



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Diana Isabel Coimbra da Silva

**VIGILÂNCIA DE SUPLEMENTOS ALIMENTARES
DESPORTIVOS POR GC-MS**

Dissertação no âmbito do Mestrado em Química Forense orientada pela
Professora Doutora Maria Elisa Silva Serra e apresentada ao Departamento de
Química da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra

Junho de 2021

Faculdade de Ciências e Tecnologia
da Universidade de Coimbra

VIGILÂNCIA DE SUPLEMENTOS ALIMENTARES DESPORTIVOS POR GC-MS

Diana Isabel Coimbra da Silva

Dissertação no âmbito do Mestrado em Química Forense orientada pela Professora Doutora
Maria Elisa Silva Serra e apresentada ao Departamento de Química da Faculdade de Ciências e
Tecnologia da Universidade de Coimbra

Junho de 2021



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

“There’s just no substitute for the truth” – *Dan Brown (Perception Point)*

Agradecimentos

Dizem que a “idade dos porquês” surge entre os 3 e os 4 anos de idade, mas acaba por desaparecer eventualmente. No meu caso, sinto que surgiu bem cedo, mas nunca terminou. Talvez esta procura incessante pelo saber tenha sido o principal ponto de partida para o meu percurso académico. E nenhuma ciência faz tantas questões, procura tantas pistas e procura perceber como tudo aconteceu como as ciências forenses. Mas como todos sabemos, nem mesmo no CSI em que 1 elemento faz mais de 10 análises de diferentes áreas, se consegue chegar ao objetivo final sozinho. Por esta razão, presto aqui os devidos agradecimentos a todos aqueles que me acompanharam neste longo percurso, pois sem a vossa marca não teria sido possível fazer este trabalho.

À Professora Doutora Maria Ermelinda Eusébio agradeço por ter acreditado em mim e ter dado a oportunidade de propor o meu tema.

À Professora Doutora Elisa Serra, um agradecimento muito especial por toda a orientação ao longo destes meses, pela ajuda prestada sempre que solicitada e pela confiança que depositou em mim ao permitir que fosse autónoma no meu trabalho. Sinto que cresci muito a nível pessoal e profissional consigo.

À Doutora Sílvia Gamacho pelo conhecimento transmitido, pelas dúvidas que me esclareceu e pelo apoio na execução do meu trabalho com o GC-FID e GC-MS.

Agradeço também à Cristina, por me ter orientado no espaço do laboratório do Grupo de Química Orgânica da Universidade de Coimbra e por nunca se ter negado a ajudar uma colega de laboratório em apuros.

Aos meus amigos e colegas de curso tenho de agradecer todo o apoio que me deram ao longo destes meses e por todas as vezes que me sossegaram a minha ansiedade ou que também sofreram comigo. Um obrigada especial à Helena e à Sofia. Obrigada pelo vosso apoio e lealdade, por enriquecerem a minha vida e por todos os momentos que mais me ajudaram. Espero que o nosso futuro não apague este passado.

À Andreia e à Catarina, minhas colegas de estágio no IPO de Coimbra, principalmente por me ouvirem queixar do cansaço de quem decidiu fazer este trabalho e um estágio voluntário em simultâneo. Que nos juntemos mais vezes, de preferência fora do contexto hospitalar.

Aos meus pais e irmão, pelo orgulho e sacrifícios feitos ao longo deste percurso. Obrigada por me darem o que não queria, mas precisava.

A todos vocês um obrigada do fundo do meu coração.

Índice

| | |
|---|------|
| Índice de Figuras | xi |
| Índice de Tabelas | xiii |
| Resumo | xiv |
| Abstract..... | xvi |
| 1-Introdução..... | 3 |
| 1.1- Doping | 5 |
| 1.1.1 Controlo Anti- <i>Doping</i> | 7 |
| 1.2- Suplementos Alimentares | 9 |
| 1.2.1 Problemática dos suplementos alimentares | 12 |
| 1.3- Esteroides Anabolizantes | 13 |
| 1.3.1 Mecanismo de ação | 15 |
| 1.3.2 Eficácia | 18 |
| 1.3.3 Efeitos Adversos..... | 18 |
| 1.4- Análise de EAA em suplementos alimentares | 18 |
| 1.4.1 Metodologias de deteção de EAA | 21 |
| 1.5- Objetivos..... | 25 |
| 2-Experimental | 29 |
| 2.1- Materiais e Equipamentos..... | 29 |
| 2.2- Preparação das amostras | 30 |
| 2.3- Preparação dos padrões externos | 31 |
| 2.4- Preparação das amostras para injeção direta..... | 31 |
| 2.5- Metodologias analíticas | 31 |
| 2.5.1 GC-FID..... | 31 |
| 2.5.2 GC-MS | 32 |
| 3-Resultados e discussão | 35 |
| 3.1- Análise por GC-FID..... | 35 |
| 3.2- Análise por GC-MS | 39 |
| 3.2.1 Suplemento de Tribulus Terrestris | 39 |
| 3.2.2 Suplemento de BCAAs..... | 42 |
| 3.2.3 Suplemento de proteína | 45 |
| 3.2.4 Suplemento de CLA com carnitina | 52 |
| Conclusão | 65 |
| Referências | 67 |

Índice de Figuras

| | |
|---|----|
| Figura 1: Gráficos sobre o motivo e tipo de suplementos consumidos..... | 11 |
| Figura 2: Estrutura de um esteroide da testosterona..... | 14 |
| Figura 3: Esquema do metabolismo da testosterona..... | 16 |
| Figura 4: Esquema geral do mecanismo de ação dos EAA..... | 17 |
| Figura 5: Ilustração de uma cromatografia gasosa..... | 22 |
| Figura 6: Esquema de um cromatógrafo gasoso..... | 23 |
| Figura 7: Composição básica de um espectrómetro de massa..... | 24 |
| Figura 8: Reação de sililação com BSTFA..... | 25 |
| Figura 9: Cromatogramas da amostra de BCAA, injeção direta, Ácido Esteárico, L-Leucina e L-Valina..... | 36 |
| Figura 10: Cromatogramas de um suplemento desportivo proteico, de Tribulus Terrestris e CLA com carnitina..... | 38 |
| Figura 11: Cromatograma do suplemento alimentar de Tribulus Terrestris..... | 39 |
| Figura 12: Espetro de massa ácido octadecanoico (IUPAC)..... | 40 |
| Figura 14: Espetro de massa do ácido 9,12,15 – octadecatrienoico (IUPAC)..... | 41 |
| Figura 16: Cromatograma do suplemento alimentar de BCAAs..... | 42 |
| Figura 17: Espetro de massa ácido octadecanoico (IUPAC)..... | 43 |
| Figura 18: Espetro de massa do ácido 9,12,15 – octadecatrienoico (IUPAC)..... | 43 |
| Figura 19: Espetro de massa do ácido (Z)-octadec-9-enoico (IUPAC)..... | 44 |
| Figura 20: Espetro de massa do ácido hexadecanoico (IUPAC)..... | 44 |
| Figura 21: Espetro de massa do 1-monolinoleoilglicerol..... | 45 |
| Figura 22: Cromatograma do suplemento alimentar de proteína..... | 46 |
| Figura 23: Espetro de massa do acetato de etilo..... | 46 |
| Figura 24: Estruturas dos fragmentos do acetato de etilo..... | 47 |
| Figura 25: Espetro de massa do 1-monolinoleoilglicerol..... | 47 |
| Figura 26: Espetro de massa do ácido tetradecanoico (IUPAC)..... | 48 |
| Figura 27: Espetro de massa do ácido hexadecanoico (IUPAC)..... | 48 |
| Figura 28: Espetro de massa do ácido 9,12,15 – octadecatrienoico (IUPAC)..... | 49 |
| Figura 29: Espetro de massa ácido octadecanoico (IUPAC)..... | 49 |
| Figura 30: Espetro de massa da molécula de lactose..... | 50 |
| Figura 31: Espetro de massa do colesterol..... | 50 |
| Figura 32: Espetro de massa do ácido propanoico 2-(3-acetoxi-4,4,14-trimetilandro-8-en-17-yl)..... | 51 |
| Figura 33: Espetro de massa do glicerol..... | 52 |
| Figura 34: Cromatograma I do suplemento alimentar de CLA com carnitina..... | 53 |
| Figura 35: Espetro de massa da cafeína..... | 53 |
| Figura 36: Espetro de massa do ester etílico do ácido hexadecanoico..... | 54 |
| Figura 37: Espetro de massa do oleato de etilo..... | 55 |
| Figura 38: Espetro de massa do ester etílico do ácido 9,12 – octadecadienoico..... | 55 |
| Figura 39: Espetro de massa do ester metílico do ácido 10, 13 – eicosadienoico..... | 55 |

| | |
|--|----|
| Figura 40: Cromatograma II do suplemento alimentar de CLA com carnitina | 56 |
| Figura 41: Espetro de massa do ester etílico do ácido 9,12,15 – octadecatrienoico | 56 |
| Figura 42: Espetro de massa do ester metílico do ácido 11 –eicosanoico | 57 |
| Figura 43: Espetro de massa do 9,12,15 – octadecatrienoato de butilo | 57 |
| Figura 44: Espetro de massa do ester etílico do ácido eicosanoico | 57 |
| Figura 45: Cromatograma III do suplemento alimentar de CLA com carnitina | 58 |
| Figura 46: Espetro de massa do ácido hexadecanoico (IUPAC)..... | 59 |
| Figura 47: Espetro de massa ácido octadecanoico (IUPAC) | 59 |
| Figura 48: Espetro de massa da linoleína | 60 |
| Figura 49: Espetro de massa do ester metílico do ácido 15 – tetracosanoico. | 60 |
| Figura 50: Espetro de massa do trioctanoato de glicerol | 61 |
| Figura 51: Espetro de massa do acetato de α -tocoferol..... | 61 |
| Figura 52: Espetro do ester do ácido 1,2,3 – decanoico com glicerol..... | 62 |

Índice de Tabelas

| | |
|--|----|
| Tabela 1: Efeitos secundários do uso de EAA..... | 20 |
| Tabela 2: Lista de reagentes, equipamentos e software utilizados..... | 29 |
| Tabela 3: Tipo de suplementos adquiridos e local de aquisição..... | 30 |
| Tabela 4: Resumo dos tempos de retenção relevantes para o estudo..... | 37 |

Resumo

Atualmente, o *doping* é um grave problema na área do desporto, principalmente por este ser um fenómeno que move milhões de pessoas por todo o mundo. A prática de desporto deve ser sempre realizada de forma segura e, em particular, a competição deve assentar em valores como a honestidade e igualdade, o que não é alcançado com o uso de substâncias ou métodos proibidos. Contudo, para além dos atletas que conscientemente escolhem a via mais fácil e rápida para o sucesso - *doping* - existem relatos de outros atletas que acusam positivo nos controlos *anti-doping* e afirmam não ter qualquer comportamento que leve a este resultado. Desta forma, a realização deste trabalho tirou partido de um problema que há muito se debate: a possível contaminação (intencional ou não) de suplementos alimentares com substâncias proibidas. De facto, existem diferentes estudos que demonstram que tanto os suplementos hormonais como não hormonais podem conter substâncias não declaradas no rótulo. Muitas destas substâncias não declaradas são pro-hormonas de testosterona ou 19-nortestosterona, designadas por esteroides anabólicos-androgénicos (EAA).

Numa primeira parte da dissertação, é dada uma breve contextualização do problema do *doping* e das contaminações de suplementos alimentares. De seguida, são descritos os procedimentos para análise de 4 suplementos consumidos num contexto desportivo, escolhidos por serem os suplementos com maior probabilidade de ter contaminações. A análise destes foi feita recorrendo a técnicas de GC-FID e GC-MS, com um passo prévio de extração em dois passos, usando metanol e hexano como solventes. Esta etapa permitiu eliminar alguns dos constituintes dos suplementos, dado que a matriz destes é muito complexa. Foram ainda preparados padrões externos e feita uma injeção direta dos suplementos, para análise por GC-FID.

A análise por GC-FID revelou algumas informações interessantes sobre a quantidade de substâncias presentes nos suplementos e sobre os seus tempos de retenção. Por si só, esta informação não é suficiente para fazer a sua identificação, não existindo padrões de EAA para poder fazer um trabalho comparativo. Procedeu-se então a alguns estudos de espectrometria de massa, tendo sido feita uma identificação de alguns dos componentes. O estudo por GC-MS das amostras dos suplementos alimentares revelou-se bastante complexo, pois implica conhecer as moléculas descritas no rótulo e que possam estar no

extrato final, assim como fazer a identificação de outras moléculas, não descritas no rótulo, pelos seus padrões de fragmentação. Em muitos casos não foi possível identificar a molécula em questão, devido à complexidade do seu espectro de massa e a não haver um padrão disponível para comparação. Dos componentes identificados, alguns faziam parte da constituição dos suplementos, como alguns ácidos gordos, lactose ou glicerol, sendo seguros para consumo. Foi também identificado o acetato de etilo, em dois suplementos, cuja origem é desconhecida, podendo tratar-se de uma contaminação por solvente usado no processo de fabrico ou como aroma sintético. Já o ester metílico do ácido 15 – tetracosanoico, identificado num suplemento, cuja sua origem também é desconhecida, pode ser tóxico para o ser humano, indicando que o suplemento em questão pode não ser seguro para consumo.

Palavras-chave: GC-MS, GC-FID, *doping*, desporto, suplementos alimentares

Abstract

Doping is a widespread problem in sports, mainly because it's a phenomenon that moves millions of people. Sports practice should be safe, and competitions should be honest and equal between athletes, values that are not achieved with the use of prohibited substances or methods. However, besides the athletes that choose this easy way of winning – *doping* – there are reports that state that some athletes, whose anti-*doping* tests were positive, didn't consciously consume any substances. Thus, the present work took advantage of a problem that is being debated for a long time: the possibility of contaminations (intentional or not) of nutritional supplements, consumed by sportsmen, with prohibited substances. In fact, there are different studies that demonstrate that nutritional supplements, hormonal or non-hormonal, may have substances not declared on the label. Many of these substances are pro-hormones from testosterone or 19-nortestosterone, like anabolic-androgenic steroids.

Firstly, in this dissertation, the background of the *doping* problem and the contaminations of sports supplements. Then, the steps for the analysis of 4 supplements, consumed by sportsmen, are explained. These were chosen for being the ones with greater probability of being contaminated. Analytical studies were made by GC-FID and GC-MS, with a previous phase of a 2-step extraction, with methanol and hexane. This allowed the elimination of some supplements' constituents, which is crucial because of their complex matrix. In addition, external standards were prepared, and a direct injection of the supplements was made for the GC-FID analysis.

The GC-FID analysis revealed some interesting information about the quantity of substances present in the various supplements tested and their retention time. However, this analysis alone was not sufficient for the identification of these substances, as were not available standards of anabolic-androgenic steroids for a comparative work. Consequently, mass spectrometry studies were conducted, and the identification of some components of the 4 supplements were made. This GC-MS study was found to be complex, not only because it involved previous knowledge of the molecules described in the label and maybe in the final extract, but also because it was necessary to identify others not disclosed in the label, through their fragmentation patterns. In many cases, identification of the molecules in question was not possible, because of the complex mass spectrum and the lack of standards for comparison. From the identified components, some

were part of the supplement constitution, like some fatty acids, lactose, or glycerol. It was also identified ethyl acetate, in 2 supplements, which origin is unknown, indicating the possibility of contamination with an industrial solvent used during the manufacturing phase or may be use as a synthetic flavor additive. The 15-tetracosanoic acid methyl ester, identified in 1 supplement, which origin is also unknown, may be toxic for humans, indicating that this supplement may not be safe for human consumption.

Keywords: GC-MS, GC-FID, *doping*, sports, nutritional supplements.

CAPÍTULO 1

1- Introdução

A ciência forense é uma área com um papel importante na aplicação da lei e que conjuga diferentes disciplinas científicas, como a química, física, toxicologia, genética, balística, antropologia, entre outras.¹ Os cientistas forenses procuram examinar e interpretar evidências que possam ser úteis para uma investigação criminal, com o objetivo de auxiliar a justiça na percepção dos acontecimentos, culminando na condenação ou absolvição de suspeitos.²

De acordo com o *World Anti-Doping Code*, *doping* é definido como uma ocorrência de uma ou mais violações das regras *anti-doping*, que englobam a posse, administração ou tentativa de administração e tráfico ou tentativa de tráfico de substâncias ou métodos proibidos.³ Uma vez que estes problemas assentam nos objetivos de uma investigação criminal, uma abordagem forense pode auxiliar na avaliação de potenciais violações destas regras. Por este motivo, o controlo *anti-doping* faz parte da área das ciências forenses.⁴

Atualmente, o *doping* é um grave problema na área do desporto, principalmente por este ser um fenómeno que move milhões de pessoas por todo o mundo. A prática de desporto deve ser sempre realizada de forma segura e, em particular, a competição deve assentar em valores como a honestidade e igualdade, o que não é alcançado com o uso de substâncias ou métodos proibidos. Desta forma, percebe-se a importância do controlo *anti-doping*.

Vários são os nomes de atletas de alta competição associados a práticas de *doping*, mas talvez o mais mediático seja Lance Armstrong. O ciclista tornou-se um ídolo a nível mundial depois de ter recuperado de um cancro e vencido a *Tour de France*, a principal competição do ciclismo, sete vezes consecutivas. Por este motivo os rumores de *doping* começaram a surgir e, em 2012, estes foram finalmente confirmados. A *Union Cycliste Internationale* (UCI) em conjunto com a *U.S. Anti-Doping Agency* (USADA) decidiu, então, retirar todos os títulos a Lance Armstrong e bani-lo do ciclismo profissional. Em janeiro de 2013, Armstrong confessa tudo numa entrevista dada a Oprah Winfrey.⁵ Este é um dos muitos casos de *doping* voluntário no desporto profissional.

Contudo, para além dos atletas que conscientemente escolhem a via mais fácil e rápida para o sucesso - *doping* - existem relatos de outros atletas que acusam positivo nos controlos *anti-doping* e afirmam não ter qualquer comportamento que leve a este resultado. Exemplo disso é o caso de Taylor Lewan, atleta profissional de futebol americano, que em 2019 foi suspenso. Em declarações numa conferência de imprensa, Lewan, que testou positivo para ostarina (um modulador seletivo do recetor de androgénio), afirma que não teve qualquer intenção de consumir substâncias dopantes e que deverá ter sido fruto do consumo de suplementos contaminados.⁶ Este caso é só mais uma confirmação de que existe um problema que há muito se debate: a possível contaminação (intencional ou não) de suplementos alimentares com substâncias proibidas, originando positivos nos controlos *anti-doping*. De facto, existem diferentes estudos que demonstram que tanto os suplementos hormonais como não hormonais podem conter substâncias não declaradas no rótulo e que estão proibidas pelo *Comité Olímpico Internacional* (IOC) e pela *World Anti-Doping Agency* (WADA).^{7,8} Muitas destas substâncias não declaradas são pro-hormonas de testosterona ou 19-nortestosterona, designadas por esteroides anabólicos-androgénicos (EAA).⁷ Dentro desta categoria recaem várias substâncias, sendo as mais comumente encontradas o Estanozolol, Metandienona, Prostanazol, Metasterona, DHEA, 4-androstanediona, 4-androstaneniol e outros análogos.⁸⁻¹⁰

Atualmente, o consumo de suplementos alimentares não está restrito apenas a atletas profissionais, podendo ser adquiridos por qualquer pessoa e em diversos locais, desde farmácias e ginásios, supermercados e até diferentes sites da internet.^{11,12} Por este motivo, o mercado dos suplementos alimentares tem vindo a crescer nas últimas décadas. Em 2006, o valor deste estava estimado em mais de 60 bilhões US\$ e alguns investigadores estimam que o valor do mercado de suplementos alimentares desportivos chegue aos 12 bilhões US\$ em 2020.^{13,14}

Assim, com o largo consumo de suplementos alimentares torna-se premente garantir a sua segurança. Os atletas amadores, apesar de não serem controlados, podem estar a ingerir substâncias que põem em risco a sua saúde. Os atletas profissionais têm um risco acrescido, já que podem acusar positivo nos controlos *anti-doping*, sem estarem conscientes das substâncias que ingeriram.

Atualmente, existe uma grande variedade de métodos de análise e deteção de agentes dopantes em diferentes matrizes biológicas, especialmente urina, o tipo de amostra com

mais relevância em controlos *anti-doping*.¹⁵⁻¹⁸. Para extração e deteção destes agentes em suplementos alimentares desportivos também existem diferentes métodos de análise possíveis^{7,19-21}, mas a amostra de suplementos testada não acompanha o crescimento deste mercado. Desta forma, considera-se pertinente a investigação para deteção de algumas substâncias proibidas em suplementos, uma ferramenta importante aliada ao controlo *anti-doping* em atletas.

1.1- Doping

Desde os primórdios da sociedade, quer em guerras, competições desportivas, no emprego ou na vida em geral, os seres humanos competem entre si, na esperança de serem o melhor.²² Este fator competitivo está profundamente inserido nas nossas estruturas sociais quando se fala em produtividade ou capital, no mundo da tecnologia ou inovação social.²³ Há, então, uma constante procura pelo sucesso, por ser o melhor e pela vantagem a todo o custo.

Esta procura incessante faz com que se escolha, muitas vezes, o caminho mais fácil, mas nem sempre o mais correto. É o que acontece frequentemente nas competições desportivas. No entanto, a natureza do ser humano não é o único fator a ter em conta, sendo necessário salientar a pressão gerada pelo público e treinadores, o interesse financeiro e/ou a sede por fama. A prática de *doping* é um problema complexo no mundo do desporto e que merece séria consideração, não só pelas consequências a nível da credibilidade dos desportistas como também pelos problemas de saúde que podem surgir com esta prática, cabendo aos especialistas procurar perceber como acontece e como preveni-lo.²⁴

Para além da prática, também a própria definição de *doping* é bastante complexa. Até a origem da palavra *doping* é controversa. De acordo com o Serviço de Intervenção nos Comportamentos Aditivos e nas Dependências (SICAD), o termo *doping* tem origem na palavra *doop*, que significa um sumo vistoso obtido do ópio, originado no tempo da Grécia Antiga.²⁵ Outros afirmam que a palavra tem origem em *doop* do dialeto Sul Africano, referindo a uma infusão estimulante usada em festividades religiosas.²⁶ Há ainda há quem defenda que a palavra *doping* tem origem na expressão americana *dope*, uma palavra calão para referir ópio.²⁷

Ao longo dos anos a definição de *doping* tem sofrido alterações. A primeira definição oficial de *doping* é apresentada em 1963 pelo *European Committee Council*, em que o

define como a “representação do uso de substâncias ou mediadores fisiológicos, não presentes normalmente no corpo humano, introduzidas como ajuda externa para aumentar a *performance* de um atleta durante competição.”²⁴ Atualmente, *doping* é definido pela WADA como a ocorrência de uma ou mais violações das regras *anti-doping*, que englobam a posse, administração ou tentativa de administração e tráfico ou tentativa de tráfico de substâncias ou métodos proibidos.³ Esta definição pode ser encontrada no código publicado pela agência, revisto todos os anos.

A problemática do *doping* não é nova e esta prática continua nos dias de hoje, ainda que de forma mais evoluída. Em 1972, Csaky menciona o começo desta prática no paraíso quando Eva entrega alimentos a Adão para o tornar tão forte como Deus.²⁶ Os primeiros registos oficiais do uso de *doping* em desportos remetem para os Jogos Olímpicos da Antiguidade, na Grécia, onde os atletas consumiam figos, chás de ervas e cogumelos acreditando na sua capacidade de aumentar a *performance* desportiva.^{26,27} Outra forma peculiar de *doping* descrita nesta época era o ato de beber um preparado de óleo, pó e suor de um atleta recolhido após a competição. Quem consumia acreditava que esta mistura traria de forma milagrosa as competências físicas de um campeão.²⁶

Independentemente da forma rudimentar como era realizado o *doping*, o objetivo intemporal estava presente: aumentar a força, ultrapassar mais rapidamente a fadiga e melhorar a *performance* em geral. Desta forma, os atletas colocavam em risco a credibilidade da *performance* desportiva e abriam precedentes para questionar os supostos “heróis”. Para além disso, é importante referir ainda o impacto negativo do *doping* na saúde dos atletas, pois o que começou com o consumo de alimentos inofensivos logo se tornou fatal.²⁸

A primeira fatalidade descrita ocorreu em 1886, 10 anos antes da inauguração dos Jogos Olímpicos modernos. O ciclista Linton morreu de overdose de um estimulante durante uma volta entre Bordeaux e Paris.²⁶ Mais tarde, em 1904, durante a maratona de *Sant Louis*, nos Estados Unidos, Tom Hicks teve uma overdose como resultado do consumo de uma mistura de conhaque e estriçnina, um alcaloide muito tóxico, hoje usado como veneno, acreditando que lhe traria vantagem na corrida.^{24,29} Estes incidentes em competições não foram eventos únicos, pelo que foi necessário colocar um travão no problema. A primeira tentativa surge em 1928, quando a *International Athletics Federation* (IAF) se tornou a primeira federação a banir o *doping* de competições. Passados 32 anos é implementado o controlo *anti-doping*.^{24,26}

1.1.1 Controlo Anti-Doping

Após a posição tomada pela IAF, em 1928, outras seguiram o seu exemplo. No entanto, esta ação não foi suficiente, especialmente pela falta de testes eficazes para deteção de substâncias ou métodos ilícitos, o que levou a uma onda de acontecimentos negros na história do desporto.²⁷ Em 1960, nos Jogos Olímpicos em Roma, houve uma série de mortes relacionadas com o consumo de anfetaminas, como Knud Jensen, um ciclista dinamarquês. Mais tarde, em 1967, morre um ciclista britânico Tom Simpson, na *Tour de France*.^{30,31} Estes foram apenas dois exemplos que traduzem o perigo do *doping*, escolhidos para ilustrar o facto de em 7 anos pouco ou nada se evoluiu em termos do controlo *anti-doping*. Para além disso, a escolha destes dois exemplos prende-se também com o facto de os Jogos Olímpicos e a *Tour de France* serem competições muito prestigiadas que ainda hoje são palco para resultados positivos nos controlos *anti-doping*. Assim, com estas (e outras) fatalidades, entende-se a motivação para abolir o consumo de substâncias ou o uso de métodos proibidos.

