energético devido ao seu efeito desintoxicante, facilitando a excreção pelo fígado das substâncias que já não são mais úteis para o organismo. Além disso, a taurina também intensifica os efeitos da insulina, tornando-se responsável por um melhor funcionamento do metabolismo da glicose e dos aminoácidos, auxiliando no anabolismo. A taurina ainda é útil como inibidora dos neurotransmissores, sendo utilizada para prevenir e sedar estados cerebrais excitáveis (como convulsões em epiléticos) (216,217). A ingestão média diária de taurina entre consumidores de bebidas energéticas é de aproximadamente 0,4 g aumentando para cerca de 1,0 g entre altos consumidores. Quando a taurina é combinada com a cafeína, ocorre o aumento do trabalho cardíaco, intensificando a sensação de energia, consequentemente a combinação do consumo excessivo destes dois compostos aliados à extrema atividade física, pode causar problemas no coração, já que a taurina potencializa os efeitos da cafeína relativos à contração do músculo cardíaco (218). A concentração de taurina contida nas bebidas energéticas é mais alta que a quantidade encontrada em outros produtos. No Brasil, a legislação estabelece um limite máximo de 400 mg/100 mL de taurina como ingrediente em bebidas energéticas (201).

1.4 Métodos de determinação de taurina e cafeínas em bebidas energéticas

Nos últimos anos foram publicados diversos trabalhos para a determinação de cafeína e taurina em bebidas energéticas, utilizando várias técnicas (Tabela 16). No entanto, poucos trabalhos fazem a determinação simultânea desses analitos. Normalmente os compostos são determinados de forma isolada, ou utilizando condições operacionais ou reacionais distintas para ambas as determinações. Por RMN ^1H os analitos podem ser determinados simultaneamente, utilizando uma única medida, além de fornecer informações estruturais dos diversos compostos que compõe as amostras (219).

Tabela 16 - Métodos da literatura para determinação de cafeína e taurina em bebidas energéticas.

Técnica	Faixa linear (Taurina)	Faixa linear (Cafeína)	Comentários	Referência
Espectrofotometria (UV-Vis)	4-100 mg L ⁻¹	Não é analisado	Determinação ocorreu via reação com ninidrina e etanol (70% v/v)	Draganov et al., 2014 (220)
HPLC-DAD, Espectrofotométrico	Não é analisado	1-50 mg L ⁻¹	As amostras foram dissolvidas em uma solução tampão de fosfato/metanol (60:40)	Leacock et al., 2011 (221)
SP-FT-Raman	Não é analisado	18-200 mg L ⁻¹	Os espectros Raman foram obtidos entre: 3500 e 70 cm ⁻¹	Armenta et al., 2005 (222)
HPLC-DAD, Espectrofotométrico	1-50 mg L ⁻¹	Não é analisado	Utilizou reação derivatização como o 2,4-dinitrofluorobenzene (DNFB)	McConn, 2012 (223)
HPTLC/ESI-MS	2,29 - 4.58 µg mL ⁻¹	4,10 - 8,19 µg mL ⁻¹	A fase móvel era composta de uma mistura de clorofórmio, etanol, ácido acético, acetona e água 54:27:10:2:2 (v/v)	Aranda et al., 2006 (224)
HPLC-UV	6,64 - 18,21 mg L ⁻¹	2,96 - 381 mg L ⁻¹	Reação de derivatização como o 2,4-dinitrofluorobenzene (DNFB) e condições cromatográficas diferentes para ambas as determinações	Rai et al., 2016 (225)
RMN ¹ H	2,6 - 10,4 mg L ⁻¹	Não é analisado	Para a análise das amostras utilizou, NaN ₃ e KH ₂ PO ₄	Hohmann et al., 2014 (226)
Eletroforese Capilar com detector UV- Vis	25,0 - 625,0 mg L ⁻¹	19,8 - 496,0 mg L ⁻¹	Os analito foram determinados com condições experimentais diferentes	Vochoyánová et al., 2014 (227)
Eletroforese (microchip)	10 - 20 mmol L ⁻¹	Não é analisado	Adição do reagente de marcação NBD-Cl(4-cloro-7-nitrobenzofurazan)	Götz et al., 2007 (228)
Voltametria	Não é analisado	4.0×10 ⁻⁷ - 8.0×10 ⁻⁵ mol L ⁻¹	Determinação com eletrodo de carbono vítreo modificado com óxido de grafeno	Zhao et al., 2011 (229)

Fonte: Elaborada pelo autor.

2. Objetivos

- Validar uma metodologia para determinação e quantificação simultânea da cafeína e taurina em bebidas energéticas, utilizando a RMN ^1H .
- Determinar o teor de cafeína e taurina em bebidas energéticas em amostras comerciais e avaliar se as concentrações contidas nas bebidas estão de acordo com o valor declarado no rótulo e com a legislação vigente.

3. Procedimento Experimental

3.1 Reagentes e Padrões analíticos

Para as análises por RMN ^1H foram utilizados os seguintes padrões analíticos: taurina (99,5%; Sigma-Aldrich®) e cafeína (99,0%; Sigma-Aldrich®). Para o ajuste de pH foi utilizado hidróxido de sódio (97,0%; Vetec®). Todas as amostras foram solubilizadas utilizando água deuterada (D_2O ; 99,8%; Sigma-Aldrich®) contendo 0,05% de ácido 3-(trimetilsilil)-propiónico- d_4 deuterado (TSP).

Para as análises por CLAE, foram utilizados: Metanol (99,97%; J.T.Baker®), Acetonitrila (99,98%; J.T.Baker®), Dimetilsulfóxido (99,90%; Sigma-Aldrich®), Fosfato de potássio dibásico (99,0%; Synt®), Fosfato de potássio monobásico (99,0%; Quemis®), dinitrofluorobenzeno (98,0%; Sigma-Aldrich®).

3.2 Preparo das amostras para análises por RMN ^1H

Primeiramente as amostras foram desgaseificadas em ultrassom durante 15 min. Posteriormente ajustou-se o pH das soluções para 11, utilizando NaOH a $1,0 \text{ mol L}^{-1}$. A quantidade de NaOH utilizado para ajuste do pH foi anotada para considerar os fatores de diluição resultantes para quantificação dos analitos. Alíquotas de $180 \mu\text{L}$ das amostras, com pH recém ajustado, foram transferidas para tubos Eppendorf de 1,5 mL e adicionados $20 \mu\text{L}$ de água de deuterada (com 0,05 % de TSP). Por fim, $200 \mu\text{L}$ da solução final foram transferidas para tubos de RMN de 3 mm e submetidas a análise. Para os métodos comparativos o preparo de amostra seguiu o procedimento indicado no item (Seção 3.5).

3.3 Amostras Analisadas

Foram analisadas um total de 15 amostras de diversas marcas e adquiridas no mercado local (Tabela 17).

Tabela 17 - Amostras de bebidas energéticas analisadas.

Amostras analisadas	Cidade (Produção)	Concentração Rotulada (mg mL ⁻¹)	
		Cafeína	Taurina
1	Linhares - ES	64 mg/200 mL	800 mg/200 mL
2	Santa Rita do Passa Quatro - SP	62 mg/200 mL	830 mg/200 mL
3	Analândia - SP	64 mg/200 mL	864 mg/200 mL
4	Analândia - SP	64 mg/200 mL	864 mg/200 mL
5	Jaú - SP	64 mg/200 mL	864 mg/200 mL
6	Leme - SP	64 mg/200 mL	864 mg/200 mL
7	Piraí - RJ	70 mg/200 mL	830 mg/200 mL
8	Barueri - SP	64 mg/200 mL	800 mg/200 mL
9	Leme - SP	65 mg/200 mL	800 mg/200 mL
10	Analândia - SP	64 mg/200 mL	800 mg/200 mL
11	Itajaí - SC	64 mg/200 mL	800 mg/200 mL
12	Itajaí - SC	64 mg/200 mL	800 mg/200 mL
13	Leme - SP	65 mg/200 mL	800 mg/200 mL
14	Petrópolis - RJ	54 mg/200 mL	740 mg/200 mL
15	Piraí - RJ	70 mg/200 mL	800 mg/200 mL

Fonte: Elaborada pelo autor.

3.4 Análises por RMN ¹H

As medidas espectroscópicas foram obtidas, em um espectrômetro de RMN Bruker de 14,1 Tesla (600,13 MHz para ¹H), modelo: Avance III HD 600, usando uma sonda Triple Inverse TCI Cryo-probehead de 5 mm a 298 K. A sequência de pulsos utilizada na aquisição dos espectros de RMN ¹H com supressão do sinal do solvente foi a ZGCPPR. Os espectros foram adquiridos com 32 FIDs (NS), largura de pulso de 7,0 μs (P1), janela espectral de 12,0166 ppm (SW), tempo de aquisição de 4,5 s (AQ), tempo de espera entre cada aquisição de 2 s (D1), número de pontos (TD) 64K, LB = 0,3 Hz, fator de ganho do receptor (RG) de 18 e atenuação da potência para supressão do sinal da água de 48,05 dB (PL9). A fase e a linha de base foram ajustadas usando o software TopSpin versão 3.2.7 (Bruker Biospin). Os espectros foram alinhados para integração, com base no sinal do ácido 3-(trimetilsilil)-propiónico-d4 deuterado (TSP) sendo a ele atribuído o valor de 0,0 ppm. Por fim, os espectros resultantes foram salvos como arquivos ASCII e transferidos para um PC para análise dos dados. As medidas

quantitativas foram realizadas, pela metodologia PULCON, utilizando a ferramenta ERECTIC 2 (TopSpin v. 3.2.7).

3.5 Métodos Comparativos

Foram utilizados 2 trabalhos da literatura como métodos comparativos. Todas as análises foram realizadas em um HPLC Shimadzu, modelo: UFLC-20, com detecção DAD, utilizando uma coluna chromosil C18 (250mm x 4,6mm x 5µm).

3.5.1 Determinação de cafeína

Para a quantificação da cafeína, foi utilizado o método proposto por Saad e Bustan, 2016 (230). Antes das análises foi ajustado o pH de todas as amostras para 5, utilizando NaOH a 0,1 mol L⁻¹. A fase móvel foi constituída por metanol e água com eluição no modo isocrático, na proporção de 60:40 (v/v) (metanol/água). Utilizou-se um fluxo de vazão de 1,0 mL min⁻¹ e volume de injeção de 20 µL. O tempo para cada corrida foi de 10 min. Os cromatogramas foram obtidos a 30°C. A determinação da cafeína foi realizada no comprimento de onda de 273 nm.

3.5.2 Determinação de taurina

Para a quantificação da taurina, foi utilizado o método proposto por McConn, 2012 (230). Antes das análises, as amostras passaram por um processo de derivatização que constituiu na adição em um tubo de ensaio: 1,0 mL de amostra (energéticos), 2,0 mL do tampão de carbonato, 0,5 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) e 0,1 mL de 2,4-dinitrofluorobenzeno (DNFB). As soluções foram agitadas durante 30 s e colocadas em banho maria à 40 °C durante 15 min. No final dos 15 minutos, adicionou-se à mistura 6,5 mL de tampão fosfato. A fase móvel foi constituída por metanol e água com eluição no modo isocrático, na proporção de 80:20 (v/v) (tampão de fosfato/acetoneitrila). Utilizou-se um fluxo de vazão de 1,0 mL min⁻¹ e volume de injeção de 10 µL. O tempo para cada corrida foi de 10 min. Os cromatogramas foram obtidos a 30°C. A determinação do derivado de taurina foi realizada no comprimento de onda de 360 nm.

3.6 Validação Analítica

Os resultados quantitativos foram validados, seguindo os parâmetros recomendados pelo Guia de Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos (ANVISA) (59). Os parâmetros

avaliados foram: especificidade, linearidade, precisão (repetitividade e intermediária), exatidão e robustez.

4. Resultados e Discussão

As bebidas energéticas apresentam um espectro de RMN ^1H bastante amplo, tendo em vista a presença dos diversos compostos que compõe as amostras, principalmente na região entre 3,0 a 4,5 ppm, onde a maioria dos sinais são pertencentes a açúcares (Figura 58).

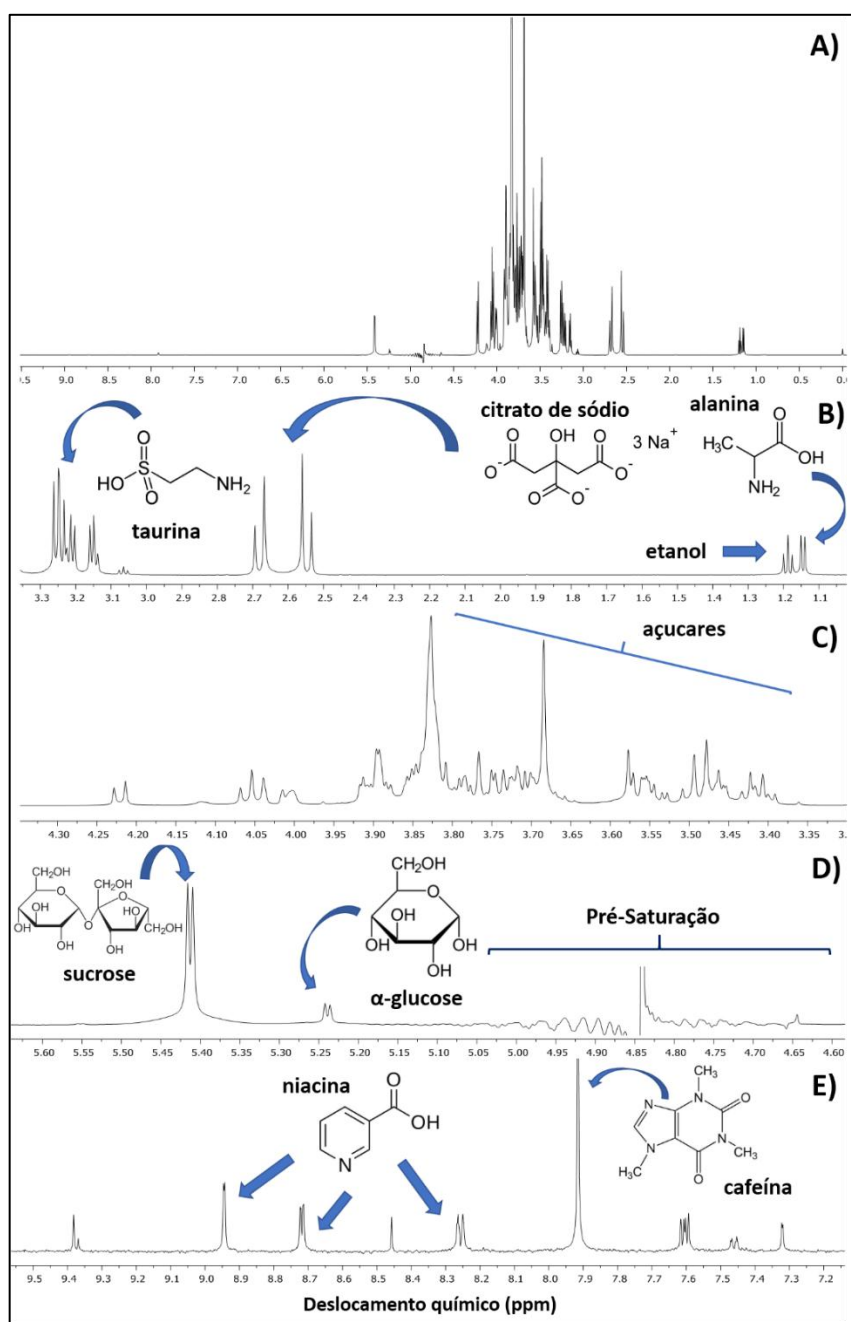


Figura 58 - Perfil em RMN ^1H , 600 MHz, da amostra 11 (energético), em D_2O .

