



Tiago André Marinho Caldeira da Rocha

# **Desenvolvimento e validação de um método de HPLC-DAD-FLD para a determinação de inibidores da enzima fosfodiesterase tipo-5 (PDE-5) em suplementos alimentares à base de plantas**

Dissertação do 2º Ciclo de Estudos Conducente ao Grau de Mestre em Controlo de  
Qualidade  
Especialidade em Águas e Alimentos

Trabalho desenvolvido sobre a orientação:  
**Professora Doutora Maria Beatriz Prior Pinto de Oliveira**  
**Professora Doutora Joana Andréa Soares Amaral**  
**Doutora Joana Manuela Silva Santos**

**Outubro, 2015**

De acordo com a legislação em vigor, não é permitida a reprodução de qualquer parte desta dissertação/tese.

Este trabalho foi financiado pela União Europeia (fundos FEDER através do COMPETE) e pela Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT), através de projeto de EXPL/DTP-SAP/1438/2013 (Segurança de suplementos alimentares com base em plantas: pesquisa de adulterantes farmacêuticos e plantas) e LAQV UID/QUI/50006/2013.



## Agradecimentos

Ao finalizar esta dissertação sinto o dever e a necessidade de expressar os meus mais sinceros agradecimentos a todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram com o seu apoio e incentivo para que conseguisse alcançar o final desta etapa na minha formação. Deste modo agradeço:

À Professora Doutora Beatriz Oliveira, dirijo o mais especial agradecimento pela orientação, pela simpatia e pela disponibilidade com que me recebeu desde o início. Bem como pela sua compreensão e pelos conhecimentos transmitidos ao longo destes dois anos.

À Professora Doutora Joana Amaral, pela ajuda prestada durante a orientação destes dois anos de trabalho, principalmente nesta fase final de entrega da dissertação.

À Doutora Joana Santos, um agradecimento muito especial, por todo o acompanhamento, empenho, paciência e por me ajudar a melhor continuamente as minhas competências.

Ao departamento de Bromatologia da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, em especial à Mestre Anabela Costa, por ser sempre tão prestável, principalmente nas alturas mais difíceis deste trabalho.

Por fim, agradeço à minha família e aos meus amigos pela compreensão e apoio durante este ano de dissertação.

Um muito obrigado a todos.

## Resumo

Na última década, tem-se assistido a um consumo crescente de suplementos alimentares pela população mundial, especialmente, no que diz respeito ao consumo de suplementos alimentares à base de plantas (SABP). Estes produtos, utilizados com diversas finalidades, são frequentemente rotulados como “naturais” transmitindo uma falsa sensação de segurança aos consumidores. Contudo, recentemente tem sido referida a ocorrência de adulterações nestes produtos, o que compromete a sua segurança. Entre os casos de fraude detetados destaca-se a adição ilegal de substâncias ativas. Atualmente os inibidores da enzima fosfodiesterase tipo-5 (PDE-5) constituem um dos principais adulterantes encontrados em suplementos alimentares à base de plantas, que alegam um aumento do desempenho sexual. O presente trabalho teve como objetivo o desenvolvimento e validação de um método de cromatografia líquida de alta eficiência acoplado a um detetor de díodos e um detetor de fluorescência (HPLC-DAD-FLD), para a determinação de inibidores da enzima fosfodiesterase tipo-5 (PDE-5) em suplementos alimentares à base de plantas.

A separação foi efetuada numa coluna de fase reversa à temperatura de 31°C, em modo de gradiente, usando dois eluentes, um composto pela mistura de ACN:MeOH (50:50 v/v) e outro composto por uma solução de acetato de amónio 50mM (pH 7). O tempo de corrida foi de 35 minutos e a deteção dos cromatogramas por DAD foi registada a 290 nm.

Depois de otimizado o método procedeu-se ao estudo dos parâmetros de validação, tais como a gama de trabalho, linearidade, precisão e exatidão (ensaios de recuperação), limite de deteção e limite de quantificação. Após validação, o método foi aplicado na avaliação de 12 amostras de SABP provenientes do mercado Português, tendo-se detetado a presença de inibidores da PDE-5 em 7 SABP, nomeadamente sildenafil, tadalafil, tiosildenafil e um possível análogo do sildenafil. Em 5 das amostras adulteradas, verificou-se a presença simultânea de mais do que um inibidor da PDE-5. Os resultados obtidos demonstram a necessidade de um maior controlo deste tipo de produtos, de forma a assegurar a segurança do consumidor.

**Palavras-chave:** Suplementos à Base de Plantas, adulterantes, HPLC-DAD-FLD, otimização analítica.

## Abstract

In the last decade has been an increase in the consumption of food supplements by global population, specially concerning plant food supplements (PFS). These products, which have many uses, are frequently labelled as “naturals” causing a false sense of security in the consumer. Recently, however, the occurrence of adulterations in these products has been brought up, compromising security. The illegal adding of active substances stands out across fraud cases. Currently, the phosphodiesterase type-5 enzyme (PDE-5) inhibitors constitute one of the main adulterants found in plant food supplements which allegedly enhance sexual performance. This paper’s goal was to develop and validate a high-performance liquid chromatography method coupled to a diode array detector and a fluorescence detector (HPLC-DAD-FLD) in order to detect phosphodiesterase type-5 enzyme (PDE-5) inhibitors in plant food supplements.

The separation was made in a reverse phase column at 31°C, in gradient mode using two eluents. One of them was a ACN:MeOH (50:50 v/v) mixture and the other a 50mM ammonium acetate solution (pH 7). The running time was 35 minutes and the DAD chromatographic detection was registered a 290 nm. After reaching the method’s optimized level, its validation was established through parameters, such as range, linearity, accuracy and precision (recovery testing), detection limit and quantification limit. After validation, the method was applied to the evaluation of 12 samples of PFS from the Portuguese market. The PDE-5 inhibitors were detected in 7 SABP, namely sildenafil, tadalafil and tiosildenafil and another possible sildenafil analog. In 5 adulterated samples, the simultaneous presence of more than a PDE-5 inhibitor was detected. The obtained results show the need of a bigger control over these kind of products in order to secure consumer’s safety.

**Keywords:** Plant Food Supplements, adulterants, HPLC-DAD-FLD, analytical optimization.

## Publicações e Comunicações

### Publicações em jornais científicos:

1. **Tiago Rocha**, Joana S. Amaral, Maria Beatriz P.P. Oliveira, Adulteration of Dietary Supplements by the Illegal Addition of Synthetic drugs: A Review, *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *in press*.

### Comunicações Orais em encontros científicos:

1. **T. Rocha**, J. Santos, J.S. Amaral, M. B. P.P. Oliveira, Development and validation of HPLC-DAD-FL method for the determination of food supplements adulteration with undeclared phosphodiesterase type-5 inhibitor drugs, 8º Encontro da Investigação Jovem da Universidade do Porto (IJUP), 14th May 2015, Porto, Portugal.

### Comunicações escritas em forma de Poster em encontros científicos:

1. **T. Rocha**, J.S. Amaral, M. B. P.P. Oliveira. Safety concerns regarding Plant Food Supplements. 7º Encontro da Investigação Jovem da Universidade do Porto (IJUP), 13th February 2014, Porto, Portugal.
2. **T. Rocha**, J.S. Amaral, M. B. P. P. Oliveira, Food Supplements adulteration with undeclared synthetic phosphodiesterase type-5 drugs (PDE-5) inhibitors, XX Encontro Luso-Galego de Química, 26th-28th November 2014, Porto, Portugal.
3. **T. Rocha**, J. Santos, J.S. Amaral, M. B. P.P. Oliveira. Monitorização da adulteração de suplementos alimentares à base de plantas comercializados em Portugal com inibidores de fosfodiesterase tipo 5 (PDE-5). 2º Simpósio Nacional “Promoção de uma Alimentação Saudável e Segura - Qualidade Nutricional & Processamento Alimentar”, 26th November 2015, Lisbon, Portugal.