As medidas *anti-doping* começaram em 1962 na Áustria. Mais tarde, em 1965, a França, Bélgica e Grécia adotam a legislação *anti-doping*.²⁶ Em 1966, a *International Cycling Union* e a *International Federation of Association Football* decidem introduzir os testes *anti-doping* pela primeira vez. Um ano depois, o *International Olympic Committee* estabelece uma comissão médica para adotar uma política de testes mais extensa, de forma a banir o uso de drogas específicas, especialmente narcóticos e estimulantes como anfetaminas ou cocaína.^{27,31} Em 1968, foram coletadas, pela primeira vez, amostras de atletas nos Jogos da Cidade do México. Nestas análise foi detetado um caso positivo para álcool num membro da equipa da Suécia de pentatlo moderno, tendo sido assim encontrado o primeiro caso de *doping* olímpico.³² Também em 1968 foi implementado o primeiro controlo *anti-doping* em Portugal, no decurso da Volta a Portugal em bicicleta. Dois anos mais tarde, é publicado o primeiro diploma legal (Decreto-Lei nº 420/70) em Portugal onde é abordado o tema do *doping*.³³

Apesar de terem sido implementados testes *anti-doping* estes eram muito rudimentares e pouco abrangentes, tendo sido só em 1972 introduzido um programa de testes mais complexo, ainda que focado apenas em estimulantes. Este teve início nos jogos de verão de Munique, onde cerca de 7000 atletas competiram, tendo sido recolhidas 2000 amostras.^{24,32} Para além de serem os primeiros jogos sob testes *anti-doping* estes ficaram

marcados por outro motivo: o não reconhecimento do direito ao tratamento do atleta. O nadador Rick DeMont testou positivo para efedrina, um estimulante usado para tratar asma.³⁴ Ainda que ele tivesse sido diagnosticado com asma e reportado o uso desde composto, o facto de a efedrina ser considerada uma substância proibida e de não haver regras de isenção levou à retirada da sua medalha de ouro.³⁵

Mais tarde, em 1986, o ICO inaugurou o *International Olympic Charter* contra o *doping* no desporto.³⁶ Em 1987, é acreditado o Laboratório de Análises do *Doping* por esta mesma entidade, em Portugal, passando este laboratório a fazer parte de um grupo muito pequeno de laboratórios acreditados a nível mundial.³³ Em 1989 é finalizada a Convenção *Anti-Doping* do Conselho Europeu, o primeiro passo para a harmonização internacional na luta contra o *doping*, assinada por Portugal em 1990 e ratificada em 1994 (Decreto-Lei n.º 2/94, de 20 de Janeiro)^{33,36} Também em 1990 surge uma nova definição de *doping* em Portugal, sendo necessária uma nova reforma na legislação, o que levou à publicação do Decreto-Lei n.º 105/90, de 23 de Março, regulamentado pela Portaria n.º 130/91 e, conseqüentemente, à criação do Conselho Nacional Antidopagem (CNAD).³³

Apesar dos esforços destas organizações, a falta de testes verdadeiramente eficazes e o aparecimento de novas substâncias e métodos para os quais não existiam testes levou a que os atletas continuassem a praticar *doping*, continuando a arriscar a sua saúde e reputação. Após um desenrolar de eventos no *Tour de France*, na segunda metade dos anos 90, o IOC propõe a criação de uma agência internacional *anti-doping*. Em dezembro de 1999 é criada a *World Anti-Doping Agency* (WADA), com o apoio do IOC, do Conselho da Europa e de alguns representantes governativos.^{36,37} Portugal tem colaborado de forma ativa com a WADA, na elaboração do código mundial *anti-doping*, na participação de várias comissões, em campanhas informativas e educativas e na realização de controlos *anti-doping*.³³

É importante ainda salientar o papel pioneiro de Portugal no reconhecimento do direito ao tratamento dos desportistas, ainda em 1994, com a criação de um sistema de notificação do uso de substâncias proibidas, em condições patológicas. Este direito só viria a ser reconhecido internacionalmente pela WADA em 2004.^{33,38}

A criação de todas estas regras e agências mundiais prende-se não só com uma questão da promoção do *Fair-Play*, mas também com a preocupação pela saúde pública. O conceito de *doping* é normalmente associado ao desporto, principalmente ao desporto

elite, no entanto, não está limitado apenas a este. Substâncias dopantes como os esteroides anabolizantes-androgénicos (EAA) estão largamente disponíveis a atletas de todos os níveis.¹⁰ Para além disso, estas substâncias têm-se tornado bastante populares entre as camadas mais jovens. Um estudo publicado na revista “Pediatrics in Review”, comprovou que cerca de 3.3% dos estudantes do secundário nos Estados Unidos admite usar estas substâncias, de forma a melhorar a sua aparência ou aumentar a sua massa muscular.³⁹

A par com a preocupação do risco para a saúde pública da prática de *doping* consentida, não só por atletas profissionais como por amadores, surge um novo problema: a prática de *doping*, principalmente o consumo de EAA, não consentido obtido através de suplementos alimentares adulterados.^{10,19,40}

1.2- Suplementos Alimentares

Nos últimos anos, o mercado mundial de suplementos alimentares tem ganho um grande destaque. De acordo com a diretiva parlamentar europeia (2002/46/EC), todo e qualquer suplemento alimentar é definido como um produto que suplementa a dieta normal do consumidor e consiste numa fonte de nutrientes ou outras substâncias com efeitos nutricionais ou fisiológicos.⁴¹ Para além da definição de suplemento alimentar, esta norma visa garantir a segurança destes produtos e a veracidade da informação contida nos rótulos. Esta foi a primeira norma a ser formada, mas ao longo dos anos tem sido reformulada de modo a atualizar a lista de substâncias abrangentes.⁴²

Em Portugal, os suplementos alimentares estão sob o controlo legal do Decreto-Lei nº118/2015, que transpõe a Diretiva nº 2002/46/CE, passando a haver uma uniformidade entre produtos que anteriormente tinham designação e categorias variadas.⁴³ Neste sentido, a Associação Portuguesa de Suplementos Alimentares (APARD) tem vindo a desempenhar um papel muito importante na implementação das regras definidas por este Decreto-Lei.

De acordo com a Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde (INFARMED), os suplementos alimentares podem ser divididos em 3 grupos: Vitaminas e Minerais, Plantas e Extratos Botânicos e Outras Substâncias (como fibras e probióticos, ácidos gordos e aminoácidos e enzimas). No entanto, apesar de se apresentarem com formas doseadas e de terem um suposto efeito benéfico, os suplementos alimentares não são regulados pelo INFARMED, por não se tratar de medicamentos.⁴⁴ Ainda assim, foi assinado um protocolo entre a Autoridade de

Segurança Alimentar e Económica (ASAE) e o INFARMED para a colaboração e partilha de recursos de forma a fiscalizar diferentes suplementos alimentares.⁴⁵

Nos Estados Unidos, o *Dietary Supplement Health and Education Act* (DSHEA) de 1994 classifica os suplementos alimentares como uma subcategoria de alimentos, o que isenta as empresas que os fabricam de providenciar evidências de segurança e eficácia do produto antes da sua venda.¹³ Em Portugal, o mesmo acontece.

De acordo com o Decreto-Lei nº 118/2015 a colocação dos suplementos alimentares no mercado requer a notificação da Direção Geral da Alimentação e Veterinária (DGAV), com envio do rótulo para esse produto. A rotulagem dos suplementos deve também estar de acordo com este mesmo Decreto-Lei. Contudo, em nenhum passo deste processo é requerido a apresentação de ensaios de segurança.^{44,46}

Assim, a fiscalização dos suplementos alimentares é feita apenas após a sua colocação no mercado e esta fiscalização é da responsabilidade da *Food and drug Administration* (FDA), nos Estados Unidos, onde são produzidos a maioria dos suplementos à venda na internet e pela ASAE, no nosso país.^{46,47}

Os suplementos alimentares são largamente utilizados na população, ainda que não sejam obrigatórios num regime alimentar saudável e variado.⁴⁸ Um estudo de 2017 sobre a população holandesa mostra que muitos dos que consomem suplementos são pessoas com um estilo de vida saudável, que inclui a prática regular de desporto e com uma alimentação variada e com um status económico médio-alto.⁴⁹ Este aparente paradoxo do uso de suplementos por pessoas que não necessitam deles tem intrigado a comunidade científica. Em Portugal, foi publicado este ano um estudo sobre a prevalência do uso de suplementos alimentares por membros do ginásio. Este estudo envolveu cerca de 459 participantes e mostra que a maioria dos consumidores são homens cujo principal motivo para o uso de suplementos é o desejo pelo aumento de massa muscular (**Figura 1-A**) e o principal suplemento consumido é a proteína em pó (**Figura 1-B**). Este trabalho mostra ainda a tendência do aumento do consumo de suplementos alimentares, tendo sido 25% em 2010, 41% em 2012 e 44% em 2020.⁵⁰

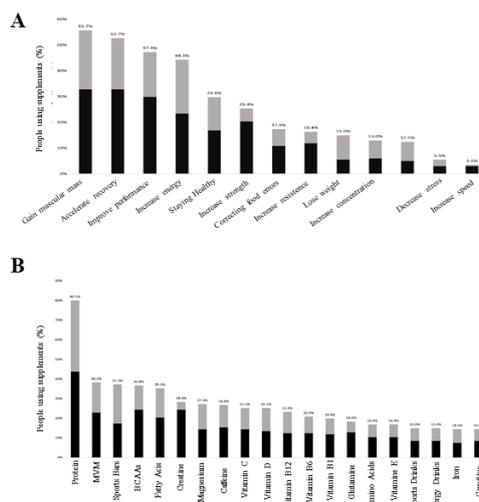


Figura 1: Gráfico representativo do motivo para o consumo de suplementos alimentares por membros de ginásio (A) e gráfico representativo do tipo de suplementos alimentares mais consumidos por membros de ginásio (B). Adaptado de: Ruano, J. & Teixeira, V. H. Preva.

Apesar de não obrigatórios para a população em geral, são considerados necessários no desporto profissional e é raro o atleta de elite que não os consuma. Durante os últimos 50 anos o mundo do desporto competitivo tem operado sob uma regulação muito estrita no que toca a substâncias proibidas, pelo que os atletas recorrem a suplementos legais que lhes permita melhorar a cada dia a sua *performance*.^{51,52} A maioria dos suplementos alimentares cujos consumidores alvo, são desportistas são publicitados salientando a sua capacidade de aumentar a *performance* desportiva, melhorar a recuperação do atleta, prevenir lesões ou permitir atingir a composição corporal ótima, que são os motivos principais que levam ao seu consumo.⁵³ Este consumo pretende satisfazer algumas deficiências em micronutrientes (como vitaminas e minerais) ou aumentar a massa muscular (suplementos proteicos ou aminoácidos).⁴¹ Em 2019, um estudo conduzido por Baltazar-Martins reporta que cerca de 64% dos atletas elite entrevistados consomem, de forma regular, suplementos alimentares.⁵⁴

É conhecido que os atletas são considerados exemplos a seguir, pelo seu carácter e pela sua disciplina e perseverança. Para além disso, têm uma presença constante nos media, pelo que se tornam figuras públicas, ganhando bastante visibilidade.⁵⁵ De acordo com Bandura (1977), o nosso processo de aprendizagem enquanto humanos passa pela imitação de comportamentos, surgindo o conceito de *role models* ou modelos.⁵⁶ É considerado um “modelo” toda e qualquer pessoa cujo comportamento sirva como estímulo para um comportamento de um observador.⁵⁷ Consequentemente, os atletas

podem servir como “modelos” no que toca ao consumo de suplementos alimentares, o que explica o aumento da popularidade destes produtos.

1.2.1 Problemática dos suplementos alimentares

A atleta Jessica Hardy, uma nadadora profissional, conseguiu assegurar o seu lugar nos Jogos Olímpicos de Verão, em Beijing 2008, sendo uma forte candidata à medalha de ouro nesta modalidade. Num esforço para ganhar massa muscular e força consumiu um suplemento alimentar de arginina, um aminoácido metabolicamente versátil, com efeitos farmacológicos benéficos quando usado em doses maiores do que numa alimentação normal, como a melhoria da *performance* aeróbica e anaeróbica.⁵⁸ Contudo, antes desses jogos, Jessica testou positivo nos controlos *anti-doping* para uma substância com propriedades anabólicas. Isto fez com que fosse banida durante 1 ano, não sendo um período maior por ter sido provado que essa substância veio do suplemento e não constava no rótulo.⁹ Este é apenas um dos exemplos de *doping* não intencional por consumo de suplementos alimentares contaminados com substâncias proibidas.

Estes casos de *doping* não intencional resultam, então, em cenários de *Adverse Analytical Finding* (AAF), que segundo a WADA se traduzem na presença de substâncias ou métodos proibidos numa amostra, ou seja, resultados positivos nos controlos *anti-doping*. De acordo com as estatísticas da WADA, entre 2013 e 2017, 4 a 19% destas AAF eram relativas a contaminações de suplementos alimentares e carne, que depois de confirmadas levaram à exoneração dos atletas.⁸

A presença de substâncias em suplementos alimentares que não constam nos seus rótulos não é um problema recente. Já em 1990 o IOC emitiu um comunicado ao público avisando sobre a possibilidade de alguns suplementos alimentares estarem contaminados com pseudoefedrina, na altura uma substância proibida. Este comunicado veio no seguimento do caso do corredor Linford Christie que testou positivo para esta substância nos Jogos Olímpicos de 1988. Na altura o atleta não sofreu nenhuma sanção pois foi apurado a fonte, depois de ele ter negado o consumo consciente dessa substância: um chá de ginseng, uma planta muito usada na medicina tradicional chinesa.^{12,59} Este foi o primeiro caso oficial de reconhecimento de *doping* não intencional e abriu precedentes para a investigação de outros casos.

Um estudo conduzido na Grã-Bretanha mostra que entre 1994 e 1998 houve um aumento do número de casos positivos para nandrolona, um esteroide anabolizante, associados ao

consumo de suplementos alimentares contaminados.¹² Entre 2005 e 2013, 8.8% das violações no Código da WADA dos atletas britânicos estavam associadas ao uso de suplementos.¹¹ Em 2010, a ASEA emitiu um comunicado onde notifica os consumidores da probabilidade de contaminação de 65 suplementos alimentares com EAA, fabricados nos Estados Unidos e vendidos na internet pela Bodybuilding.com.⁶⁰

Devido a estas descobertas é importante perceber como é que estas contaminações ocorrem. Enquanto que os produtos farmacêuticos são extensamente controlados de forma a garantir a sua segurança, pureza e eficácia, os suplementos alimentares não necessitam deste controlo.^{44,61} Estas contaminações podem ocorrer de forma accidental, uma vez que muitos fabricantes de suplementos inócuos também produzem produtos com EAA ou estimulantes ou de forma intencional, quando os fabricantes colocam grandes quantidades destas substâncias para que aumente a eficácia do seu produto e leve a mais vendas.^{41,62} Isto revela ser um problema para os atletas, que põem em risco a sua saúde e podem originar AAF nos controlos *anti-doping*, sem estarem conscientes das substâncias que ingeriram.^{63,64} Para além disso, é também um problema para a população em geral, que apesar de não serem controlados, podem estar a ingerir substâncias desconhecidas, que põem em risco a sua saúde, diretamente pelos seus efeitos secundários ou indiretamente devido a interações com medicamentos ou outras substâncias.^{8,9,14,65}

Os problemas com a contaminação de suplementos existem em todos os países e dizem respeito a todos os tipos de suplementos, seja vendido na forma de pó, comprimidos, cápsulas ou líquidos, incluindo BCAAs (*Branched-chain amino acids*), carnitina, glutamina, proteínas, vitaminas, etc.¹² Nestes casos, os ingredientes que constam no rótulo não correspondem ao conteúdo verdadeiro do produto. Atualmente existem diversos estudos sobre a prevalência de suplementos contaminados que sugerem que entre 3 a 25% destas contaminações se devem a pro-hormonas, especialmente EAA e estimulantes.^{40,62,66}

1.3- Esteroides Anabolizantes

O termo “esteroide” refere-se um grupo de compostos lipossolúveis que possuem uma estrutura básica de 17 átomos de carbono, dispostos em 4 anéis ligados entre si de forma específica (**Figura 2-A**).⁶⁷ Podem ser divididos em dois grupos: corticosteroides, versões sintéticas de hormonas produzidas naturalmente e os esteroides anabolizantes-androgénicos (EAA).^{68,69}



Figura 2: Estrutura química básica de um esteroide (A) e estrutura molecular da testosterona, a principal hormona sexual masculina, sendo esta o ponto de partida para o design dos EAA (B). Estruturas desenhadas no ChemDraw Ultra.

Os EAA são derivados sintéticos da testosterona (**Figura 2-B**), a principal hormona sexual masculina com efeitos anabolizantes e androgénicos no organismo humano.^{68,70}

Esta foi descoberta e purificada pela primeira vez em 1935 e desde então tem sido extensamente estudada pelo seu potencial terapêutico e como agente dopante.^{71,72}

A administração oral ou parenteral de testosterona exógena não exerce grande efeito no organismo humano, pois é rapidamente metabolizada. Por este motivo, são feitas modificações químicas à molécula de testosterona, de forma a aumentar a sua biodisponibilidade ou o tempo de duração dos efeitos.⁷³ Existem três tipos de EAA dependendo das alterações introduzidas^{74,75}:

- 1) Derivados por **alquilação do carbono 17- α** , ultrapassando assim o metabolismo hepático, tornando-os viáveis para administração oral; no entanto também os torna hepatotóxicos.
- 2) Derivados por **esterificação do carbono 17- β** , tornando as moléculas mais hidrofóbicas e, logo, mais duradoura.
- 3) Derivados por **alteração nos anéis**.

Apesar de, nos dias de hoje, os EAA serem largamente usados em casos de *doping*, esta não é a sua única finalidade. Desde os anos 40, os EAA são usados na reabilitação em queimados, em traumas ou cirurgias.⁷⁰ Por promoverem a síntese de proteínas, mantendo ou aumentando a massa muscular, a hematopoiese e a proliferação da medula óssea, os EAA podem ser usados no tratamento de algumas doenças causadas por vírus ou de alguns cancros, como leucemia, que levam a uma deficiência do sistema imunitário.⁷⁶⁻⁷⁸

Contudo, a partir dos anos 50, estes começaram a ser usados por atletas elite como estimulantes para aumentar a sua *performance* desportiva, tirando partido dos efeitos anabólicos e androgénicos dos EAA.^{70,72} O seu uso indevido aumentou exponencialmente no início dos anos 60, sendo banidos em 1968 pelo IOC.⁷¹

Ao longo destes anos muito se procurou separar os efeitos androgénicos e anabólicos destes esteroides, mas sem sucesso. A ação androgénica inclui o desenvolvimento de

características masculinas, como o aumento da força, engrossamento da voz e crescimento típico masculino de pelos. Já a ação anabólica inclui a estimulação da síntese proteica, resultando no crescimento do músculo esquelético e estimulação do crescimento ósseo.^{74,79}

Atualmente são conhecidos vários EAA, que constam na lista de substâncias proibidas, classe S1, pela WADA, divididos em **EAA exógenos** (normalmente não produzidos naturalmente no organismo), como 1-Androstenediol (5α -androst-1-ene- 3β , 17β -diol), 1-Androstenediona (5α -androst-1-ene-3, 17 -diona), 1-Androsterona (3α -hidroxi- 5α -androst-1-ene- 17 -ona), 1-Testosterona (17β -hidroxi- 5α -androst-1-en- 3 -ona), Estanozolol, etc.; e **EAA endógenos** (substâncias e metabolitos produzidos naturalmente pelo organismo, mas administrados externamente), como 4-Androstenediol (androst-4-ene- 3β , 17β -diol), 4-Hidroxitestosterona ($4,17\beta$ -di-hidroxiandrost-4-en- 3 -ona), Nandrolona (19-nortestosterona), Prasterona (de-hidroepiandrosterona, DHEA, 3β -hidroxiandrost-5-en- 17 -ona), Testosterona, etc.⁸⁰

A crescente popularidade dos EAA leva a muitas questões a nível da prevalência do seu uso. Quem consome? Como consome? Porque consome? A resposta a estas questões depende de vários fatores, como a disponibilidade dos produtos, políticas governamentais, ambiente cultural e condições individuais do consumidor.⁸¹

Um estudo conduzido por Hanley Santos e Coomber⁸², mostra que certas ocupações como a indústria de segurança ou forças armadas, a exposição a drogas ilícitas ou a entrada em certas competições desportivas podem levar ao consumo de EAA. O motivo comum para o consumo destas substâncias prende-se com o desejo de aumentar a massa muscular e melhorar a aparência física, tanto em atletas profissionais como amadores.⁸¹

Para além do consumo consistente destas substâncias, é importante ainda salientar a problemática das contaminações de suplementos alimentares com EAA, discutida nos capítulos anteriores. Por estes motivos, é importante conhecer o mecanismo de ação e efeitos adversos dos EAA.

1.3.1 Mecanismo de ação

O mecanismo de ação dos esteroides anabolizantes-androgénicos tem sido largamente estudado ao longo dos anos. Vários mecanismos gerais têm explicado o modo de atuação dos EAA, mas devido às variações nas moléculas, o mecanismo específico de ação sofre

também variações, sendo difícil prevê-lo.⁷⁴ O primeiro passo para compreender os seus mecanismos de ação é perceber de que forma os esteroides androgénicos naturais atuam (**Figura 3**).

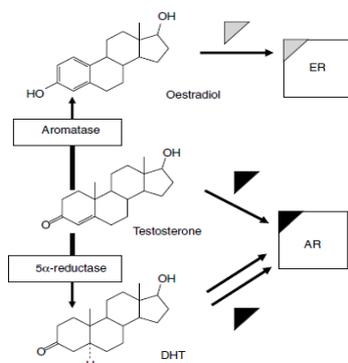


Figura 3: Esquema do metabolismo da testosterona e ligação ao recetor de androgénio (AR) ou ao recetor de estradiol (ER). Adaptado de: Kicman, A. T. Pharmacology of anabolic steroids. Br. J. Pharmacol. 154, 502–521 (2008).

A molécula com propriedades androgénicas mais importante no organismo humano é a testosterona.⁷⁹ Esta hormona esteroide é produzida naturalmente nas células Leydig nos testículos do organismo masculino e nos ovários no organismo feminino, sendo também produzida pela glândula adrenal, nos dois sexos.⁸³ Nos ovários e na glândula adrenal a testosterona é produzida em quantidades muito reduzidas. Estes órgãos produzem ainda outros androgénios, ainda que mais fracos: de-hidroepiandrosterona (DHEA) e androstenediona, muito importantes num organismo feminino pois são precursores da testosterona e 5α-di-hidrotestosterona (DHT).⁷⁹

Os efeitos androgénicos são modulados a nível celular, ou seja, a sua ação depende do tecido em questão, recorrendo a enzimas específicas. Nos tecidos reprodutivos, a testosterona é considerada uma pró-hormona, sendo convertida a DHT pela 5α-reductase.^{74,84,85} No tecido adiposo é convertida a estradiol, em ambos os sexos, pela aromatase.^{74,86,87} Já no tecido ósseo o seu mecanismo não está bem definido, mas sabe-se que o seu efeito é mediado diretamente pela testosterona e pela aromatização a estradiol.⁷⁹ No músculo esquelético, a testosterona liga diretamente ao recetor de androgénio, uma vez que a atividade enzimática da 5α-reductase é quase não existente. No entanto, a atividade da aromatase é significativa, ainda que o seu papel no desenvolvimento das fibras musculares seja debatido.^{75,79,88}

Uma vez que os EAA derivam da testosterona a sua ação no organismo é muito semelhante a esta hormona. Os EAA, sendo uma grande classe de derivados esteroides, podem exercer a sua ação por diversos mecanismos: modulação da expressão do recetor

de androgénio por metabolismo intracelular ou por ação direta, afetando co-ativadores e a atividade transcritcional; efeito anti-catabólico, por intervenção no recetor de glucocorticoides; e por vias genómicas no sistema nervoso central, causando mudanças no comportamento.^{74,79,89-100}

Dependendo da interação com os recetores de esteroides intracelulares, pode-se distinguir três grupos: EAA que ligam com grande afinidade ao recetor de androgénio, chamados de EAA fortes, como é o caso da 19-nortestosterona e metenolona; EAA que ligam com pouca afinidade, designados por EAA fracos, como o Estanozolol e fluoximesterona; e EAA que não ligam de todo aos recetores, como a oximetolona, que necessitam de biotransformação para formarem compostos mais ativos ou por uma via alternativa, ainda não estabelecida.^{74,84,101,102}

Para os EAA cujo mecanismo passa pela ativação de um recetor é possível delinear um mecanismo geral (**Figura 4**). Por serem moléculas relativamente pequenas e hidrofóbicas, os esteroides atravessam facilmente a membrana celular, até ao citoplasma da célula. Aqui as hormonas ligam ao domínio do recetor que estabelece uma conexão com o ligando, causando uma dissociação do complexo recetor-Hsp90, resultando numa alteração da conformação do mesmo, tornando assim o recetor ativo. Ocorre, então, uma dissociação da chaperona e o complexo recetor-ligando é translocado para o núcleo da célula, onde pode interagir, como homodímero, com a cromatina. Esta ligação ao DNA promove a transcrição do mRNA e, conseqüentemente, ao aumento da síntese proteica. Para além disso, podem também ativar co-reguladores positivos do recetor, aumento o número destes na célula.^{68,75,79,103}

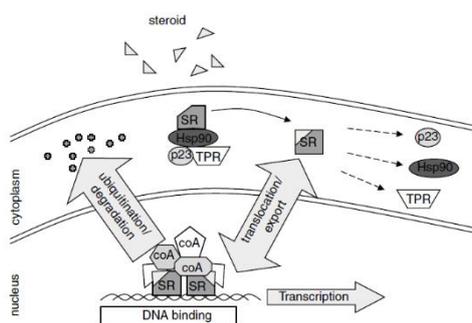


Figura 4: Esquema geral do mecanismo de ação dos EAA, cuja ação envolve a ligação aos recetores de androgénio, culminando na transcrição de DNA. Adaptado de: Kicman, A. T. Pharmacology of anabolic steroids. Br. J. Pharmacol. 154, 502-521 (2008).