Fonte: Elaborada pelo autor.

Foram identificados diversos sinais, tais como, a alanina em: δ 1,15 (d, $J = 6,6$ Hz, 1H); etanol: δ 1,19 (t, $J = 7,3$ Hz, 1H); niacina: δ 7,60 (dd, $J = 8,3, 5,2$ Hz, 1H), δ 8,26 (dt, $J = 8,1, 2,0$ Hz, 1H), δ 8,72 (dd, $J = 5,1, 1,6$ Hz, 1H) e δ 8,94 (d, $J = 2,4$ Hz, 1H); cafeína: δ 7,92 (s, 3H). Também foram identificados sinais relativos aos hidrogênios anoméricos da sucralose e α -glucose, com deslocamentos químicos em: δ 5,41 (d, $J = 4,0$ Hz) e δ 5,24 (d, $J = 3,9$ Hz) respectivamente.

A presença de uma grande quantidade de compostos (principalmente carboidratos), dificulta a determinação de alguns sinais, entre eles o da taurina (Figura 58). Para efeito de comparação, pode-se perceber a diferença entre espectro de RMN ^1H de uma bebida energética “normal” e uma denominada “zero açúcar” (Figura 59).

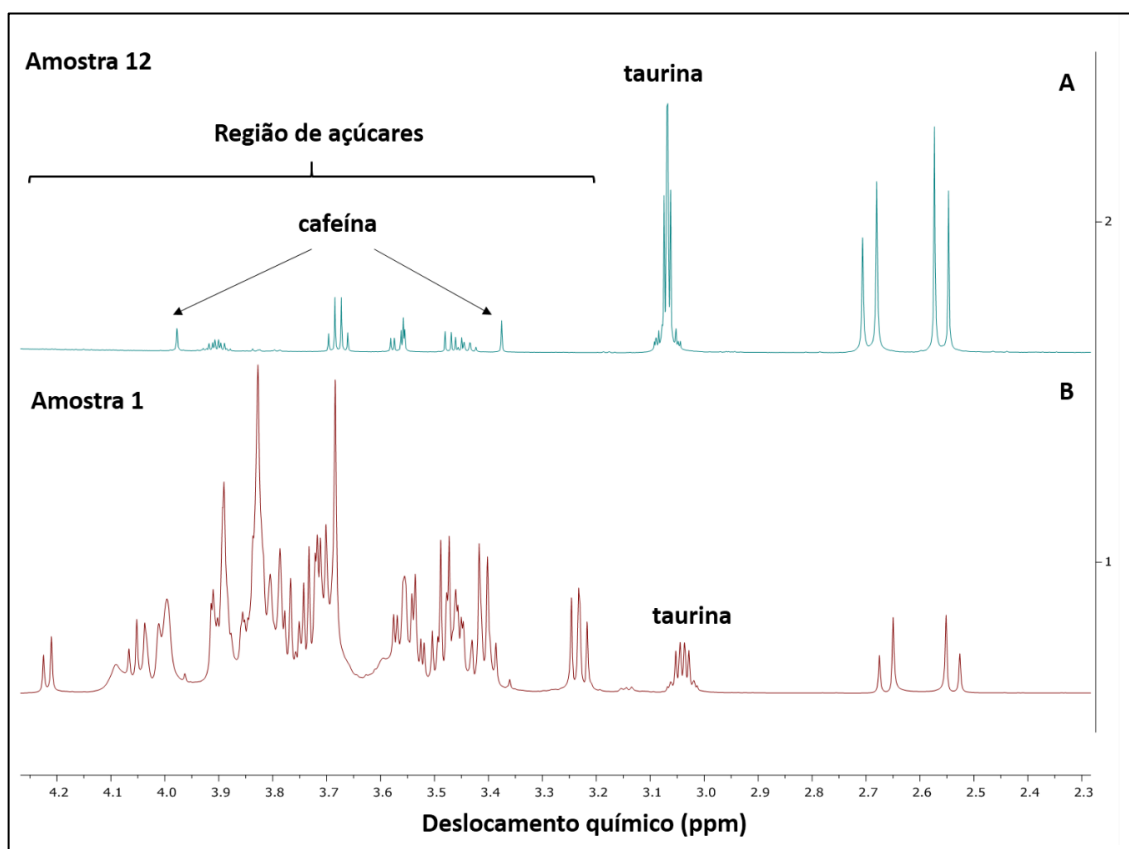


Figura 59 - Perfil em RMN ^1H , 600 MHz, das amostras 12 e 1 (energéticos), em D_2O , pH 11.

Fonte: Elaborada pelo autor.

É possível notar a diferença na quantidade de sinais presentes na amostra 12 (zero açúcar) (Figura 59A), em relação a amostra 1 (normal) (Figura 59B), principalmente na região de δ 3,1 a 4,2 ppm. Além disso, outros sinais referentes a cafeína puderam ser observados na amostra 12, o mesmo não pôde ser observado na amostra 1 devido a sobreposição de sinais.

4.1 Variação do deslocamento químico em função do pH

Para viabilizar a determinação quantitativa da taurina por RMN, foi testada a aplicabilidade da variação do pH, com a intenção de deslocar os sinais referentes a taurina, localizados na região de δ 3,24-3,4 ppm (dois tripletos). A variação do pH a fim de melhorar a resolução de sinais em RMN já foi bastante estudada, apresentando bons resultados (28,231). Vale ressaltar, que além desse artifício, mudanças na composição do solvente, aumento da temperatura, adição de reagentes auxiliares como ciclodextrinas e variação da concentração de íons presentes nas amostras, também podem ser utilizados para deslocarem sinais do analito de interesse, para uma região livre de sobreposição (28,232). Fez-se o teste da variação do pH no intervalo de 3 a 13. Pode-se notar claramente que a separação dos sinais é melhorada, podendo ser identificado um multipletto em pH 11 (Figura 60), que é formado pela sobreposição de dois multipletos (em δ 3,10 ppm) de taurina.

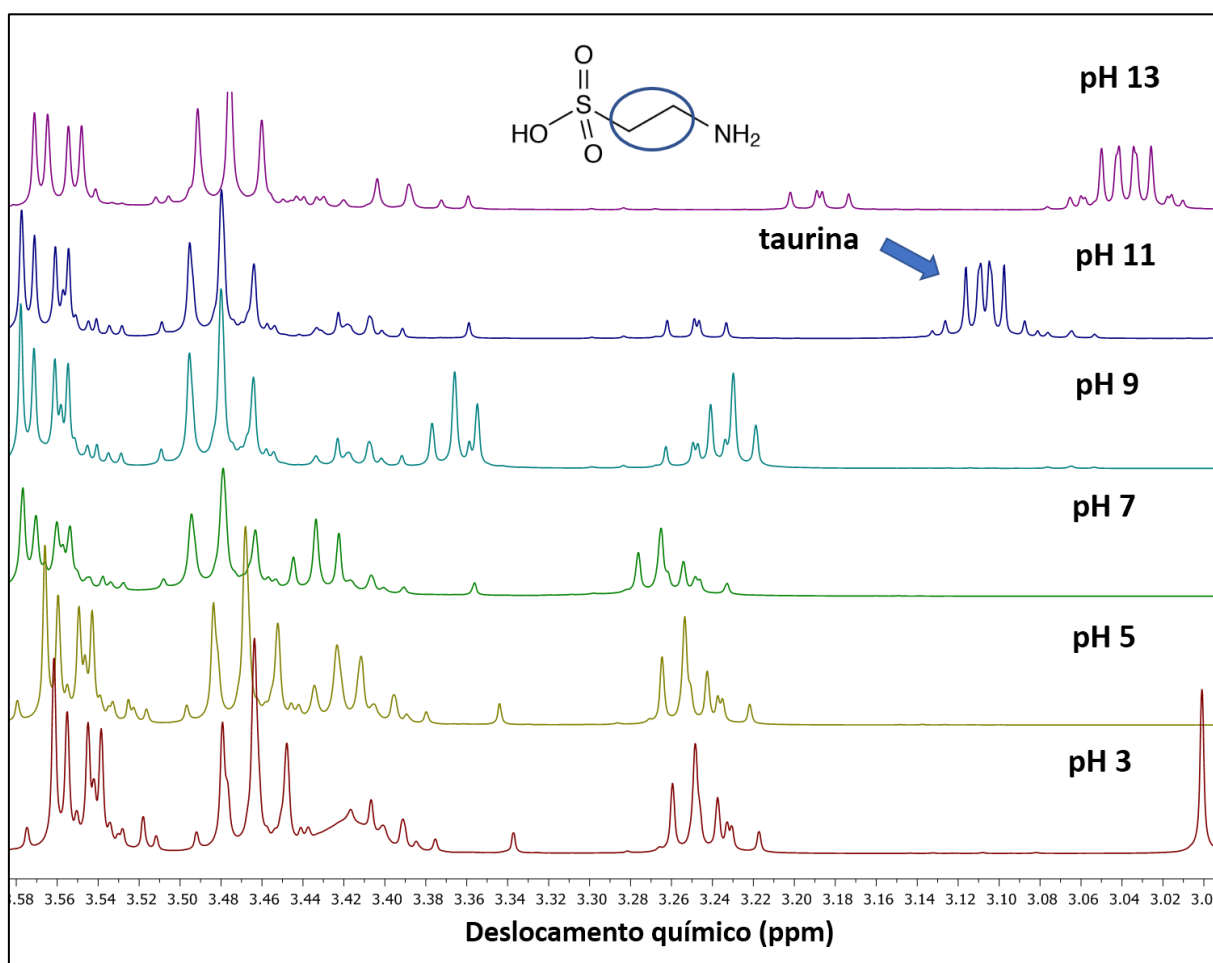


Figura 60 - Espectros em RMN ¹H, 600 MHz, referentes a variação do sinal da taurina com o aumento do pH.

Fonte: Elaborada pelo autor.

As mudanças ocasionadas no deslocamento químico do sinal da taurina são provocadas pela protonação do grupo amina e a desprotonação do grupo sulfóxido, que promovem um aumento na introdução de cargas do sistema.

Para a cafeína, é possível verificar que o sinal com deslocamento químico em δ 7,92 ppm, no pH 3 (normal da bebida), aparece de forma livre no espectro, sem a presença de interferentes (Figura 61). Mas à medida que o pH é aumentado outros sinais começam a se deslocarem e se aproximarem do sinal da cafeína. Entretanto, a pesar da determinação da cafeína poder ser feita tranquilamente no pH 3, o foco do trabalho foi a determinação simultânea de ambos os analitos (taurina e cafeína), conseqüentemente resolve-se trabalhar no pH 11, já que assim eles puderam ser determinados de modo simultâneo.

Após encontrar as melhores condições para a determinações dos analitos, validou-se o método seguindo os parâmetros da legislação vigente (59).