# Índice

|   |             |
|---|-------------|
| <b>AGRADECIMENTOS</b> .....   | <b>IV</b>   |
| <b>RESUMO</b> .....   | <b>V</b>    |
| <b>ABSTRACT</b> .....   | <b>VI</b>   |
| <b>PUBLICAÇÕES E COMUNICAÇÕES</b> .....   | <b>VII</b>  |
| <b>ÍNDICE</b> .....   | <b>VIII</b> |
| <b>LISTA DE FIGURAS</b> .....   | <b>X</b>    |
| <b>LISTA DE TABELAS</b> .....   | <b>XI</b>   |
| <b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....  | <b>XII</b>  |
| <b>1. INTRODUÇÃO</b> .....  | <b>1</b>    |
| 1.1 REGULAMENTAÇÃO DE SUPLEMENTOS ALIMENTARES À BASE DE PLANTAS .....   | 3           |
| 1.2 CONSUMO DE SUPLEMENTOS ALIMENTARES À BASE DE PLANTAS .....  | 5           |
| 1.3 ADULTERAÇÃO DE SUPLEMENTOS ALIMENTARES À BASE DE PLANTAS .....  | 6           |
| 1.4 ADULTERAÇÃO DE SUPLEMENTOS ALIMENTARES À BASE DE PLANTAS COM INIBIDORES DA ENZIMA FOSFODIESTERASE TIPO-5 (PDE-5) .....          | 8           |
| 1.5 METODOLOGIAS DE DETEÇÃO DE SUPLEMENTOS ALIMENTARES À BASE DE PLANTAS ADULTERADOS COM INIBIDORES DE FOSFODIESTERASE TIPO 5 ..... | 10          |
| 1.5.1 Métodos cromatográficos .....   | 11          |
| 1.6 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (HPLC).....  | 13          |
| 1.7 VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO .....   | 15          |
| 1.7.1 Especificidade e seletividade.....  | 15          |
| 1.7.2 Precisão .....  | 16          |
| 1.7.3 Exatidão .....  | 18          |
| 1.7.4 Linearidade .....   | 18          |
| 1.7.5 Gama de trabalho.....   | 19          |
| 1.7.6 Limite de deteção .....   | 19          |
| 1.7.7 Limite de quantificação.....  | 20          |
| 1.7.8 Sensibilidade .....   | 22          |
| 1.7.9 Recuperação.....  | 22          |
| 1.8 OBJETIVOS DO TRABALHO .....   | 23          |
| <b>2. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....   | <b>24</b>   |

---

|  |           |
|--|-----------|
| 2.1 REAGENTES E PADRÕES.....   | 25        |
| 2.2 AMOSTRAS.....  | 26        |
| 2.3 PREPARAÇÃO DE SOLUÇÕES .....   | 26        |
| 2.3.1 <i>Solução padrão individual</i> .....                                   | 26        |
| 2.3.2 <i>Solução padrão de trabalho</i> .....                                  | 26        |
| 2.3.3 PREPARAÇÃO DA FASE MÓVEL USADA NA TÉCNICA ANALÍTICA DE HPLC-DAD-FLD...   | 27        |
| 2.4 EXTRAÇÃO DAS AMOSTRAS .....  | 27        |
| 2.5 CONDIÇÕES DE FLUORESCÊNCIA DOS INIBIDORES DA PDE-5.....                    | 30        |
| 2.6 ANÁLISE CROMATOGRÁFICA .....   | 30        |
| 2.6.1 <i>Condições cromatográficas</i> .....                                   | 31        |
| 2.7 VALIDAÇÃO DO MÉTODO .....  | 32        |
| <b>3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>   | <b>33</b> |
| 3.1. IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DOS ADULTERANTES NAS AMOSTRAS DE SABP ..... | 34        |
| 3.2 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES ANALÍTICAS .....                                  | 37        |
| 3.2.1 <i>Otimização do gradiente dos eluentes</i> .....                        | 37        |
| 3.2.2 <i>Otimização das condições de fluorescência</i> .....                   | 40        |
| 3.2.3 <i>Otimização do processo de extração das amostras</i> .....             | 42        |
| 3.3 VALIDAÇÃO DO MÉTODO .....  | 43        |
| 3.3.1 <i>Gama de Trabalho</i> .....  | 43        |
| 3.3.2 <i>Linearidade</i> .....   | 43        |
| 3.3.3 <i>Limite de deteção e de quantificação</i> .....                        | 45        |
| 3.3.4 <i>Precisão</i> .....  | 46        |
| 3.3.5 <i>Ensaio de Recuperação</i> .....                                       | 50        |
| 3.4 ANÁLISE DAS AMOSTRAS DE SUPLEMENTOS ALIMENTARES À BASE DE PLANTAS .....    | 51        |
| <b>4. CONCLUSÃO .....</b>  | <b>59</b> |
| <b>5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>                                     | <b>62</b> |

## Lista de Figuras

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 1</b> – Esquema do procedimento de extração efetuado nas amostras de SABP ....  | 27 |
| <b>Figura 2</b> - Espectro UV obtido pelo padrão de Sildenafil a 290 nm .....   | 35 |
| <b>Figura 3</b> – Espectro de UV obtido pelo padrão de Vardenafil a 290nm.....  | 36 |
| <b>Figura 4</b> - Espectro UV obtido pelo padrão de Tadalafil a 290nm.....  | 36 |
| <b>Figura 5</b> - Espectro UV obtido pelo padrão de Tiosildenafil a 290nm.....  | 36 |
| <b>Figura 6</b> - Espectro UV obtido pelo padrão de Acetildenafil a 290nm .....   | 37 |
| <b>Figura 7</b> - Espectro UV obtido pelo padrão de Iohimbina a 290nm .....   | 37 |
| <b>Figura 8</b> – Cromatograma obtido pela aplicação do gradiente determinado inicialmente, para os padrões de SIL, VAR, TAD e YOH .....  | 38 |
| <b>Figura 9</b> - Cromatograma obtido pela aplicação do gradiente X1, para os padrões de SIL, VAR, TAD e YOH (deteção a 290 nm) .....   | 39 |
| <b>Figura 10</b> - Cromatograma obtido pela aplicação do gradiente X2, para os padrões de SIL, VAR, TAD e YOH (deteção a 290 nm) .....  | 40 |
| <b>Figura 11</b> - Cromatograma obtido pela deteção por FLD para as soluções padrão de trabalho nas concentrações de 100µg/mL (à direita) e 200µg/mL (à esquerda) (deteção a 290 nm)..... | 41 |
| <b>Figura 12</b> - Curvas de calibração e respetivos coeficiente de correlação, para os compostos em estudo pela deteção por DAD.....   | 44 |
| <b>Figura 13</b> - Curvas de calibração e respetivos coeficiente de correlação, para os compostos em estudo pela deteção FLD .....  | 45 |
| <b>Figura 14</b> - Exemplo de um cromatograma obtido para amostra SA1 e SA5 (deteção a 290 nm).....   | 51 |
| <b>Figura 15</b> - Exemplo dos espectros UV obtidos para o pico correspondente ao SIL para as amostras SA1 (esquerda) e SA5 (direita) .....   | 52 |
| <b>Figura 16</b> - Exemplo dos espectros UV obtidos para o pico correspondente ao THS para as amostras SA1 (esquerda) e SA5 (direita) .....   | 52 |
| <b>Figura 17</b> - Exemplo de um cromatograma obtido para amostra SA4.....  | 53 |
| <b>Figura 18</b> - Exemplo de um cromatograma obtido para amostra SA11.....   | 53 |
| <b>Figura 19</b> - Exemplo dos espectros UV obtidos para o pico correspondente ao análogo do Sildenafil (ASIL) para as amostras SA4 (esquerda) e SA11 (direita) .....                     | 53 |
| <b>Figura 20</b> - Exemplo de um cromatograma obtido para amostra SA8, SA9 e SA10.....  | 54 |
| <b>Figura 21</b> - Exemplo dos espectros UV obtidos para o pico correspondentes as amostras .....   | 54 |