1.3.2 Eficácia

Atualmente, a informação disponível que suporte a eficácia dos EAA na *performance* desportiva é limitada e muitos estudos contêm falhas no que toca à dose consumida e às estratégias de administração.¹⁰⁴

Geralmente, a administração dos EAA é feita através de ciclos, com aumento gradual das doses, entre 7 a 14 semanas. No entanto, por questões éticas, a investigação está limitada ao estudo da eficácia de uma única dose, de concentração inferior à usada para efeitos de *doping*.^{104,105} Ainda assim, é uniforme na comunidade científica de que os EAA não são totalmente eficazes se o seu consumo não for complementado com um regime de exercício físico.¹⁰⁴⁻¹⁰⁹

1.3.3 Efeitos Adversos

O uso crónico de EAA causa diversas alterações fisiológicas, dependendo da dose consumida, frequência e tipos de ciclos de administração usados, alterações estas quase sempre associadas a efeitos adversos no organismo.¹¹⁰ Apesar de alguns destes efeitos serem reversíveis, especialmente no sexo masculino, muitos são irreversíveis e estão na origem de várias mortes.¹⁰³

Atualmente, os efeitos a longo prazo do consumo de EAA ainda não são conhecidos, especialmente os efeitos relacionados com tipos específicos de esteroides, dose, frequência de uso ou idade. No entanto, os efeitos a curto-prazo têm sido intensamente estudados nas últimas décadas.¹⁰⁵ Ainda assim, como por questões éticas é difícil de replicar os efeitos dos EAA no laboratório, alguns destes efeitos adversos poderão ser mais prenunciados.⁷⁴

Existem inúmeros efeitos adversos do uso de EAA e podem ser divididos em 5 categorias gerais: hepáticos, cardiovasculares, endócrinos/reprodutivos, psiquiátricos e dermatológicos, resumidos na **Tabela 1**.^{104,111}

1.4- Análise de EAA em suplementos alimentares

Os métodos de análise de esteroides, incluindo os EAA, envolvem quase sempre uma primeira etapa de extração, com recurso aos mais variados solventes. De seguida, para a separação das diferentes substâncias que possam estar na amostra extraída e a identificação das mesmas é frequente o uso da cromatografia gasosa e espectrometria de massa.¹¹²

No que toca à extração de EAA de suplementos alimentares, esta é a etapa decisiva para o alcance da seletividade e sensibilidade da sua análise. De facto, existem diferentes fatores que interferem com o processo de extração como a complexidade das matrizes dos diferentes suplementos, a baixa concentração de EAA e a possibilidade de deterioração dos EAA pelos solventes usados.⁷

Relativamente à escolha dos melhores solventes para a extração de EAA de suplementos alimentares, esta é feita com base nas características não só destes compostos como também do próprio suplemento.¹¹² As hormonas esteroides são, no geral, consideradas moléculas hidrofóbicas devido ao seu núcleo de base tetracíclico. Contudo, possuem diferentes grupos funcionais, em diferentes posições, sendo estes grupos polares.¹¹³ Por este motivo, estas hormonas são solúveis em solventes polares e solventes não-polares, tendo mais afinidade para um ou outro dependendo do grau de polaridade dos grupos funcionais.¹¹⁴

A escolha do solvente também pode ajudar na purificação do extrato final, sendo por isso influenciada pela constituição dos suplementos. Suplementos à base de BCAA, contêm leucina, isoleucina e valina, que são aminoácidos não-polares.¹¹⁵ Neste caso, o uso de um solvente polar para extração de EAA contaminantes, faz com que o extrato final seja mais puro, pois não vai extrair estes aminoácidos. O mesmo acontece com suplementos à base de proteína, se estas forem maioritariamente compostas por aminoácidos não-polares, principalmente à superfície. É com base neste princípio que é feita a precipitação de proteínas com solventes polares, nomeadamente metanol, de modo a separá-las de outros componentes de uma solução.¹¹⁶

Tabela 1: Efeitos secundários do uso de EAA, dividido pelas 5 categorias conhecidas: problemas hepáticos, cardiovasculares, no sistema endócrino/reprodutivo, dermatológicos e psicológicos.

| Problemas Hepáticos 74,104,105,107,111,117-122 | Problemas Cardiovasculares 70,74,103-105,107,110,111,123-125 | Problemas no sistema endócrino/reprodutivo 74,103,104,107,111,126,127 | Problemas dermatológicos 104,128 | Problemas psicológicos 105,129-138 |
|--|--|---|--|--|
| Alterações enzimáticas | Mudança na fração de lipoproteínas | Supressão do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal | Acne | Comportamentos agressivos |
| Colestase aguda | Aumento fatores coagulantes | Supressão de LH e FSH | Aumento da produção de sebo | Dano cognitivo |
| Dano crónico vascular | Hipertensão | Infertilidade | Oleosidade da pele | Depressão |
| Desenvolvimento de tumores | Alterações no miocárdio | Alteração do tecido mamário | Oleosidade do cabelo | Psicose |

Por estes motivos, pensa-se que para a extração de EAA de suplementos alimentares seja pertinente realizar uma extração em 2 passos. Em primeiro lugar dever-se-á realizar uma extração sólido-líquido, no caso de suplementos sólidos, ou líquido-líquido, no caso de óleos ou suplementos líquidos usando um solvente polar, como o metanol. Pretende-se com este passo dissolver os EAA, eliminando impurezas maioritariamente não-polares. De seguida, dever-se-á proceder a uma extração líquido-líquido, com fase aquosa e orgânica, usando um solvente não-polar, como o hexano, para o qual os EAA possuem maior afinidade.^{19,66,114}

1.4.1 Metodologias de deteção de EAA

Técnicas hifenadas como a cromatografia de gás (GC) ou líquida (LC) acoplada a espectrometria de massa (MS) são a primeira abordagem nos testes *anti-doping* realizados nos laboratórios creditados, para deteção de EAA.^{139,140} Este tipo de análise prevê a deteção das substâncias e/ou os seus metabolitos, mesmo em pequenas concentrações, em amostras de urina dos atletas.^{16,141} Em 2007, a WADA estipulou o painel de marcadores de EAA em amostras de urina que devem ser testados: testosterona, epitestosterona, androsterona, etiocolanolona, 5 α -androstano-3 α , 17 β -diol e 5 β -androstano-3 α , 17 β -diol.¹⁴²

Os métodos usados nos laboratórios de controlo de *doping* têm de cumprir certos requisitos analíticos tal como a sensibilidade, especificidade, rapidez e poder de quantificação e identificação. Pelo grande impacto social de um resultado positivo nos controlos *anti-doping*, estes laboratórios têm que se certificar que cumprem todas as normas estabelecidas, de forma a que os resultados não sejam questionáveis.¹⁴¹ Assim, as amostras são analisadas por GC-MS e/ou LC-MS, uma vez que estes são considerados sistemas analíticos de elevada resolução e recolhem informação espectrométrica precisa, em *full-scan*.^{139,143}

A escolha do método de análise é feita com base nas propriedades dos EAA a analisar. Pela sua baixa eficiência de ionização, a maioria dos EAA são analisados por GC-MS. Hidroxi-esteroides ou oxo-esteroides, por exemplo, não são possíveis de analisar por LC-MS.¹⁴⁴ O uso do método de LC-MS recai na análise de EAA fáceis de ionizar por *electrospray* (ESI), como é o caso de alguns EAA na sua forma livre (não-conjugados).¹⁷

Relativamente ao GC-MS, só alguns EAA com alta conjugação nos grupos ceto, como o tetra-hidrogestrinona (THG), são difíceis de analisar pois não são facilmente

derivatizados.¹⁶ Por proporcionar uma maior eficiência de separação e porque as suas propriedades combinam melhor com o MS, o método de GC-MS é o método preferencial para a deteção de EAA em amostras biológicas.^{144–146}

Atualmente, não só em amostras biológicas se detetam EAA. Devido à problemática da contaminação de suplementos alimentares, é necessário que estes sejam monitorizados pelas entidades competentes. Esta análise aos suplementos pode ser realizada por GC-MS, que mantém todas as suas vantagens, de forma semelhante às amostras de urina, com exceção do passo de hidrólise enzimática.^{7,8}

1.4.1.1 Cromatografia de gás

Os métodos de separação cromatográfica são dos métodos mais utilizados para determinar contaminantes e resíduos em diferentes tipos de comida.¹⁴⁶ A cromatografia é uma técnica de química analítica desenvolvida no início do século 20, cujo objetivo é separar os diferentes compostos químicos que compõem uma mistura.¹⁴⁷ Esta separação de componentes pressupõe a existência de duas fases distintas: uma fase estacionária e uma fase móvel, que passa de forma contínua na coluna cromatográfica e baseia-se no princípio de afinidades: diferentes compostos possuem diferentes afinidades para com a fase móvel e estacionária, afetando assim a sua distribuição entre as duas fases e o seu comportamento dentro do sistema (**Figura 5**).¹⁴⁸ A cromatografia de gás é uma técnica capaz de separar misturas complexas, baseado nos diferentes pontos de ebulição e polaridade, desenvolvida em 1952. Com os avanços da ciência, é espectável que a instrumentação continue a melhorar com o passar dos anos. Ainda assim, os componentes básicos de um cromatógrafo gasoso mantiveram-se e continuam bastante simples (**Figura 6**).

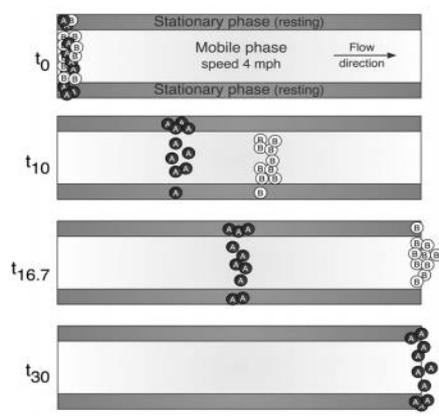


Figura 5: Ilustração do conceito de separação cromatográfica, onde A e B representam diferentes compostos numa mistura e t representa o tempo decorrido. Adaptado de: Harvey, D. J. Gas chromatography | Gas chromatography/mass spectrometry. Encycl. Anal.

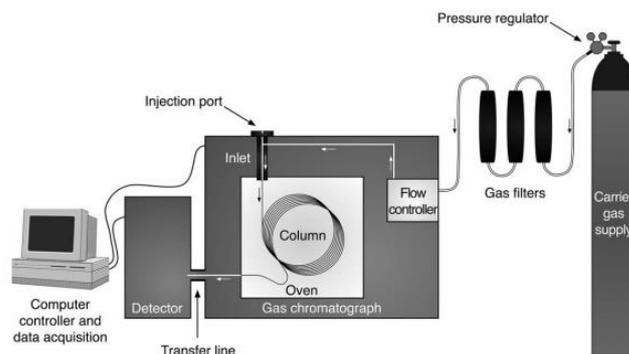


Figura 6: Exemplo esquemático de um cromatógrafo gasoso e os seus componentes principais. Adaptado de: Harvey, D. J. Gas chromatography | Gas chromatography/mass spectrometry. *Encycl. Anal. Sci.* 169–179 (2019) doi:10.1016/B978-0-12-409547-2.14103-4.

O processo inicia-se com a introdução da amostra via injetor, onde é vaporizada. O gás arrastador, que é a fase móvel, transporta a amostra para a coluna, onde se encontra a fase estacionária, com temperatura regulada. Aqui é, então, separada de acordo com características dos seus componentes, sendo estes monitorizados por um detetor, à medida que saem da coluna. Cada componente irá chegar a este detetor em tempos diferentes, tempos de retenção.^{148,149} Existem diferentes tipos de detetores, sendo o mais usado o detetor de ionização por chama ou FID. Este detetor permite uma análise de compostos orgânicos com elevada sensibilidade, permitindo avaliar uma amostra em termos de concentração de hidrocarbonetos.¹⁵⁰ Um FID usa uma chama, geralmente de hidrogénio/ar, pela qual passa a amostra para oxidar as moléculas do analito, produzindo iões. De forma a detetar estes iões são usados dois eléctrodos (um positivo e um negativo, para onde os iões são atraídos) que medem a diferença de potencial.^{150,151}

Apesar de ser bastante usado, o FID também tem algumas limitações, pois destrói a amostra, só fornece informação sobre a presença de compostos, não os identificando, não deteta compostos inorgânicos e é sensível à humidade, pois esta não permite a ignição do gás e, logo, não é possível acender a chama.¹⁵¹

1.4.1.2 Espetrometria de massa

A espetrometria de massa é uma técnica de química analítica usada para a identificação de compostos de estrutura conhecida ou para elucidar sobre a estrutura de compostos desconhecidos.^{139,147} Esta técnica foi desenvolvida na base de um único princípio: quando uma partícula carregada percorre um campo magnético, o seu percurso é desviado de forma inversamente proporcional à massa da partícula.¹⁵²

Esta técnica pode ser aplicada a variadas substâncias, que sejam voláteis ou não voláteis, polares ou não polares, sólidas, líquidas ou gasosas. Dentro de condições específicas, o MS também pode fornecer informação quantitativa.¹⁵³ Os resultados do MS são apresentados em unidades de rácio massa-carga ou m/z , onde m representa a massa do ião (em Dalton) e z o número de cargas presentes na molécula.¹⁵⁴

A análise por MS consiste em três fases: uma **fase I**, onde ocorre fragmentação da molécula através da fonte de ionização. Estas fontes podem ser variadas, sendo a mais usada a ionização por impacto eletrónico, ou seja, por aplicação de um feixe de eletrões de elevada energia que irá quebrar as ligações na molécula, com perda de eletrões; uma **fase II** de separação dos iões formados com recurso a um analisador de massa. A escolha deste depende da amplitude de massas que se pretende separar, da resolução, sensibilidade e transmissão dos iões, ou seja, a percentagem de iões que chega ao detetor; e, por fim, uma **fase III** que permite a deteção da molécula.¹⁵⁵

A aquisição do espectro de massa pode ser feito através do método de varrimento total (TIC), sendo monitorizados todos os iões do intervalo predefinido ou pelo método de monitorização seletiva de iões (SIM), onde são monitorizados um pequeno grupo de iões ou apenas um ião.¹⁵⁶

Nos últimos anos, os espectrómetros de massa evoluíram bastante e os últimos modelos possuem uma maior sensibilidade e rapidez, ainda que a sua composição básica se tenha mantido (**Figura 7**).¹⁴¹

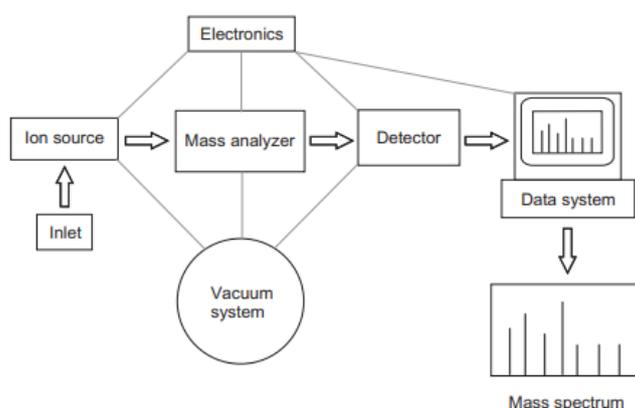


Figura 7: Composição básica de um espectrómetro de massa. Adaptado de: Perutka, Z. & Šebela, M. Basis of Mass Spectrometry: Technical Variants. Use Mass Spectrom. Technol. Clin. Microbiol. 19–45 (2018) doi:10.1016/B978-0-12-814451-0.00002-2.

1.4.1.3 Derivatização

Relativamente ao GC, certas moléculas com grupos funcionais como -COOH, -NH, -SH e -OH, como é o caso dos esteroides (incluindo os EAA), têm a capacidade de formar ligações de hidrogénio entre compostos e, conseqüentemente, são pouco voláteis, têm baixa estabilidade térmica e podem interagir com compostos da coluna cromatográfica, resultando em baixa detetabilidade.^{157,158} Para ultrapassar este problema é, então, adicionada uma etapa de derivatização. É denominado por derivatização todo e qualquer processo que envolve a transformação de um composto num produto derivado, com melhores propriedades cromatográficas.^{157,159} Desta forma, pretende-se converter substâncias polares ou não-voláteis a substâncias não polares e voláteis, melhorar a estabilidade térmica, aumentar o sinal no detetor ao adicionar certos grupos funcionais e/ou melhorar a separação no GC.¹⁶⁰

As reações de derivatização mais usadas incluem esterificação, sililação, acetilação e alquilação.¹⁶¹ Existem vários reagentes que podem ser usados para que ocorram estas reações, cuja escolha depende das características do analito. Uma das reações mais usadas em GC para a derivatização é a trimetilsililação, que envolve a adição de grupos trimetilsilil (TMS) (**Figura 8**). O reagente N, O - bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida, conhecido pelo seu acrónimo BSTFA, é um dos mais utilizados para este tipo de reações.^{159,162-164}

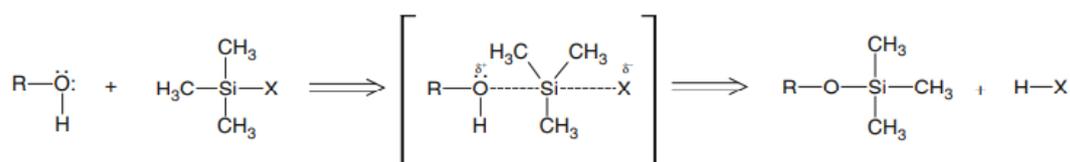


Figura 8: Reação de sililação de um grupo -OH, com o reagente BSTFA por adição de um grupo TMS. Adaptado de: Biology, M. The Strengths and Weaknesses of NMR Spectroscopy and Mass Spectrometry with Particular Focus on Metabolomics Research Metadata of the chapter

1.5- Objetivos

A contaminação de suplementos alimentares com EAA constitui uma preocupação para a comunidade medico-científica devido aos inúmeros efeitos secundários destes compostos e ao desconhecimento da sua toma, o que faz com o diagnóstico de certas condições de saúde seja difícil. Adicionalmente, atletas profissionais correm o risco de originar AAF nos controlos *anti-doping*.

Este trabalho tem como finalidade a análise de alguns tipos diferentes de suplementos alimentares, consumidos num contexto desportivo. O objetivo principal é a tentativa de avaliação da veracidade do rótulo de suplementos não hormonais, determinando o seu conteúdo em termos de EAA por GC-MS.

CAPÍTULO 2

2- Experimental

2.1- Materiais e Equipamentos

Tabela 2: Lista de reagentes, equipamentos e software utilizados ao longo do trabalho.

| REAGENTES | |
|---|-------------------------------------|
| Ácido Esteárico | Merck KGaA |
| Cloreto de Sódio | Baker Analyzed |
| Diclorometano seco e destilado | - |
| Hexano seco e destilado | - |
| Hidróxido de Sódio | Baker Analyzed |
| L-Leucina | Fluka-Garantie |
| L-Valina 99% | Acrós Organics |
| Metanol seco e destilado | - |
| BSTFA | Sigma Aldrich |
| EQUIPAMENTOS | |
| Cromatógrafo gasoso com detetor de ionização de chama | Agilent 6890 |
| Cromatógrafo gasoso | Agilent 7820 ^a GC System |
| Espetrómetro de Massa | Agilent 5975 series MSD |
| Centrífuga | Hettich Universal II |
| Placa de agitação e aquecimento | Heidolph MR 3001 |
| Balança semi-analítica | Mettler Toledo |
| Evaporador a vácuo | IKA MVP10 Basic |
| SOFTWARE | |
| Origin 8.5.1 | Origin Lab |

O metanol foi seco em refluxo segundo o método de Lund e Bjerrum e destilado a partir do respetivo alcóxido de magnésio. O hexano foi também seco em refluxo, na presença de fios de sódio e benzofenona e destilado. O diclorometano foi refluxado na presença de CaCl_2 e destilado.

Para a realização deste trabalho foram ainda adquiridos em lojas físicas 4 tipos de suplementos diferentes, os mais consumidos em contexto desportivo, como consta na **Tabela 3**.

Tabela 3: Tipo de suplementos adquiridos bem como o local de aquisição dos mesmos e uma breve descrição da sua função. ¹Descrição adaptada da publicidade feita aos suplementos.

| SUPLEMENTO | LOCAL RECOLHA | DESCRIÇÃO ¹ |
|---|-------------------------|---|
| Proteína (pó) | Loja produtos saudáveis | “Para desenvolver ou manter a massa muscular” |
| BCAAs (comprimido) | Loja produtos saudáveis | “Blocos de construção do novo tecido muscular, que o nosso organismo não consegue produzir” |
| <i>Tribulus Terrestris</i> (comprimido) | Hipermercado | “Impulsiona os níveis naturais de testosterona” |
| CLA com Carnitina (cápsula) | Hipermercado | “Eficaz na queima de gordura, dia e noite” |

2.2- Preparação das amostras

Para a identificação de possíveis contaminações de EAA em suplementos alimentares desportivos foi necessária uma etapa de extração, pois a matriz destes suplementos é muito complexa. É importante salientar que a extração de EAA é considerada a etapa obstáculo do processo. Por este motivo, a extração foi otimizada de forma a minimizar perdas e a maximizar o isolamento dos EAA no passo final, tendo sido adaptado o protocolo de V. Abbate *et al* (2014).¹⁹

Assim, para este trabalho foram adquiridos suplementos em forma de pó, cápsula ou comprimidos. Às cápsulas foi-lhe retirado o conteúdo e utilizado cerca de 1 mL deste. Entre 5 e 10 comprimidos (dependendo do seu tamanho) foram reduzidos a pó e usada 1g deste homogeneizado. Foi também usada 1g de suplemento em pó. De seguida, foram adicionados 20 mL de metanol e a mistura foi colocada numa placa de agitação durante cerca de 15 minutos para auxiliar a dissolução.

A mistura foi então centrifugada a 80 rpm, durante 5 minutos, tendo sido transferida a camada metanólica para um novo tubo e o solvente evaporado a vácuo. Ao resíduo seco foram adicionados 5 mL de NaOH (0.1M), 1g de NaCl e 10 mL de hexano, de forma a criar uma fase aquosa e repetiu-se as condições de centrifugação. Posteriormente, a camada de hexano foi transferida para um novo tubo e guardada. À camada aquosa

restante foram adicionados 5 mL de hexano, sendo esta mistura novamente centrifugada. Esta etapa foi repetida duas vezes.

Como os EAA são moléculas pouco voláteis é necessária uma etapa de derivatização antes da análise por GC-FID ou GC-MS. Para esse efeito, à camada de hexano foi retirado 1 mL e a este volume adicionados 200 µL de BSTFA e verificou-se a mudança de cor da solução. As amostras onde não se verificou mudança de cor foram colocadas num banho de parafina, a cerca de 80°C, durante 30 minutos. De seguida, o solvente foi evaporado com atmosfera de azoto. Por fim, adicionou-se 500 µL de diclorometano para reconstituição do resíduo e procedeu-se às injeções no GC-FID e GC-MS.

2.3- Preparação dos padrões externos

Foram preparadas soluções de L-valina, L-Leucina e Ácido Esteárico em diclorometano, com concentrações de 4 mg/mL, 25 mg/mL e 29 mg/mL respetivamente. Estas foram posteriormente derivatizadas com BSTFA, de igual forma às amostras de suplementos alimentares desportivos e procedeu-se às injeções no GC-FID.

2.4- Preparação das amostras para injeção direta

As amostras de suplementos alimentares desportivos foram também preparadas para injeção direta, ou seja, sem o passo de extração. Para isso foram preparadas soluções com 10 mL de diclorometano e 1g de suplemento sólido (pó ou comprimidos homogeneizados) ou 1 mL de suplemento em óleo (interior das cápsulas). A 1 mL destas foram adicionados 200 µL de BSTFA, seguindo o mesmo processo de derivatização que as amostras no ponto 2.1 e procedeu-se à injeção no GC-FID.

2.5- Metodologias analíticas

2.5.1 GC-FID

Os cromatogramas obtidos das amostras e padrões externos foram obtidos recorrendo ao GC-FID *Agilent 6890*, equipado com uma coluna HP-5 crosslinked com uma fase estacionária 5% fenilo e 95% metilpoli-siloxano (*Agilent*), de dimensões 30m x 0.32mm x 0.25µm. O gás arrastador usado foi o azoto, a 1 mL/min. O injetor foi mantido a uma temperatura de 250°C. Para as injeções foi utilizado um volume de amostra de 1µL. O forno foi colocado a uma temperatura inicial de 70°C. A temperatura aumentou até 290°C a 10°C/min, sendo mantida neste valor durante 15 minutos. Este programa permitiu ter os

sinais dos diferentes compostos da amostra com a separação necessária e os cromatogramas correspondentes foram analisados através do Origin 8.5.1.

2.5.2 GC-MS

As alíquotas das amostras após derivatização foram analisadas por GC-MS, equipado com uma coluna HP5-MS com uma fase estacionária 5% fenilo e 95% metilpoli-siloxano (*Agilent*), de dimensões 30m x 0.25mm x 0.25 μ m. O gás arrastador usado foi o hélio, a 1mL/min. O injetor foi mantido a uma temperatura de 250°C. Para as injeções foi utilizado um volume de amostra de 1 μ L. O forno foi colocado a uma temperatura inicial de 70°C. A temperatura aumentou até 290°C a 10°C/min, sendo mantida neste valor durante 15 minutos, para a amostra de suplemento de CLA com carnitina. Para as restantes amostras a temperatura aumentou de 70°C até 290°C a 10°C/min, sendo mantida neste valor 5 minutos e de 290°C até 310°C a 10°C/min, também mantida durante 5 minutos. Este programa permitiu ter os sinais dos diferentes compostos da amostra com a separação necessária.

CAPÍTULO 3

3- Resultados e discussão

3.1- Análise por GC-FID

Como referido anteriormente, a etapa de extração dos suplementos alimentares desportivos com metanol seguida de hexano está otimizada de forma a eliminar o máximo de constituintes não relevantes para o estudo em questão, enquanto assegura a integridade dos EAA que possam estar presentes.¹⁹ As amostras dos 4 suplementos e os padrões externos foram analisados por GC-FID, tendo-se obtido os cromatogramas apresentados neste capítulo.

De acordo com a informação que consta no seu rótulo, a amostra do suplemento de BCAAs continha, para além de outras substâncias, L-Valina, L-Leucina e Ácido Esteárico, sendo estas realçadas pois eram as únicas disponíveis em laboratório para serem usadas como padrão externo. Como controlo da extração foi também efetuada uma injeção direta deste suplemento. Os tempos de retenção (TR) mais relevantes para o estudo encontram-se discriminados na **Tabela 4** e os cromatogramas correspondentes encontram-se da **Figura 9**.

Como se pode observar, é possível identificar alguns tempos de retenção iguais entre as amostras e os padrões externos. O TR de 4.6 minutos é referente à L-valina e apresenta-se tanto na amostra de BCAA pós extração como na injeção direta. Com a presença deste sinal é admitida a hipótese de que este aminoácido não é totalmente eliminado na etapa de extração. Relativamente à L-leucina, a sua presença não é detetada, nem na amostra nem na injeção direta. Já o ácido esteárico encontra-se apenas na amostra de BCAA com um TR de 18.9 minutos. Assim, ainda que não possa ser feita uma identificação total dos compostos presentes na amostra do suplemento de BCAA, pode-se esperar uma extração pouco eficaz no que toca à eliminação de substâncias não revelantes para o estudo, como é o caso dos aminoácidos e ácido esteárico. Por outro lado, comparando o padrão cromatográfico da amostra pós extração (**Figura 9-A**) com o da injeção direta (**Figura 9-B**) é notória a diferença entre ambos, indicando a existência de outras substâncias na injeção direta que foram eliminadas durante o processo de extração, mas que não são passíveis de identificação por GC-FID.

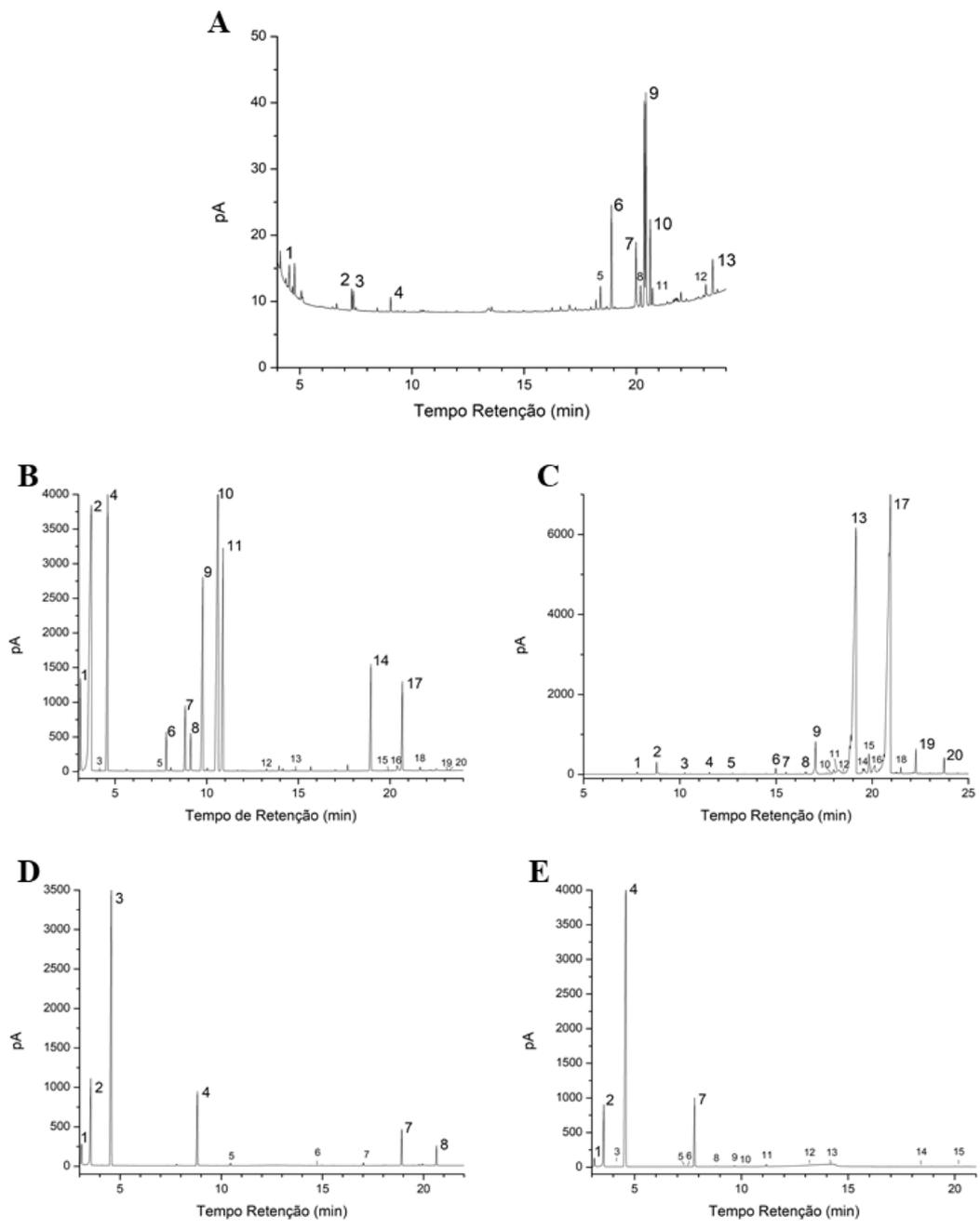


Figura 9: Cromatogramas relativos à amostra de BCAA (A), injeção direta (B), ácido esteárico (C), L-leucina (D) e L-valina (E).