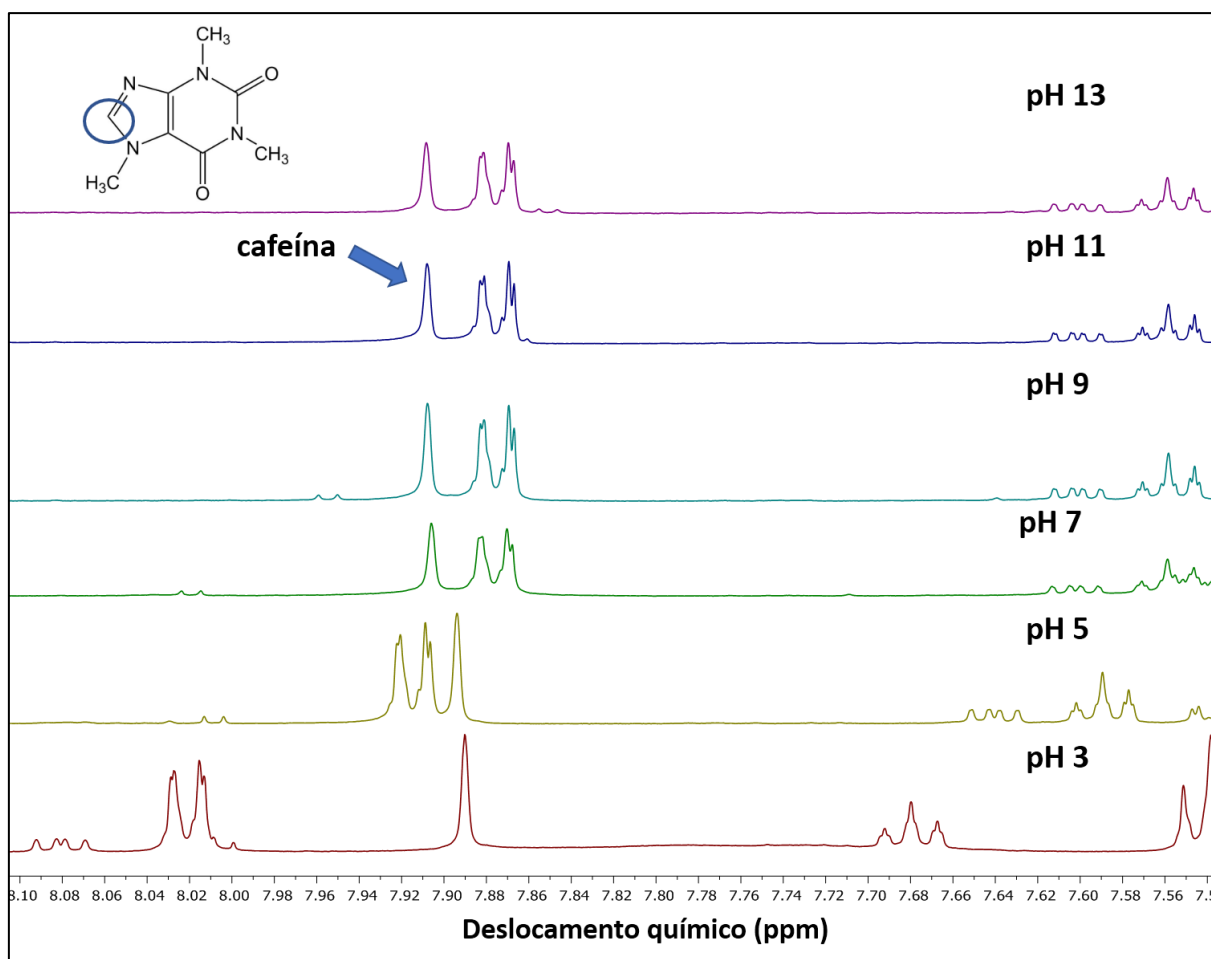


Figura 61 - Espectros em RMN ¹H, 600 MHz, referentes a variação do sinal da cafeína com o aumento do pH.

Fonte: Elaborada pelo autor.

4.2 Validação Analítica

4.2.1 Seletividade

Para garantir que os sinais a serem integrados para a quantificação correspondam a apenas a composto a ser determinado, foram realizados testes com os padrões de taurina e cafeína e comparados com o espectro da amostra. Os resultados demonstram que os sinais com deslocamento químicos em: δ 7,92 (s, 3H) e δ 3,04 (m, 4H) ppm, puderam ser utilizados para as determinações quantitativas de cafeína e taurina, respectivamente (Figura 62).

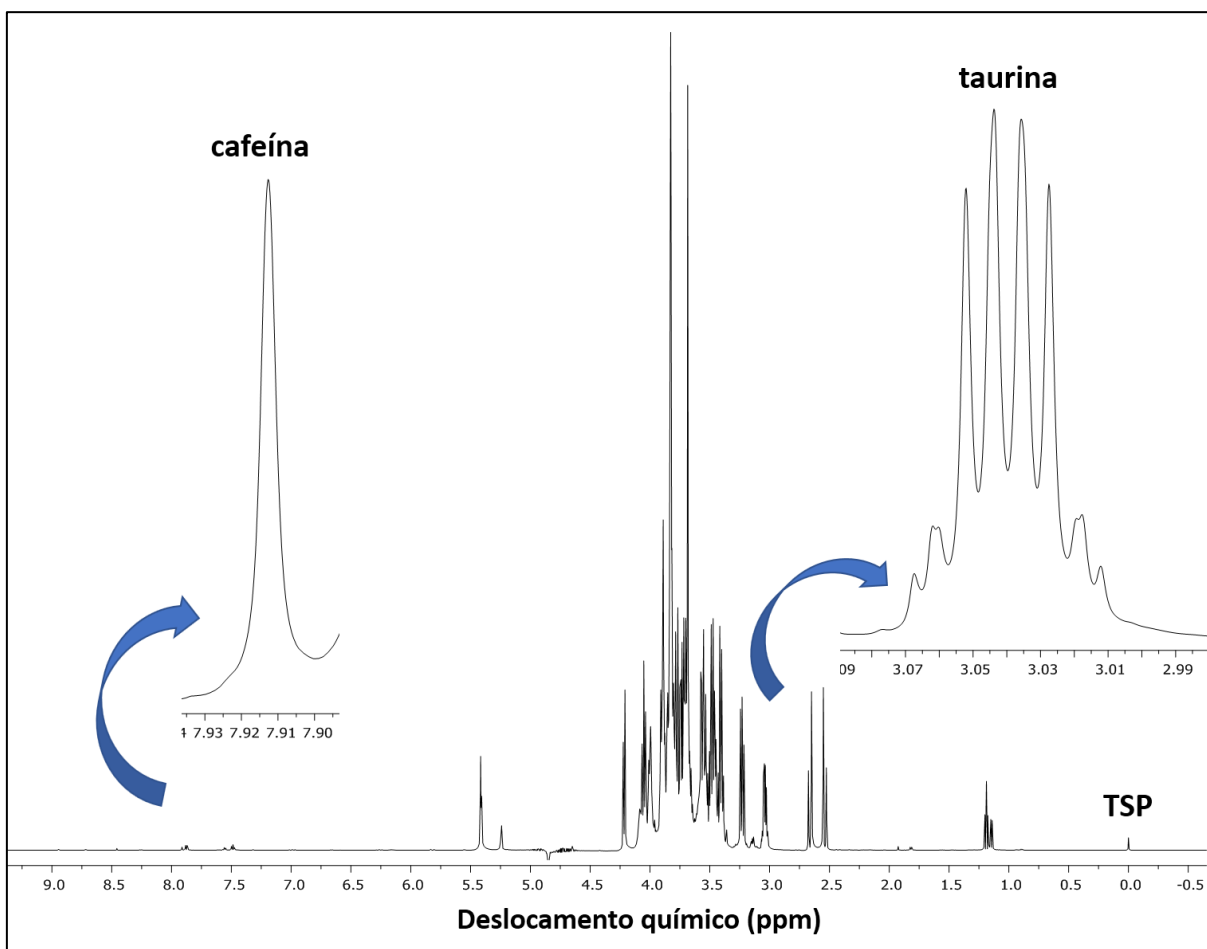


Figura 62 - Espectros em RMN ^1H , 600 MHz, amostra 1, D_2O , em pH 11.

Fonte: Elaborada pelo autor.

4.2.2 Linearidade

As curvas de analíticas (Figura 63) foram obtidas com 5 concentrações dos analitos, conforme recomendação da Resolução RE nº 899 (ANVISA) (59).

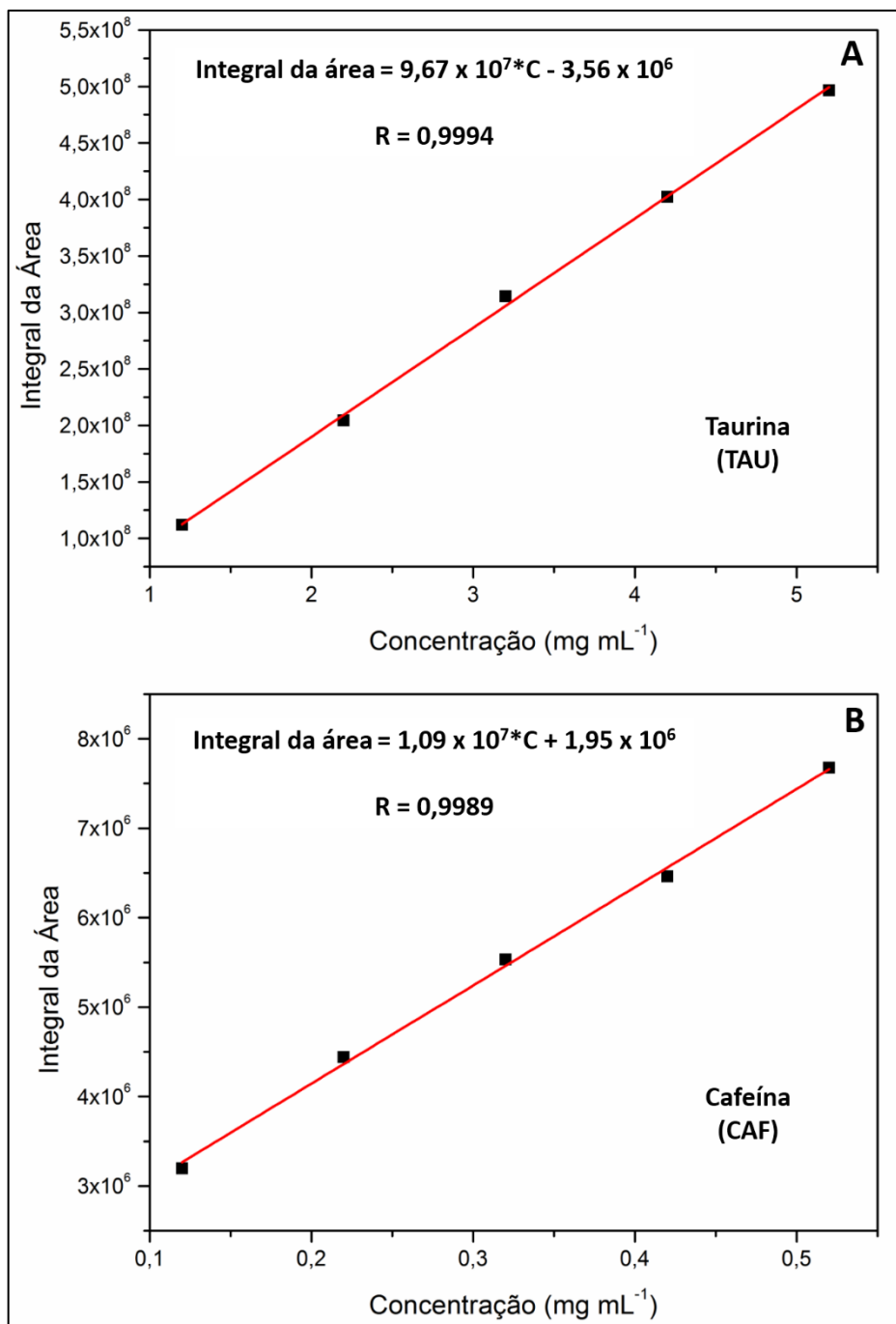


Figura 63 - Curvas analíticas obtidas no ensaio de linearidade, A - taurina e B - cafeína. Número de repetições para cada ponto da curva ($n = 3$).

Fonte: Elaborada pelo autor.

Os resultados (Figura 63) mostraram que os métodos propostos apresentaram boas inclinações e coeficientes de correlação maiores do que os valores recomendados pela ANVISA ($r = 0,99$) e ICH (59,60). Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram determinados de acordo com as recomendações da IUPAC (26): $LD = 3 \times S/b$ e $LQ = 10 \times S/b$, onde S é o

desvio padrão da curva analítica e b é coeficiente angular (inclinação) da curva analítica. Os valores de limite de detecção e quantificação foram de 0,9 e 1,2 mg mL⁻¹, respectivamente para taurina. Já para cafeína os LD e LQ foram de 0,08 a 0,13 mg mL⁻¹, respectivamente. Os valores encontrados para os limites de quantificação foram avaliados considerando as relações sinal-ruído (S/R) para todas as amostras analisadas. A menor relação S/R observada foi de 172, superando o intervalo considerado satisfatório de acordo com a literatura, o que, para uma incerteza de 1% o valor de S/R, deve ser maior que 150 (28,31,199).

4.2.3 Ensaio de Precisão

Foram realizados ensaios a fim de verificar a repetibilidade do método dentro de um mesmo dia (Intra-dia) e entre dias diferentes (Inter-dia). Para tal, foram realizadas três determinações da quantidade de taurina e cafeína nas amostras, sendo dois desses experimentos realizados num mesmo dia em períodos diferentes e o terceiro, no dia subsequente a fim de se calcular o desvio padrão relativo (DPR). Onde o DPR intra-dia variou de 2,75 a 4,17% e o DPR inter-dia de 2,99 a 4,85% (Tabela 18). Esses resultados demonstraram que a precisão das medidas foi satisfatória.

Tabela 18 - Análise de precisão intra-dia e inter-dia para o método proposto.

Amostra (Energético)	Analito (sinal)	Concentração (mg mL ⁻¹)	Intra-dia DPR (%)	Inter-dia DPR (%)
1	Taurina	2,50	3,76	4,04
	(δ 7,92)	4,00	2,93	3,11
	Cafeína	0,15	3,82	2,99
	(δ 3,04)	0,25	2,91	3,18
4	Taurina	2,50	3,22	3,47
	(δ 7,92)	4,00	2,86	3,29
	Cafeína	0,15	4,02	4,72
	(δ 3,04)	0,25	3,66	3,94
6	Taurina	2,50	2,75	3,10
	(δ 7,92)	4,00	2,90	3,08
	Cafeína	0,15	4,17	3,72
	(δ 3,04)	0,25	2,43	2,84
10	Taurina	2,50	3,40	4,72
	(δ 7,92)	4,00	3,91	4,28
	Cafeína	0,15	3,96	4,85
	(δ 3,04)	0,25	3,69	3,81

Fonte: Elaborada pelo autor.