## Lista de Tabelas

|   |    |
|---|----|
| <b>Tabela 1</b> – Características dos padrões utilizados neste trabalho.....  | 25 |
| <b>Tabela 2</b> - Características dos SABP em estudo .....  | 28 |
| <b>Tabela 3</b> – Características de fluorescência dos padrões em estudo.....   | 30 |
| <b>Tabela 4</b> – Condições cromatográficas aplicadas ao método de HPLC usado.....  | 31 |
| <b>Tabela 5</b> – Programa de gradiente usado para análise das amostras.....  | 32 |
| <b>Tabela 6</b> – Tempos de retenção dos padrões obtidos pelos sistemas de deteção DAD e FLD .....  | 35 |
| <b>Tabela 7</b> – Recuperação (%) obtida de SIL para os diferentes ensaios de extração.....   | 43 |
| <b>Tabela 8</b> – Limites de deteção e limites de quantificação ( $\mu\text{g/mL}$ ), para os diferentes inibidores da PDE-5 determinados pelo sistema de HPLC-DAD-FLD.....   | 46 |
| <b>Tabela 9</b> – Repetibilidade e precisão intermédia do método calculada com base na análise das áreas dos picos cromatográficos detetados por DAD para os diferentes padrões de inibidores da PDE-5.....                 | 48 |
| <b>Tabela 10</b> – Repetibilidade e precisão intermédia do método calculadas com base na análise dos tempos de retenção dos picos cromatográficos detetados por DAD para os diferentes padrões de inibidores da PDE-5 ..... | 48 |
| <b>Tabela 11</b> – Repetibilidade e precisão intermédia do método calculadas com base na análise das áreas dos picos cromatográficos para os padrões de Inibidores da PDE-5 detetados por FLD.....                          | 49 |
| <b>Tabela 12</b> – Repetibilidade e precisão intermédia do método calculadas com base na análise dos tempos de retenção dos picos cromatográficos para os padrões de Inibidores da PDE-5 detetados por FLD .....            | 49 |
| <b>Tabela 13</b> – Percentagem de recuperação para os diferentes padrões e respetivos coeficientes de variação.....   | 50 |
| <b>Tabela 14</b> – Resultados das análises às amostras de SABP adulteradas com inibidores da PDE-5, através da análise por HPLC-DAD-FLD.....  | 56 |

## Lista de Abreviaturas

ACE – Acetildenafil

ACN – Acetonitrilo

ASAE – Autoridade de Segurança Alimentar e Económica

C<sub>18</sub> – Coluna cromatográfica com enchimento de octadecilsilano

C<sub>8</sub> – Coluna cromatográfica com enchimento de octilsilano

CAS – *Chemical Abstract Service*

CRS – Substância certificada de referência (*Chemical Reference Substances*)

DAD – Detetor de díodos (*Diode Array Detector*)

DE – Disfunção erétil

DSHEA – *Dietary Supplement Health and Education Act*

EMA – Agência Europeia do Medicamento (*European Medicines Agency*)

EUA – Estados Unidos da América

FDA – *Food and Drug Administration*

GC – Cromatografia Gasosa (*Gas Chromatography*)

GMP – Guanosina monofosfato

GMPc – Guanosina monofosfato cíclica

HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (*High Performance Liquid Chromatography*)

HPTLC – Cromatografia em Camada Fina de Alta Eficiência (*High Performance Thin Layer Chromatography*)

ICH – Conferência Internacional de Harmonização (*International Conference on Harmonisation*)

IUPAC – União Internacional de Química Pura e Aplicada (*International Union of Pure and Applied Chemistry*)

LC – Cromatografia líquida (*Liquid Chromatography*)

LOD – Limite de deteção (*Limit of Detection*)

LOQ – Limite de quantificação (*Limit of Quantitation*)

MeOH – Metanol

MS – Espectrometria de massa (*Mass spectrometry*)

NHANES – *National Health and Nutrition Examination Survey*

NHIS – *National Health Interview Survey*

NP-HPLC – Cromatografia Líquida em Alta Eficiência com Separação em Fase Normal (*Normal Phase High Performance Liquid Chromatography*)

PDE-5 – Enzima fosfodiesterase tipo-5

RASFF – Sistema de alerta rápido para os géneros alimentícios e alimentos de animais (*Rapid Alert System for Food and Feed*)

RP-HPLC – Cromatografia Líquida em Alta Eficiência com Separação em Fase Reversa (*Reverse Phase High Performance Liquid Chromatography*)

SABP – Suplemento Alimentar à Base de Plantas

SIL – Sildenafil

TAD – Tadalafil

THS – Tiosildenafil

TLC – Cromatografia em Camada Fina (*Thin Layer Chromatography*)

UE – União Europeia

UV – Ultravioleta

UV-VIS – Ultravioleta-Visível

VAR – Vardenafil

YOH – Iohimbina

# 1. Introdução

Desde dos primórdios do Homem, que as plantas e/ou preparações botânicas desempenham um papel fundamental na saúde, quer seja pelas suas propriedades nutricionais para manter o bem-estar e prevenir doenças, quer pelo seu uso como medicamentos para curar doenças ou aliviar os seus sintomas (Eussen et al., 2011).

O uso de plantas e preparações botânicas, está principalmente relacionado com a sua composição em diferentes compostos reconhecidos pelo seu efeito fisiológico nos humanos, tais como uma grande variedade de nutrientes, vitaminas e minerais, entre outras substâncias biologicamente ativas (Silano et al., 2011). Para além de serem usadas na alimentação e na medicina tradicional, mais recentemente, plantas e preparações botânicas têm surgido com outras aplicações incluindo em cosméticos, produtos homeopáticos, biocidas, na extração de compostos para a indústria farmacêutica e como ingredientes em suplementos alimentares (Garcia-Alvarez et al., 2014). Em particular, durante os últimos anos, tem-se assistido no mercado global a um aumento de produtos botânicos na forma de suplementos alimentares à base de plantas (SABP), que legalmente são considerados como alimento, tanto na União Europeia (UE) como nos Estados Unidos da América (EUA), segundo a Diretiva 2002/46/CE e a Lei de 1994, *Dietary Supplement Health and Education Act (DSHEA)*, respetivamente. Não sendo necessária nenhuma avaliação de segurança antes da sua comercialização.