Tabela 4: Resumo dos tempos de retenção relevantes para o estudo por comparação obtidos por GC-FID da amostra de BCAA e a sua injeção direta, L-valina e Ácido esteárico.

| Amostra BCAA | |
|---------------------|-----------------------------|
| Sinal | Tempo Retenção (min) |
| 1 | 4.6 |
| 6 | 18.9 |

| Ácido esteárico | |
|------------------------|-----------------------------|
| Sinal | Tempo Retenção (min) |
| 13 | 18.9 |

| L-valina | |
|-----------------|-----------------------------|
| Sinal | Tempo Retenção (min) |
| 4 | 4.6 |

| Injeção direta | |
|-----------------------|-----------------------------|
| Sinal | Tempo Retenção (min) |
| 4 | 4.6 |

Uma vez que no laboratório não existem as substâncias descritas nos rótulos dos suplementos alimentares de proteína em pó, de *Tribulus Terrestris* ou de CLA com carnitina, não foi possível usar padrões externos para fazer o mesmo tipo de comparação feita com o suplemento de BCAA. No entanto, tal como foi feito para o suplemento anterior, é possível tirar algumas conclusões quanto à eficácia do método de extração usado, por comparação com a injeção direta. É também possível proceder às otimizações da cromatografia gasosa.

Relativamente à amostra de proteína em pó, é possível verificar que aparecem mais sinais na injeção direta, após os 15 minutos (**Figura 10 A-2**) do que na amostra pós extração (**Figura 10 A-1**). Logo, pode-se suspeitar que a extração foi, de alguma forma, eficaz na eliminação de algumas substâncias, que não podem ser identificadas por GC-FID. A existência de poucos sinais nesta amostra pode ser explicada pela composição do suplemento analisado, sendo maioritariamente constituído por proteínas que não se dissolvem nos solventes usados e, logo, não estarão presentes na solução analisada.

Em relação às amostras de *Tribulus Terrestris* (**Figura 10-B**) e de CLA com carnitina (**Figura 10-C**) chega-se à mesma conclusão relativamente à eficácia da extração, novamente por comparação entre a amostra após extração e a injeção direta de ambos os suplementos.

Através das injeções do GC-FID apenas se retira informação sobre a quantidade de substâncias presentes nos suplementos e sobre os seus tempos de retenção. Por si só, esta informação não é suficiente para fazer a sua identificação, não existindo padrões de EAA para poder fazer um trabalho comparativo. Consequentemente, procedeu-se a alguns estudos de espectrometria de massa, na tentativa de identificar alguns dos componentes.

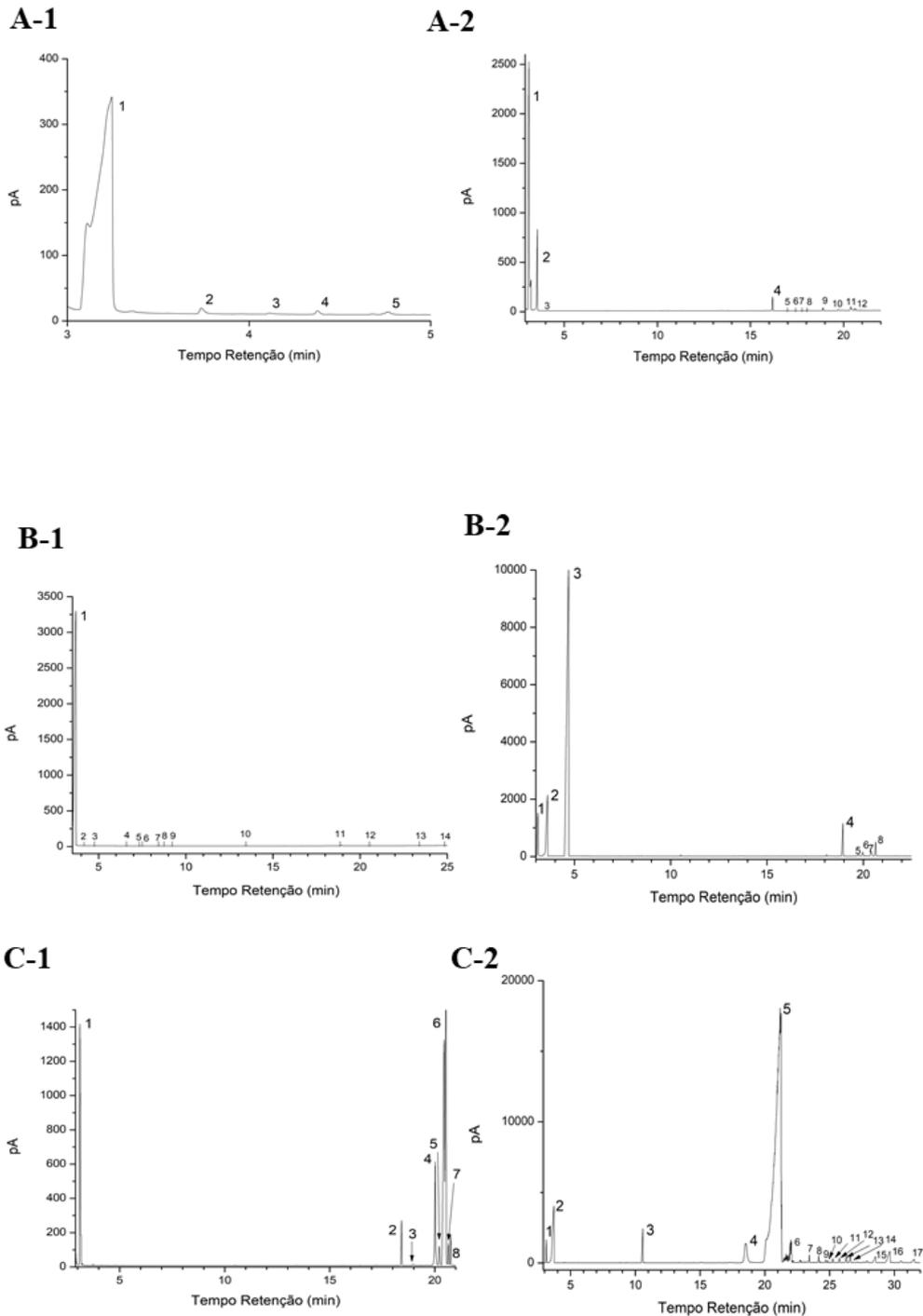


Figura 10: Cromatogramas relativos a uma amostra de um suplemento desportivo proteico (A) após extração (A-1) e injeção direta (A-2), de um suplemento de Tribulus Terrestris (B) após extração (B-1) e injeção direta (B-2) e de um suplemento de CLA com carnitina (C) após extração (C-1) e injeção direta (C-2).

3.2- Análise por GC-MS

O estudo por GC-MS das amostras dos suplementos alimentares revelou-se bastante complexa, pois implica conhecer as moléculas descritas no rótulo e que possam estar no extrato final, assim como fazer a identificação de outras moléculas, não descritas no rótulo, pelos seus padrões de fragmentação.

3.2.1 Suplemento de Tribulus Terrestris

Tribulus Terrestris é uma planta comum que cresce sem discriminação um pouco por todo o mundo e é bastante usada na medicina tradicional Chinesa e Indiana.¹⁶⁵ É também conhecida no mundo do desporto pelo seu conteúdo em saponinas esteroides, que podem atuar como promotor natural de testosterona ao aumentar a hormona luteinizante.¹⁶⁶ No entanto, considerando os poucos estudos conduzidos, a influencia de *Tribulus Terrestris* em atletas não é conclusiva, pelo que a publicidade que acompanha este suplemento (“Impulsiona os níveis naturais de testosterona”, retirado do site do supermercado onde é comercializado) parece ser infundada.¹⁶⁷

Relativamente ao conteúdo do rótulo e tendo em conta o tipo de extração feita, não seria de esperar a presença de muitos componentes no cromatograma. De facto, como se pode observar pelo cromatograma representado na **Figura 11**, apenas foram detetados 5 sinais com interesse para este estudo, por serem os de maior intensidade.

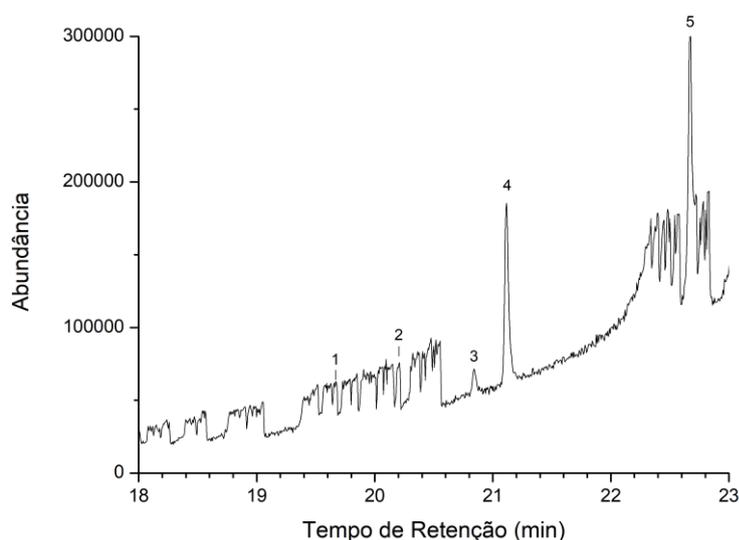


Figura 11: Cromatograma do suplemento alimentar de Tribulus Terrestris, obtido por GC-MS, entre os 18 e os 23 minutos, em que o sinal 1 é referente à molécula de 1-monolinoleoilglicerol bis-TMS, o sinal 2 e 3 ao ácido 9,12,15 – octadecatrienoico bis-TMS, o sinal 4 ao ácido hexadecanoico bis-TMS e o sinal 5 ao ácido octadecanoico bis-TMS.

A única molécula identificada por GC-MS que estava descrita no rótulo foi o “estereato de magnésio”, com um TR de 22.7 minutos. O estereato de magnésio é um sal de magnésio do ácido esteárico, também conhecido por ácido octadecanoico (IUPAC). Uma vez que o magnésio não é detetado por GC-MS, o estereato de magnésio é identificado pelo ácido esteárico. Este é usado na indústria alimentar como aditivo, especialmente em comprimidos, devido à sua capacidade aglutinante e emulsionante, mantendo os ingredientes ativos juntos.¹⁶⁸ O seu espectro de massa e estrutura do fragmento maioritário estão representado na **Figura 12**.

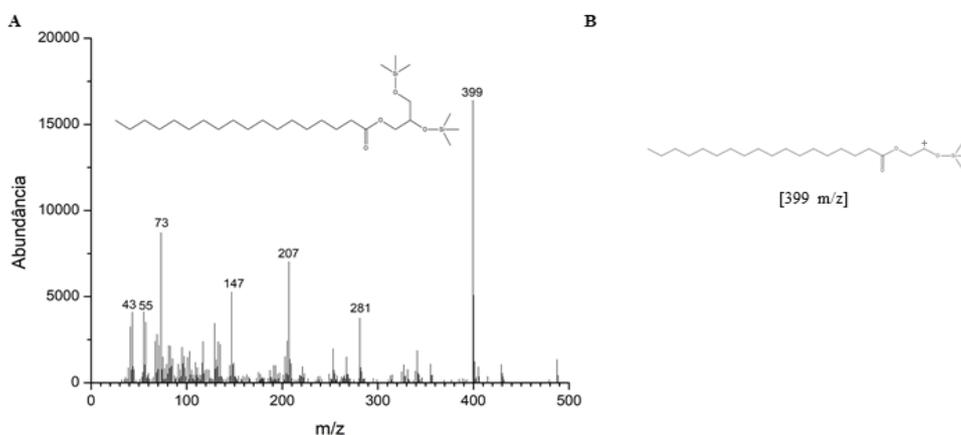


Figura 12: Espectro de massa ácido octadecanoico (IUPAC) ou ácido esteárico, relativo ao TR de 22.672 minutos (A) e estrutura do fragmento maioritário com 399 m/z (B).

Como descrito por Georgi Petkov¹⁶⁹ e A. Al Maofari *et al*¹⁶⁶, extratos de *Tribulus Terrestris* também possuem outros ácidos gordos como o ácido hexadecanoico (IUPAC) ou ácido palmítico. Este também foi identificado na amostra de suplemento analisado, tendo um TR de 21.1 minutos, ainda que não venha especificado no rótulo. O seu espectro de massa e a estrutura do fragmento maioritário com 371 m/z está representado na **Figura 13**.

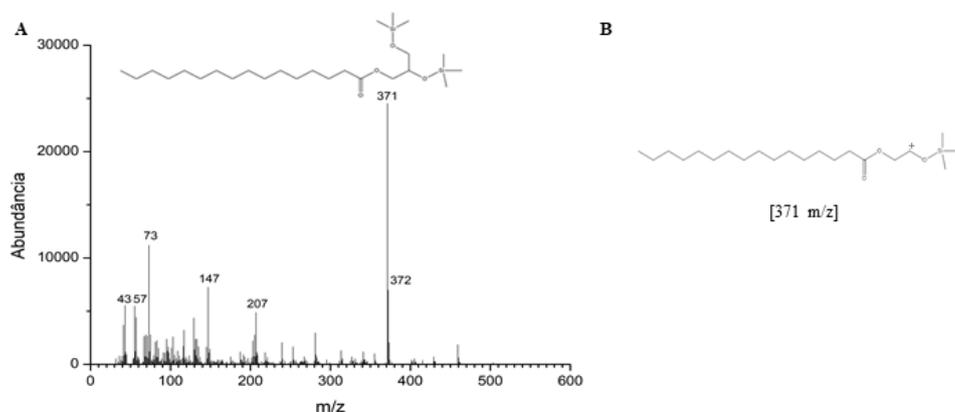


Figura 13: Espectro de massa do ácido hexadecanoico (IUPAC) ou ácido palmítico, relativo ao TR de 21.116 minutos (A) e estrutura do fragmento maioritário com 371 m/z (B).

Adicionalmente, este suplemento contém também 1-monolinoleoilglicerol, detetado com um TR de 19.7 minutos, um composto presente em diversos extratos vegetais com atividade antimicrobial e antioxidante^{170,171} e 9,12,15 – ácido octadecatrienoico (IUPAC) ou ácido alfa-linolênico, um ômega-3 comum de origem vegetal, detetado com dois sinais no cromatograma com TR de 20.2 e 20.8 minutos, cuja presença já foi confirmada por outros autores.^{165,169,172} Os seus espectros de massa estão representados nas **Figura 14** e **15**, respetivamente, com a estrutura dos fragmentos maioritários. Relativamente ao último composto, é ainda apresentada a estrutura de um dos fragmentos característicos com 147 m/z. Não foi possível identificar a fragmentação que origina o outro fragmento característico com 129 m/z.

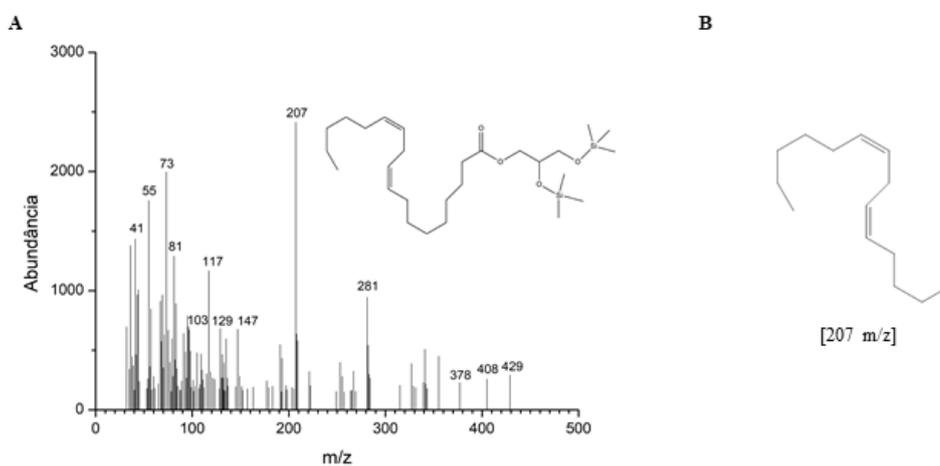


Figura 15: Espectro de massa do 1-monolinoleoilglicerol, relativo ao TR de 19.7 minutos (A) e estrutura do fragmento maioritário, com 207 m/z (B).

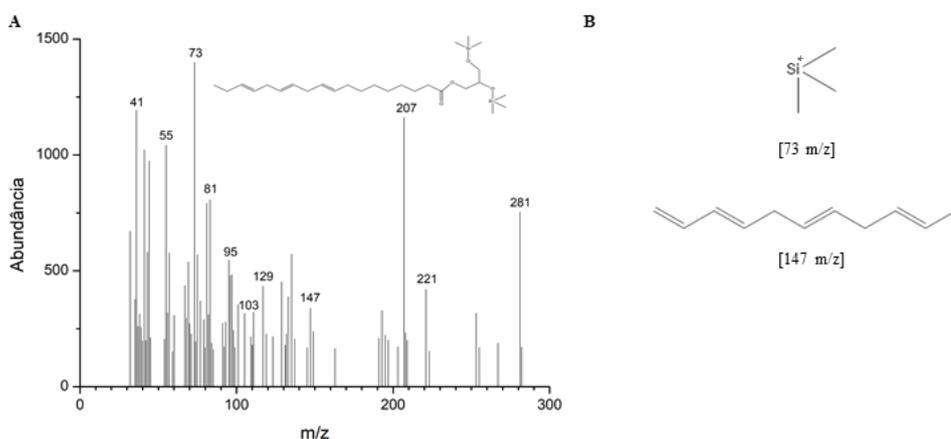


Figura 14: Espectro de massa do ácido 9,12,15 – octadecatrienoico (IUPAC) ou ácido alfa-linolênico, relativo ao TR de 20.2 e 20.8 minutos (A) e do fragmento maioritário com 73 m/z e um dos fragmentos característicos encontrados com 147 m/z (B).

Este suplemento foi escolhido para esta análise, pois está à venda em qualquer supermercado e é publicitado como um suplemento que “impulsiona os níveis naturais de testosterona”, o que poderia indicar que tivesse vestígios de EAA na sua composição, de forma a atender as expectativas dos consumidores. Nesta análise não foram identificados EAA. Os compostos identificados que não estão descritos no rótulo são seguros para consumo humano. Assim, é possível concluir que este suplemento é seguro para os consumidores, não contendo substâncias tóxicas aparentes nem EAA que possam fazer com que atletas apresentem testes positivos nos controlos *anti-doping*.

3.2.2 Suplemento de BCAAs

O suplemento de BCAA escolhido para este estudo é composto maioritariamente por valina, isoleucina e leucina, aminoácidos essenciais para o ser humano. Nenhum destes foram identificados por GC-MS no extrato final, apesar de se suspeitar da presença de valina pela análise por GC-FID. Por serem estes os compostos maioritários, é de esperar que os outros compostos não tenham sinais muito intensos. Esta suspeita é confirmada pela observação do cromatograma, na **Figura 16**.

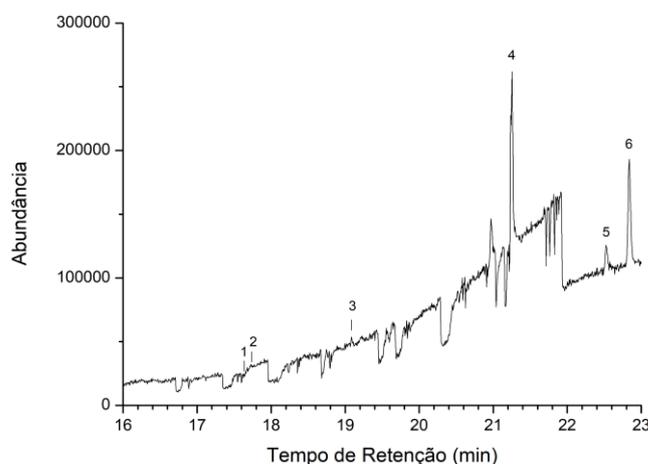


Figura 16: Cromatograma do suplemento alimentar de BCAAs, obtido por GC-MS, entre os 16 e os 23 minutos, em que o sinal 1 é referente à molécula de ácido 9,12,15 – octadecatrienoico bis-TMS, o sinal 2 ao ácido oleico TMS, o sinal 3 ao 1-monolinoleoilglicerol bis-TMS, o sinal ao ácido hexadecanoico bis-TMS, o sinal 5 novamente ao 1-monolinoleoilglicerol bis-TMS e o sinal 6 ao ácido octadecanoico bis-TMS.

De todas as moléculas identificadas, apenas o estereato de magnésio e o ácido esteárico ou ácido octadecanoico (IUPAC), detetado com um TR de 22.8 minutos, estavam especificados no rótulo. Estes dois compostos são usados em conjunto neste suplemento como agentes anti-aglomerantes. O espetro de massa relativo ao ácido esteárico e a estrutura do fragmento maioritário encontram-se na **Figura 17**.

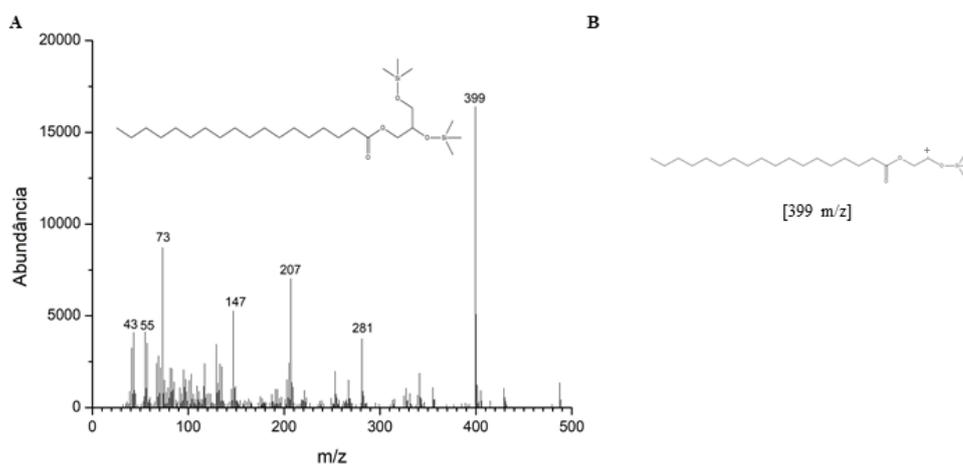


Figura 17: Espectro de massa ácido octadecanoico (IUPAC) ou ácido esteárico, relativo ao TR de 22.8 minutos (A) e estrutura do fragmento maioritário com 399 m/z (B).

Para além destas substâncias, este suplemento tem ainda na sua constituição cera de carnaúba, usada como agente de revestimento. Estudos anteriores mostram que esta cera é composta por 5 constituintes principais: hidrocarbonetos, esterres, álcoois gordos, aldeídos gordos e ácidos gordos.¹⁷³ Contudo, não são especificados quais os ácidos gordos presentes. Pela análise feita a este suplemento, foram detetados 3 ácidos gordos não especificados no rótulo: ácido 9,12,15 – octadecatrienoico bis-TMS (IUPAC) ou ácido alfa-linolénico (ómega 3), com um TR de 17.68 minutos, ácido (Z)-octadec-9-enoico (IUPAC) ou ácido oleico (ómega 9), com um TR de 17.72 minutos e ácido hexadecanoico (IUPAC) ou ácido palmítico, com um TR de 21.3 minutos. Os espectros de massa destes ácidos gordos e respetivas estruturas dos fragmentos maioritários encontram-se na **Figura 18, 19 e 20**, respetivamente.

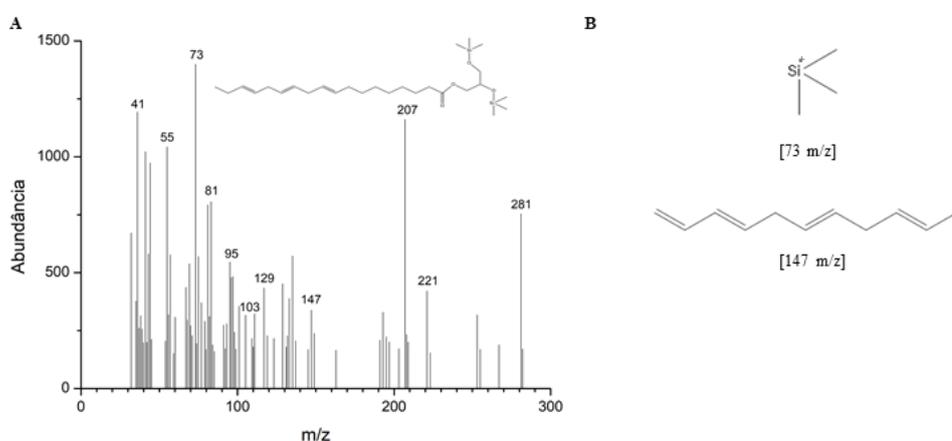


Figura 18: Espectro de massa do ácido 9,12,15 – octadecatrienoico (IUPAC) ou ácido alfa-linolénico, relativo ao TR de 17.68 minutos (A) e estruturas do fragmento maioritário com 73 m/z e um dos fragmentos característicos encontrados com 147 m/z (B).

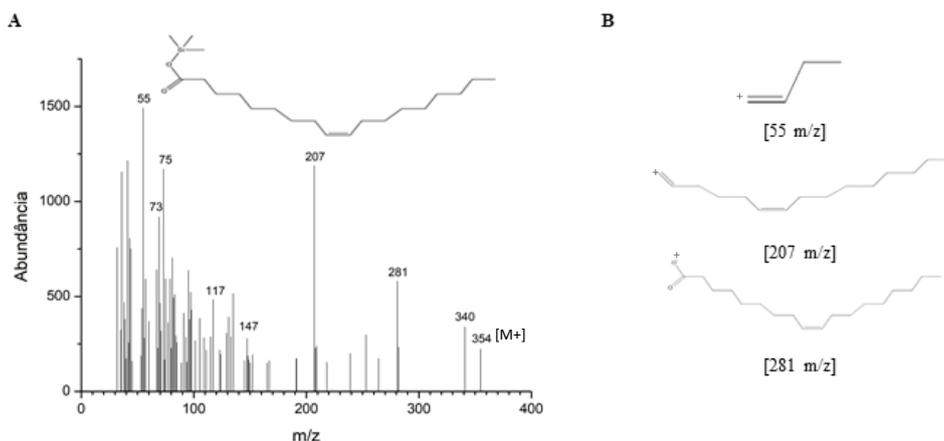


Figura 19: Espectro de massa do ácido (Z)-octadec-9-enoico (IUPAC) ou ácido oleico, relativo ao TR de 17.72 minutos (A) e algumas das estruturas dos fragmentos maioritários com 55 m/z, 207 m/z e 281 m/z (B).