4.2.4 Ensaio de Exatidão

O estudo de recuperação consistiu na fortificação das amostras de energéticos, adicionando soluções padrão contendo o analito de interesse em proporções de 50, 100 e 150%, em relação à concentração do analito indicado na embalagem, seguido pela determinação da concentração de analito adicionada, expressa em porcentagem. Para a determinação de cafeína foram fortificadas com concentrações de 0,20; 0,40 e 0,60 mg mL⁻¹, já para determinação de taurina, foram fortificadas com concentrações de 2,0; 4,0 e 6,0 mg mL⁻¹, utilizando as soluções padrões dos analitos. Todas as análises foram realizadas em triplicata (n=3). Os resultados (Tabela 19) mostraram que as recuperações variaram de 91,00% a 108,0%, que estavam dentro dos limites estipulados pela ANVISA e ICH (59,60).

Tabela 19 - Resultados dos testes de exatidão para as amostras de energéticos em três níveis de concentração (50, 100 e 150%).

Amostra	Analito (sinal)	Nível (%)	Adicionado (mg mL ⁻¹)	Recuperado (mg mL ⁻¹)	Recuperação (%)
1	Taurina (δ 7,92)	50	2,00	5,48	91,33 (\pm 0,45)
		100	4,00	7,36	92,00 (\pm 0,52)
		150	6,00	9,45	94,50 (\pm 0,36)
1	Cafeína (δ 3,04)	50	0,20	0,56	93,33 (\pm 0,62)
		100	0,40	0,79	98,75 (\pm 0,31)
		150	0,60	0,91	91,00 (\pm 0,85)
4	Taurina (δ 7,92)	50	2,00	6,11	101,83 (\pm 0,52)
		100	4,00	7,93	99,12 (\pm 0,79)
		150	6,00	10,05	100,50 (\pm 0,43)
4	Cafeína (δ 3,04)	50	0,20	0,64	106,67 (\pm 0,92)
		100	0,40	0,82	102,50 (\pm 0,21)
		150	0,60	1,08	108,00 (\pm 0,43)
10	Taurina (δ 7,92)	50	2,00	6,02	100,33 (\pm 0,54)
		100	4,00	7,89	98,63 (\pm 0,70)
		150	6,00	10,60	106,00 (\pm 0,81)
10	Cafeína (δ 3,04)	50	0,20	0,55	91,67 (\pm 0,62)
		100	0,40	0,83	103,75 (\pm 0,93)
		150	0,60	1,04	104,00 (\pm 0,30)

Fonte: Elaborada pelo autor.

4.2.5 Teste de Robustez

Para verificar a robustez, avaliou-se as diferenças obtidas nos resultados, através da mudança em alguns parâmetros operacionais, tais como, janela espectral, número de *scans*, temperatura e processamento dos dados por diferentes analistas. O teste foi realizado nas amostras 4, 6 e 10. A análise estatística dos dados mostraram valores de desvio padrão relativo menores que 3%, entre os resultados comparados (Tabela 20), concluindo que o método é robusto para essas pequenas variações.

Tabela 20 - Valores obtidos no estudo da robustez nas amostras de energéticos.

Amostra (Energéticos)	Parâmetros	Modificação	Cafeína	Taurina
			DPR (%) n=3	DPR (%) n=3
4	Janela Espectral (SW)	10	2,81	2,02
		12		
	Processamento dos dados	Analista 1	1,85	2,39
		Analista 2		
Número de scans (NS)	32	1,99	1,82	
	16			
Temperatura (T)	294 K	2,37	2,58	
	298 K			
6	Janela Espectral (SW)	10	2,17	1,94
		12		
	Processamento dos dados	Analista 1	1,26	1,72
		Analista 2		
Número de scans (NS)	32	2,79	1,44	
	16			
Temperatura (T)	294 K	2,08	1,61	
	298 K			
10	Janela Espectral (SW)	10	1,90	2,84
		12		
	Processamento dos dados	Analista 1	1,15	1,77
		Analista 2		
Número de scans (NS)	32	2,52	1,64	
	16			
Temperatura (T)	294 K	1,33	2,89	
	298 K			

Fonte: Elaborada pelo autor.

4.3 Métodos comparativos

Assim como no trabalho de anabolizantes (Capítulo II), as medidas quantitativas foram realizadas utilizando a ferramenta ERECTIC 2, nesse tipo de determinação, a concentração da amostra é calculada a partir de uma amostra de referência com a concentração devidamente conhecida. Para realizar essas determinações, foram utilizados padrões com concentrações de taurina (31,96 mmol L⁻¹) e cafeína (2,06 mmol L⁻¹), onde foram realizados uma série de testes e definidos como referências para quantificação. É importante ressaltar que para esse tipo de determinação, o padrão de referência utilizado, não precisa ser necessariamente do analito a ser determinado, basta ser um padrão com a concentração devidamente conhecida e ter sido obtido nas mesmas condições das amostras analisadas.

Comparando os valores encontrados na determinação quantitativa dos analitos pelos métodos comparativos (CLAE) com o método de determinação desenvolvido (RMN), os resultados obtidos foram estatisticamente concordantes, já que os valores de teste *t*, com nível de confiança de 95%, não excederam o valor crítico (*t*=4,303) mostrando que não existe diferença significativa (Tabela 21).

Tabela 21 - Comparação dos métodos para a determinação de cafeína e taurina em bebidas energéticas.

Amostra	Método RMN (Taurina) ^a	Método CLAE (Taurina) ^a	Teste ^b <i>t</i>	Método RMN (Cafeína) ^a	Método CLAE (Cafeína) ^a	Teste ^b <i>t</i>
1	803,53 (±1,50)	802,95 (±1,29)	2,04	63,21 (±0,22)	62,78 (±0,14)	1,17
2	759,12 (±1,07)	758,32 (±1,31)	1,73	56,24 (±0,15)	55,83 (±0,16)	2,31
3	753,79 (±0,99)	752,01 (±0,87)	3,29	62,73 (±0,20)	63,02 (±0,19)	1,12
4	802,21 (±1,12)	801,97 (±1,07)	2,55	63,32 (±0,13)	63,51 (±0,22)	3,08
5	760,50 (±0,91)	761,07 (±0,78)	1,89	54,62 (±0,24)	55,03 (±0,19)	2,92
6	801,20 (±0,85)	801,53 (±1,01)	2,15	62,71 (± 0,27)	62,09 (± 0,11)	1,92
7	801,28 (±0,65)	800,99 (±0,78)	3,13	55,32 (±0,15)	55,01 (±0,24)	1,10
8	740,11 (±0,92)	737,98 (±0,85)	4,04	61,88 (±0,19)	61,29 (±0,12)	3,65
9	799,15 (±0,74)	798,92 (±0,83)	3,80	65,01 (±0,09)	64,88 (±0,14)	2,84
10	800,70 (±1,01)	799,16 (±0,91)	2,76	63,90 (±0,24)	63,04 (±0,11)	2,11
11	801,26 (±0,65)	802,03 (±0,86)	3,05	62,56 (±0,15)	61,80 (±0,09)	3,94
12	798,75 (±0,95)	799,01 (±0,77)	1,99	63,55 (±0,26)	62,41 (±0,10)	4,15
13	750,21 (±1,15)	749,65 (±0,99)	3,70	62,94 (±0,14)	61,01 (±0,08)	4,22
14	735,18 (±0,64)	736,22 (±0,85)	2,83	51,26 (±0,11)	50,78 (±0,09)	3,79
15	802,56 (±0,99)	803,81 (±0,76)	2,16	63,11 (±0,15)	62,94 (±0,18)	2,04

^a mg por 200 mL, média ± desvio padrão (DP), n=3; ^b valores de *t* a um nível de confiança 95% (*t* crítico = 4,303).

Fonte: Elaborada pelo autor

Nesse trabalho, optou-se por não usar a metodologia (via padrão interno), devido à complexidade dos espectros em RMN ^1H das amostras analisadas. As curvas analíticas e os cromatogramas obtidos nos métodos comparativos, podem ser observados nas Figuras 64 e 65.

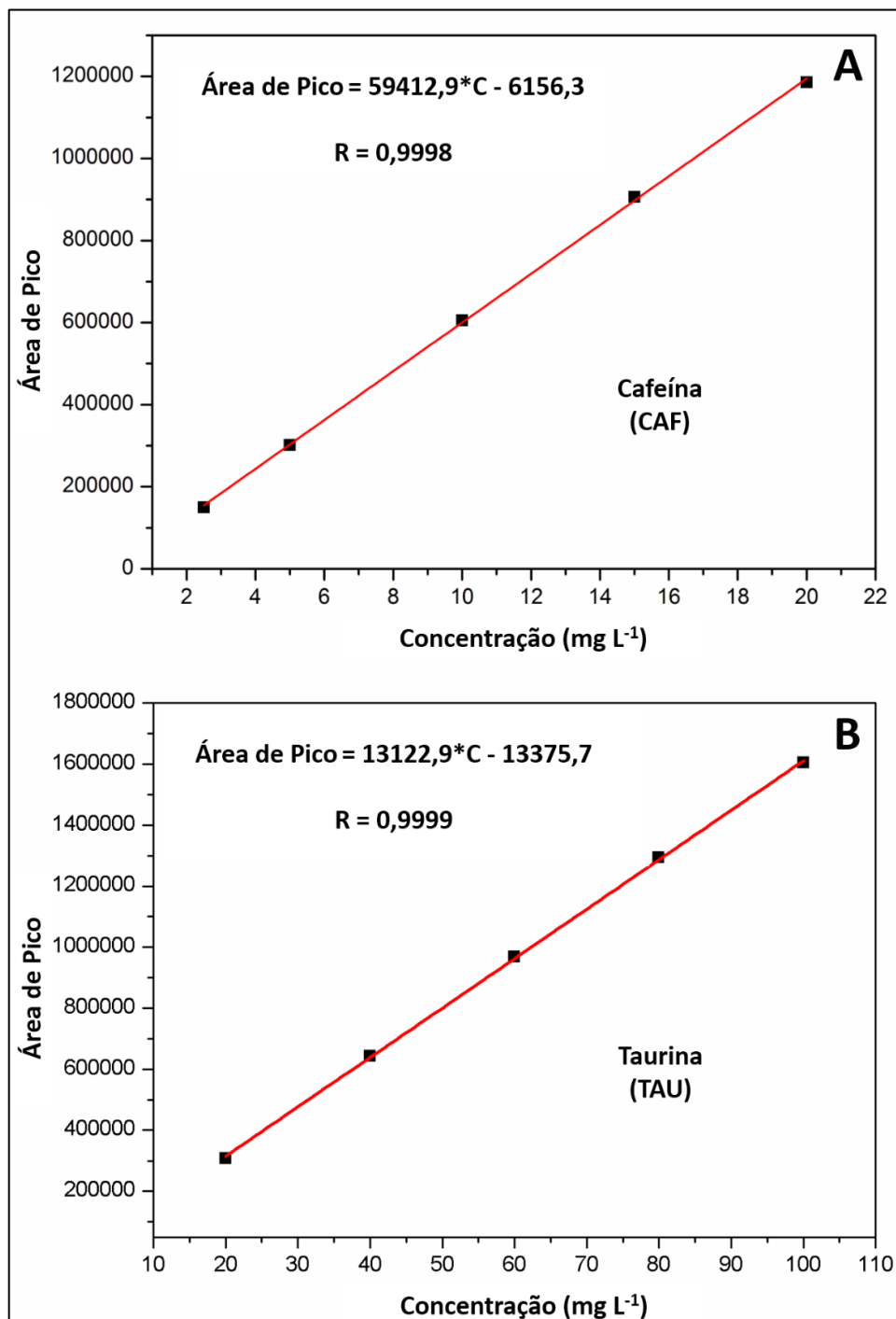


Figura 64 - Curvas analíticas para a determinação por CLAE: A) Cafeína B) Taurina. Número de repetições para cada ponto da curva (n = 3).

Fonte: Elaborada pelo autor.

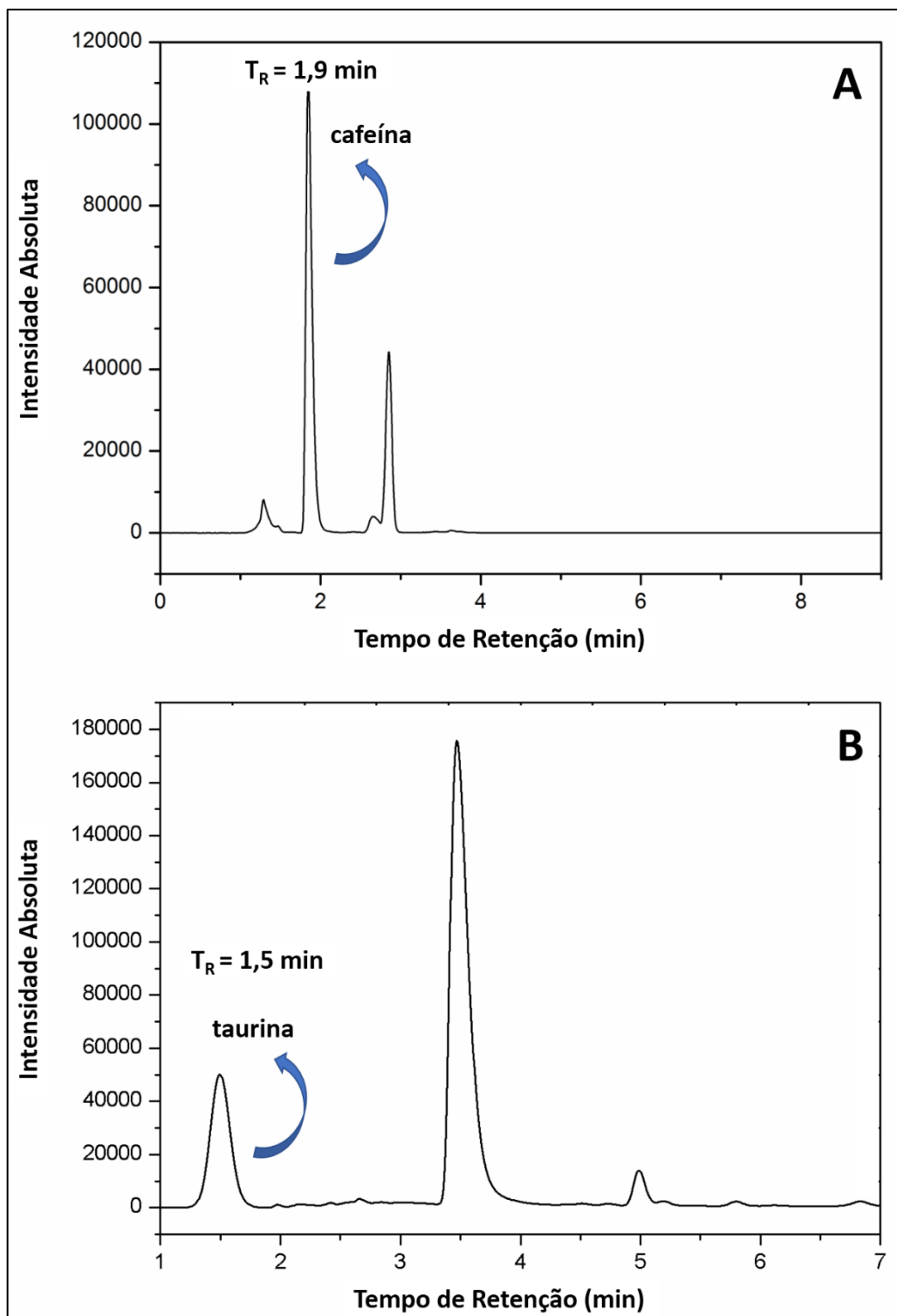


Figura 65 - Cromatogramas da amostra 4 por CLAE: A) Cafeína e B) Taurina.