Devido à formulação dos SABP incluir plantas e/ou extratos de plantas, usualmente estes são publicitados como sendo “naturais”. Por este motivo, os consumidores frequentemente depreendem que estes produtos são mais saudáveis e seguros, comparativamente aos medicamentos provenientes da indústria farmacêutica. Contudo, para além dos riscos inerentes ao consumo de produtos botânicos, tais como possíveis efeitos secundários e interações das moléculas fitoquímicas biologicamente ativas com medicamentos, nos últimos anos diferentes estudos têm reportado casos de adulterações de SABP com diferentes fármacos. Considerando o aumento do consumo de SABP e o facto de os consumidores não estarem cientes do risco associado à adição ilegal de medicamentos farmacêuticos a estes produtos, este tipo de adulteração é atualmente considerado como sendo um problema muito preocupante ao nível da segurança alimentar e saúde pública. Por este motivo, vários trabalhos têm sido realizados na última década respeitantes ao desenvolvimento e aplicação de técnicas para a deteção de adulterantes em SABP.

## 1.1 Regulamentação de suplementos alimentares à base de plantas

Na UE, os suplementos alimentares (os quais incluem os SABP) estão regulamentados pela Diretiva 2002/46/CE que define estes produtos como sendo “...géneros alimentícios que se destinam a complementar o regime alimentar normal e que constituem fontes concentradas de determinados nutrientes ou outras substâncias com efeito nutricional ou fisiológico, estremaes ou combinados, comercializados em forma doseada, ou seja, as formas de apresentação como cápsulas, pastilhas, comprimidos, pílulas e outras formas semelhantes, saquetas de pó, ampolas de líquido, frascos com conta-gotas e outras formas similares de líquidos ou pós que se destinam a ser tomados em quantidades reduzidas”. Esta diretiva também especifica “nutrientes” como sendo vitaminas e minerais, e estabelece os limites máximos e mínimos em que estes podem ser encontrados nestes produtos. Não especificando contudo, do que se pode entender com “outras substâncias com efeito nutricional ou fisiológico”. Assim, várias substâncias diferentes são geralmente aceites como estando incluídas nesta definição tais como, aminoácidos, enzimas, prebióticos e probióticos, ácidos gordos essenciais e plantas e seus extratos, sendo que o uso destas substâncias depende frequentemente da legislação nacional de cada país (Silano et al., 2011). A falta de harmonização e especificação entre os diferentes países da UE no que respeita à utilização de plantas medicinais e seus extratos nos suplementos alimentares, resulta em discrepâncias entre os países dos estados membros. Pelo que, certos produtos botânicos são autorizados em determinados países e proibidos, ou não regulamentados, noutros. Adicionalmente, com base na legislação atual da UE, as plantas medicinais e seus extratos podem ser usadas tanto na produção de SABP, como de medicamentos tradicionais à base de plantas (regulados pela Diretiva 2004/24/CE). No entanto, a distinção entre ambos é de algum modo confusa, com a fronteira entre “alimentação” e “uso medicinal” muitas vezes sendo definida pelos hábitos da população e interpretação das disposições legais (Silano et al., 2011).

Sendo considerados como alimentos na UE, os SABP estão ainda sujeitos às disposições legais do Regulamento (CE) 178/2002, que determina os princípios e normas gerais da legislação alimentar, segundo o qual a responsabilidade no que concerne à segurança alimentar recai sobre os operadores das empresas do sector alimentar. De igual forma, os SABP devem de obedecer à restante legislação do âmbito alimentar tal como, regras de higiene alimentar (Regulamento (CE) 853/2004), níveis máximos de contaminantes (Regulamento (CE) 1831/2003), novos alimentos e ingredientes alimentares (Regulamento (CE) 258/97), entre outros.

Apesar da abrangente regulamentação, diferentes problemas de segurança alimentar podem mesmo assim acontecer nos diferentes estados membros, o que conduziu à criação, por parte da UE, do Sistema de Alerta Rápido para os Géneros Alimentícios e Alimentos de Animais (RASFF). O RASFF proporciona às autoridades uma ferramenta de alerta rápida e eficiente para as notificações emitidas pelos diferentes estados membros da UE, sempre que um alimento apresente um elevado risco para a saúde pública devido a contaminações, adulterações ou não se encontre dentro das leis acima mencionadas. Esta informação, permite que os diferentes estados membros tomem uma ação imediata no que concerne ao alerta aos consumidores e à retirada do produto do mercado (Petroczi et al., 2011). Na base de dados do RASFF podemos efetuar uma pesquisa por género alimentício ou categoria de produto na qual se inclui a opção “*Dietetic foods, food supplements, fortified foods*”.

Nos EUA, os suplementos alimentares (nos quais estão incluídos os SABP) e seus ingredientes são regulados pela *Food and Drug Administration* (FDA). Segundo a lei DSHEA de 1994, os suplementos alimentares são reconhecidos como sendo alimentos, colocando-os contudo numa categoria diferente destes, obedecendo a requisitos de segurança e rotulagem específicos. A referida legislação define um suplemento alimentar como um produto (outro que não tabaco) com intenção de suplementar a dieta normal, desde que contenha um ou mais dos seguintes ingredientes dietéticos: vitaminas; minerais; plantas medicinais ou outro tipo de produto botânico; aminoácidos; substâncias dietéticas usadas pelo Homem para suplementar a dieta através do aumento do seu consumo diário; concentrados, metabolitos, extratos, ou uma combinação dos mesmos, com a intenção de serem consumidos por via oral na forma de comprimido, cápsula, pílula ou líquido (USA, 1994). Mais ainda, segundo a DSHEA, este tipo de produtos não deve substituir a alimentação convencional, não podendo assim ser vendidos como alimento ou dieta alimentar, devendo estar rotulados como suplementos alimentares (USA, 1994). Adicionalmente, segundo esta legislação, a responsabilidade em determinar se os suplementos alimentares são seguros e se o efeito reivindicado é suportado por evidências comprovadas recai sobre a empresa (sejam produtores ou distribuidores) (Silano et al., 2011).

Nos EUA, semelhante ao que acontece na UE, os suplementos alimentares não precisam de uma aprovação prévia das autoridades de regulamentação antes da sua entrada no mercado, e os produtores também não necessitam de apresentar provas sobre a segurança e eficácia dos produtos, sendo contudo proibida a comercialização de produtos que não se enquadrem dentro da regulamentação ou que sejam perigosos ou ineficientes (Rapaka e Coates, 2006). Não obstante, um suplemento alimentar com uma

formulação ou ingrediente não comercializado antes de 1994, é considerado como “novo alimento”, pelo que o produtor deve notificar a FDA e fornecer informação relevante que demonstre a segurança do produto para o consumo humano (Rapaka e Coates, 2006). Segundo Wheatley e Spink (2013), a legislação DSHEA enfraquece a autoridade da FDA sobre os suplementos alimentares, principalmente no que concerne aos produtos importados.

## 1.2 Consumo de suplementos alimentares à base de plantas

Durante a última década é inegável a existência de um crescimento notório no consumo de suplementos alimentares. Entre estes, o consumo de SABP tem mostrado um aumento significativo, sendo que os *records* de consumo ocorrem nos EUA e UE (Egan et al., 2011). O aumento da aceitação deste tipo de produtos pelos consumidores tem sido associado a inúmeros fatores, entre os quais (i) a crescente desconfiança na medicina e medicamentos convencionais, (ii) a percepção de que o que é “natural” é saudável e, sendo as plantas de origem natural, é seguro o seu consumo, (iii) a necessidade de um controlo maior sobre a própria saúde e decisões que a podem afetar, aumentando assim a tendência dos consumidores para se automedicar (Ritchie, 2007; Egan et al., 2011; Vargas-Murga et al., 2011).