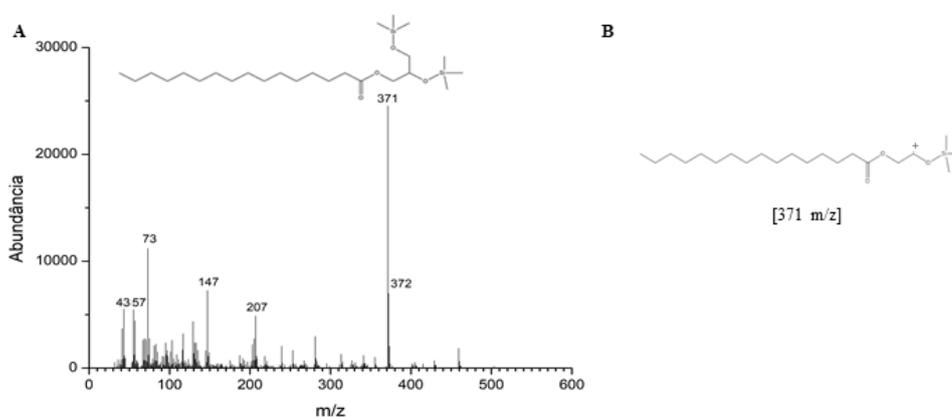


Figura 20: Espectro de massa do ácido hexadecanoico (IUPAC) ou ácido palmítico, relativo ao TR de 21.3 minutos (A) e estrutura do fragmento maioritário com 371 m/z (B).

Para além destas moléculas, foi ainda detetado o 1-monolinoleoilglicerol, com dois TR diferentes: 19.2 e 22.3 minutos, cujo espectro de massa se encontra na **Figura 21**. A presença deste composto no suplemento de BCAAs não seria de esperar uma vez que não existem relatos da presença deste composto na cera de carnaúba, ainda que esta seja de origem vegetal. Para além disto, este suplemento não possui na sua composição mais substâncias de origem vegetal. Contudo, este suplemento contém um aviso de alérgenos que informa os consumidores sobre a possibilidade de ter vestígios de leite, ovos, glúten e derivados e soja, pois é fabricado nas mesmas instalações em que se manuseiam estes produtos. A soja é uma das leguminosas mais consumidas em todo o mundo, pelo que existe um grande interesse em estudar o seu perfil fitoquímico.¹⁷⁴ Os estudos realizados aos grãos de soja, conduzidos por GC-MS, detetam a presença de 1-monolinoleoilglicerol, entre outros compostos.¹⁷⁵ Por este motivo, é provável que a presença desta molécula no suplemento de BCAAs seja fruto de contaminações.

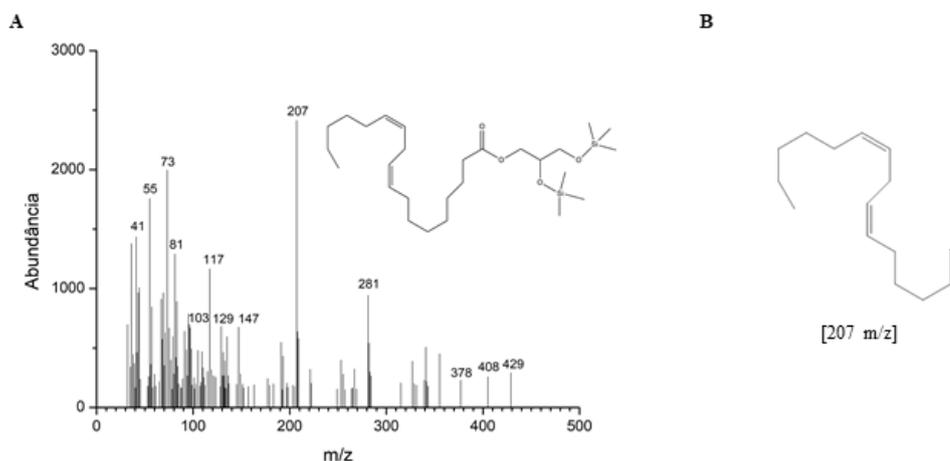


Figura 21: Espectro de massa do 1-monolinoleoilglicerol, relativo ao TR de 19.2 e 22.3 minutos (A) e estrutura do fragmento maioritário com 207 m/z (B).

Este suplemento foi escolhido pois é um dos mais consumidos em contexto desportivo e é um dos suplementos com maior probabilidade de terem contaminações por EAA, como discutido no Capítulo 1. No entanto, nesta análise não foram identificados vestígios de EAA. Além disso, as substâncias identificadas não presentes no rótulo podem ser consumidas pelo ser humano e fazem parte de outros compostos usados. Também a possível contaminação com 1-monolinoleoilglicerol não é problemática, uma vez que este é comum em compostos vegetais. Assim, conclui-se que este suplemento é seguro para os consumidores, de igual forma ao suplemento anterior.

3.2.3 Suplemento de proteína

O suplemento de proteína escolhido para este estudo é composto por 98% de proteínas do soro de leite que, devido ao tipo de extração feita, não estão no extrato final e, como tal, não aparecem na análise por GC-MS. Para além de proteínas, este suplemento contém ainda outras moléculas, como aditivos e adoçantes, que podem aparecer na análise por GC-MS. De facto, aparecem diversos sinais entre os 18 e 28 minutos no cromatograma, como se pode observar na **Figura 22**.

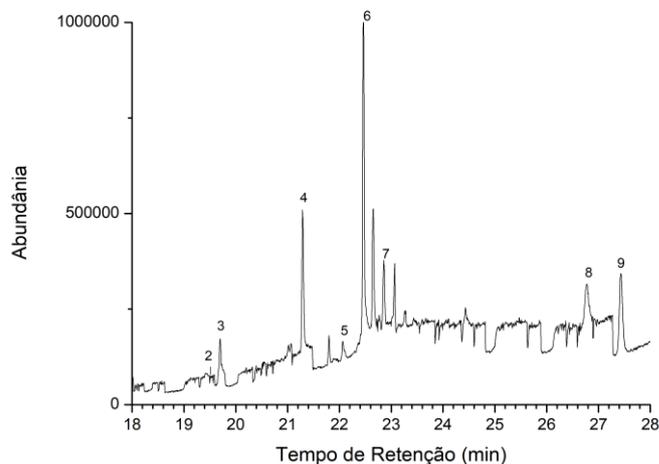


Figura 22: Cromatograma do suplemento alimentar de proteína, obtido por GC-MS, entre os 18 e os 28 minutos, em que o sinal 2 é referente à molécula de 1-monolinoleoilglicerol bis-TMS, o sinal 3 ao ácido mirístico bis-TMS, o sinal 4 ao ácido hexadecanoico bis-TMS, o sinal 5 ao ácido 9,12,15 – octadecatrienoico bis-TMS, o sinal 6 à lactose 8-TMS, o sinal 7 ao ácido octadecanoico bis-TMS, o sinal 8 ao ácido propanoico 2-(3-acetoxi-4,4,14- trimetilandro-8-en-17-yl) e o sinal 9 ao colesterol TMS.

Na análise deste suplemento foi detetado, com um TR de 1.6, o acetato de etilo (não representado no cromatograma acima), cujo espectro de massa se encontra representado na **Figura 23**. As estruturas dos fragmentos originados encontram-se na **Figura 24**. Por ser uma molécula cuja presença é totalmente inesperada, foi feita uma análise mais detalhada do espectro de massa, para confirmar a identificação da molécula.

O sinal com 88 m/z é o ião molecular $[M+]$; o ião com 43 m/z é o mais estável e, logo, o mais abundante. O acetato de etilo é também conhecido pela sua fragmentação pelo Rearranjo de McLafferty +1, originando o fragmento com 61 m/z. Esta molécula pode também originar um fragmento com 70 m/z por perda de uma molécula de água.¹⁷⁶

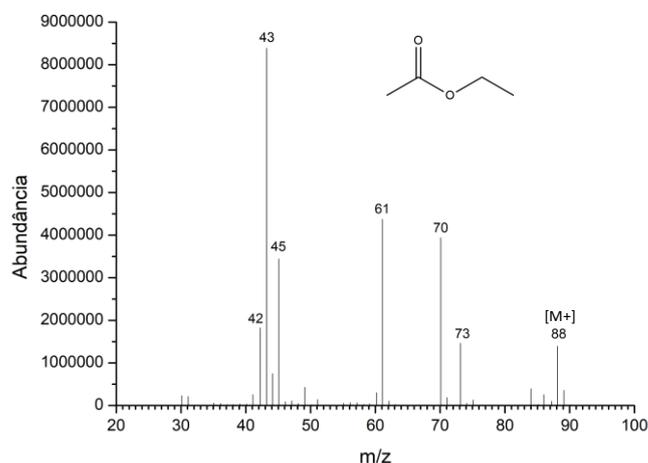


Figura 23: Espectro de massa do acetato de etilo, relativo ao TR de 1.6 minutos.

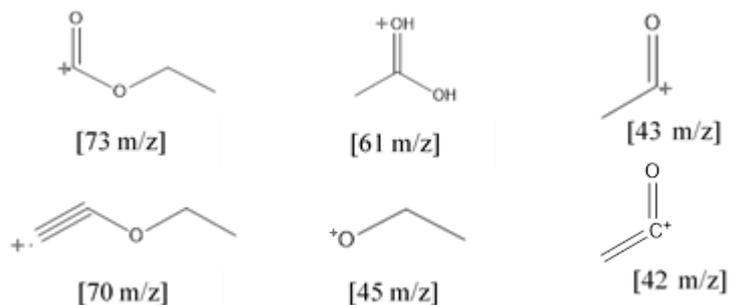


Figura 24: Estruturas dos fragmentos do acetato de etilo, com 73 m/z, 70 m/z, 61 m/z, 45 m/z, 43 m/z e 42 m/z.

A presença destes íons no espectro de massa confirma a suspeita de que existe acetato de etilo nesta amostra de suplemento analisada. Na indústria alimentar, a manipulação da soja envolve a utilização de solventes como etanol.^{177,178} O etanol pode ser oxidado a ácido acético, que por sua vez pode originar acetato de etilo, o que explica a sua presença neste composto. Por outro lado, o acetato de etilo é também um solvente bastante usado nas diferentes indústrias, podendo ser usado na indústria alimentar como aroma.^{179,180} Este suplemento de proteína tem também especificado no rótulo a presença de lecitina de soja. A lecitina é uma mistura constituída por colina, glicerol, ácidos gordos, glicolípido, triglicerídeos e fosfolípidos, sendo a lecitina de soja a mais comum.¹⁸¹ Devido à presença de soja neste suplemento, não é de estranhar a presença de 1-monolinoleoilglicerol, com um TR de 19.6 minutos.¹⁷⁵ O espectro de massa encontra-se representado na **Figura 25**.

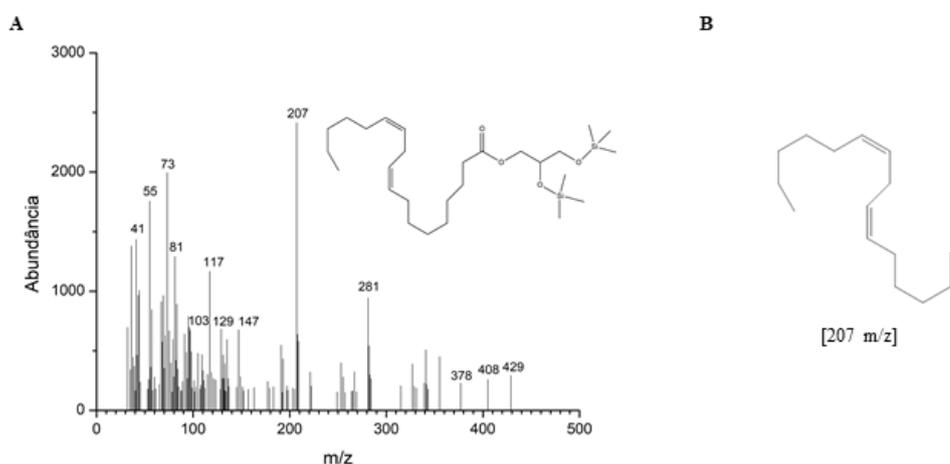


Figura 25: Espectro de massa do 1-monolinoleoilglicerol, relativo ao TR de 19.6 minutos (A) e estrutura do fragmento principal com 207 m/z (B).

Para além destas moléculas, foram ainda detetados 4 ácidos gordos: ácido tetradecanoico (IUPAC) ou ácido mirístico, com um TR de 19.7 minutos, ácido hexadecanoico (IUPAC) ou ácido palmítico, com um TR de 21.3 minutos, ácido 9,12,15 – octadecatrienoico

(IUPAC) ou ácido alfa-linolénico, com um TR de 22.0 minutos e ácido octadecanoico (IUPAC) ou ácido esteárico, com um TR de 22.9 minutos, não especificados no rótulo do suplemento em análise. Os espectros de massa e estruturas de alguns dos fragmentos estão representados nas Figuras 26-29.

O ácido Tetradecanoico (IUPAC) ou ácido mirístico é um dos principais ácido gordo presentes na gordura de leite, o que justifica a sua presença neste suplemento.¹⁸²

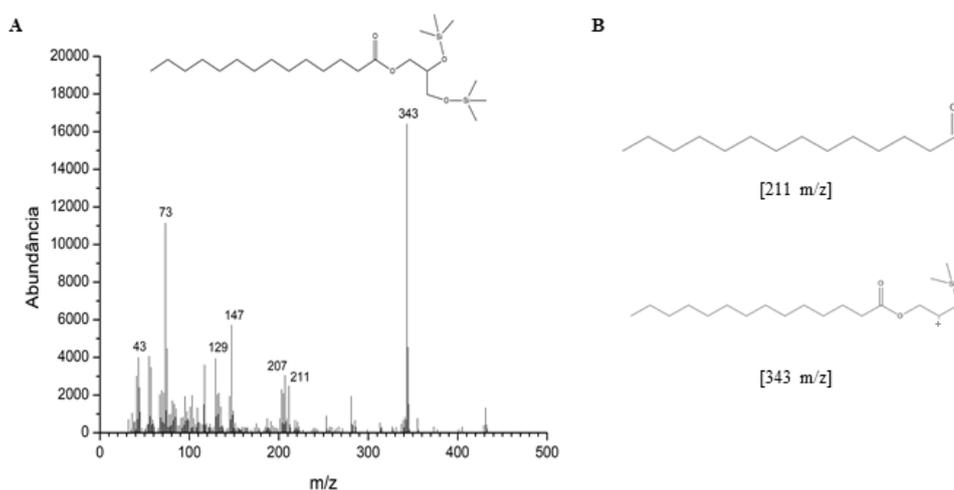


Figura 27: Espectro de massa do ácido tetradecanoico (IUPAC) ou ácido mirístico, relativo ao TR de 19.7 minutos (A) e estrutura de um dos fragmentos característicos com 211 m/z e do fragmento principal com 343 m/z. (B).

Relativamente aos restantes ácidos gordos detetados, como o ácido palmítico, ácido alfa-linolénico e o ácido esteárico, a sua provável origem é a lecitina de soja, ainda que na literatura consultada não sejam especificados os ácidos gordos que a constituem. No entanto, existem relatos da presença destes ácidos gordos nos grãos de soja que lhe dão origem.¹⁷⁵ A lecitina de soja é usada como emulsionante, impedindo a separação da água e gordura no suplemento.¹⁸³

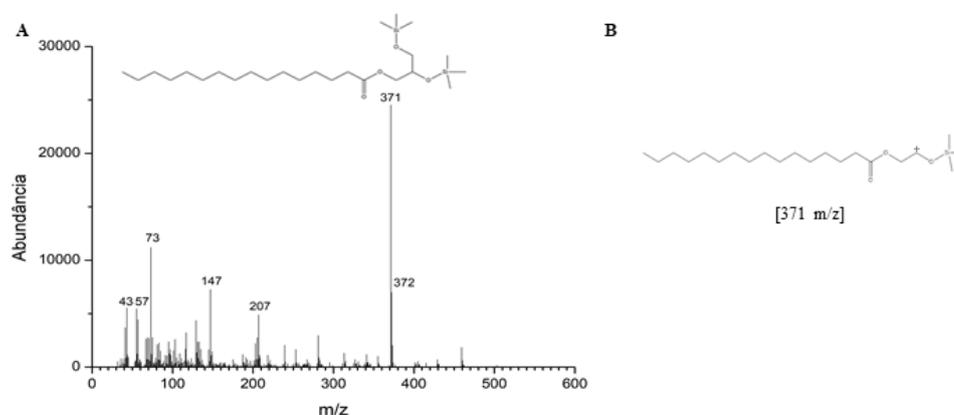


Figura 26: Espectro de massa do ácido hexadecanoico (IUPAC) ou ácido palmítico, relativo ao TR de 21.3 minutos (A) e estrutura do fragmento principal com 371 m/z (B).

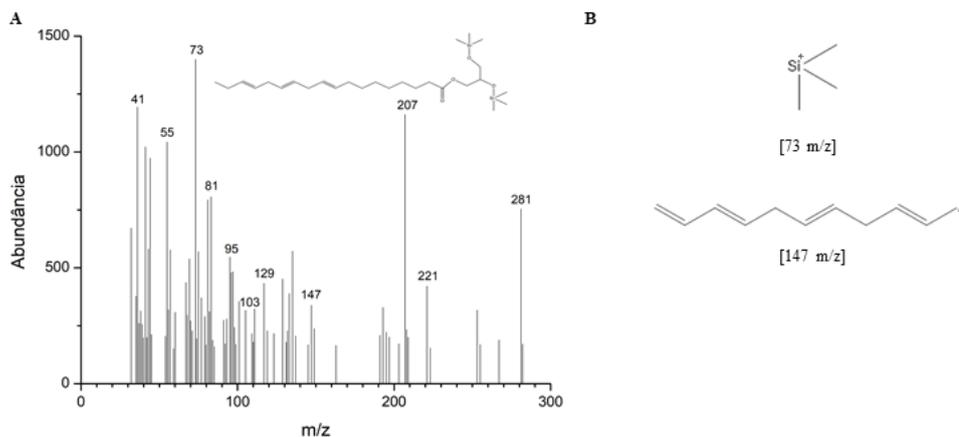


Figura 28: Espectro de massa do ácido 9,12,15 – octadecatrienoico (IUPAC) ou ácido alfa-linolénico, relativo ao TR de 22.0 minutos (A) e da estrutura do fragmento principal com 73 m/z e um dos fragmentos característicos com 147 m/z (B).

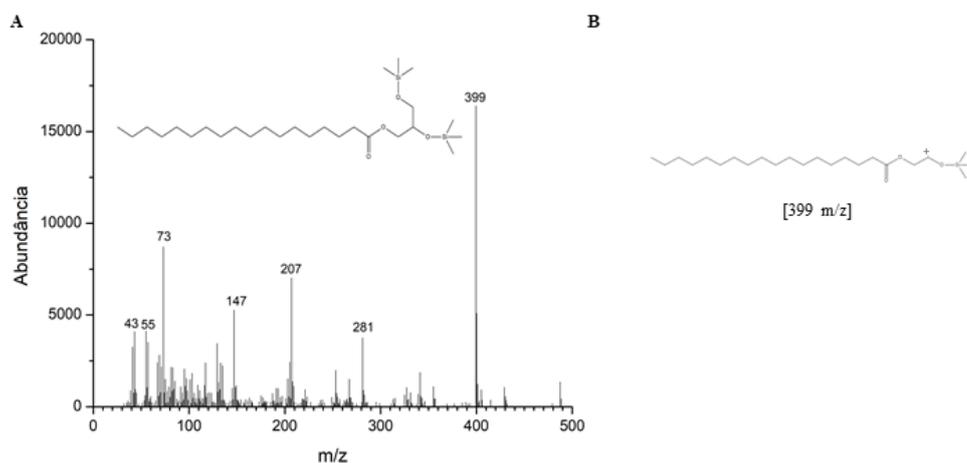


Figura 29: Espectro de massa ácido octadecanoico (IUPAC) ou ácido esteárico, relativo ao TR de 22.8 minutos (A) e do fragmento principal com 399 m/z (B).

Na análise a este suplemento foi ainda detetada a presença de lactose, com um TR de 22.5 minutos. A lactose é um dissacarídeo que consiste em β -D-galactose e β -D-glucose, unidas por uma ligação glicosídica $\beta(1-4)$.¹⁸⁴ Esta é também conhecida como “açúcar do leite” e está presente no soro do leite, de onde são retiradas as proteínas para este suplemento. Por este motivo, não é de estranhar a presença de lactose. O espectro de massa da lactose encontra-se na **Figura 30**.

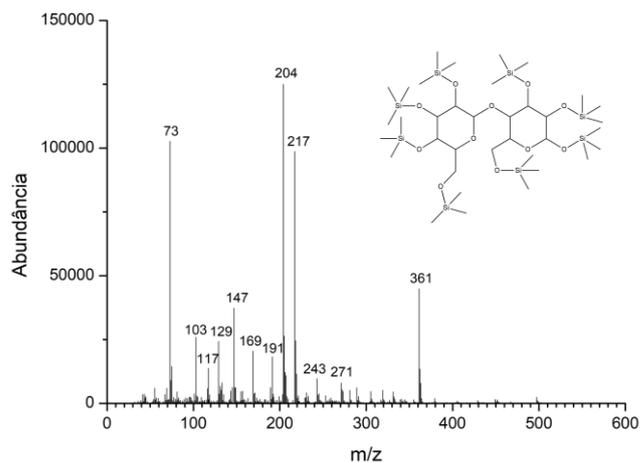


Figura 30: Espectro de massa da molécula de lactose 8-TMS, relativo ao TR de 22.5 minutos.

Neste suplemento foi também foi detetada a presença de colesterol, cujo espectro de massa encontra-se representado na **Figura 31**. O sinal com 458 m/z é o ião molecular $[M+]$ e o sinal com 443 m/z corresponde à perda de um grupo metilo. O colesterol é um esteroide muito comum em produtos animais para consumo humano, como a carne e o leite.¹⁸⁵ Tal como acontece com a lactose, a presença de colesterol é justificada, uma vez que este suplemento é fabricado a partir do soro do leite.

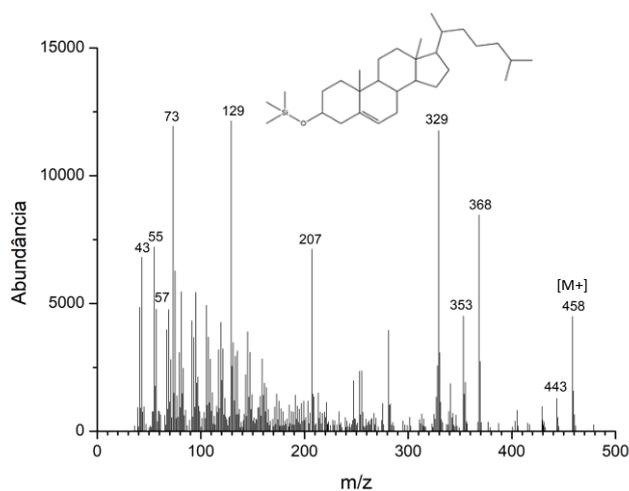


Figura 31: Espectro de massa do colesterol TMS, relativo ao TR de 27.4 minutos.

Por fim, foi ainda detetado o ácido propanoico 2-(3-acetoxi-4,4,14- trimetilandrosto-8-en-17-yl), com um TR de 26.8 minutos, que não se encontra no rótulo do suplemento. O seu espectro de massa está representado na **Figura 32**. O ácido propanoico é uma molécula natural com 3 carbonos usado como conservante alimentar devido à sua atividade anti microbiana e antifúngica.¹⁸⁶ A molécula detetada parece tratar-se de um derivado esteroide

deste ácido, pelo que poderá ser um conservante sintético, usado com o mesmo objetivo. Na literatura parece não haver registo da função desta molécula, pelo que esta teoria não pode ser confirmada.

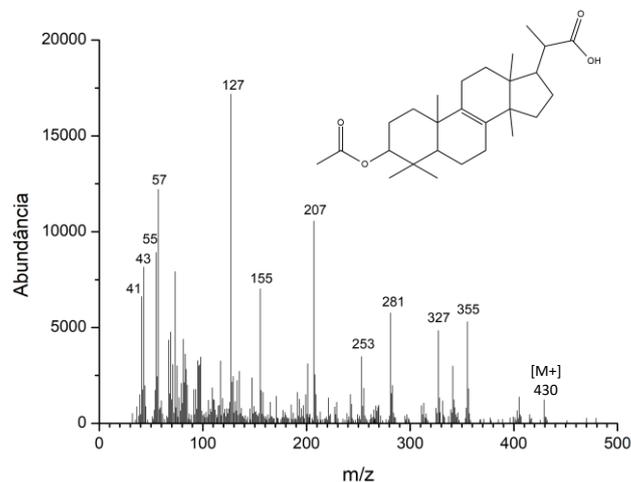


Figura 32: Espectro de massa do ácido propanoico 2-(3-acetoxi-4,4,14- trimetilandrosta-8-en-17-yl), relativo ao TR de 26.8 minutos.

Este suplemento foi escolhido para esta análise pois é um dos mais consumidos em contexto desportivo, em conjunto com o suplemento anterior de BCAAs e também é um dos suplementos com maior probabilidade de terem contaminações por EAA, como discutido no Capítulo 1. Contudo, nesta análise não foram identificados vestígios de EAA.

A análise deste suplemento revelou ainda a presença de acetato de etilo, que poderá ter origem numa contaminação com o solvente industrial ou poderá ser usado como aroma sintético. A FDA caracteriza este composto como sendo de classe 3, ou seja, é uma substância com baixo risco de toxicidade para o ser humano a curto prazo. No entanto, desconhecem-se os seus efeitos secundários a longo prazo.¹⁸⁷ Por ser uma potencial contaminação com possíveis repercussões negativas para o ser humano, sugere-se uma análise confirmatória a este suplemento e uma análise a outros lotes à venda, para perceber se a esta substância está presente. Dos outros compostos identificados que não constam no rótulo, deve-se ter atenção apenas ao ácido propanoico 2-(3-acetoxi-4,4,14-trimetilandrosta-8-en-17-yl), por não se saber que implicações tem o seu consumo para o ser humano, uma vez que os outros são moléculas seguras para consumo.

Assim, não é possível concluir com certeza de que este suplemento é seguro para os consumidores. Sugere-se, para estudos futuros, uma análise por GC-MS/MS, que permite

eliminar algumas interferências da matriz, de modo a perceber se possam existir outras moléculas contaminantes e o uso de um padrão para os contaminantes encontrados.

3.2.4 Suplemento de CLA com carnitina

O suplemento de CLA com carnitina revelou ser o suplemento com mais substâncias no extrato final detetadas por GC-MS. Para facilitar a interpretação dos sinais, o cromatograma estará dividido em 3 partes, que não incluem os TR iniciais.

Na análise deste suplemento foi detetado, com um TR de 2.0 minutos, o acetato de etilo, o mesmo encontrado no suplemento anterior. Este suplemento contém óleo de soja, pelo que se chega à mesma conclusão quanto à origem deste componente.