Fonte: Elaborada pelo autor.

5. Conclusão

O método desenvolvido apresentou excelentes resultados para os parâmetros de validação, possibilitando a determinação simultânea de cafeína e taurina em um único espectro, com um preparo de amostra simples e eficiente. A técnica utilizou poucos reagentes, menor tempo de análise e baixa geração de resíduos, apresentando-se como uma boa alternativa para análises de controle de qualidade de bebidas energéticas existentes na literatura. Das 15 amostras analisadas, 6 apresentaram uma quantidade de taurina inferior a declarada no rótulo do produto, enquanto que para cafeína 5 amostras apresentaram quantidade inferior à declarada no rótulo do produto, estando em desacordo com a legislação brasileira. Os resultados confirmam a necessidade no desenvolvimento de métodos seguros e confiáveis, que informa os consumidores sobre a qualidade dos produtos que estão consumindo.

4. Conclusões Gerais

No capítulo I, ficou evidente que a utilização da impressão digital em RMN ^1H de cafés torrados, proporcionou um método simples e eficaz para distinguir os produtos de acordo com as regiões de origem, apesar dos padrões de ressonância complexos, devido aos numerosos compostos presentes no café. Os cafés foram claramente diferenciados, mesmo considerando a proximidade de regiões produtoras como São Paulo e o sul de Minas Gerais e seus climas e altitudes similares. O método desenvolvido ofereceu ainda um grande potencial para ser usado no controle de qualidade relacionado ao grau de torra de cafés. Já os resultados obtidos para avaliação da adulteração de cafés comerciais, mostraram-se altamente eficientes para determinação dos adulterantes (milho, soja, cevada e casca de café), sendo-os bastante concordantes com os resultados obtidos por metodologia oficial (microscopia óptica).

No capítulo II, a técnica de RMN mostrou ser uma ferramenta poderosa para avaliar a qualidade das amostras contendo esteróides anabolizantes, já que um único espectro foi necessário para obter informações valiosas sobre as estruturas dos compostos presentes, tanto na verificação da autenticidade das substâncias analisadas como na detecção de impurezas. A quantificação por RMN ^1H (usando padrão interno ou ERETIC 2) dos ingredientes ativos puderam ser realizadas sem o uso de padrões de referência dos analitos, que são frequentemente caros e difícil obtenção, oferecendo assim uma vantagem em relação aos métodos cromatográficos e fotométricos. Houve constatação de adulteração em 80% das amostras analisadas, conforme indicado pela ausência do analito, presença de outras substâncias não indicadas no rótulo ou conteúdo do ingrediente ativo abaixo do valor indicado na embalagem, evidenciando o caráter duvidoso desses medicamentos. Esses resultados confirmaram a importância do desenvolvimento de novas metodologias analíticas para esse tipo de aplicação.

No capítulo III, os resultados mostraram a facilidade da técnica de RMN na determinação simultânea de cafeína e taurina em bebidas energéticas, onde seus resultados puderam ser validados de acordo com os parâmetros da ANVISA, e mostraram que diversas amostras analisadas apresentaram resultados discordantes com o indicado no rótulo.

Por fim, avaliando todos os resultados obtidos, fica evidente que as potencialidades da técnica de RMN deveriam ser mais exploradas para análises de produtos farmacêuticos e alimentícios, já que seu uso mais frequente e difundido poderia contribuir significativamente para a melhora da qualidade desses produtos, evitando perdas econômicas graves.

5. Referências Bibliográficas

- 1 OSÓRIO, A. C. P. **Regulação e controle de qualidade como salvaguardas à falsificação de medicamentos. estudo de caso: métodos analíticos aplicáveis a substâncias anticancerígenas**. 2009. Dissertação (Mestrado em Metrologia), Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.
- 2 VIRELLA, D. Falsificação de medicamentos . Uma realidade à qual é preciso dar atenção. **Acta Pediátrica Portuguesa**, v. 39, n. 1, p. 46–50, 2008.
- 3 ANVISA. **Medicamentos falsificados**. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/resultadodebusca?p_p_id=101&p_p_lifecycle=0&p_p_state=maximized&p_p_mode=view&p_p_col_id=column1&p_p_col_count=1&_101_struts_action=%2Fasset_publisher%2Fview_content&_101_assetEntryId=2861443&_101_type=content&_101_groupId=2>. Acesso em: 18/2/2018.
- 4 WHO. **Substandard and falsified medical products**. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs275/en/>>. Acesso em: 27/12/2017.
- 5 OMS. **Diretrizes para o desenvolvimento de medidas de combate a medicamentos falsificados**, 2005. Disponível em: <http://www.paho.org/bra/index.php?option=com_docman&view=download&category_slug=influenza-a-h1n1-081&alias=183-medicamentos-falsificados-diretrizes-para-desenvolvimento-medidas-combate-3&Itemid=965>. Acesso em: 18/2/2018.
- 6 CARVALHO, P. **O perigo dos remédios falsos**. Disponível em: <<https://istoe.com.br/o-perigo-dos-remedios-falsos/>>. Acesso em: 18/2/2018.
- 7 RODRIGUES, A. **O Brasil na rota dos remédios falsificados**. Disponível em: <https://istoe.com.br/437819_O+BRASIL+NA+ROTA+DOS+REMEDIOS+FALSIFICADOS/>. Acesso em: 29/11/2017.
- 8 HURTADO, R.L.; LASMAR, M.C. Medicamentos falsificados e contrabandeados no Brasil: panorama geral e perspectivas de combate ao seu consumo. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 30, n. 4, p. 891–895, 2014.
- 9 LAMAS, M.T. **Métodos analíticos para a identificação de espécies animais**. 2011. Trabalho de conclusão de curso (Graduação de medicina veterinária), Universidade Estadual Paulista, Botucatu.
- 10 CHARRO, F. **Fraudes em alimentos**. Disponível em: <<https://www.infoescola.com/curiosidades/fraudes-em-alimentos/>>. Acesso em: 29/11/2017.
- 11 KOLICHESKY, M.B. Fraudes em Alimentos. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 12, n. 1, 1994.
- 12 MACHADO, G. **Tipos de fraude em alimentos - Myleus Food Safety**. Disponível em: <<http://foodsafety.myleus.com/tipos-de-fraude-em-alimentos/>>. Acesso em: 29/11/2017.
- 13 SANTOS, M.S.; COLNAGO, L.A. Validation of quantitative ¹H NMR method for the analysis of pharmaceutical formulations. **Química Nova**, v. 36, n. 2, p. 324–330, 2013.
- 14 TAVARES, L.A.; FERREIRA, A.G. Análises quali- e quantitativa de cafés comerciais via ressonância magnética nuclear. **Química Nova**, v. 29, n. 5, p. 911–915, 2006.

- 15 HOLZGRABE, U.; DEUBNER, R.; et al. Quantitative NMR spectroscopy—Applications in drug analysis. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 38, n. 5, p. 806–812, 2005.
- 16 LEITE, L.L.B. **Aplicação da espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear quantitativa de Hidrogênio (RMNq-1H) na área farmacêutica e afins**. 2013. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Farmácia), Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa.
- 17 SILVERSTEIN, R.M.; WEBSTER, F.X.; et al. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. Rio de Janeiro: LTC, 2006.
- 18 SILVA, C.B.S. **Processamento de Sinais de Ressonância Magnética Nuclear Usando Classificador Neural para Reconhecimento de Carne Bovina**. 2007. Dissertação (Mestrado em Engenharia Elétrica), Universidade de São Paulo, São Carlos.
- 19 PAVIA, D.L.; LAMPMAN, G.M.; et al. **Introdução à espectroscopia**. Cengage Learning, 2012.
- 20 MAZZOLA, A.A. **Princípios Físicos da Ressonância Magnética**. Disponível em: <http://rle.dainf.ct.utfpr.edu.br/hipermidia/images/documentos/Principios_fisicos_da_ressonancia_magnetica.pdf>. Acesso em: 19/2/2018.
- 21 GAMA, L.D.A. **Uso de ressonância magnética nuclear sem solvente deuterado (No-D NMR) para análise de cocaína e seus adulterantes**. 2014. Dissertação (Mestrado em Química), Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória.
- 22 GERARD, T. **Chapter 5 : NMR proton: principles**. Disponível em: <<http://brussels-scientific.com/?p=6273>>. Acesso em: 14/3/2018.
- 23 AMARAL, F.M. **Uso da espectroscopia de ressonância magnética nuclear de 1H e 13C na análise de uvas e vinhos brasileiros**. 2005. Tese (Doutorado em Química), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.
- 24 KOLLAR, S.R.M. **Desenvolvimento de Metodologias Analíticas para Análise de Biodiesel por RMN - 1H 1,40 T**. 2012. Dissertação (Mestrado em Química), Universidade de Brasília, Brasília.
- 25 COSTA, R.A.R. **Determinação do grau de pureza de amostra de crack apreendidas no Estado da Paraíba por RMNq-1H e CLAE-DAD**. 2012. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos), Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa.
- 26 JUNGnickel, J.L.; FORBES, J.W. Quantitative Measurement of Hydrogen Types by Intergrated Nuclear Magnetic Resonance Intensities. **Analytical Chemistry**, v. 35, n. 8, p. 938–942, 1963.
- 27 HOLLIS, D.P. Quantitative Analysis of Aspirin, Phenacetin, and Caffeine Mixtures by Nuclear Magnetic Resonance Spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 35, n. 11, p. 1682–1684, 1963.
- 28 HOLZGRABE, U. Quantitative NMR spectroscopy in pharmaceutical applications. **Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy**, v. 57, n. 2, p. 229–240, 2010.
- 29 BHARTI, S.K.; ROY, R. Quantitative 1H NMR spectroscopy. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 35, p. 5–26, 2012.
- 30 ALMEIDA, N.S. **Desenvolvimento e validação de metodologias para quantificação**

de 3,4-metilenodioximetanfetamina (MDMA) em comprimidos de ecstasy por cromatografia gasosa e ressonância magnética nuclear. 2016. Dissertação (Mestrado em Química), Universidade de Brasília, Brasília.

- 31 MALZ, F.; JANCKE, H. Validation of quantitative NMR. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 38, n. 5, p. 813–823, 2005.
- 32 GAMA, L.A.; MERLO, B.B.; et al. No-deuterium proton NMR (No-D NMR): A simple, fast and powerful method for analyses of illegal drugs. **Microchemical Journal**, v. 118, p. 12–18, 2015.
- 33 RUNDLOF, T.; MATHIASSEN, M.; et al. Survey and qualification of internal standards for quantification by ¹H NMR spectroscopy. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 52, n. 5, p. 645–651, 2010.
- 34 SINGH, S.; ROY, R. **The application of absolute quantitative ¹H NMR spectroscopy in drug discovery and development.** 2016.
- 35 AKOKA, S.; BARANTIN, L.; et al. Concentration Measurement by Proton NMR Using the ERETIC Method. **Analytical Chemistry**, v. 71, n. 13, p. 2554–2557, 1999.
- 36 WALKER, G.S.; RYDER, T.F.; et al. Validation of Isolated Metabolites from Drug Metabolism Studies as Analytical Standards by Quantitative NMR. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 39, n. 3, p. 433–440, 2011.
- 37 MONAKHOVA, Y.B.; KOHL-HIMMELSEHER, M.; et al. Determination of the purity of pharmaceutical reference materials by ¹H NMR using the standardless PULCON methodology. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 100, p. 381–386, 2014.
- 38 FRANK, O.; KREISSL, J.K.; et al. Accurate determination of reference materials and natural isolates by means of quantitative ¹H NMR spectroscopy. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, n. 12, p. 2506–2515, 2014.
- 39 HONG, R.S.; HWANG, K.H.; et al. Survey of ERETIC2 NMR for quantification. **Journal of the Korean Magnetic Resonance Society**, v. 17, n. 2, p. 98–104, 2013.
- 40 WATANABE, R.; SUGAI, C.; et al. Quantitative nuclear magnetic resonance spectroscopy based on PULCON methodology: Application to quantification of invaluable marine toxin, okadaic acid. **Toxins**, v. 8, n. 10, p. 1–9, 2016.
- 41 COSTA, L.F.; ALCANFOR, S.K.B.; et al. Development and Validation of Furosemide Quantification Method By ¹H NMR. **Revista Virtual de Química**, v. 8, n. 5, p. 1683–1692, 2016.
- 42 FERREIRA, L. **Estudos de Quantificação do Fármaco furosemida por Ressonância Magnética Nuclear.** 2014. Dissertação (Mestrado em Química), Universidade de Brasília, Brasília.
- 43 BRIAN. **Bloch Equation Simulation.** Disponível em: <<http://mrsrl.stanford.edu/~brian/bloch/>>. Acesso em: 13/3/2018.
- 44 PAULI, G.F.; JAKI, B.J.; et al. Quantitative ¹H NMR: Development and Potential of a Method for Natural Products Analysis. **Journal of Natural Products**, v. 68, n. 1, p. 133–139, 2005.