Os suplementos alimentares são geralmente consumidos devido a uma variedade de propósitos, incluindo o equilíbrio da dieta, a compensação de uma falta nutricional resultante de um estilo de vida não saudável, a manutenção da saúde, a prevenção de doenças crónicas, a melhoria da aparência, a melhoria de bem-estar incluindo a condição mental, sexual e desportiva, entre outros (Egan et al., 2011; Petroczi et al., 2011).

Até à presente data, diversos estudos têm vindo a ser efetuados relativos ao consumo de suplementos alimentares, normalmente focando um determinado tipo de população tal como crianças, grávidas, idosos, pacientes com doenças crónicas ou cancro, e atletas (Petroczi et al., 2011; Vargas-Murga et al., 2011). Apesar disso, a maior parte da informação referente ao uso e toma de suplementos alimentares, em particular SABP, derivam de dados obtidos por via de inquéritos gerais à população nos EUA, tais como o *National Health and Nutrition Examination Survey* (NHANES) e o *National Health Interview Survey* (NHIS) (Egan et al., 2011; Garcia-Alvarez et al., 2014). Com base nos dados obtidos pelo NHANES nos anos de 2003/2004 e de 2005/2006 estima-se que aproximadamente 49% da população nos EUA consome suplementos alimentares, sendo que 14% refere já ter consumido SABP. Já no NHIS de 2007, 18% dos adultos inquiridos alegam o uso de SABP. Em 2002, um estudo sobre o uso de suplementos não-

vitamínicos não-minerais efetuado com 1000 participantes, sendo estes estudantes de uma universidade Norte-Americana, demonstrou que 26% dos inquiridos consome algum tipo de suplementos, sendo os ingredientes mais reportados ginseng, equinácea, proteínas/aminoácidos e ginko biloba (Perkin et al., 2002). Na UE, o projeto PlantLIBRA, financiado pelo 7º Programa-Quadro de Investigação Científica da UE, levou a cabo a realização de um inquérito em 6 países da UE (Alemanha, Espanha, Finlândia, Itália, Reino Unido e Roménia), sobre o tipo e frequência de consumo de SABP (Garcia-Alvarez et al., 2014). O estudo, que incluiu 2359 participantes, mostrou que quase 19% usa pelo menos um SABP, sendo que o valor mais alto é observado na Itália (22,7%) e o valor mais baixo na Finlândia (9,6%). Os SABP referidos como os mais frequentemente usados contêm plantas como, ginko biloba, onagra e alcachofra, sobre a forma de cápsulas ou comprimidos.

Apesar dos fatores que levam ao consumo de SABP variarem de acordo com a demografia e saúde, entre outros, a informação proveniente de estudos realizados sobre as características dos consumidores de SABP mostra geralmente um consumo mais elevado por parte de mulheres adultas, consumidores com elevado nível de escolaridade e socioeconómico, fisicamente ativos, não fumadores e que tendem a ter a sua condição de saúde em boa consideração (Schaffer et al., 2003; Radimer et al., 2004; Nielsen et al., 2005; Egan et al., 2011; Garcia-Alvarez et al., 2014). Estudos reportam ainda, um elevado consumo de SABP também por atletas, com vista num aumento de rendimento e performance no treino que efetuam (Petroczi et al., 2008, 2011; Kiertscher e DiMarco, 2013).

### **1.3 Adulteração de suplementos alimentares à base de plantas**

Com o crescente aumento do consumo de suplementos alimentares, a segurança na produção e marketing, relativamente à qualidade e níveis de ingredientes fisiologicamente ativos e conformidade de rotulagem, é algo que preocupa globalmente as diferentes partes interessadas, tais como os consumidores, profissionais de saúde e reguladores (Sullivan e Crowley, 2006). Em particular, diferentes questões de segurança em relação aos SABP têm emergido, tais como a sua frequente rotulagem como produto “natural” (devido a serem derivados de plantas), transmitindo uma falsa sensação de segurança ao consumidor (Liang et al., 2006; Di Lorenzo et al., 2014). Entre os problemas relacionados com a adulteração de SABP, a adição de substâncias ilegais e trocas intencionais ou a incorreta identificação do produto botânico utilizado, são as mais preocupantes.

Considerando o valor económico associado ao mercado global de SABP (por exemplo, nos EUA, estima-se que o gasto efetuado pelos consumidores atinja valores na ordem de 20 mil milhões por ano em SABP), este torna-se bastante aliciante à adulteração destes produtos tendo em vista um aumento de lucro (Wheatley e Spink, 2013). Uma das várias adulterações reportadas em SABP passa pela adição de fármacos, realizada por produtores sem escrúpulos que tentam aumentar o efeito (e sua rapidez) dos suplementos que comercializam. De facto, para alguns SABP, como por exemplo os utilizados com a finalidade de melhorar a performance sexual, se o consumidor não verificar que os suplementos tem o efeito desejado, poderão eventualmente deixar de consumir o produto por não alcançar o efeito desejado no tempo pretendido. Pelo contrário, se o consumidor rapidamente atingir os resultados que pretende, o mais provável é que continue a consumir o produto e aconselhe a sua utilização a amigos e familiares, aumentando assim o lucro das empresas produtoras/distribuidoras.

Vários estudos ao longo das últimas décadas demonstram que a adição intencional de fármacos em SABP incluem vários tipos de medicamentos com propriedades farmacológicas distintas, desde supressores de apetite, estimulantes, antidepressivos, ansiolíticos, diuréticos e laxantes no caso dos SABP para emagrecimento, inibidores da enzima fosfodiesterase tipo 5 (PDE-5) no caso dos SABP para aumento do desempenho sexual, e esteroides anabolizantes e pró-hormonas no caso de SABP usados para o aumento da massa muscular/aumento da performance desportiva. Um problema adicional neste tipo de adulteração, passa pelo uso de análogos de fármacos, uma vez que, para muitas destas substâncias, não existem estudos farmacológicos que comprovem a sua segurança, sendo ainda frequente o uso de substâncias contrafeitas de qualidade duvidosa (Geyer et al., 2008; Petroczi et al., 2011; Gilard et al., 2015; Odoardi et al., 2015).

Como referido nas secções anteriores, os suplementos alimentares ao serem considerados como alimento em vários países, não necessitam de autorização especial para serem comercializados, sendo que a responsabilidade legal pela sua segurança recai sobre os produtores. Consequentemente, na UE, várias fito-formulações têm sido comercializadas sobre a denominação de SABP, evitando assim os requisitos legais e registo oficial necessário destes produtos se tais fossem considerados como medicamentos tradicionais à base de plantas. Adicionalmente, os SABP estão largamente difundidos no mercado global, facilmente acessíveis aos consumidores, sendo encontrados nos supermercados, farmácias, lojas de produtos naturais, ervanárias, ginásios, entre outros locais, sendo também possível a sua compra através de televendas e *sites online*. Na última década, a expansão de suplementos provenientes

do mercado negro tem vindo a aumentar significativamente (Geyer et al., 2008; Petroczi et al., 2011; Gilard et al., 2015; Odoardi et al., 2015).

#### **1.4 Adulteração de suplementos alimentares à base de plantas com inibidores da enzima fosfodiesterase tipo-5 (PDE-5)**

A disfunção erétil (DE) é uma doença que afeta 150 milhões de homens mundialmente (Schramek et al., 2014), sendo caracterizada pela incapacidade de criar ou manter uma ereção peniana durante a atividade sexual. O tratamento atualmente conhecido para este problema passa pela administração de fármacos contendo como substância ativa inibidores da enzima fosfodiesterase tipo 5 (PDE-5). Estes compostos agem inibindo a enzima referida, responsável pela degradação da guanosina monofosfato cíclica (GMPc), a guanosina monofosfato (GMP), causando um aumento dos níveis de GMPc, resultando no relaxamento das artérias helicinas seguido de um aumento do fluxo sanguíneo para o pénis, melhorando assim a função erétil (Codevilla et al., 2013).