Com um TR de 7.9 minutos, foi detetado o glicerol (não representado no cromatograma), cujo espectro de massa e estrutura dos fragmentos principais se encontram na **Figura 33**. O sinal com 293 m/z é relativo à perda de um grupo metilo. O sinal com 147 m/z é característico de compostos com mais de um grupo trimetilsilil.¹⁸⁸ O glicerol é muito usado em produtos alimentares como solvente para aromatizantes e corantes alimentares.¹⁸⁹ Este é assinalado no rótulo do suplemento, não como “glicerol” mas como “glicerina”, que é o nome dado ao glicerol comercial.

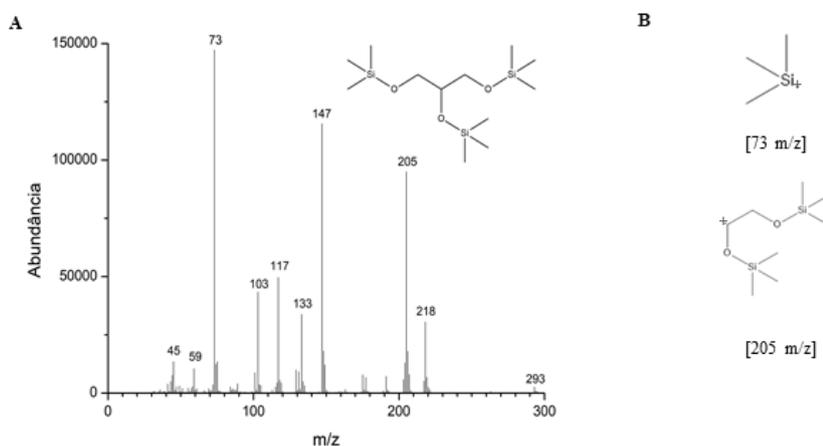


Figura 33: Espectro de massa do glicerol, relativo ao TR de 7.9 minutos (A) e estrutura do fragmento principal com 73 m/z e do fragmento com 205 m/z (B).

Como se pode observar na primeira parte do cromatograma (**Figura 34**), entre os 16 e os 20 minutos é possível detetar 5 substâncias diferentes: cafeína, com um TR de 16.2 minutos, ester etílico do ácido hexadecanoico, com um TR de 16.7 minutos, oleato de etilo, com um TR de 18.4 minutos, ester etílico do ácido 9,12 – octadecadienoico, com um TR de 18.9 minutos e ester metílico do ácido 10, 13 – eicosadienoico, com um TR de

19.9 minutos. Os espectros de massa destes e respectivos fragmentos principais encontram-se representados nas **Figuras 35-39**.

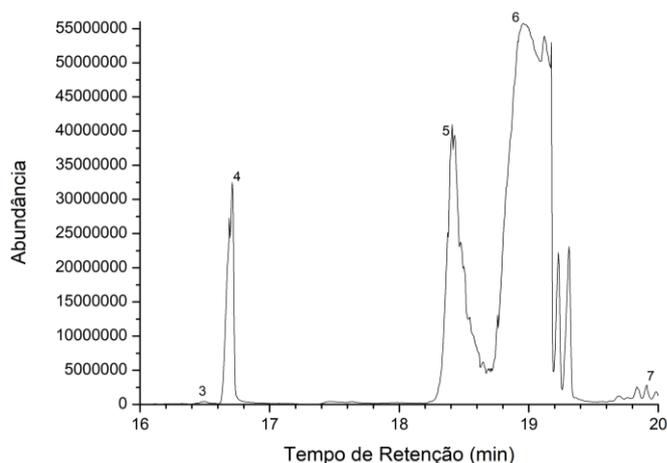


Figura 34: Cromatograma do suplemento alimentar de CLA com carnitina, obtido por GC-MS, entre os 16 e os 20 minutos, em que o sinal 3 é referente à cafeína, o sinal 4 ao ester etílico do ácido hexadecanoico, o sinal 5 ao oleato de etilo, o sinal 6 ao ester etílico do ácido 9,12 – octadecadienoico e o sinal 7 ao ester metílico do ácido 10, 13 – eicosadienoico.

A cafeína é um alcaloide psicostimulante, com estrutura de purina, naturalmente encontrada no café, chá, cacau, entre outros. Atualmente, sabe-se que a cafeína está presente em mais de 60 espécies de plantas.¹⁹⁰ Devido à sua presença em diversas plantas, é levantada a hipótese de que a cafeína foi, originalmente, um nutriente não essencial, presente em quantidades mínimas, mas extremamente útil como pesticida. Ao longo dos anos, a sua presença foi aumentando a probabilidade de sobrevivência da planta, pelo que se tornou um agente protetor co evolucionário.¹⁹¹

O suplemento de CLA com carnitina analisado contém chá verde, que por sua vez contém cafeína, pelo que a presença desta substância não é de estranhar. O ião mais predominante é o ião molecular com 194 m/z. nois é o ião mais estável.

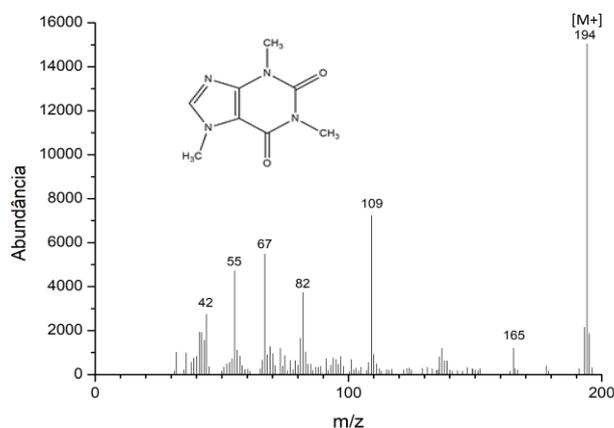


Figura 35: Espectro de massa da cafeína, relativo ao TR de 16.2 minutos.

Este suplemento também contém na sua constituição *Camellia Sinensis*, a espécie mais usada para o fabrico de chá verde.¹⁹² Os extratos desta planta possuem diversos compostos ativos com função anti fúngica, anti microbial e antioxidante. Um destes compostos é o ester etílico do ácido hexadecanoico, que foi detetado na análise a este suplemento e cujo espectro de massa e os fragmentos característicos se encontram na **Figura 36**.¹⁹³ Os iões característicos desta molécula têm 88 e 101 m/z.

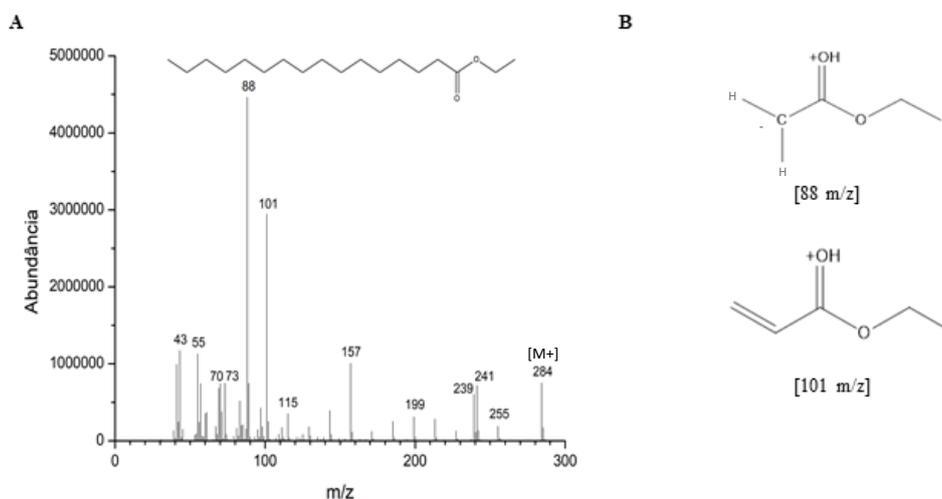


Figura 36: Espectro de massa do ester etílico do ácido hexadecanoico, relativo ao TR de 16.7 minutos (A) e estrutura dos dois fragmentos principais característicos com 88 m/z e 101 m/z (B).

Relativamente aos restantes compostos, não existe um motivo aparente para que estes se encontrem no suplemento analisado, uma vez que se trata de esteres metílicos e etílicos dos ácidos gordos, não descritos no rótulo. Para além disso, na literatura consultada, estes derivados são maioritariamente relatados como constituintes de biocombustíveis, fabricados a partir de óleos vegetais e não em produtos para consumo humano.¹⁹⁴ Contudo, existem alguns relatos destes esteres de ácidos gordos presentes em azeite, derivados de processos de fermentação nas azeitonas.¹⁹⁵ Tendo isto em conta e pelas características destes compostos, estes tanto podem ter origem no extrato de chá verde usado como no óleo de soja. No entanto, na literatura consultada não existem dados que suportem esta teoria.^{175,196}

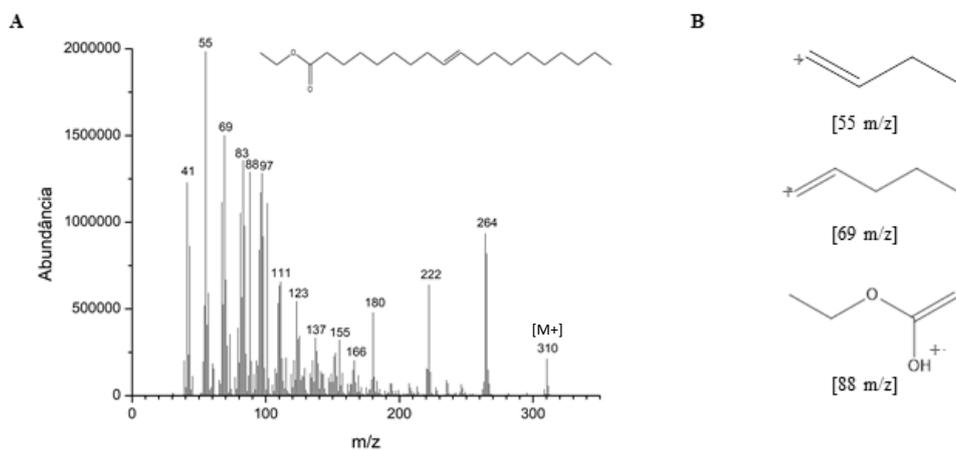


Figura 37: Espectro de massa do oleato de etilo, relativo ao TR de 18.4 minutos (A) e estrutura do fragmento principal com 55 m/z e fragmentos característicos com 69 m/z e 88 m/z (B).

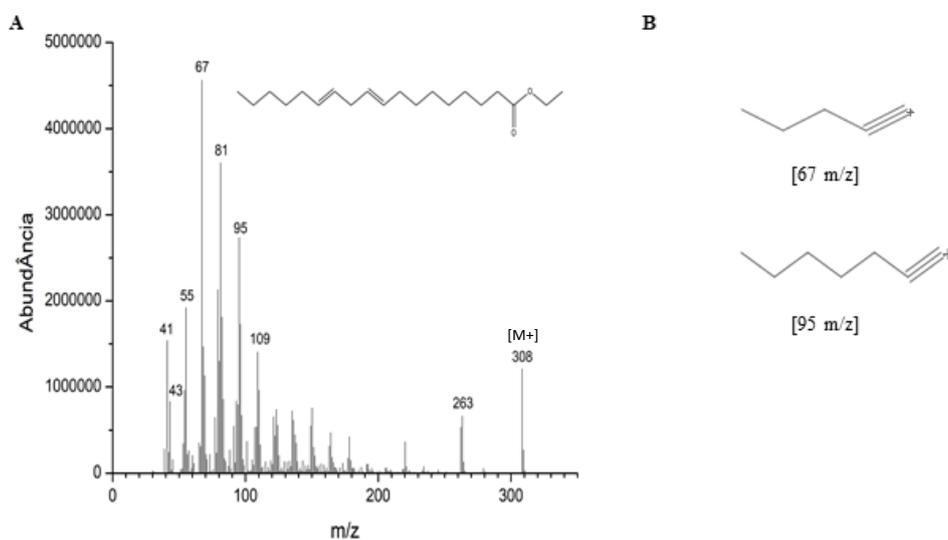


Figura 38: Espectro de massa do ester etílico do ácido 9,12 – octadecadienoico, relativo ao TR de 18.9 minutos (A) e fragmentos principais com 67 m/z e 95 m/z (B).

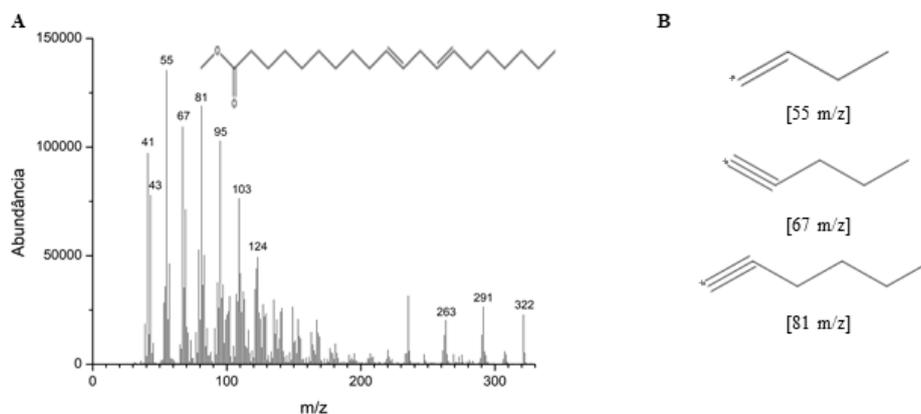


Figura 39: Espectro de massa do ester metílico do ácido 10, 13 – eicosadienoico, relativo ao TR de 19.9 minutos (A) e estruturas dos fragmentos principais com 55 m/z, 67 m/z e 81 m/z (B).

Neste suplemento foram ainda identificados 4 compostos, entre os 20 e 21 minutos, como se pode observar na segunda parte do cromatograma (**Figura 40**). Dentro deste intervalo foram detetadas outras moléculas, cuja identificação não foi possível fazer pela complexidade dos espectros de massa correspondentes e a falta de padrões.

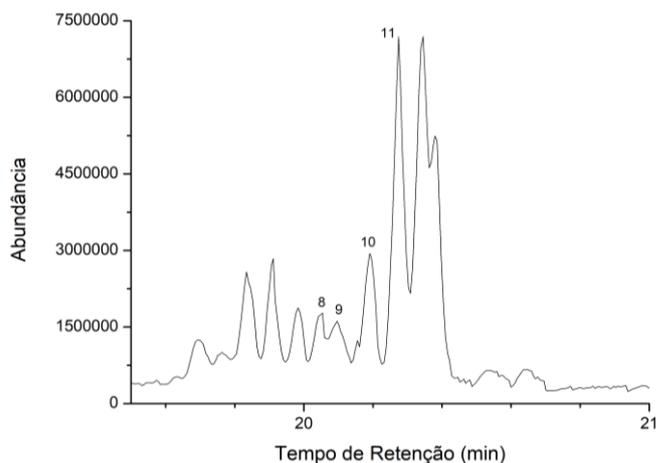


Figura 40: Cromatograma do suplemento alimentar de CLA com carnitina, obtido por GC-MS, entre os 20 e os 21 minutos, em que o sinal 8 é referente ao ester etílico do ácido 9,12,15 – octadecatrienoico, o sinal 9 ao ester metílico do ácido 11 – eicosanoico, o sinal 10 ao 9,12,15 – octadecatrienoato de butilo e o sinal 11 ao ester etílico do ácido eicosanoico.

Os compostos identificados foram então o ester etílico do ácido 9,12,15 – octadecatrienoico, com um TR de 20.1 minutos, o ester metílico do ácido 11 – eicosanoico, com um TR de 20.2 minutos, o 9,12,15 – octadecatrienoato de butilo, com um TR de 20.3 minutos e o ester etílico do ácido eicosanoico, com um TR de 20.4 minutos, que não constam no rótulo do suplemento em análise. Os espectros de massa destes compostos e a estrutura dos fragmentos principais encontram-se representados nas **Figuras 41-44**. Nenhum destes compostos está descrito na literatura como componente da *Camellia Sinensis* ou da soja, ainda que, pelas suas características, esta seja a sua provável origem, tal como os ácidos gordos descritos anteriormente.

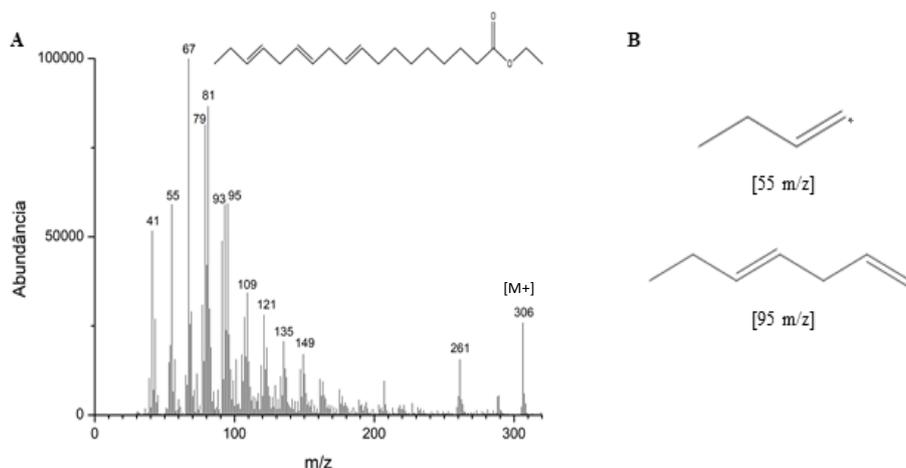


Figura 41: Espectro de massa do ester etílico do ácido 9,12,15 – octadecatrienoico, relativo ao TR de 20.1 minutos (**A**) e estrutura dos fragmentos com 55 m/z e 95 m/z (**B**).

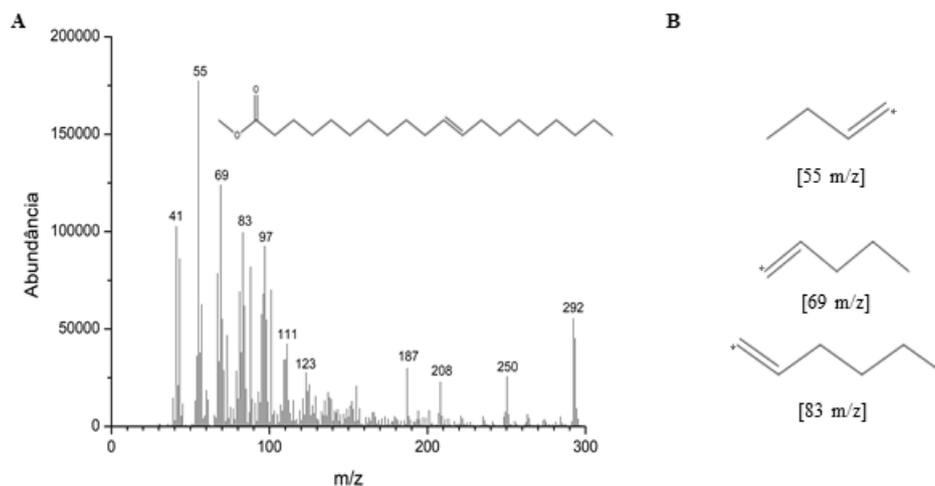


Figura 42: Espectro de massa do ester metílico do ácido 11 –eicosanoico, relativo ao TR de 20.2 minutos (A) e estrutura dos fragmentos principais com 55 m/z, 69 m/z e 83 m/z (B).

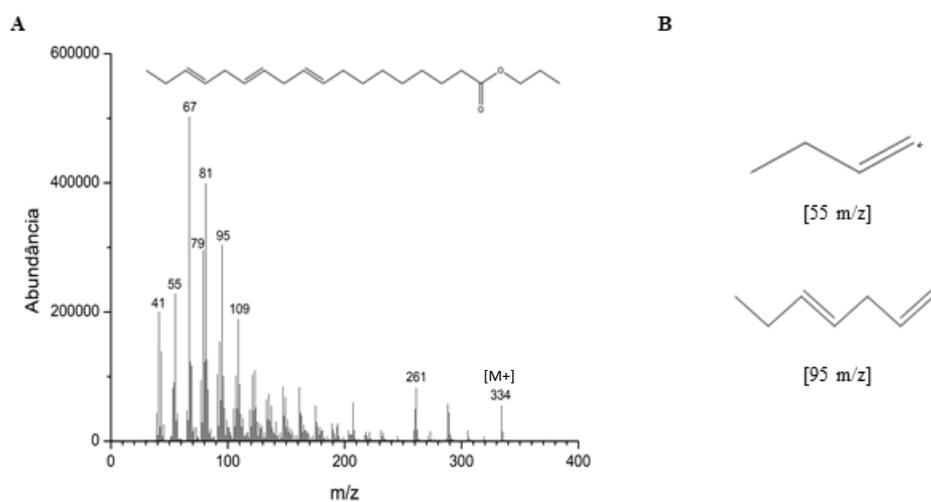


Figura 43: Espectro de massa do 9,12,15 – octadecatrienoato de butilo, relativo ao TR de 20.3 minutos (A) e estrutura de dois dos fragmentos principais com 55 m/z e 95 m/z (B).

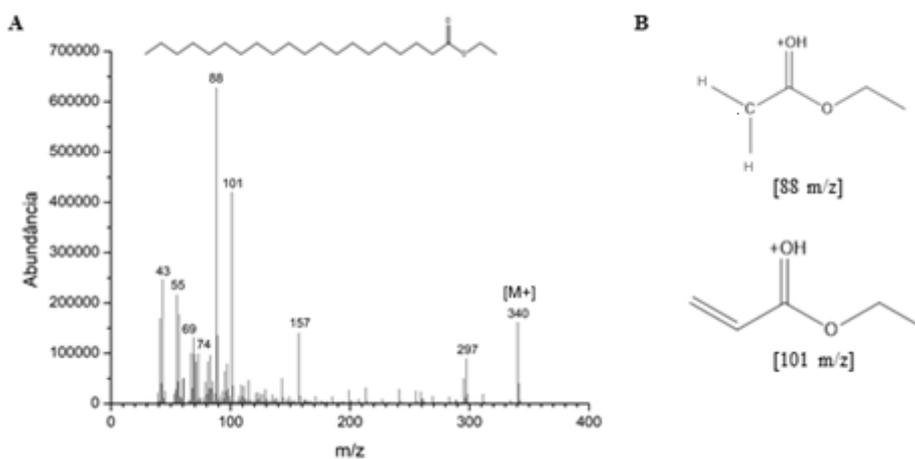


Figura 44: Espectro de massa do ester etílico do ácido eicosanoico, relativo ao TR de 20.4 minutos (A) e estrutura dos fragmentos principais com 88 m/z e 101 m/z (B).

Por fim, foram também detetados 7 compostos, entre os 21 e 33 minutos, como se pode observar na terceira parte do cromatograma (**Figura 45**). Dentro destes compostos foi identificado o ácido hexadecanoico (IUPAC) ou ácido palmítico, com um TR de 22.0 minutos, a linoleína, com um TR de 22.9 minutos, o ester metílico do ácido 15 – tetracosanoico, com um TR de 23.6 minutos, o ácido octadecanoico (IUPAC) ou ácido esteárico, com um TR de 23.7 minutos, o trioctanoato de glicerol, com um TR de 25.4 minutos, o acetato de α -tocoferol, com um TR de 29.5 minutos e o ester do ácido 1,2,3 – decanoico com glicerol, com um TR de 31.9 minutos. De todos estes compostos, apenas o acetato de α -tocoferol se encontra descrito no rótulo.

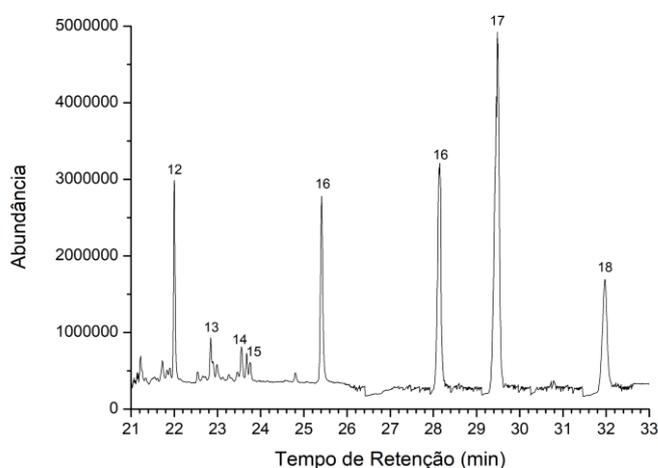


Figura 45: Cromatograma do suplemento alimentar de CLA com carnitina, obtido por GC-MS, entre os 21 e os 33 minutos, em que o sinal 12 é referente ao ácido hexadecanoico bis-TMS, o sinal 13 à linoleína, o sinal 14 ao ester metílico do ácido 15 – tetracosanoico, o sinal 15 ao ácido octadecanoico bis-TMS, o sinal 16 ao trioctanoato de glicerol, o sinal 17 ao acetato de α -tocoferol e o sinal 18 ao ester do ácido 1,2,3 – decanoico com glicerol.

A presença do ácido hexadecanoico (IUPAC) ou ácido palmítico e do ácido octadecanoico (IUPAC) ou esteárico podem ser rastreados até ao óleo de soja, à *Camellia Sinensis* e à cera de abelha (usada como espessante neste suplemento).^{175,196–198} Os espectros de massa e as estruturas dos fragmentos principais encontram-se representados nas **Figuras 46 e 47**, respetivamente.

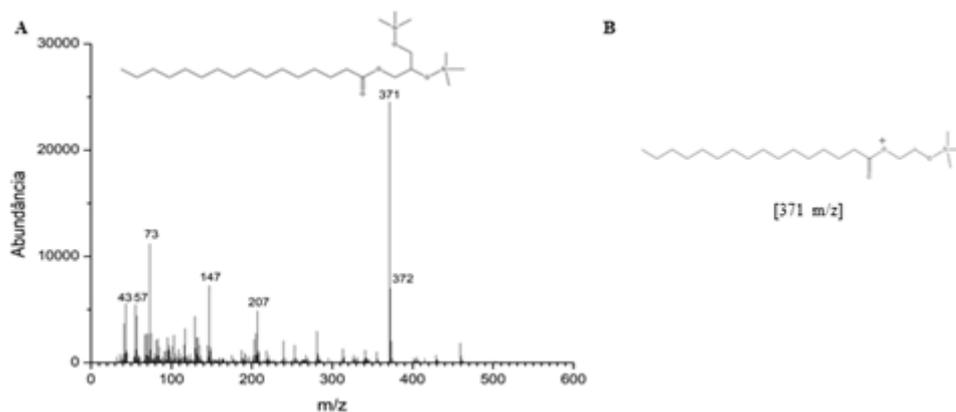


Figura 46: Espectro de massa do ácido palmítico ou ácido hexadecanoico (IUPAC), relativo ao TR de 22.0 minutos (A) e estrutura do fragmento principal com 371 m/z (B).