- 45 PAULI, G.F.; GÖDECKE, T.; et al. Quantitative ^1H NMR. Development and Potential of an Analytical Method: An Update. **Journal of Natural Products**, v. 75, n. 4, p. 834–851, 2012.
- 46 SCHOENBERGER, T.; LACHENMEIER, D.W.; et al. **Guide to NMR Method Development and Validation – Part I: Identification and Quantification**. Brussels: 2014.
- 47 MARTENS, H. Quantitative Big Data: where chemometrics can contribute. **Journal of Chemometrics**, v. 29, n. 11, p. 563–581, 2015.
- 48 CONSONNI, R.; CAGLIANI, L.R.; et al. NMR based geographical characterization of roasted coffee. **Talanta**, v. 88, p. 420–426, 2012.
- 49 BRESCIA, M.; MONFREDA, M.; et al. Characterisation of the geographical origin of buffalo milk and mozzarella cheese by means of analytical and spectroscopic determinations. **Food Chemistry**, v. 89, n. 1, p. 139–147, 2005.
- 50 FINOTELLO, C.; FORZATO, C.; et al. NMR quantification of 16-O-methylcafestol and kahweol in *Coffea canephora* var. robusta beans from different geographical origins. **Food Control**, v. 75, p. 62–69, 2017.
- 51 AGIOMYRGIANAKI, A.; PETRAKIS, P. V.; et al. Detection of refined olive oil adulteration with refined hazelnut oil by employing NMR spectroscopy and multivariate statistical analysis. **Talanta**, v. 80, n. 5, p. 2165–2171, 2010.
- 52 BOFFO, E.F. **Utilização da RMN aliada a métodos quimiométricos na análise de méis e aguardentes**. 2009. Tese (Doutorado em Química), Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.
- 53 RITOTA, M.; CASCIANI, L.; et al. HRMAS-NMR spectroscopy and multivariate analysis meat characterisation. **Meat Science**, v. 92, n. 4, p. 754–761, 2012.
- 54 CONSONNI, R., CAGLIANI, L.R. Nuclear Magnetic Resonance and Chemometrics to Assess Geographical Origin and Quality of Traditional Food Products. In: **Advances in food and nutrition research**. v.59.2010, p. 87–165.
- 55 FERNANDES, A.P. **Emprego de estratégias quimiométricas para a diferenciação de alimentos de acordo com as formas de produção**. 2006. Tese (Doutorado em Química), Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.
- 56 JOLLIFFE, I.T.; CADIMA, J. Principal component analysis: a review and recent developments. **Philosophical transactions. Series A, Mathematical, physical, and engineering sciences**, v. 374, n. 2065, p. 20150202, 2016.
- 57 CUNHA, F.F. **Análise Discriminante (Módulo I)**. Disponível em: <http://www.ufpa.br/heliton/arquivos/aplicada/seminarios/M1_06_Analise_Discriminante_Franciely.pdf>. Acesso em: 21/2/2018.
- 58 NOBREGA, D.M. **Análise discriminante utilizando o software SPSS**. 2010. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Estatística), Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande.
- 59 ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2003. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/documents/33836/349509/Consolidado%2Bde%2Bnormas%2BCEBIO.pdf/3122249b-48cb-47aa-be78-76f3129a62ba>>. Acesso em: 27/12/2017.

- 60 ICH - International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, 2005. Disponível em: <https://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1__Guideline.pdf>. Acesso em: 27/12/2017.
- 61 INMETRO. **Orientação sobre validação de métodos analíticos**. Disponível em: <http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/Cgcre/DOQ/DOQ-Cgcre-8_04.pdf>. Acesso em: 5/3/2018.
- 62 PEREIRA, A.; SCHESHOWITSCH, K.; et al. Validação de metodologia analítica para quantificação de piroxicam em cápsulas de gelatina por espectrofotometria ultravioleta (UV). **Visão Acadêmica**, v. 8, n. 2, p. 1518–5192, 2007.
- 63 RIBEIRO, M.V.M.; MELO, I.S.; et al. Development and validation of a method for the determination of folic acid in different pharmaceutical formulations using derivative spectrophotometry. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 52, n. 4, p. 741–750, 2016.
- 64 RIBANI, M.; BOTTOLI, C.B.G.; et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771–780, 2004.
- 65 CURRIE, L.A. International Recommendations Offered on Analytical Detection and Quantification Concepts and Nomenclature: Preamble, in Validation of Analytical Methods. **Analytica Chimica Acta**, v. 391, p. 103–134, 1999.
- 66 ABIC - Associação Brasileira da Indústria de Café. Disponível em: <<http://abic.com.br/estatisticas/exportacoes/exportacao-brasileira-de-cafe-em-graos/>>. Acesso em: 19/12/2017.
- 67 CEFAFÉ - Conselho dos Exportadores de Café do Brasil. Disponível em: <<http://www.cecafe.com.br/dados-estatisticos/exportacoes-brasileiras/>>. Acesso em: 19/12/2017.
- 68 TAVARES, K.M. **Deteção de adulteração em café riado torrado e moído por espectroscopia no infravermelho e análise sensorial**. 2012. Dissertação (Mestrado em Ciências de Alimentos), Universidade Federal de Lavras, Lavras.
- 69 BESSA, F.;TADEU, L. **Café é a segunda bebida mais consumida no Brasil**. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/2574254/cafe-e-a-segunda-bebida-mais-consumida-no-brasil>>. Acesso em: 1/2/2018.
- 70 ICO - International Coffee Organization. Disponível em: <<http://www.ico.org/>>. Acesso em: 1/2/2018.
- 71 FERREIRA, L.T.; SANTOS, J.; AIACHE, E. **Produção mundial de café do ano-safra 2016/17 contabiliza 154 milhões de sacas**. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/26030763/producao-mundial-de-cafe-do-ano-safra-201617-contabiliza-154-milhoes-de-sacas>>. Acesso em: 1/2/2018.
- 72 CLARKE, R.J.; MACRAE, R. **Coffee Chemistry**. London, UK: Elsevier Applied Science Publishers, 1985.
- 73 MONAKHOVA, Y.B.; RUGE, W.; et al. Rapid approach to identify the presence of Arabica and Robusta species in coffee using ¹H NMR spectroscopy. **Food Chemistry**, v. 182, p. 178–184, 2015.

- 74 NASSER, P. **As principais regiões produtoras de café do Brasil**. Disponível em: <<http://www.mexidodeideias.com.br/industria/as-principais-regioes-produtoras-de-cafe-do-brasil/>>. Acesso em: 1/2/2018.
- 75 TOCI, A.T.; RIBEIRO, M.V.M.; et al. Fingerprint and authenticity roasted coffees by ¹H-NMR: the Brazilian coffee case. **Food Science and Biotechnology**, v. 27, n. 1, p. 19–26, 2018.
- 76 RIBEIRO, M.V.M.; BORALLE, N.; et al. Authenticity of roasted coffee using ¹H NMR spectroscopy. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 57, p. 24–30, 2017.
- 77 THOMAZIELLO, R.A. **A classificação do café**. Disponível em: <<http://revistacafeicultura.com.br/?mat=55115>>. Acesso em: 2/2/2018.
- 78 MARTINEZ, H.E.P.; CLEMENTE, J.M.; et al. Nutrição mineral do cafeeiro e qualidade da bebida. **Revista Ceres**, v. 61, n. suppl, p. 838–848, 2014.
- 79 RISTICEVIC, S.; CARASEK, E.; et al. Headspace solid-phase microextraction–gas chromatographic–time-of-flight mass spectrometric methodology for geographical origin verification of coffee. **Analytica Chimica Acta**, v. 617, n. 1–2, p. 72–84, 2008.
- 80 FREITAS, A.M.C.; PARREIRA, C.; et al. The Use of an Electronic Aroma-sensing Device to Assess Coffee Differentiation—Comparison with SPME Gas Chromatography–Mass Spectrometry Aroma Patterns. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 14, n. 5, p. 513–522, 2001.
- 81 KNYSAK, D. Volatile compounds profiles in unroasted *Coffea arabica* and *Coffea canephora* beans from different countries. **Food Science and Technology**, v. 37, n. 3, p. 444–448, 2017.
- 82 TOLEDO, P.R.A.B.; PEZZA, L.; et al. Relationship Between the Different Aspects Related to Coffee Quality and Their Volatile Compounds. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 15, n. 4, p. 705–719, 2016.
- 83 OLIVEIRA, R.C.S.; OLIVEIRA, L.S.; et al. Evaluation of the potential of SPME-GC-MS and chemometrics to detect adulteration of ground roasted coffee with roasted barley. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 22, n. 3, p. 257–261, 2009.
- 84 RIBEIRO, B.B.; MENDONÇA, L.L.; et al. Parâmetros qualitativos do café provenientes de diferentes processamentos na pós-colheita. **Revista Agrarian**, v. 4, n. 14, p. 273–279, 2011.
- 85 ILLY, A.; VIANI, R. **Espresso coffee: the science of quality**. Italy: Elsevier Academic Press, 2005.
- 86 MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Disponível em: <http://www.mpsp.mp.br/portal/page/portal/cao_consumidor/legislacao/leg_produtos_humanos/IN-16-2010-MAPA.pdf>. Acesso em: 3/2/2018
- 87 TOCI, A.T.; FARAH, A.; et al. Coffee Adulteration: More than Two Decades of Research. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 46, n. 2, p. 83–92, 2016.
- 88 TOCI, A.T.; FARAH, A. Volatile fingerprint of Brazilian defective coffee seeds: corroboration of potential marker compounds and identification of new low quality indicators. **Food Chemistry**, v. 153, p. 298–314, 2014.

- 89 TOCI, A.T.; FARAH, A. Volatile compounds as potential defective coffee beans' markers. **Food Chemistry**, v. 108, n. 3, p. 1133–1141, 2008.
- 90 BANDEIRA, R.D.C.C.; TOCI, A.T.; et al. Composição volátil dos defeitos intrínsecos do café por CG/EM-headspace. **Química Nova**, v. 32, n. 2, p. 309–314, 2009.
- 91 FARAH, A.; MONTEIRO, M.C.; et al. Correlation between cup quality and chemical attributes of Brazilian coffee. **Food Chemistry**, v. 98, n. 2, p. 373–380, 2006.
- 92 FRANCA, A.S.; OLIVEIRA, L.S.; et al. Physical and chemical attributes of defective crude and roasted coffee beans. **Food Chemistry**, v. 90, n. 1–2, p. 89–94, 2005.
- 93 FERRAZ, M.B.M.; FARAH, A.; et al. Kinetics of ochratoxin A destruction during coffee roasting. **Food Control**, v. 21, n. 6, p. 872–877, 2010.
- 94 GIL-SERNA, J.; GONZÁLEZ-SALGADO, A.; et al. ITS-based detection and quantification of *Aspergillus ochraceus* and *Aspergillus westerdijkiae* in grapes and green coffee beans by real-time quantitative PCR. **International Journal of Food Microbiology**, v. 131, n. 2–3, p. 162–167, 2009.
- 95 PIMENTA, C.J.; VILELA, E.R. Composição microbiana e ocratoxina a no café (*Coffea arabica* L.) submetido a diferentes tempos de espera antes da secagem. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 27, n. 6, p. 1315–1320, 2003.
- 96 SHEARS, P. Food fraud – a current issue but an old problem. **British Food Journal**, v. 112, n. 2, p. 198–213, 2010.
- 97 CAI, T.; TING, H.; et al. Novel identification strategy for ground coffee adulteration based on UPLC–HRMS oligosaccharide profiling. **Food Chemistry**, v. 190, p. 1046–1049, 2016.
- 98 TAVARES, K.M.; PEREIRA, R.G.F.A.; et al. Espectroscopia no infravermelho médio e análise sensorial aplicada à detecção de adulteração de cafés torrado por adição de cascas de café **Química Nova**, v. 35, n. 6, p. 1164–1168, 2012.
- 99 PAULI, E.D.; BARBIERI, F.; et al. Detection of ground roasted coffee adulteration with roasted soybean and wheat. **Food Research International**, v. 61, p. 112–119, 2014.
- 100 CAGLIANI, L.R.; PELLEGRINO, G.; et al. Quantification of *Coffea arabica* and *Coffea canephora* var. *robusta* in roasted and ground coffee blends. **Talanta**, v. 106, p. 169–173, 2013.
- 101 ALVES, R.C.; CASAL, S.; et al. Discrimination between arabica and robusta coffee species on the basis of their tocopherol profiles. **Food Chemistry**, v. 114, n. 1, p. 295–299, 2009.
- 102 GONZÁLEZ, A.G.; PABLOS, F.; et al. HPLC analysis of tocopherols and triglycerides in coffee and their use as authentication parameters. **Food Chemistry**, v. 73, n. 1, p. 93–101, 2001.
- 103 GARRETT, R.; VAZ, B.G.; et al. Arabica and Robusta Coffees: Identification of Major Polar Compounds and Quantification of Blends by Direct-Infusion Electrospray Ionization–Mass Spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 17, p. 4253–4258, 2012.
- 104 PIZARRO, C.; ESTEBAN-DÍEZ, I.; et al. Mixture resolution according to the

percentage of robusta variety in order to detect adulteration in roasted coffee by near infrared spectroscopy. **Analytica Chimica Acta**, v. 585, n. 2, p. 266–276, 2007.

105 BRIANDET, R.; KEMSLEY, E.K.; et al. Discrimination of *Arabica* and *Robusta* in Instant Coffee by Fourier Transform Infrared Spectroscopy and Chemometrics. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, n. 1, p. 170–174, 1996.