Atualmente, os inibidores da PDE-5 legalmente comercializados a nível mundial são: citrato de sildenafil (Viagra®), tadalafil (Cialis®), hidrocloreto de vardenafil (Levitra®), udenafil (Zydena®), mirodenafil (Mvix®), carbonato de iodenafil (Helleva®) e avanafil (Stendra® nos EUA ou Spedra® na UE) (Patel et al., 2014). Porém, nos EUA e na UE só o sildenafil, tadalafil, vardenafil e avanafil estão aprovados pela FDA e pela Agência Europeia do Medicamento (EMA) para o tratamento da DE (FDA, 2015b; EMA, 2015).

Os efeitos secundários devido à interação de inibidores da PDE-5 e outros medicamentos encontram-se documentados. Estes medicamentos podem causar cefaleia, eritemas, dispepsia, congestão nasal e problemas visuais, podendo até mesmo potenciar um efeito hipotensivo quando o uso de inibidores da PDE-5 é administrado concomitantemente com medicamentos como nitratos ou  $\alpha$ -bloqueadores (Gur et al., 2013). Além disso, uma vez que o sildenafil, tadalafil e vardenafil são principalmente metabolizados pela via do citocromo P450 3A4, certos medicamentos podem inibir a via de metabolização dos inibidores da PDE-5, aumentando assim a sua concentração no plasma (Schwartz et al., 2010).

Nos últimos anos, a procura de inibidores da PDE-5 tem aumentando mundialmente, não só por pacientes que sofrem de DE, mas também em “uso recreativo” por jovens sem DE, de modo a aumentar o seu desempenho sexual, e ocasionalmente associado ao consumo de álcool e drogas (Korkes et al., 2008; Bechara et al., 2010).

Apesar da aquisição de inibidores da PDE-5 ser feita apenas com prescrição médica, várias razões tais como o estigma associado à disfunção sexual, falta de confiança em

falar abertamente perante um profissional de saúde, falta de informação, custo, e disponibilidade de obtenção do medicamento por outras vias, sendo estas mais baratas e discretas, tais como a internet, faz com que a procura destes medicamentos sem prescrição médica e fora dos canais oficiais tenha aumentado nos últimos anos (Campbell et al., 2013; Fejos et al., 2014; Patel et al., 2014). Estima-se que só na Europa, mais de 6 milhões de produtos ilegais contendo inibidores da PDE-5 são comprados fora do sistema nacional de saúde (Dorsey et al., 2010; Schnetzler et al., 2010; Venhuis e de Kaste, 2012) e nos EUA, mais de meio milhão de comprimidos sem controlo de qualidade são vendidos todos os meses (Dorsey et al., 2007). Uma vez que os comprimidos contrafeitos não têm nenhum tipo de controlo de qualidade, existe o risco adicional da compra de produtos de baixa qualidade, contendo por exemplo impurezas, não apresentando homogeneidade de produto ou tendo uma dosagem incorreta. Para além da problemática dos medicamentos contrafeitos, estudos recentes têm demonstrado a presença ilegal de inibidores da PDE-5 e seus análogos em SABP. Este tipo de suplemento tem-se tornado popular, sendo publicitado como “produto natural” para o aumento do desempenho sexual, levando a uma falsa sensação de segurança por parte do consumidor (Liang et al., 2006; Singh et al., 2009; Campbell et al., 2013; Fejos et al., 2014). Como geralmente a existência de procura leva a um aumento da oferta, recentemente o número de produtos publicitados como “naturais” para a resolução dos problemas sexuais têm vindo aumentar, sendo frequentemente publicitados através de anúncios de televisão e internet (Liang et al., 2006; Singh et al., 2009; Petroczi et al., 2011; Strano-Rossi et al., 2015). Contudo, de forma a potenciar o desempenho destes produtos, tem-se verificado que produtores inescrupulosos adicionam inibidores da PDE-5 aos SABP.

Desde 2010, a FDA emitiu 229 notificações públicas sobre produtos de desempenho sexual (correspondente a mais de 55% das notificações públicas emitidas nesse mesmo período sobre suplementos alimentares) devido à deteção de inibidores da PDE-5 e seus análogos (sendo principalmente detetada a presença de sildenafil, mas também tadalafil e análogos como sulfoildenafilil, aminotadalafil, hidroxítiohomosildenafilil, sulfosildenafilil; dimetilsildenafilil, sulfohidroxihomosildenafilil, dimetilacetildenafilil, noraacetildenafilil, desmetil carbodenafil, sulfosildenafilil and propoxifenildenafilil). No mesmo período, 81 notificações foram emitidas pelo RASSF quanto à presença de inibidores da PDE-5 e análogos em suplementos dietéticos, suplementos alimentares e alimentos fortificados.

A adulteração de SABP para o desempenho sexual impõem um elevado risco à saúde do consumidor, já que estes compram e consomem produtos que podem causar efeitos adversos na sua saúde, especialmente em pessoas com doenças cardiovasculares

medicadas com nitratos e  $\alpha$ -bloqueadores (Champagne e Emmel, 2011; Venhuis e de Kaste, 2012). Não sendo aconselhada a toma de inibidores da PDE-5 por parte dessas pessoas, estas podem recorrer a outras alternativas de tratamento, tais como produtos publicitados como “naturais” e que inadvertidamente podem colocar as suas vidas em risco devido à interação de medicamentos causada pela adulteração de SABP. Além disso, de acordo com Venhuis et al. (2012), os SABP são frequentemente adulterados com análogos de inibidores da PDE-5. Estes análogos são geralmente sintetizados com base nas moléculas de inibidores da PDE-5, apresentando pequenas alterações estruturais, sendo que alguns destes análogos correspondem a substâncias descritas nas patentes de companhias farmacêuticas (Venhuis et al., 2012). Estes análogos não aprovados, levantam preocupações de segurança adicionais no que diz respeito à sua farmacocinética e farmacodinâmica, sendo que o seu perfil de segurança é normalmente desconhecido.

Por outro lado, do ponto de vista dos produtores que realizam as adulterações de SABP, o uso de análogos novos e exóticos reduz substancialmente a probabilidade de serem detetados em inspeções de rotina pelas autoridades que aplicam metodologias protocolares (Patel et al., 2014).

Dentro dos inúmeros métodos utilizados para a deteção de adulterantes em SABP, a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) é um dos métodos mais referidos para a separação de matrizes complexas, como a dos SABP adulterados com inibidores da PDE-5. Podendo esta metodologia ser acoplada com diferentes tipos de detetores (tais como UV-VIS, fluorescência, espectrometria de massa, etc.) (Patel et al., 2014).

### **1.5 Metodologias de deteção de suplementos alimentares à base de plantas adulterados com inibidores de fosfodiesterase tipo 5**

De modo a controlar a qualidade dos SABP, é fundamental a aplicação de técnicas analíticas para a deteção de adulterações. Vários fatores devem ser considerados na escolha do método para a deteção de adulterantes em SABP, tais como o tipo de formulação, tipo de adulterante expectável, sensibilidade pretendida, e a complexidade da matriz dos SABP.