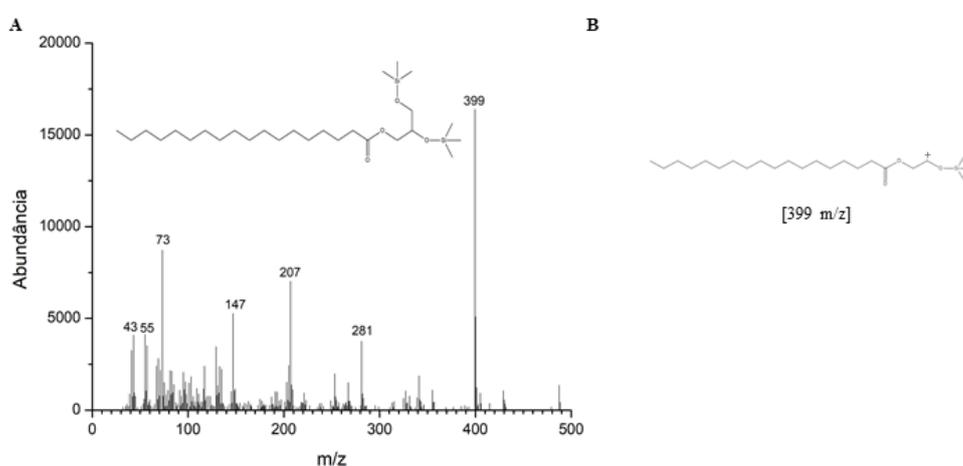


Figura 47: Espectro de massa ácido octadecanoico (IUPAC) ou ácido esteárico, relativo ao TR de 23.7 minutos (A) e estrutura do fragmento principal com 399 m/z (B).

Também a linoléina tem origem no óleo de soja usado neste suplemento. A linoléina é um triglicerídeo muito comum no qual o glicerol é esterificado com ácido linolénico, estando presente em diversos óleos vegetais, como o óleo de girassol e óleo de soja.^{199,200} O espectro de massa deste composto encontra-se na **Figura 48**.

Relativamente ao ester metílico do ácido 15 – tetracosanoico, apesar de ter sido identificado neste suplemento, a sua presença não tem motivo aparente. O seu espectro de massa encontra-se na **Figura 49**. Este aparenta ser um derivado do ácido 15 – tetradecanoico, mais conhecido como ácido nervónico, um ácido gordo de cadeia longa encontrado em diversas plantas, como *Lunaria annua* ou *Cannabis sativa*, considerado um nutriente vital para o bom funcionamento do cérebro humano.²⁰¹ A função do derivado encontrado é desconhecida.

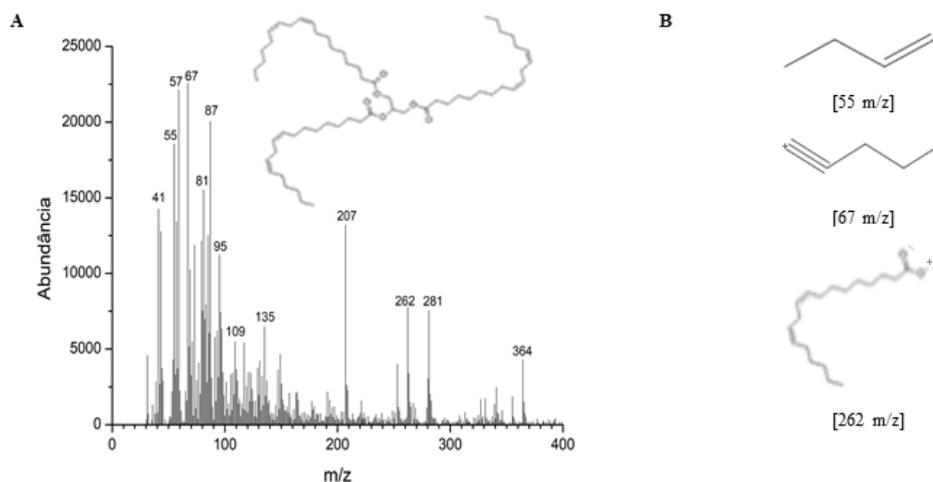


Figura 48: Espectro de massa da linoleína, relativo ao TR de 22.9 minutos (A) e estrutura dos fragmentos principais com 55 m/z e 67 m/z e de um dos fragmentos característicos com 262 m/z (B).

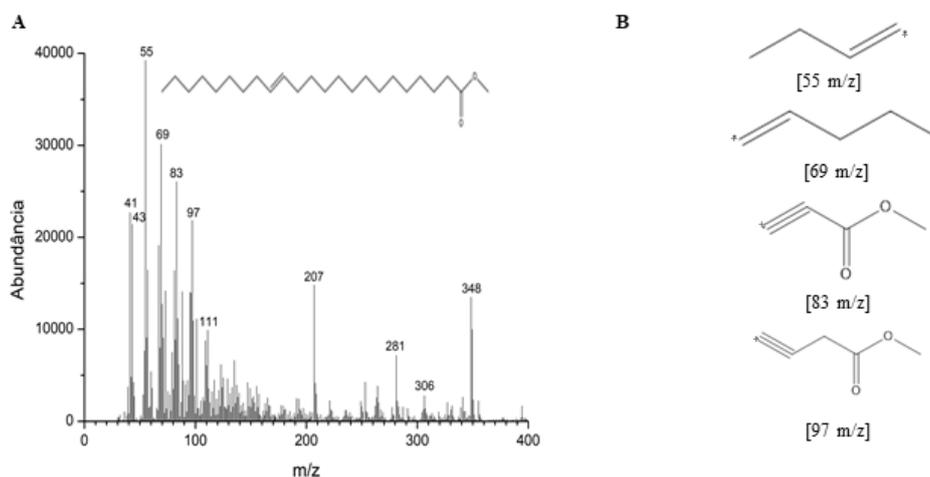


Figura 49: Espectro de massa do ester metílico do ácido 15 – tetracosanoico, com um TR de 23.6 minutos (A) e estrutura dos fragmentos principais com 55 m/z, 69 m/z, 83 m/z e 97 m/z (B).

Neste suplemento, como mencionado anteriormente, foi também detetada a presença de trioctanoato de glicerol, um triglicerídeo obtido pela acetilação dos 3 grupos hidroxilo do glicerol com ácido octanóico.²⁰² O ácido octanóico, também conhecido como ácido caprílico, é naturalmente encontrado em leite de diversos mamíferos, estando presente em maiores concentrações no leite de cabra e ovelha e é um componente minoritário do óleo de coco.^{203,204} Assim, dada a natureza do trioctanoato de glicerol, a sua presença neste suplemento não pode ser justificada. O seu espectro de massa e fragmentos principais encontram-se na **Figura 50**.

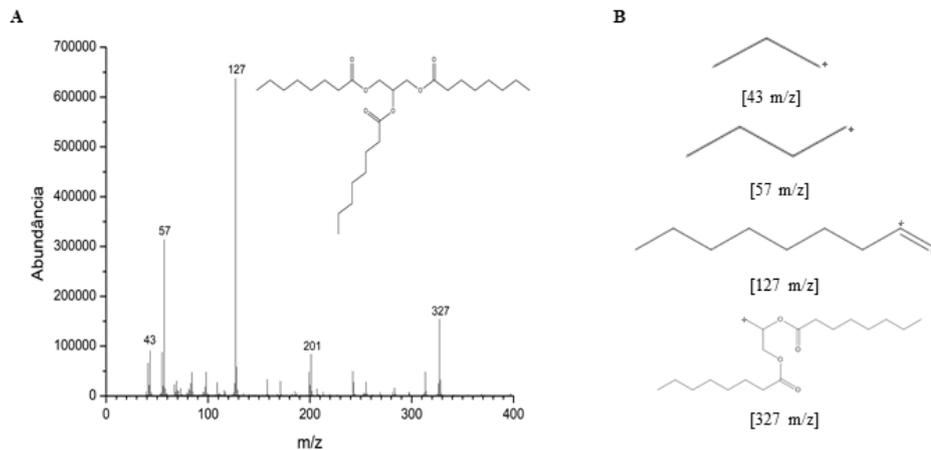


Figura 50: Espectro de massa do trioleato de glicerol, relativo ao TR de 25.4 minutos (A) e estrutura dos fragmentos principais com 43 m/z, 57 m/z, 127 m/z e 327 m/z (B).

Foi ainda identificado neste suplemento acetato de α -tocoferol, composto este descrito no rótulo do suplemento em questão. O acetato de α -tocoferol é a forma primária de vitamina E que é bem absorvida pelo organismo humano e é frequente o seu uso como aditivo alimentar.²⁰⁵ O seu espectro de massa na **Figura 51**.

Por fim, foi ainda detetado o ester do ácido 1,2,3 – decanoico com glicerol ou tricaprina, um triglicerídeo obtido por acilação dos 3 grupos hidroxilo do glicerol com ácido decanoico ou ácido cáprico. A tricaprina quando consumida oralmente é metabolizada a ácido decanoico, que liga e ativa parcialmente o recetor- γ ativado por proliferadores de peroxissoma, sem induzir a adipogénese, o que lhe confere um potencial anti androgénico e anti hiperglicémico.²⁰⁶ Dada a sua natureza a sua presença neste suplemento, tal como o trioleato de glicerol, não pode ser explicada. O seu espectro de massa e fragmentos principais encontram-se na **Figura 52**.

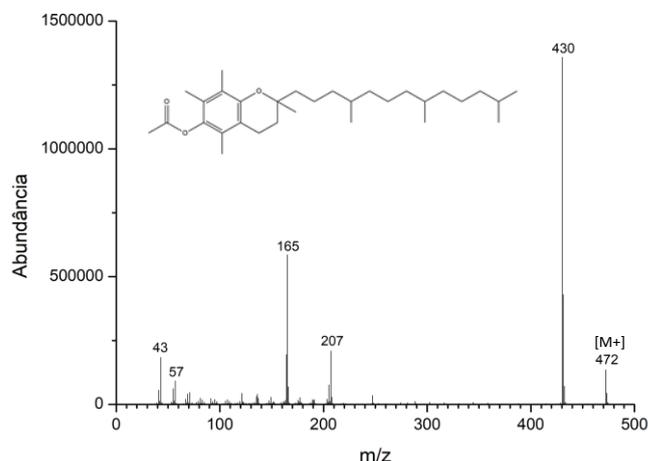


Figura 51: Espectro de massa do acetato de α -tocoferol, relativo ao TR de 29.5 minutos.

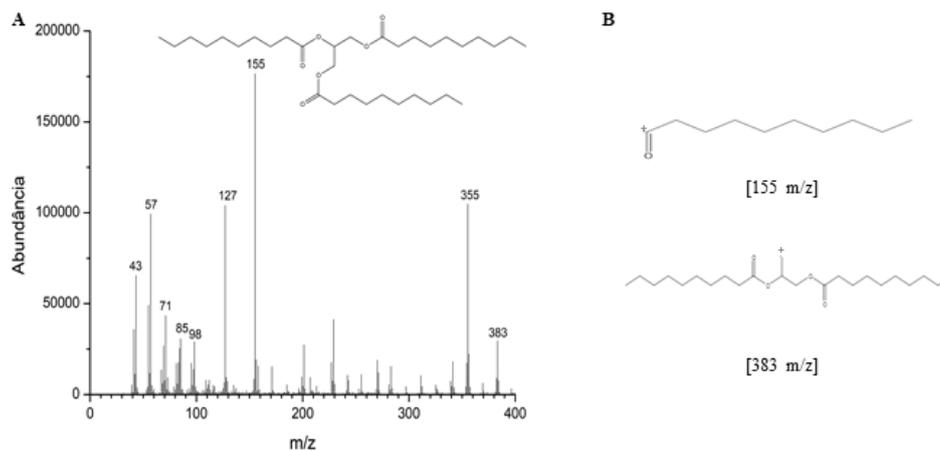


Figura 52: Espectro do ester do ácido 1,2,3 – decanoico com glicerol, com um TR de 31.9 minutos (A) e fragmentos principais com 383 m/z e 155 m/z (B).

Este suplemento foi escolhido para análise pois é um tipo de suplemento publicitado para ajudar na perda de peso, o que o torna aliciante para os consumidores. Dada a sua suposta função, não seria de estranhar que tivesse contaminações por EAA, como discutido no Capítulo 1. Contudo, não foram identificados vestígios de EAA neste suplemento alimentar, nestas condições laboratoriais.

A análise deste suplemento, tal como no suplemento anterior, revelou a presença de acetato de etilo, cuja origem é uma incógnita. Assim, sugere-se para futuros estudos uma análise confirmatória e uma análise a outros lotes à venda, para perceber se está presente. Deve se ainda ter em atenção outros compostos que foram detetados e que não constam no rótulo, visto não terem uma origem confiável e, logo, não se saber que implicações têm para o ser humano, uma vez consumidas.

Assim, não é possível concluir com certeza de que este suplemento é seguro para os consumidores. Futuramente, sugere-se fazer uma análise por GC-MS/MS e o uso de um padrão para os contaminantes encontrados, tal como sugerido para o suplemento anterior.

CONCLUSÃO

Conclusão

Atualmente, o *doping* é um grave problema na área do desporto, principalmente por este ser um fenómeno que move milhões de pessoas por todo o mundo. Em particular, o *doping* não consentido, através de suplementos alimentares contaminados, é um problema real, mais difícil de controlar, que põe em risco a saúde de quem os consome e acarreta consequências para o atleta que teste positivo nos controlos anti-*doping*. O objetivo deste trabalho, que consistia na análise de alguns tipos de diferentes suplementos alimentares, consumidos num contexto desportivo e na avaliação da veracidade do seu rótulo, foi alcançado com sucesso, ainda que com alguns percalços pelo caminho. No entanto, devido à falta de padrões, a análise destes suplementos em relação ao seu conteúdo em termos de EAA não foi totalmente conseguida.

A primeira análise dos 4 suplementos escolhidos foi feita por GC-FID, tendo sido otimizadas as condições da cromatografia e feita uma pré-análise (por comparação) dos compostos que apareceriam no extrato final. Relativamente ao suplemento de BCAAs, a sua análise por GC-FID indicou a presença de aminoácidos e de ácido esteárico no extrato final. Por GC-MS foi apenas confirmada a presença deste último, não aparecendo sinais relativos aos aminoácidos. A diferença entre as duas análises deve-se ao facto de o detetor FID ser mais sensível do que o MS. No entanto, a técnica de GC-MS continua a ser a preferida para este tipo de análises pois permite a identificação dos compostos.

A interpretação dos resultados obtidos por GC-MS dos suplementos escolhidos, revelou-se extremamente complexa, especialmente no suplemento de CLA com carnitina. Em muitos casos não foi possível identificar a molécula em questão, devido à complexidade do seu espectro de massa e a não haver um padrão disponível para comparação. Por outro lado, este tipo de análise não é muito explorado, o que se reflete na falta de informação sobre os componentes das substâncias que constituem os suplementos. Exemplificando, no caso da cera de abelha ou na cera de carnaúba, usadas como espessantes ou como agentes de revestimento, poucas são as publicações que especificam o tipo de ácidos gordos que detetam. Neste sentido, este trabalho veio, de certa forma, contribuir para completar a informação na literatura.

Os estudos realizados com os 4 suplementos alimentares permitiram concluir que alguns componentes nos suplementos não estavam especificados nos rótulos das embalagens. Alguns destes componentes seria de esperar serem encontrados, como os ácidos gordos

no óleo de soja, no chá verde ou no leite, nomeando alguns, identificados como componentes do suplemento. Outros, como por exemplo o acetato de etilo, suscitam dúvidas quanto à sua origem, podendo tratar-se de um aditivo alimentar aprovado para consumo ou uma contaminação com solvente durante o processo de fabrico.

Apesar de terem sido escolhidos suplementos com uma grande probabilidade de terem contaminações por EAA, estes não foram detetados nos estudos realizados, o que indica que estes suplementos não irão fazer com que os atletas testem positivo nos controlos anti-*doping*. Relativamente a 2 dos suplementos, existe uma probabilidade de terem contaminações que podem ser tóxicas para o ser humano, pelo que seriam necessários estudos adicionais para confirmação.

Num projeto futuro, seria interessante alargar o espetro de suplementos analisados, escolhendo alguns vendidos *online*, em sites como a *Amazon* ou o *eBay* e fazer um levantamento do tipo de suplementos consumidos e onde foram adquiridos estes mesmos suplementos por membros de ginásios ou por atletas de competição, procedendo à sua análise. Seria também interessante fazer um estudo quantitativo, para determinar concentrações, dado importante no caso do acetato de etilo, por exemplo. Por fim, seria importante a aquisição de padrões para completar a análise e fazer réplicas das extrações.

Referências

1. Siegel, J. A. Forensic science. <https://www.britannica.com/science/forensic-science> (2020).
2. U.S. Department of Justice. FORENSIC SCIENCE. <https://www.justice.gov/olp/forensic-science> (2020).
3. WADA. Anti-doping Code 2015 (With 2019 amendments). 30–31 (2019).
4. Jan, N. *et al.* Use of forensic investigations in anti-doping. *Forensic Sci. Int.* **213**, 109–113 (2011).
5. Museum, N. Lance Armstrong. <https://www.newsmuseum.pt/pt/desporto/lance-armstrong-0> (2020).
6. Grey, J. & Zurik, L. Illegal Contact: Banned drugs found in athletic performance supplements. <https://www.wtoc.com/2020/02/02/illegal-contact-banned-drugs-found-athletic-performance-supplements/> (2020).
7. Dahmani, H., Louati, K., Hajri, A., Bahri, S. & Safta, F. Development of an extraction method for anabolic androgenic steroids in dietary supplements and analysis by gas chromatography-mass spectrometry: Application for doping-control. *Steroids* **138**, 134–160 (2018).
8. Walpurgis, K., Thomas, A., Geyer, H., Mareck, U. & Thevis, M. Dietary Supplement and Food Contaminations and Their Implications for Doping Controls. *Foods* **9**, 1012 (2020).
9. Mathews, N. M. Prohibited Contaminants in Dietary Supplements. *Sports Health* **10**, 19–30 (2018).
10. Ahmadi, N., Ljungqvist, A. & Svedsäter, G. *Doping and Public Health*. Routledge (2016). doi:10.1017/CBO9781107415324.004.
11. Outram, S. & Stewart, B. Doping through supplement use: A review of the available empirical data. *Int. J. Sport Nutr. Exerc. Metab.* **25**, 54–59 (2015).
12. De Hon, O. & Coumans, B. The continuing story of nutritional supplements and doping infractions. *Br. J. Sports Med.* **41**, 800–805 (2007).
13. Denham, B. E. Athlete Information Sources about Dietary Supplements: A

- Review of Extant Research. *Int. J. Sport Nutr. Exerc.* (2017).
14. Geyer, H. *et al.* Nutritional supplements cross-contaminated and faked with doping substances. *J. mass Spectrom.* (2008) doi:10.1002/jms.
 15. Geyer, H., Schänzer, W. & Thevis, M. Anabolic agents: Recent strategies for their detection and protection from inadvertent doping. *Br. J. Sports Med.* **48**, 820–826 (2014).
 16. Pozo, O. J. *et al.* Current status and bioanalytical challenges in the detection of unknown anabolic androgenic steroids in doping control analysis. *Bioanalysis* **5**, 2661–2677 (2013).
 17. Abushareeda, W. *et al.* Gas chromatographic quadrupole time-of-flight full scan high resolution mass spectrometric screening of human urine in antidoping analysis. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **1063**, 74–83 (2017).
 18. Gosetti, F., Mazzucco, E., Gennaro, M. C. & Marengo, E. Ultra high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry determination and profiling of prohibited steroids in human biological matrices. A review. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **927**, 22–36 (2013).
 19. Abbate, V. *et al.* Anabolic steroids detected in bodybuilding dietary supplements - A significant risk to public health. *Drug Test. Anal.* **7**, 609–618 (2015).
 20. Parr, M. K., Geyer, H., Reinhart, U. & Schänzer, W. Analytical strategies for the detection of non-labelled anabolic androgenic steroids in nutritional supplements. *Food Addit. Contam.* **21**, 632–640 (2004).
 21. Van Poucke, C., Detavernier, C., Van Cauwenberghe, R. & Van Peteghem, C. Determination of anabolic steroids in dietary supplements by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta* **586**, 35–42 (2007).
 22. Yesalis, C. & Bahrke, M. History of doping in sport. *Int. Sport. Stud.* **24**, 42–76 (2002).
 23. Thiel, M. *et al.* Human and Social Competition: An Interdisciplinary and Transdisciplinary Perspective. *Front. Psychol* **10**, (2019).

24. Vlad, R. A., Hancu, G., Popescu, G. C. & Lungu, I. A. Doping in sports, a never-ending story? *Adv. Pharm. Bull.* **8**, 529–534 (2018).
25. SICAD. Doping. <http://www.sicad.pt/PT/Cidadao/Tu-alinhas/PelaTuaSaude/Paginas/detalhe.aspx?itemId=3&lista=Doenca&bkUrl=/BK/Cidadao/Tu-alinhas/PelaTuaSaude> (2018).
26. De Rose, E. H. Doping in Athletes - An Update. *Clin. Sports Med.* **27**, 107–130 (2008).
27. Holt, R. I. G., Erotokritou-Mulligan, I. & Sönksen, P. H. The history of doping and growth hormone abuse in sport. *Growth Horm. IGF Res.* **19**, 320–326 (2009).
28. Birzniece, V. Doping in sport: Effects, harm and misconceptions. *Intern. Med. J.* **45**, 239–248 (2015).
29. Portugal, P. A.-. Estricnina. <https://www.antidoto-portugal.org/portal/PT/27/default.aspx> (2020).
30. Willick, S. E., Miller, G. D. & Eichner, D. The Anti-Doping Movement. *PM R* **8**, S125–S132 (2016).
31. Kamber, M. & Mullis, P. E. The Worldwide Fight Against Doping: From the Beginning to the World Anti-Doping Agency. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* **39**, 1–9 (2010).
32. Ljungqvist, A. Brief History of Anti-Doping. *Med. Sport Sci.* **62**, 1–10 (2017).
33. ADOP. História da luta contra a dopagem em Portugal. <http://www.adop.pt/adop/historia.aspx>.
34. Índice, T. a S. Efedrina. <https://www.indice.eu/pt/medicamentos/DCI/efedrina/informacao-geral> (2020).
35. Fame, I. S. H. of. Rick DeMont (USA). [https://www.ishof.org/rick-demont-\(usa\).html](https://www.ishof.org/rick-demont-(usa).html).
36. Mu, R. K. History of Doping and Doping Control. 1–23 (2010) doi:10.1007/978-3-540-79088-4.
37. Institutet, K. From the Anti-Doping Library THE HISTORY OF DOPING AND

- ANTIDOPING A systematic collection of published scientific literature. (2016).
38. WADA. World Anti-Doping Code International Standard: Therapeutic Use Exemptions. 21 (2019).
 39. Dandoy, C. & Gereige, R. S. Performance-enhancing drugs. *Pediatr. Rev.* **33**, 265–272 (2012).
 40. Eichner, A. & Tygart, T. Adulterated dietary supplements threaten the health and sporting career of up-and-coming young athletes. *Drug Test. Anal.* **8**, 304–306 (2016).
 41. Martínez-Sanz, J. M. *et al.* Intended or unintended doping? A review of the presence of doping substances in dietary supplements used in sports. *Nutrients* **9**, 1–22 (2017).
 42. APARD. Legislação Suplementos Alimentares. <https://www.apard.pt/informacoes/suplementos-alimentares/legislacao> (2017).
 43. APARD. Suplementos Alimentares. <https://www.apard.pt/informacoes/suplementos-alimentares> (2017).
 44. Martins, A. S. *et al.* Suplementos alimentares: o que são e como notificar reações adversas. *Bol. Farm. - INFARMED* **21**, 1–4 (2017).
 45. ASAE. Protocolo entre ASAE e o INFARMED no âmbito dos suplementos alimentares. <https://www.asae.gov.pt/cooperacao-nacional-e-internacional/cooperacao-nacional-/protocolo-entre-asae-e-o-infarmed-no-ambito-dos-suplementos-alimentares-.aspx>.
 46. ASAE. Suplementos Alimentares. <https://www.asae.gov.pt/perguntas-frequentes1/suplementos-alimentares.aspx> (2019).
 47. Reports, A. ASHP Statement on the Use of Dietary Supplements APPROVED BY THE ASHP BOARD OF DIRECTORS. **61**, 1707–1711 (2004).
 48. Goston, J. L. & Toulson Davisson Correia, M. I. Intake of nutritional supplements among people exercising in gyms and influencing factors. *Nutrition* **26**, 604–611 (2010).
 49. Pajor, E. M., Eggers, S. M., Curfs, K. C. J., Oenema, A. & de Vries, H. Why do

- Dutch people use dietary supplements? Exploring the role of socio-cognitive and psychosocial determinants. *Appetite* **114**, 161–168 (2017).
50. Ruano, J. & Teixeira, V. H. Prevalence of dietary supplement use by gym members in Portugal and associated factors. *J. Int. Soc. Sports Nutr.* **17**, 1–8 (2020).
 51. Petróczi, A. & Naughton, D. P. Supplement use in sport: Is there a potentially dangerous incongruence between rationale and practice? *J. Occup. Med. Toxicol.* **2**, 2–7 (2007).
 52. Savino, G. *et al.* Dietary supplements, drugs and doping in the sport society. *Ann. di Ig.* **31**, 548–555 (2019).
 53. Burke, L. M. Supplements for Optimal Sports Performance. *Curr. Opin. Physiol.* **10**, 156–165 (2019).
 54. Baltazar-Martins, G. *et al.* Prevalence and patterns of dietary supplement use in elite Spanish athletes. *J. Int. Soc. Sports Nutr.* **16**, 30 (2019).
 55. Leng, H. K. & Phua, Y. X. P. Athletes as role models during the COVID-19 pandemic. *Manag. Sport Leis.* **0**, 1–5 (2020).
 56. Connolly, G. J. Applying Social Cognitive Theory in Coaching Athletes: The Power of Positive Role Models. *Strategies* **30**, 23–29 (2017).
 57. Dictionary, C. Role Model. <https://dictionary.cambridge.org/pt/dicionario/ingles/role-model> (2020).
 58. Viribay, A., Burgos, J., Fernández-Landa, J., Seco-Calvo, J. & Mielgo-Ayuso, J. Effects of Arginine Supplementation on Athletic Performance Based on Energy Metabolism: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Nutrients* 1–20 (2020).
 59. Celeiro. Ginseng. <https://www.celeiro.pt/cuide-de-si/temas-de-saude/ginseng>.
 60. ASAE. Suplementos Alimentares com suspeita de incluírem na sua composição Esteróides. <https://www.asae.gov.pt/noticias-/noticias-de-2012-e-antiores/antiores-a-2012/suplementos-alimentares-com-suspeita-de-incluirem-na-sua-composicao-esteroides.aspx> (2010).