106 SPANIOLAS, S.; MAY, S.T.; et al. Authentication of Coffee by Means of PCR-RFLP Analysis and Lab-on-a-Chip Capillary Electrophoresis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 20, p. 7466–7470, 2006.

107 EL-ABASSY, R.M.; DONFACK, P.; et al. Discrimination between Arabica and Robusta green coffee using visible micro Raman spectroscopy and chemometric analysis. **Food Chemistry**, v. 126, n. 3, p. 1443–1448, 2011.

108 ASSAD, E.D.; SANO, E.E.; et al. Identificação de impurezas e misturas em pó de café por meio de comportamento espectral e análise de imagens digitais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 37, n. 2, p. 211–216, 2002.

109 MENEZES Jr, J.B.F.; BICUDO, B.A.A. Sobre um método microscópico para contagem de cascas no café em pó. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 11, n. 1–2, p. 13–48, 1951.

110 WINKLER-MOSER, J.K.; SINGH, M.; et al. Detection of Corn Adulteration in Brazilian Coffee (*Coffea arabica*) by Tocopherol Profiling and Near-Infrared (NIR) Spectroscopy. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, n. 49, p. 10662–10668, 2015.

111 DOMINGUES, D.S.; PAULI, E.D.; et al. Detection of roasted and ground coffee adulteration by HPLC by amperometric and by post-column derivatization UV-Vis detection. **Food Chemistry**, v. 146, p. 353–362, 2014.

112 TAVARES, K.M.; LIMA, A.R.; et al. Free tocopherols as chemical markers for Arabica coffee adulteration with maize and coffee by-products. **Food Control**, v. 70, p. 318–324, 2016.

113 CORREIA, R.M.; TOSATO, F.; et al. Portable near infrared spectroscopy applied to quality control of Brazilian coffee. **Talanta**, v. 176, p. 59–68, 2018.

114 REIS, N.; FRANCA, A.S.; et al. Discrimination between roasted coffee, roasted corn and coffee husks by Diffuse Reflectance Infrared Fourier Transform Spectroscopy. **LWT - Food Science and Technology**, v. 50, n. 2, p. 715–722, 2013.

115 EBRAHIMI-NAJAFABADI, H.; LEARDI, R.; et al. Detection of addition of barley to coffee using near infrared spectroscopy and chemometric techniques. **Talanta**, v. 99, p. 175–179, 2012.

116 REIS, N.; FRANCA, A.S.; et al. Quantitative evaluation of multiple adulterants in roasted coffee by Diffuse Reflectance Infrared Fourier Transform Spectroscopy (DRIFTS) and chemometrics. **Talanta**, v. 115, p. 563–568, 2013.

117 LACHENMEIER, D.W.; FRANK, W.; et al. Quality control of beer using high-resolution nuclear magnetic resonance spectroscopy and multivariate analysis. **European Food Research and Technology**, v. 220, n. 2, p. 215–221, 2005.

118 ERIKSON, U.; STANDAL, I.B.; et al. Use of NMR in fish processing optimization: a

- review of recent progress. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 50, n. 7, p. 471–480, 2012.
- 119 TZOUROS, N.E.; Arvanitoyannis, I.S. Agricultural Produces: Synopsis of Employed Quality Control Methods for the Authentication of Foods and Application of Chemometrics for the Classification of Foods According to Their Variety or Geographical Origin. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 41, n. 4, p. 287–319, 2001.
- 120 GIL, A.M.; DUARTE, I.F.; et al. Characterization of the aromatic composition of some liquid foods by nuclear magnetic resonance spectrometry and liquid chromatography with nuclear magnetic resonance and mass spectrometric detection. **Analytica Chimica Acta**, v. 488, n. 1, p. 35–51, 2003.
- 121 LOLLI, M.; BERTELLI, D.; et al. Classification of Italian Honeys by 2D HR-NMR. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 4, p. 1298–1304, 2008.
- 122 DEFERNEZ, M.; COLQUHOUN, I.J. Factors affecting the robustness of metabolite fingerprinting using ¹H NMR spectra. **Phytochemistry**, v. 62, n. 6, p. 1009–17, 2003.
- 123 SCAA - Specialty Coffee Association of America. Disponível em: <<http://www.scaa.org/?page=resources%26d=cupping-protocols/>>. Acesso em: 16/2/2018.
- 124 DIRINCK, M.; VAN LEUVEN, I. V.; DIRINCK, J.P. **Analytical flavour characterisation and classification of arabica and robusta coffees from different origins**. Disponível em: <<http://asic-cafe.org/content/analytical-flavour-characterisation-and-classification-arabica-and-robusta-coffees-different>>. Acesso em: 20/12/2017
- 125 MONDELLO, L.; COSTA, R.; et al. Reliable characterization of coffee bean aroma profiles by automated headspace solid phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry with the support of a dual-filter mass spectra library. **Journal of separation science**, v. 28, n. 9–10, p. 1101–9, 2005.
- 126 COSTA FREITAS, A.; MOSCA, A. Coffee geographic origin — an aid to coffee differentiation. **Food Research International**, v. 32, n. 8, p. 565–573, 1999.
- 127 MAZZAFERA, P. Chemical composition of defective coffee beans. **Food Chemistry**, v. 64, n. 4, p. 547–554, 1999.
- 128 TOCI, A.; FARAH, A.; et al. Efeito do processo de descafeinação com diclorometano sobre a composição química dos cafés arábica e robusta antes e após a torração. **Química Nova**, v. 29, n. 5, p. 965–971, 2006.
- 129 WEI, F.; FURIHATA, K.; et al. ¹³C NMR-Based Metabolomics for the Classification of Green Coffee Beans According to Variety and Origin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 40, p. 10118–10125, 2012.
- 130 WEI, F.; FURIHATA, K.; et al. Two-Dimensional ¹H–¹³C Nuclear Magnetic Resonance (NMR)-Based Comprehensive Analysis of Roasted Coffee Bean Extract. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 17, p. 9065–9073, 2011.
- 131 TRUGO, L.C.; MACRAE, R. Chlorogenic acid composition of instant coffees. **The Analyst**, v. 109, n. 3, p. 263, 1984.
- 132 VASCONCELOS, A.L.S.; FRANCA, A.S.; et al. A comparative study of chemical attributes and levels of amines in defective green and roasted coffee beans. **Food Chemistry**, v. 101, n. 1, p. 26–32, 2007.

- 133 SPEER, K.; KÖLLING-SPEER, I. The lipid fraction of the coffee bean. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 18, n. 1, p. 201–216, 2006.
- 134 RAHMAN, A.; CHOUDHARY, M.I. **Solving problems with NMR spectroscopy**. Academic Press, 1996.
- 135 RIBEIRO, M.V.M.; PEZZA, H.R.; PEZZA, L.; TOCI, A.T. **Evaluation of authenticity by H NMR of brazilian commercial coffee blends**. Disponível em: <<http://www.s bq.org.br/38ra/cdrom/resumos/T0995-1.pdf>>. Acesso em: 22/2/2018..
- 136 GUO, F.; SHAO, J.; et al. Automated and sensitive determination of four anabolic androgenic steroids in urine by online turbulent flow solid-phase extraction coupled with liquid chromatography–tandem mass spectrometry: A novel approach for clinical monitoring and doping control. **Talanta**, v. 125, p. 432–438, 2014.
- 137 DESHMUKH, N.; HUSSAIN, I.; et al. Analysis of anabolic steroids in human hair using LC–MS/MS. **Steroids**, v. 75, n. 10, p. 710–714, 2010.
- 138 CARTAS, S.T.; ALVAREZ-COQUE, M.C.G.; et al. Determination of anabolic steroids in pharmaceuticals by liquid chromatography with a microemulsion of sodium dodecyl sulfate and pentanol as mobile phase. **Analytica Chimica Acta**, v. 302, n. 2–3, p. 163–172, 1995.
- 139 CARMO, E.C.; BUENO Jr, C.R.; et al. O papel do esteroide anabolizante sobre a hipertrofia e força muscular em treinamentos de resistência aeróbia e de força. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 17, n. 3, p. 212–217, 2011.
- 140 CASAVANT, M.J.; BLAKE, K.; et al. Consequences of Use of Anabolic Androgenic Steroids. **Pediatric Clinics of North America**, v. 54, n. 4, p. 677–690, 2007.
- 141 ROCHA, F.L.; ROQUE, F.R.; et al. Esteróides anabolizantes : mecanismos de ação e efeitos sobre o sistema cardiovascular. **O Mundo da Saúde**, v. 31, n. 4, p. 470–477, 2007.
- 142 NEVES, D.B.J. **Avaliação das falsificações e adulterações de medicamentos e suplementos alimentares com esteroides anabolizantes e cafeína, e desenvolvimento de métodos analíticos**. 2016. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas), Universidade de Brasília, Brasília.
- 143 SILVA, P.R.P.; DANIELSKI, R.; et al. Esteróides anabolizantes no esporte. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 8, n. 6, p. 235–243, 2002.
- 144 SENDON, M. **Tabela de Esteróides e Anabolizantes**. Disponível em: <<https://dicasdemusculacao.com.br/tabela-esteroides-anabolizantes/>>. Acesso em: 24/2/2018.
- 145 CUNHA, T.S.; CUNHA, N.S.; et al. Esteróides anabólicos androgênicos e sua relação com a prática desportiva. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 40, n. 2, p. 165–179, 2004.
- 146 MOORADIAN, A.D.; MORLEY, J.E.; et al. Biological Actions of Androgens. **Endocrine Reviews**, v. 8, n. 1, p. 1–28, 1987.
- 147 SHAHIDI, N.T. A review of the chemistry, biological action, and clinical applications of anabolic-androgenic steroids. **Clinical Therapeutics**, v. 23, n. 9, p. 1355–1390, 2001.
- 148 KICMAN, A.T. Pharmacology of anabolic steroids. **British Journal of Pharmacology**, v. 154, n. 3, p. 502–521, 2008.

- 149 LISE, M.L.Z.; SILVA, T.S.G.; et al. O abuso de esteróides anabólico-androgênicos em atletismo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 45, n. 4, p. 364–370, 1999.
- 150 MATOS, A.P. **Perigo! Um bomba chama anabolizante**. Disponível em: <http://www.cff.org.br/sistemas/geral/revista/pdf/124/057a060_anabolizantes.pdf>. Acesso em: 24/2/2018.
- 151 DUBOSE, M.M. Criminal Enforcement of Intellectual Property Laws in the Twenty-First Century. **Columbia Journal of Law & the Arts**, v. 29, p. 481, 2005.
- 152 ABRAHIN, O.; FÉLIX SOUZA, N.S.; et al. Anabolic–androgenic steroid use among Brazilian women: an exploratory investigation. **Journal of Substance Use**, v. 22, n. 3, p. 246–252, 2017.
- 153 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 Science International**, v. 275, p. 272–281, 2017.
- 154 JUSTA NEVES, D.B.; MARCHETI, R.G.A.; et al. Incidence of anabolic steroid counterfeiting in Brazil. **Forensic Science International**, v. 228, n. 1–3, p. 81–83, 2013.
- 155 CORTES, P.N.S. **Contrafacção na indústria farmacêutica**. 2011. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Universidade Fernando Pessoa, Porto.
- 156 COSTA, C.R.A. **Falsificação de medicamentos: um breve panorama e estudo de caso**. 2016. Trabalho de Conclusão de Curso (Especialização em Vigilância Sanitária), Fundação Oswaldo Cruz.
- 157 LUIZA, V.L., OLIVEIRA, M.A., et al. Pharmaceutical Policy in Brazil. In: **Pharmaceutical Policy in Countries with Developing Healthcare Systems**. Cham: Springer International Publishing, 2017, p. 123–149.
- 158 BANCROFT, A.; REID, P.S. Concepts of illicit drug quality among darknet market users: Purity, embodied experience, craft and chemical knowledge. **International Journal of Drug Policy**, v. 35, p. 42–49, 2016.
- 159 PROKUDINA, E.; PRCHALOVÁ, J.; et al. Analysis of anabolic androgenic steroids by direct analysis in real time ionization with time-of-flight mass spectrometry. **International Journal of Mass Spectrometry**, v. 392, p. 28–33, 2015.
- 160 BRITO, D.; NEVES, J.; et al. Title: GC-MS quantitative analysis of black market pharmaceutical products containing anabolic androgenic steroids seized by the Brazilian Federal Police GC-MS quantitative analysis of black market pharmaceutical products containing anabolic androgenic st. **Forensic Science International**, v. 275, p. 272–281, 2017.
- 161 CHO, S.H.; PARK, H.J.; et al. Determination of anabolic-androgenic steroid adulterants in counterfeit drugs by UHPLC-MS/MS. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 111, p. 138–146, 2015.
- 162 OSTA, R. E.; ALMONT, T.; et al. Anabolic steroids abuse and male infertility. **Basic and Clinical Andrology**, v. 26, n. 1, p. 2, 2016.
- 163 LINDON, J.C.; TRANTER, G.E.; et al. **Encyclopedia of spectroscopy and spectrometry**. Academic Press, 2016.
- 164 ELDER, D.P.; HOLM, R. Analytical advances in pharmaceutical impurity profiling.

European Journal of Pharmaceutical Sciences, v. 87, p. 118–135, 2016.

165 LUO, G.; LI, Y.; et al. Development and application of a high-throughput sample cleanup process based on 96-well plate for simultaneous determination of 16 steroids in biological matrices using liquid chromatography–triple quadrupole mass spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 408, n. 4, p. 1137–1149, 2016.

166 CUSTERS, D.; CANFYN, M.; et al. Headspace–gas chromatographic fingerprints to discriminate and classify counterfeit medicines. **Talanta**, v. 123, p. 78–88, 2014.

167 COCK, K.J.S.; DELBEKE, F.T.; et al. Detection and determination of anabolic steroids in nutritional supplements. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 25, n. 5–6, p. 843–852, 2001.

168 MARQUES, M.A.S.; PEREIRA, H.M.G.; et al. Improvements in steroid screening in doping control with special emphasis to GC-MS analytical conditions and method validation. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 17, n. 2, p. 382–392, 2006.