Devido à complexidade da matriz da maioria dos SABP, por estes frequentemente apresentarem misturas de plantas medicinais na sua composição, a utilização de métodos cromatográficos que permitam realizar a separação dos analitos de interesse, previamente à sua deteção/identificação, é de elevada importância na análise deste tipo de produtos (Vaclavik et al., 2014b).

### 1.5.1 Métodos cromatográficos

**Cromatografia em camada fina (TLC)** é uma técnica há muito tempo usada para a caracterização de plantas com componentes farmacologicamente ativos, tanto nos extratos como em formulações botânicas, podendo também ser usada para a identificação preliminar de produtos botânicos adulterados com fármacos (Cai et al., 2010; Zou et al., 2008). A TLC é considerada como um método simples, de fácil manipulação, rápido e económico para o teste preliminar de adulterações em SABP contendo inibidores da PDE-5. No entanto, apresenta como desvantagens a necessidade de ter os padrões dos adulterantes a determinar, e sobretudo de ser um método que apresenta uma baixa sensibilidade (Ariburnu et al., 2012; Sanzini et al., 2011; Singh et al., 2009).

O uso da cromatografia em camada fina de alta eficiência (HPTLC) permite melhorar a sensibilidade do método comparativamente à TLC, pelo que é descrita como um possível método de rastreio da adulteração de produtos botânicos com inibidores da PDE-5 (Abourashed et al., 2005; Sanzini et al., 2011). Apesar da técnica HPTLC apresentar uma maior sensibilidade comparativamente à TLC, ambas requerem obrigatoriamente a utilização de padrões de referência para uma identificação positiva, não sendo por isso considerados métodos apropriados para o rastreio de adulterações com novos fármacos ou análogos de inibidores da PDE-5.

**Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)** é uma técnica bem estabelecida e difundida para análise quotidiana de diferentes compostos por todo o mundo. No caso de matrizes complexas, como as que encontramos em SABP, um passo cromatográfico antes da deteção/identificação do adulterante, permite uma melhor separação de compostos fitoquímicos presentes na matriz principal, os quais podem interferir ou suprimir o sinal do composto de interesse (Vaclavik et al., 2014a). A utilização de HPLC e mais recentemente de cromatografia líquida de ultra eficiência (UPLC), têm sido frequentemente reportadas na separação de adulterantes em SABP utilizados para aumento do desempenho sexual (Gratz et al., 2004; Ng et al., 2010; Savaliya et al., 2010; Zhang et al., 2010; Ren et al., 2012; Campbell et al., 2013; Poplawska et al., 2013; Jankovics et al., 2013; Lee et al., 2013a; Lee et al., 2013b; Reeuwijk et al., 2013; Strano-Rossi et al., 2013; Zhang et al., 2014; Schramek et al., 2014; Lebel et al., 2014; Fejos et al., 2014; Damiano et al., 2014). O uso da técnica de HPLC acoplada a um detetor de díodos (DAD), tem sido referida como um método preliminar de identificação e rastreio de

adulterantes em SABP contendo inibidores da PDE-5 (Singh et al., 2009; Ortiz e Linden, 2010; Savaliya et al., 2010; Sacré et al., 2011; Venhuis et al., 2011a, 2011b; Wollein et al., 2011; Jankovics et al., 2013; Fejos et al., 2014; Zhang et al., 2014). A técnica de HPLC-UV também pode ser usada na cromatografia semi-preparativa para isolamento de compostos desconhecidos (Lee et al., 2011). No método de HPLC-DAD, o rastreio e deteção de compostos é baseado na informação fornecida pelo espectro UV e tempo de retenção, a qual é comparada com os valores obtidos para os padrões puros de referência. Apesar de ser um método simples e económico comparativamente a outras técnicas, o HPLC-DAD tem um limite de aplicabilidade, em específico quando se trata de novos inibidores da PDE-5 e os seus análogos para a maioria dos quais não existem padrões de referência. No entanto, em alguns casos, esta técnica pode auxiliar os investigadores na deteção preliminar de inibidores da PDE-5, principalmente no caso de análogos que apresentem uma estrutura semelhante à dos compostos originais, podendo neste caso variar o tempo de retenção, apresentando contudo um espectro UV idêntico (Hou et al., 2006).

Na última década, a cromatografia líquida (LC) acoplada a um detetor de espectrometria de massa (MS), tem-se tornado a técnica principal para a análise de inibidores da PDE-5 em SABP, uma vez que combina o método de separação por LC com a sensibilidade e seletividade da deteção por MS, permitindo uma identificação ao nível molecular (Patterson et al., 2012; Vaclavik et al., 2014). Quando os padrões de referência estão disponíveis, o uso da cromatografia líquida precedendo a análise por MS pode contribuir para a identificação de compostos baseados no seu tempo de retenção.

Atualmente, a utilização de LC-MS é considerada por muitos investigadores como sendo o método de eleição para determinar inibidores da PDE-5 em SABP (Gratz et al., 2004; Chen et al., 2009; Ng et al., 2010; Savaliya et al., 2010; Zhang et al., 2010; Toomey et al., 2012; Ren et al., 2012; Vaysse et al., 2012; Jankovics et al., 2013; Lee et al., 2013a, 2013b; Reeuwijk et al., 2013, Schramek et al., 2014; Lebel et al., 2014; Damiano et al., 2014; Strano-Rossi et al., 2015).

**Cromatografia gasosa (GC).** Apesar de ser um método quantitativo, sensível, reproduzível, exato e bastante adequado para análise de misturas, sendo considerado de baixo custo comparativamente a outros métodos tais como LC-MS, um critério importante para o uso da metodologia de GC passa pela volatilidade e estabilidade térmica dos compostos em estudo. Por este motivo, a técnica de GC raramente é usada para a deteção de inibidores da PDE-5 em SABP pois estes são considerados termicamente instáveis e de difícil derivatização utilizando reações de silição (Patel et al., 2014). No

entanto, em casos pontuais, quando a técnica de LC-MS não consegue fornecer informação suficiente para a identificação dos compostos, a análise dos produtos de reação (ex. obtidos por hidrólise) através de GC-MS, é descrita como uma técnica complementar para a elucidação estrutural e identificação de novos fármacos, por exemplo novos inibidores da PDE-5 e seus análogos (Patel et al., 2014; Vaclavik et al., 2014).

### **1.6 Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)**

A cromatografia líquida de alta eficiência é uma técnica analítica de separação de componentes de uma matriz, na qual a separação depende da distribuição molecular dos componentes da matriz em duas fases, fase móvel, que neste tipo de cromatografia é um líquido, e a fase estacionária, que compreende uma coluna de separação de aço inox com um tipo de enchimento poroso.

Um sistema de HPLC consiste em 5 componentes principais: sistema de bombas, sistema de injeção da amostra, coluna de separação, detetor e um sistema que permite registar os dados do detetor, o qual normalmente é um computador. Todos estes sistemas, com exceção do computador são conectados por tubos de aço inox resistente a elevadas pressões.

O sistema de bombas injeta, a elevadas pressões, a fase móvel num determinado fluxo (mL/min), podendo ser programado para efetuar a injeção dos componentes da fase móvel a diferentes proporções, chamada de eluição em gradiente, ou a uma proporção constante, designando-se neste caso como eluição isocrática. O sistema de injeção (automático ou manual) injeta a amostra líquida que se pretende separar. A amostra entra em contacto com a fase móvel que força a amostra a seguir o fluxo do sistema até à coluna de separação (fase estacionária). A separação ocorre quando a amostra interage simultaneamente com a fase móvel e a fase estacionária, sendo esta separação devida aos diferentes tipos de enchimento que uma coluna cromatográfica pode conter. As diferentes interações que ocorrem na coluna cromatográfica podem ser classificadas como: partição, adsorção, exclusão ou troca iónica. A classificação da separação deve-se aos diferentes tipos de enchimento na coluna cromatográfica, pelo que a sua seleção para uma determinada análise, influencia significativamente o método de separação, podendo este ser afetado tanto na seletividade como na eficiência de separação dos analitos de interesse, constituindo assim um dos passos importantes no desenvolvimento de um método cromatográfico.