61. Castanho, G. K. F., Fontes, E. B. & Fernandes, P. T. O perigo da contaminação de suplementos alimentares com substâncias ilícitas para os praticantes de exercício físico e esporte. *Conexões* **12**, 161–180 (2014).
62. Judkins, C. M. G., Teale, P. & Hall, D. J. The role of banned substance residue analysis in the control of dietary supplement contamination. *Drug Test. Anal.* **2**, 417–420 (2010).
63. Maughan, R. J. *et al.* IOC consensus statement: Dietary supplements and the high-performance athlete. *Br. J. Sports Med.* **52**, 439–455 (2018).
64. Maughan, R. J., Depiesse, F. & Geyer, H. The use of dietary supplements by athletes. *J. Sports Sci.* **25**, 103–113 (2007).
65. Tsarouhas, K. *et al.* Use of nutritional supplements contaminated with banned doping substances by recreational adolescent athletes in Athens, Greece. *Food Chem. Toxicol.* **115**, 447–450 (2018).
66. Geyer, H. *et al.* Analysis of non-hormonal nutritional supplements for anabolic-androgenic steroids - Results of an international study. (2003) doi:10.1055/s-2004-815793.
67. Clayton, R. & Kluger, R. H. Steroid - chemical compound. *Encyclopedia Britannica* <https://www.britannica.com/science/steroid> (2020).
68. O'Hagan, A. Bigger, Faster, Stronger! An Overview of Anabolic Androgenic Steroids and their Use and Impact on the Sport Industry. *Foresic Res. Criminol. Int. J.* **1**, 104–115 (2015).
69. Adcock, I. M. Corticosteroids: Limitations and future prospects for treatment of severe inflammatory disease. *Drug Discov. Today Ther. Strateg.* **1**, 321–328 (2004).
70. Liu, J. Di, Wu, Y. Q. & Cui, Y. Anabolic-androgenic steroids and cardiovascular risk. *Chin. Med. J. (Engl).* **132**, 2229–2236 (2019).
71. Gheddar, L., Ameline, A., Raul, J. S. & Kintz, P. Designer anabolic steroids: A challenge for toxicologists. *Toxicol. Anal. Clin.* **31**, 293–297 (2019).
72. Christou, M. A. *et al.* Effects of Anabolic Androgenic Steroids on the

- Reproductive System of Athletes and Recreational Users: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Sport. Med.* **47**, 1869–1883 (2017).
73. National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney. Androgenic Steroids. *Clinical and Research Information on Drug-Induced Liver Injury* <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK548931/> (2012).
 74. Hartgens, F. & Kuipers, H. Effects of androgenic-anabolic steroids in athletes. *Sport. Med.* **34**, 513–554 (2004).
 75. K, G., S, R. & PM, Z. Anabolic Steroids. *StatPearls [Internet]* <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482418/> (2020).
 76. Jasuja, G. K. *et al.* Use of testosterone in men infected with human immunodeficiency virus in the veterans healthcare system. *AIDS Care - Psychol. Socio-Medical Asp. AIDS/HIV* **30**, 1207–1214 (2018).
 77. Dev, R., Bruera, E. & Del Fabbro, E. When and when not to use testosterone for palliation in cancer care. *Curr. Oncol. Rep.* **16**, (2014).
 78. Wiernik, P. H. Androgen Therapy for Acute Myeloid and Hairy Cell Leukemia. *Curr. Treat. Options Oncol.* **19**, (2018).
 79. Kicman, A. T. Pharmacology of anabolic steroids. *Br. J. Pharmacol.* **154**, 502–521 (2008).
 80. World Anti-Doping Agency. Prohibited List Wada 2019. *World Anti-Doping Code 10* (2019).
 81. Mędraś, M., Brona, A. & Józków, P. The Central Effects of Androgenic-Anabolic Steroid Use. *J. Addict. Med.* **12**, 184–192 (2018).
 82. Hanley Santos, G. & Coomber, R. The risk environment of anabolic–androgenic steroid users in the UK: Examining motivations, practices and accounts of use. *Int. J. Drug Policy* **40**, 35–43 (2017).
 83. Salerno, M. *et al.* Anabolic androgenic steroids and carcinogenicity focusing on Leydig cell: A literature review. *Oncotarget* **9**, 19415–19426 (2018).
 84. Wilson, J. D. Androgen abuse by athletes. *Endocr. Rev.* **9**, 181–199 (1988).
 85. Lindzey, J., Kumar, M. V., Grossman, M., Young, C. & Tindall, D. J. *Molecular*

- Mechanisms of Androgen Action. Vitamins and Hormones* vol. 49 (Elsevier Masson SAS, 1994).
86. Nelson, L. R. & Bulun, S. E. Estrogen production and action. *J. Am. Acad. Dermatol.* **45**, S116–S124 (2001).
 87. Penatti, C. A. A., Porter, D. M. & Henderson, L. P. Chronic exposure to anabolic androgenic steroids alters neuronal function in the mammalian forebrain via androgen receptor- and estrogen receptor-mediated mechanisms. *J. Neurosci.* **29**, 12484–12496 (2009).
 88. Handelsman, D. J. Androgen Physiology, Pharmacology, Use and Misuse. *Endocrinology Book* <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK279000/> (2020).
 89. Hartgens, F. *et al.* Misuse of androgenic-anabolic steroids and human deltoid muscle fibers: Differences between polydrug regimens and single drug administration. *Eur. J. Appl. Physiol.* **86**, 233–239 (2002).
 90. Kadi, F., Bonnerud, P., Eriksson, A. & Thornell, L. E. The expression of androgen receptors in human neck and limb muscles: Effects of training and self-administration of androgenic-anabolic steroids. *Histochem. Cell Biol.* **113**, 25–29 (2000).
 91. Sinha-Hikim, I., Roth, S. M., Lee, M. I. & Bhasin, S. Testosterone-induced muscle hypertrophy is associated with an increase in satellite cell number in healthy, young men. *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.* **285**, 197–205 (2003).
 92. Pallafacchina, G., Blaauw, B. & Schiaffino, S. Role of satellite cells in muscle growth and maintenance of muscle mass. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* **23**, 1–7 (2013).
 93. de Guia, R. M. Stress, glucocorticoid signaling pathway, and metabolic disorders. *Diabetes Metab. Syndr. Clin. Res. Rev.* **14**, 1273–1280 (2020).
 94. Zhang, T., Liang, Y. & Zhang, J. Natural and synthetic compounds as dissociated agonists of glucocorticoid receptor. *Pharmacol. Res.* **156**, 104802 (2020).
 95. Coviello, A. D. *et al.* Effects of graded doses of testosterone on erythropoiesis in healthy young and older men. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **93**, 914–919 (2008).

96. Shahani, S., Braga-Basaria, M., Maggio, M. & Basaria, S. Androgens and erythropoiesis: Past and present. *J. Endocrinol. Invest.* **32**, 704–716 (2009).
97. Mainwaring, W. I. The mechanism of action of androgens. *Monogr. Endocrinol.* **10**, 1–178 (1977).
98. Yu, J. G. *et al.* Effects of long term supplementation of anabolic androgen steroids on human skeletal muscle. *PLoS One* **9**, (2014).
99. Krzysztofik, M., Wilk, M., Wojdała, G. & Gołaś, A. Maximizing muscle hypertrophy: A systematic review of advanced resistance training techniques and methods. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **16**, (2019).
100. Sinha-Hikim, I. *et al.* Testosterone-induced increase in muscle size in healthy young men is associated with muscle fiber hypertrophy. *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.* **283**, 154–164 (2002).
101. Tóth, M. & Zakár, T. Relative binding affinities of testosterone, 19-nortestosterone and their derivatives to the androgen receptor and to other androgen-binding proteins. (1981).
102. Gustafsson, J. Relative Binding Affinity of Anabolic-Androgenic Steroids : Comparison of the Binding to the Androgen Receptors in Skeletal Muscle and in Prostate , as well as. **114**, 2100–2106 (2015).
103. Of, T. & Disruptions, E. CHAPTER 2 Anabolic Androgenic Steroids. (2018) doi:10.1016/B978-0-12-813442-9.00002-X.
104. Kutscher, E. C., Lund, B. C. & Perry, P. J. Anabolic Steroids: A Review for the Clinician. *Sport. Med.* **32**, 285–296 (2002).
105. Bahrke, M. S. & Yesalis, C. E. Abuse of anabolic androgenic steroids and related substances in sport and exercise. *Curr. Opin. Pharmacol.* **4**, 614–620 (2004).
106. Boyce, E. G. Use and effectiveness of performance-enhancing substances. *J. Pharm. Pract.* **16**, 22–36 (2003).
107. Yesalis, C. E. & Bahrke, M. S. Anabolic-Androgenic Steroids: Current Issues. *Sport. Med.* **19**, 326–340 (1995).
108. Bhasin, S. *et al.* The Effects of Supraphysiologic Doses of Testosterone on

- Muscle Size and Strength in Normal Men. *N. Engl. J. Med.* **335**, 1–7 (1996).
109. do Carmo, E. C. *et al.* The role of anabolic steroids on hypertrophy and muscular strength in aerobic resistance and strength training. *Rev. Bras. Med. do Esporte* **17**, 212–217 (2011).
 110. Frati, P., Busardo, F., Cipolloni, L., Dominicis, E. & Fineschi, V. Anabolic Androgenic Steroid (AAS) Related Deaths: Autoptic, Histopathological and Toxicological Findings. *Curr. Neuropharmacol.* **13**, 146–159 (2014).
 111. Mottram, D. R. & George, A. J. Anabolic steroids. *Bailliere's Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* **14**, 55–69 (2000).
 112. Makin, H. L. J., Honour, J. W., Shackleton, C. H. L. & Griffiths, W. J. General Methods for the Extraction, Purification and Measurement of Steroids by Chromatography and Mass Spectrometry. in *Steroids Analysis* 163–282 (1996).
 113. Atkovska, K., Klingler, J., Oberwinkler, J., Keller, S. & Hub, J. S. Rationalizing Steroid Interactions with Lipid Membranes: Conformations, Partitioning, and Kinetics. *ACS Cent. Sci.* **4**, 1155–1165 (2018).
 114. Schmidt, G. & Steinhart, H. Impact of extraction solvents on steroid contents determined in beef. *Food Chem.* **76**, 83–88 (2002).
 115. Lehninger. Amino Acids, Peptides and Proteins. in *Principles of Biochemistry* 71–112.
 116. Bodzoń-Kułakowska, A. *et al.* *Fundamental Strategies of Protein and Peptide Sample Preparation. Proteomic Profiling and Analytical Chemistry* (2013). doi:10.1016/B978-0-444-59378-8.00003-7.
 117. Lemos, C. A. Aspetos estruturais e funcionais do complexo telómero / telomerase. *Univ. Fernando Pessoa Fac. Ciências da Saúde* (2015).
 118. Niedfeldt, M. W. Anabolic Steroid Effect on the Liver. *Curr. Sports Med. Rep.* **17**, 97–102 (2018).
 119. Socas, L. *et al.* Hepatocellular adenomas associated with anabolic androgenic steroid abuse in bodybuilders: a report of two cases and a review of the literature. *Br. J. Sports Med.* **39**, 1–5 (2005).

120. El Sherrif, Y. *et al.* Hepatotoxicity from anabolic androgenic steroids marketed as dietary supplements: Contribution from ATP8B1/ABCB11 mutations? *Liver Int.* **33**, 1266–1270 (2013).
121. Choi, S. K. *et al.* Spontaneous liver rupture in a patient with peliosis hepatis: A case report. *World J. Gastroenterol.* **15**, 5493–5497 (2009).
122. Ozcagli, E. *et al.* Stanozolol administration combined with exercise leads to decreased telomerase activity possibly associated with liver aging. *Int. J. Mol. Med.* **42**, 405–413 (2018).
123. White, M., Brennan, E., Mi Ren, K. Y., Shi, M. & Thakrar, A. Anabolic Androgenic Steroid Use as a Cause of Fulminant Heart Failure. *Can. J. Cardiol.* **34**, 1369.e1-1369.e3 (2018).
124. Sullivan, M. L., Martinez, C. M., Gennis, P. & Gallagher, E. J. The cardiac toxicity of anabolic steroids. *Prog. Cardiovasc. Dis.* **41**, 1–15 (1998).
125. Baggish, A. L. *et al.* Cardiovascular toxicity of illicit anabolic-androgenic steroid use. *Circulation* **135**, 1991–2002 (2017).
126. Vilar Neto, J. de O. *et al.* Disorder of hypothalamic–pituitary–gonadal axis induced by abusing of anabolic–androgenic steroids for short time: A case report. *Andrologia* **50**, 1–4 (2018).
127. Thieme, D. & Hemmersbach, P. Handbook of Experimental Pharmacology: Preface. *Handb. Exp. Pharmacol.* **195**, 459–484 (2010).
128. Melnik, B., Jansen, T. & Grabbe, S. Anabolikamissbrauch und bodybuilding-akne: Eine unterschätzte gesundheitliche gefährdung. *JDDG - J. Ger. Soc. Dermatology* **5**, 110–117 (2007).
129. McVeigh, J. & Begley, E. Anabolic steroids in the UK: an increasing issue for public health. *Drugs Educ. Prev. Policy* **24**, 278–285 (2017).
130. Lindqvist Bagge, A. S. *et al.* Somatic effects of AAS abuse: A 30-years follow-up study of male former power sports athletes. *J. Sci. Med. Sport* **20**, 814–818 (2017).
131. Sessa, F. *et al.* Anabolic-androgenic steroids and brain injury: miRNA evaluation

- in users compared to cocaine abusers and elderly people. *Aging (Albany, NY)*. (2020) doi:10.18632/aging.103512.
132. Franey, D. G. & Espiridion, E. D. Anabolic Steroid-induced Mania. *Cureus* **e3163**, (2018).
 133. Zitzmann, M. Testosterone, mood, behaviour and quality of life. *Andrology* 1–8 (2020) doi:10.1111/andr.12867.
 134. Bertozzi, G., Salerno, M., Pomara, C. & Sessa, F. Neuropsychiatric and behavioral involvement in aas abusers. A literature review. *Med.* **55**, (2019).
 135. Bertozzi, G. *et al.* The Role of Anabolic Androgenic Steroids in Disruption of the Physiological Function in Discrete Areas of the Central Nervous System. *Mol. Neurobiol.* **55**, 5548–5556 (2018).
 136. Kindlundh, A. M. S., Lindblom, J., Bergström, L. & Nyberg, F. The anabolic-androgenic steroid nandrolone induces alterations in the density of serotonergic 5HT1B and 5HT2 receptors in the male rat brain. *Neuroscience* **119**, 113–120 (2003).
 137. Henderson, L. P., Penatti, C. A. A., Jones, B. L., Yang, P. & Clark, A. S. Anabolic androgenic steroids and forebrain GABAergic transmission. *Neuroscience* **138**, 793–799 (2006).
 138. Kanayama, G., Kean, J., Hudson, J. I. & Pope, H. G. Cognitive deficits in long-term anabolic-androgenic steroid users. *Drug Alcohol Depend.* **130**, 208–214 (2013).
 139. Abushareeda, W. *et al.* Advances in the detection of designer steroids in anti-doping. *Bioanalysis* **6**, 881–896 (2014).
 140. Ponzetto, F. *et al.* Methods for Doping Detection. *Front. Horm. Res.* **47**, 153–167 (2016).
 141. Pozo, O. J., Marcos, J., Segura, J. & Ventura, R. Recent developments in MS for small molecules: Application to human doping control analysis. *Bioanalysis* **4**, 197–212 (2012).
 142. Anawalt, B. D. Detection of anabolic androgenic steroid use by elite athletes and

- by members of the general public. *Mol. Cell. Endocrinol.* **464**, 21–27 (2018).
143. Yadav, S. K., Chandra, P., Goyal, R. N. & Shim, Y. B. Chromatography-based determination of anabolic steroids in biological fluids: Future prospects using electrochemistry and miniaturized microchip device. *Chromatographia* **76**, 1439–1448 (2013).
 144. Wong, A. S. Y., Leung, G. N. W., Leung, D. K. K. & Wan, T. S. M. Doping control analysis of anabolic steroids in equine urine by gas chromatography-tandem mass spectrometry. *Drug Test. Anal.* **9**, 1320–1327 (2017).
 145. Judkins, C. M., Teale, P. & Hall, D. J. The role of banned substance residue analysis in the control of dietary supplement contamination. *Drug Test. Anal.* **2**, 417–420 (2010).
 146. Lorenzo, M. & Pico, Y. *Gas Chromatography and Mass Spectroscopy Techniques for the Detection of Chemical Contaminants and Residues in Foods. Chemical Contaminants and Residues in Food: Second Edition* (Elsevier Ltd, 2017). doi:10.1016/B978-0-08-100674-0.00002-3.
 147. Hatton, C. K. Beyond Sports-Doping Headlines: The Science of Laboratory Tests for Performance-Enhancing Drugs. *Pediatr. Clin. North Am.* **54**, 713–733 (2007).
 148. Harvey, D. J. Gas chromatography | Gas chromatography/mass spectrometry. *Encycl. Anal. Sci.* 169–179 (2019) doi:10.1016/B978-0-12-409547-2.14103-4.
 149. Feng, T., Sun, M., Song, S., Zhuang, H. & Yao, L. *Gas chromatography for food quality evaluation. Evaluation Technologies for Food Quality* (Elsevier Inc., 2019). doi:10.1016/B978-0-12-814217-2.00012-3.
 150. Braithwaite, A. & Smith, F. J. Gas Chromatography. *Chromatogr. Methods* 165–257 (2018).
 151. Chaulya, S. K. & Prasad, G. M. Gas Sensors for Underground Mines and Hazardous Areas. *Sens. Monit. Technol. Mines Hazard. Areas* 161–212 (2016) doi:10.1016/b978-0-12-803194-0.00003-9.
 152. McDonald, J. G., Matthew, S. & Auchus, R. J. Steroid profiling by gas chromatography-mass spectrometry and high performance liquid chromatography-mass spectrometry for adrenal diseases. *Horm. Cancer* **2**, 324–

- 332 (2011).
153. Perutka, Z. & Šebela, M. Basis of Mass Spectrometry: Technical Variants. *Use Mass Spectrom. Technol. Clin. Microbiol.* 19–45 (2018) doi:10.1016/B978-0-12-814451-0.00002-2.
 154. Rockwood, A. L., Kushnir, M. M. & Clarke, N. J. *Mass spectrometry. Principles and Applications of Clinical Mass Spectrometry: Small Molecules, Peptides, and Pathogens* (Elsevier Inc., 2018). doi:10.1016/B978-0-12-816063-3.00002-5.
 155. Silverstein, R. M., Webster, F. X. & J.Kiemle, D. *Spectrometric Identification of Organic Compounds* 7th. (2005).
 156. Dodds, E. D., McCoy, M. R., Rea, L. D. & Kennish, J. M. Gas chromatographic quantification of fatty acid methyl esters: Flame ionization detection vs. electron impact mass spectrometry. *Lipids* **40**, 419–428 (2005).
 157. Schummer, C., Delhomme, O., Appenzeller, B. M. R., Wennig, R. & Millet, M. Comparison of MTBSTFA and BSTFA in derivatization reactions of polar compounds prior to GC/MS analysis. *Talanta* **77**, 1473–1482 (2009).
 158. Bowden, J. A., Colosi, D. M., Mora-Montero, D. C., Garrett, T. J. & Yost, R. A. Enhancement of chemical derivatization of steroids by gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS). *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **877**, 3237–3242 (2009).
 159. Su, Y., Xia, S., Wang, R. & Xiao, L. *Phytohormonal quantification based on biological principles. Hormone Metabolism and Signaling in Plants* (2017). doi:10.1016/B978-0-12-811562-6.00013-X.
 160. He, Y. Liquid-based microextraction techniques for environmental analysis. *Compr. Sampl. Sample Prep.* **3**, 835–862 (2012).
 161. Xu, L., Basheer, C. & Lee, H. K. Chemical reactions in liquid-phase microextraction. *J. Chromatogr. A* **1216**, 701–707 (2009).
 162. Jones, J. & Stenerson, K. The Use of Derivatization Reagents for GC. *Reporter US Edition 25.1* <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/reporter-us/the-use-of-derivatization.html>.

163. Parkinson, D. R. *Analytical derivatization techniques. Comprehensive Sampling and Sample Preparation* vol. 2 (Elsevier, 2012).
164. Emwas, A.-H. M., Al-Talla, Z. A. & Kharbatia, N. M. Sample Collection and Preparation of Biofluids and Extracts for Gas Chromatography–Mass Spectrometry. in *The Strengths and Weaknesses of NMR Spectroscopy and Mass Spectrometry with Particular Focus on Metabolomics Research Metadata of the chapter that will be visualized online* vol. 1277 (2015).
165. Semerdjieva, I. B. & Zheljzkov, V. D. Chemical Constituents, Biological Properties, and Uses of Tribulus terrestris: A Review. *Nat. Prod. Commun.* **14**, (2019).
166. Al Maofari, A., Mennane, Z., Hakiki, A., Mosaddak, M. & EL Hajjaji, S. Chemical compositions and antibacterial activity of different extracts of tribulus terrestris growing in Morocco and Yemen. *Der Pharma Chem.* **8**, 14–18 (2016).
167. Pokrywka, A. *et al.* Insights into supplements with tribulus terrestris used by athletes. *J. Hum. Kinet.* **41**, 99–105 (2014).
168. Hobbs, C. A., Saigo, K., Koyanagi, M. & Hayashi, S. mo. Magnesium stearate, a widely-used food additive, exhibits a lack of in vitro and in vivo genotoxic potential. *Toxicol. Reports* **4**, 554–559 (2017).
169. Petkov, G. Enhancement of Tribulus terrestris L. yield by supplement of green house seedlings. *Biotechnol. Biotechnol. Equip.* **25**, 2366–2368 (2011).
170. Senthil, J., Rameashkannan, M. V. & Mani, P. Phytochemical Profiling of Ethanolic Leaves Extract of Ipomoea sepiaria (Koenig Ex . Roxb). *Int. J. Innov. Res. Sci. Eng. Technol.* **5**, 3140–3147 (2016).
171. Tyagi, T. & Agarwal, M. Phytochemical screening and GC-MS analysis of ethanol ACN extract. *J. Pharmacogn. Phytochem.* **6**, 195–206 (2017).
172. Blondeau, N. *et al.* Alpha-linolenic acid: An omega-3 fatty acid with neuroprotective properties - Ready for use in the stroke clinic? *Biomed Res. Int.* **2015**, (2015).
173. Harron, A. F., Powell, M. J., Nunez, A. & Moreau, R. A. Analysis of sorghum wax and carnauba wax by reversed phase liquid chromatography mass

- spectrometry. *Ind. Crops Prod.* **98**, 116–129 (2017).
174. Role, H. E., Soybeanfighting, O. F. & Hunger, W. FAO Commodities and Trade Division, Basic Foodstuffs Service 1, 2. *Plant Prod.* 1–32 (2004).
 175. Alghamdi, S. *et al.* Phytochemical Profiling of Soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) Genotypes Using GC-MS Analysis. *Phytochem. - Source Antioxidants Role Dis. Prev.* (2018) doi:10.5772/intechopen.78035.
 176. TAJIMA, S., ISHIGURO, D., MAMADA, M. & NAKAJIMA, S. Unimolecular Reactions of Diethyl Malonate Cation in Gas-phase. *J. Mass Spectrom. Soc. Jpn.* **52**, 263–270 (2004).
 177. Deak, N. A., Johnson, L. A., Lusas, E. W. & Rhee, K. C. Soy Protein Products, Processing, and Utilization. *Soybeans Chem. Prod. Process. Util.* 661–724 (2008) doi:10.1016/B978-1-893997-64-6.50022-6.
 178. Lusas, E. W. & Riaz, M. N. Soy Protein Products: Processing and Use. *J. Nutr.* **125**, (1995).
 179. Dagostin, J. L. A., Carpiné, D., Dos Santos, P. R. S. & Corazza, M. L. Liquid-liquid equilibrium and kinetics of ethanolic extraction of soybean oil using ethyl acetate as co-solvent. *Brazilian J. Chem. Eng.* **35**, 415–427 (2018).
 180. J.Marino, D. Ethyl Acetate. *Encycl. Toxicol.* (2005).
 181. Pires, L. N., Brandão, G. C. & Teixeira, L. S. G. Determination of phospholipids in soybean lecithin samples via the phosphorus monoxide molecule by high-resolution continuum source graphite furnace molecular absorption spectrometry. *Food Chem.* **225**, 162–166 (2017).
 182. Verruck, S. *et al.* Dairy foods and positive impact on the consumer's health. *Adv. Food Nutr. Res.* **89**, 95–164 (2019).
 183. ADM. Lecithin emulsifying. 4 (2014).
 184. Ouellette, R. J. & Rawn, J. D. *Carbohydrates. Organic Chemistry.* (2018). doi:10.1016/B978-0-12-812838-1.50028-1.
 185. Faye, B., Bengoumi, M., Al-Masaud, A. & Konuspayeva, G. Comparative milk and serum cholesterol content in dairy cow and camel. *J. King Saud Univ. - Sci.*

- 27, 168–175 (2015).
186. Gad, S. C. *Propionic Acid. Encyclopedia of Toxicology: Third Edition* vol. 3 (Elsevier, 2014).
 187. FDA. Q3C — Tables and List Guidance for Industry Q3C — Tables and List Guidance for Industry Q3C — Tables and List Guidance for Industry. *Microsoft Word* **9765**, 1–8 (2017).
 188. Petersson, G. Mass spectrometry of alditols as trimethylsilyl derivatives. *Tetrahedron* **25**, 4437–4443 (1969).
 189. Wurzel, K. A. Glycerol. *Encycl. Toxicol.* 449–451 (2005) doi:10.1016/B0-12-369400-0/00457-9.
 190. Willson, C. The clinical toxicology of caffeine: A review and case study. *Toxicol. Reports* **5**, 1140–1152 (2018).
 191. Cappelletti, S., Daria, P., Sani, G. & Aromatario, M. Caffeine: Cognitive and Physical Performance Enhancer or Psychoactive Drug? *Curr. Neuropharmacol.* **13**, 71–88 (2014).
 192. Prasanth, M. I., Sivamaruthi, B. S., Chaiyasut, C. & Tencomnao, T. A review of the role of green tea (*Camellia sinensis*) in antiphotaging, stress resistance, neuroprotection, and autophagy. *Nutrients* **11**, (2019).
 193. Pradhan, S. & Dubey, R. C. GC–MS analysis and molecular docking of bioactive compounds of *Camellia sinensis* and *Camellia assamica*. *Arch Microbiol* (2021).
 194. Yusoff, M. F. M., Xu, X. & Guo, Z. Comparison of fatty acid methyl and ethyl esters as biodiesel base stock: A review on processing and production requirements. *JAACS, J. Am. Oil Chem. Soc.* **91**, 525–531 (2014).
 195. Biedermann, M., Bongartz, A., Mariani, C. & Grob, K. Fatty acid methyl and ethyl esters as well as wax esters for evaluating the quality of olive oils. *Eur. Food Res. Technol.* **228**, 65–74 (2008).
 196. Joshi, R. *et al.* Characterization of volatile components of tea flowers (*Camellia sinensis*) Growing in Kangra by GC/MS. *Nat. Prod. Commun.* **6**, 1155–1158 (2011).

197. Gerde, J. A. *et al.* *Soybean Oil. Bailey's Industrial Oil and Fat Products* (2020). doi:10.1002/047167849x.bio041.pub2.
198. Bonaduce, I. & Colombini, M. P. Characterisation of beeswax in works of art by gas chromatography-mass spectrometry and pyrolysis-gas chromatography-mass spectrometry procedures. *J. Chromatogr. A* **1028**, 297–306 (2004).
199. Kanai, M., Yamada, T., Hayashi, M., Mano, S. & Nishimura, M. Soybean (*Glycine max* L.) triacylglycerol lipase GmSDP1 regulates the quality and quantity of seed oil. *Sci. Rep.* **9**, 1–10 (2019).
200. Antoniosi Filho, N. R., Carrilho, E. & Lanças, F. M. Fast quantitative analysis of soybean oil in olive oil by high-temperature capillary gas chromatography. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **70**, 1051–1053 (1993).
201. Li, Q., Chen, J., Yu, X. & Gao, J. M. A mini review of nervonic acid: Source, production, and biological functions. *Food Chem.* **301**, (2019).
202. PubChem. Tricaprylin. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Tricaprylin> (2021).
203. Djordjevic, J. *et al.* Fatty acid profile of milk. *IOP Conf. Ser. Earth Environ. Sci.* **333**, (2019).
204. PubChem. Octanoic Acid. (2021) doi:<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/octanoic%20acid>.
205. PubChem. alpha-Tocopherol acetate. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/alpha-Tocopherol-acetate> (2021).
206. PubChem. Tricaprin. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Tricaprin> (2021).