169 KOESDJOJO, M.T.; WU, Y.; et al. Low-cost, high-speed identification of counterfeit antimalarial drugs on paper. **Talanta**, v. 130, p. 122–127, 2014.

170 GREEN, M.D.; NETTEY, H.; et al. Use of refractometry and colorimetry as field methods to rapidly assess antimalarial drug quality. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 43, n. 1, p. 105–110, 2007.

171 MADRAKIAN, T.; AFKHAMI, A.; et al. Preconcentration and spectrophotometric determination of oxymetholone in the presence of its main metabolite (mestanolone) using modified maghemite nanoparticles in urine sample. **Talanta**, v. 115, p. 468–473, 2013.

172 NEUBERGER, S.; NEUSÜß, C. Determination of counterfeit medicines by Raman spectroscopy: Systematic study based on a large set of model tablets. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 112, p. 70–78, 2015.

173 LU, F.; WENG, X.; ET AL. A novel identification system for counterfeit drugs based on portable Raman spectroscopy. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 127, p. 63–69, 2013.

174 MONAKHOVA, Y.B.; LACHENMEIER, D.W.; et al. Standardless multicomponent qNMR analysis of compounds with overlapped resonances based on the combination of ICA and PULCON. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 53, n. 10, p. 821–828, 2015.

175 THEVIS, M.; SCHRADER, Y.; et al. Analysis of Confiscated Black Market Drugs Using Chromatographic and Mass Spectrometric Approaches. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 32, n. 3, p. 232–240, 2008.

176 PELLEGRINI, M.; ROTOLO, M.C.; et al. A simple toxicological analysis of anabolic steroid preparations from the black market. **Annales de Toxicologie Analytique**, v. 24, n. 2, p. 67–72, 2012.

177 PELLEGRINIA, M.; ROTOLO, M.C.; et al. Non-allowed Pharmacologically Active Substances in Physical and Sexual Performance Enhancing Products. **Current neuropharmacology**, v. 15, n. 5, p. 724–730, 2017.

178 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**, v. 115, p. 34–39, 2016.
- 179 POZO, O.; EENOO, P.; et al. Detection and characterization of anabolic steroids in doping analysis by LC-MS. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 27, n. 8, p. 657–671, 2008.
- 180 USP - United States Pharmacopeia. Disponível em: <<http://www.usp.org/>>. Acesso em: 27/12/2017 181 **The British Pharmacopeia**. London, UK: British Pharmacopeia Commission, 2013.
- 182 EVERETT, J.R.; HARRIS, R.K.; et al. **NMR in pharmaceutical sciences**. 2015.
- 183 LIU, J.; LIU, Y.; et al. Structural and Quantitative Analysis of Three C-Glycosylflavones by Variable Temperature Proton Quantitative Nuclear Magnetic Resonance. **Journal of Analytical Methods in Chemistry**, v. 2017, p. 1–5, 2017.
- 184 MESMER, M.Z.; SATZGER, R.D. Determination of Anabolic Steroids by HPLC with UV-Vis-Particle Beam Mass Spectrometry. **Journal of Chromatographic Science**, v. 35, n. 1, p. 38–42, 1997.
- 185 BASAVESWARA RAO, M. V; NAGENDRAKUMAR, A.V.D. RP-HPLC method development and validation of stanzolol for analysis of tablets dosage form. **International Journal of Research and Reviews in Pharmacy and Applied Sciences**, v. 1, n. 3, p. 153–165, 2011.
- 186 HOFFMAN, J.R.; KRAEMER, W.J.; et al. Position Stand on Androgen and Human Growth Hormone Use. **Journal of Strength and Conditioning Research**, v. 23, n. 5 Suppl, p. S1–S59, 2009.
- 185 **Oxandrolone**. Disponível em: <<https://www.steroidal.com/steroid-profiles/oxandrolone/>>. Acesso em: 26/2/2018.
- 188 OLIVEIRA, T.S.; AGUIAR, É. de F.; et al. Anabolizantes em bovinos: Impactos sobre o crescimento, características de carcaça e segurança alimentar. **Publicações em Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 3, n. 26, p. 1–15, 2009.
- 189 LLEWELLYN, W. **Dianabol (metandrostenolona)**. Disponível em: <<https://anabolic.org/dianabol-methandrostenolone/>>. Acesso em: 27/2/2018.
- 190 FELDKOREN, B.I.; ANDERSSON, S. Anabolic-androgenic steroid interaction with rat androgen receptor in vivo and in vitro: A comparative study. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 94, n. 5, p. 481–487, 2005.
- 191 MARKEN LICHTENBELT, W.D.V.; HARTGENS, F.; et al. Bodybuilders' body composition: effect of nandrolone decanoate. **Medicine and science in sports and exercise**, v. 36, n. 3, p. 484–9, 2004.
- 192 **Testosterone Cypionate**. Disponível em: <<https://www.drugs.com/pro/testosterone-cypionate.html>>. Acesso em: 28/2/2018.
- 193 TRAMS, G. Effect of drostanolone propionate on the binding of oestradiol and dihydrotestosterone by normal and malignant target tissues. **European Journal of Cancer (1965)**, v. 13, n. 2, p. 149–153, 1977.
- 194 PAVLATOS, A.M.; FULTZ, O.; et al. Review of oxymetholone: a 17 α -alkylated anabolic-androgenic steroid. **Clinical Therapeutics**, v. 23, n. 6, p. 789–801, 2001.

- 195 TEUBNER, A.; MÜLLER, K.; et al. Effects of an anabolic steroid (Durateston) on testicular angiogenesis in peripubertal stallions. **Theriogenology**, v. 84, n. 3, p. 323–332, 2015.
- 196 SANTO, F.Z.D.E. **Estanozolol : Uma Revisão De Literatura**. 2006. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Educação Física), Universidade do Estado de Santa Catarina, Florianópolis.
- 197 OLIVEIRA, E.C.S. **Estudo de Agregação em Asfaltenos por Ressonância Magnética Nuclear de Alto Campo**. 2013. Dissertação (Mestrado em Química), Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória.
- 198 SOUZA, A.A.; LAVERDE Jr., A. Aplicação da espectroscopia de ressonância magnética nuclear para estudos de difusão molecular em líquidos: a técnica DOSY. **Química Nova**, v. 25, n. 6a, p. 1022–1026, 2002.
- 199 HOLZGRABE, U.; MALET-MARTINO, M. Analytical challenges in drug counterfeiting and falsification—The NMR approach. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 55, n. 4, p. 679–687, 2011.
- 200 BEKIROGLU, S.; MYRBERG, O.; et al. Validation of a quantitative NMR method for suspected counterfeit products exemplified on determination of benzethonium chloride in grapefruit seed extracts. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 47, n. 4–5, p. 958–961, 2008.
- 201 DE CARVALHO, J. M.; MAIA, G. A.; et al. Perfil dos principais componentes em bebidas energéticas: cafeína, taurina, guaraná e glucoronolactona Major compounds profiles in energetic drinks: caffeine, taurine, guarana, and glucoronolactone. **Rev Inst Adolfo Lutz**, v. 65, n. 2, p. 78–85, 2006.
- 202 ANVISA. **Portaria nº 868, de 3 de Novembro de 1998**. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/33916/394219/PORTARIA_868_1998.pdf/a85e6878-9df9-4118-82c0-7bfa586f71e9>. Acesso em: 6/3/2018
- 203 OSCAR, N. **Consumo de bebidas energéticas cresce 325%**. Disponível em: <<http://economia.estadao.com.br/noticias/geral,consumo-de-bebidas-energeticas-cresce-325-imp-,681566>>. Acesso em: 6/3/2018.
- 204 CANGANI, A.P. **Desenvolvimento, otimização e validação de método para determinação simultânea de cafeína e taurina em bebidas energéticas por eletroforese capilar**. 2015. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos), Universidade de Campinas, Campinas.
- 205 GOMES, M.F.M. **Bebidas energéticas: o seu uso em crianças e adolescentes**. Dissertação (Mestrado em Medicina), Universidade do Porto, Porto.
- 206 **Dossiê bebidas energéticas**. Disponível em: <www.revista-fi.com>. Acesso em: 6/3/2018
- 207 PULCHERIO, G. Bebidas energéticas – uso indiscriminado? **Revista da AMRIGS**, v. 54, n. 3, 2010.
- 208 CARMEN BALLISTRERI, M.; MENDONÇA CORRADI-WEBSTER, C. O uso de bebidas energéticas entre estudantes de educação física. **Revista Latino-Americana de Enfermagem**, v. 16, 2008.

- 209 SANTOS, I.; SOUZA, A.; et al. Análise de composição química de bebidas energéticas em comparação com a rotulagem nutricional e legislações vigentes. **Revista Brasileira de Nutrição Esportiva**, v. 11, n. 63, p. 312–320, 2017.
- 210 FRANCO, R.; OÑATIBIA-ASTIBIA, A.; et al. Health benefits of methylxanthines in cacao and chocolate. **Nutrients**, v. 5, n. 10, p. 4159–73, 2013.
- 211 FOGAÇA, J.R.V. **Cafeína**. Disponível em: <<http://alunosonline.uol.com.br/quimica/cafeina.html>>. Acesso em: 7/3/2018.
- 212 ALTIMARI, L.R.; CYRINO, E.S.; et al. Efeitos ergogênicos da cafeína sobre o desempenho físico. **Revista Paulista de Educação Física**, v. 14, n. 2, p. 141–158, 2000.
- 213 MYERS, M.G. Cardiovascular Effects of Caffeine: Misconceptions about caffeine use and coronary heart disease. **Canadian family physician Medecin de famille canadien**, v. 38, p. 1459–62, 1992.
- 214 OLIVEIRA, C. DOS S.; ALVES, R.C.; et al. Efeitos da suplementação de cafeína no desempenho, percepção subjetiva do esforço e percepção de dor durante o treinamento de força: uma revisão. **Revista Brasileira de Prescrição e Fisiologia do Exercício**, v. 11, n. 71, p. 967–972, 2018.
- 215 PEREIRA, J.C.; SILVA, R.G.; et al. Effect of taurine intake on physical performance: a systematic review. **Rev Andal Med Deporte**, v. 5, n. 4, p. 156–162, 2012.
- 216 LEITE, P. **Taurina: O Que é, Para Que Serve e Efeitos Colaterais**. Disponível em: <<http://www.mundoboforma.com.br/taurina-o-que-e-para-que-serve-e-efeitos-colaterais/>>. Acesso em: 7/3/2018
- 217 RIPPS, H.; SHEN, W. Review: Taurine: A “very essential” amino acid. **Molecular vision**, v. 18, p. 2673–86, 2012.
- 218 BERGER, A.J.; ALFORD, K. Cardiac arrest in a young man following excess consumption of caffeinated “energy drinks”; **The Medical journal of Australia**, v. 190, n. 1, p. 41–3, 2009.
- 219 SHIMAMOTO, G.G.; BIANCHETTI, L.F.; et al. Alternative method to quantify biodiesel and vegetable oil in diesel-biodiesel blends through ¹H NMR spectroscopy. **Talanta**, v. 168, p. 121–125, 2017.
- 220 DRAGANOV, G.B.; PENCHEVA, I.P.; et al. UV-spectrophotometry determination of taurine in energy drink mixtures. **International Journal of Nutrition and Food Sciences**, v. 3, n. 2, p. 123–126, 2014.
- 221 LEACOCK, R.E.; STANKUS, J.J.; et al. Simultaneous Determination of Caffeine and Vitamin B6 in Energy Drinks by High-Performance Liquid Chromatography (HPLC). **Journal of Chemical Education**, v. 88, n. 2, p. 232–234, 2011.
- 222 ARMENTA, S.; GARRIGUES, S.; et al. Solid-phase FT-Raman determination of caffeine in energy drinks. **Analytica Chimica Acta**, v. 547, n. 2, p. 197–203, 2005.
- 223 MCCONN, B. Determination of taurine in energy drinks by high-performance liquid chromatography. **Concordia College Journal of Analytical Chemistry**, v. 3, p. 47–52, 2012.
- 224 ARANDA, M.; MORLOCK, G. Simultaneous determination of riboflavin, pyridoxine, nicotinamide, caffeine and taurine in energy drinks by planar chromatography-multiple

detection with confirmation by electrospray ionization mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1131, n. 1–2, p. 253–260, 2006.

225 RAI, K.P.; RAI, H.B.; et al. Determination of Caffeine and Taurine Contents in Energy Drinks by HPLC-UV. **Journal of Food Science and Technology Nepal**, v. 9, n. 0, p. 66, 2016.

226 HOHMANN, M.; FELBINGER, C.; et al. Quantification of taurine in energy drinks using ^1H NMR. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 93, p. 156–160, 2014.

227 VOCHYÁNOVÁ, B.; OPEKAR, F.; et al. Simultaneous and rapid determination of caffeine and taurine in energy drinks by MEKC in a short capillary with dual contactless conductivity/photometry detection. **Electrophoresis**, v. 35, n. 11, p. 1660–1665, 2014.

228 GÖTZ, S.; REVERMANN, T.; et al. Quantitative on-chip determination of taurine in energy and sports drinks. **Lab Chip**, v. 7, n. 1, p. 93–97, 2007.

229 ZHAO, F.; WANG, F.; et al. Voltammetric sensor for caffeine based on a glassy carbon electrode modified with Nafion and graphene oxide. **Microchim Acta**, v. 174, p. 383–390, 2011.

230 SAAD, R.; BUSTAN, H. Validation and Determination of Caffeine Contents in Energy Drinks Available on the Iraqi Market by Using High Performance Liquid Chromatography (HPLC). **International Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Research**, v. 6, n. 61, p. 181–194, 2016.

231 BUCKINGHAM, D.; CLARK, C.; et al. The Acidity of Norfloxacin. **Australian Journal of Chemistry**, v. 43, n. 2, p. 301, 1990.

232 LI, X.; HU, K. Quantitative NMR Studies of Multiple Compound Mixtures. **Annual Reports on NMR Spectroscopy**, v. 90, p. 85–143, 2017.