A interação dinâmica através de diferentes afinidades dos analitos de uma amostra, com a fase estacionária permite a separação. Quando um determinado analito tem menos afinidade com a fase estacionária e maior afinidade com a fase móvel, este elui mais rapidamente da coluna cromatográfica, ao contrário dos analitos que têm mais afinidade com a fase estacionária os quais apresentam um tempo de retenção superior até serem eluídos pela fase móvel (Harris, 2010).

À medida que o analito elui da coluna cromatográfica através do fluxo da fase móvel, este dirige-se ao detetor, que deve ser escolhido previamente de modo a ter uma sensibilidade pretendida para registar as diferentes variações de sinal das concentrações dos analitos que são separados pelo sistema. Os dados obtidos pelo detetor são enviados para um sistema de aquisição de dados, que através de um *software* processa a informação na forma de um cromatograma (intensidade de sinal /tempo (min)).

Como já foi referido o tipo de separação depende do tipo de enchimento da coluna cromatográfica que por sua vez define o modo de separação do método. Separação por partição é o tipo de separação mais frequentemente utilizada para deteção de inibidores da PED-5 em SABP.

A separação por partição pode ser dividida em 2 grupos: partição em fase normal (NP-HPLC) ou partição em fase reversa (RP-HPLC).

A divisão entre NP-HPLC e RP-HPLC está relacionada com a polaridade das fases de separação do sistema. Na NP-HPLC a fase estacionária possui elevada polaridade (normalmente o enchimento é composto de sílica) e a fase móvel é constituída por um líquido com um carácter não polar, neste caso os analitos polares ficam retidos mais tempo na coluna enquanto os analitos com menor polaridade têm mais afinidade pela fase móvel e são eluídos mais rapidamente da coluna cromatográfica. Na RP-HPLC, a fase móvel é composta por um líquido polar e a fase estacionária composta por um enchimento com um carácter não polar, geralmente utiliza-se sílica modificada quimicamente com cadeias de hidrocarbonetos, vulgarmente chamadas de colunas C<sub>8</sub> e C<sub>18</sub> classificadas consoante o número de hidrocarbonetos adicionados à estrutura base de sílica. Neste tipo de cromatografia os analitos polares têm mais afinidade com a fase estacionária ficando assim retidos mais tempo na coluna cromatográfica, enquanto os analitos com um carácter não polar, eluem com a fase móvel mais rapidamente, sendo os primeiros a chegar ao detetor (Harris, 2010).

## **1.7 Validação do método analítico**

Durante o desenvolvimento de um novo método de análise é necessário proceder à sua validação para avaliar a qualidade, consistência e fiabilidade dos resultados obtidos, bem como a sua eficiência. Um método analítico deve de ser validado, verificado ou revalidado sempre que for usado como método analítico de rotina; após transferência para outro laboratório; ou quando existam alterações substanciais nas condições ou parâmetros do método analítico (Huber, 2010). A validação de uma metodologia analítica passa pela verificação dos seguintes parâmetros: especificidade e seletividade; precisão (repetibilidade, precisão intermédia, reprodutibilidade); exatidão (ensaios de recuperação); linearidade; gama de trabalho; limite de deteção; limite de quantificação; robustez (ICH, 2005; Huber, 2010).

### **1.7.1 Especificidade e seletividade**

A especificidade e a seletividade são termos com definições muito semelhantes, que podem causar confusão. As suas definições e âmbito de aplicação diferem de acordo com os manuais das entidades que utilizamos para realizar a validação do método analítico.

A especificidade é definida pela Conferência Internacional de Harmonização (ICH) como “a capacidade de avaliar inequivocamente um determinado analito na presença de outros compostos que possam interferir com a sua determinação, tais como presença de impurezas, produtos de degradação, outros compostos da matriz, etc.”. Outras entidades tais como a União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC) preferem o uso do termo “seletividade” para a aplicação do mesmo significado, deixando a aplicação do termo “especificidade” para os procedimentos que produzem uma única resposta para um só analito de interesse.

A especificidade de um método cromatográfico é obtida através da otimização do sistema cromatográfico (e.g. escolha da coluna, tipo de detetor), e das condições cromatográficas (e.g. fase móvel, gradiente, temperatura da coluna, parâmetros do detetor). Os procedimentos de extração da amostra também podem ser otimizados de modo a aumentar a seletividade para os compostos em análise (Huber, 2010).

### 1.7.2 Precisão

A ICH define precisão como sendo “o grau de concordância (grau de dispersão) entre uma série de resultados obtidos a partir de uma série de ensaios de uma mesma amostra homogénea de acordo com as condições prescritas” (ICH, 2005). É importante realçar que para um estudo mais realista sobre a precisão, deve ser dada a preferência ao uso de amostras, minimizando assim o efeito de matriz. A precisão normalmente é expressa em termos de variância, desvio padrão e coeficiente de variação (CV) dos ensaios realizados. A precisão pode ser enquadrada em três níveis: repetibilidade, precisão intermédia e reprodutibilidade.

#### Repetibilidade

A repetibilidade é expressa pela precisão de um método efetuado sobre as mesmas condições de funcionamento, no qual são avaliados os resultados de um número de réplicas de uma determinada amostra homogénea durante um curto intervalo de tempo. A repetibilidade também pode ser designada de precisão intra-ensaio (ICH, 2005). Para avaliar a repetibilidade as seguintes condições de funcionamento devem ser constantes:

- Mesmo laboratório;
- Mesmo operador;
- Mesmo equipamento;
- Mesmo tipo de reagentes;
- Curtos intervalos de tempo.

O Coeficiente de Variação de Repetibilidade ( $CV_r$ ) é expresso em percentagem e para cada nível de concentração, é dado pela seguinte expressão:

$$CV_r(\%) = \frac{\sigma}{\bar{x}} \times 100$$

Sendo,  $\sigma$  o desvio padrão das diferentes repetições efetuadas e  $\bar{x}$  a média das determinações efetuadas (Ribani et al., 2004).

### Precisão intermédia

A precisão intermédia é expressa pela variabilidade obtida por um determinado método analítico num mesmo laboratório, (também designado de ensaio intra-laboratorial), mas que ao contrário da repetibilidade, são avaliadas uma ou mais alterações das seguintes variáveis do método (ICH, 2005):

- Diferentes operadores;
- Diferentes equipamentos;
- Com/sem verificação da calibração;
- Longos intervalos de tempo (e.g. dias ou semanas diferentes).

O coeficiente de variação da precisão intermédia pode ser dada pela seguinte expressão:

$$CV_{int}(\%) = \frac{\sigma}{\bar{x}} \times 100$$

Sendo  $CV_{int}$  o coeficiente de variação da precisão intermédia das determinações efetuadas,  $\bar{x}$  a média das determinações efetuadas no ensaio intra-laboratorial e  $\sigma$  o desvio padrão das diferentes repetições efetuadas no ensaio intra-laboratorial (Ribani et al., 2004).

### Reprodutibilidade

A reprodutibilidade expressa a precisão de um método analítico efetuado em condições de ensaio diferentes, utilizando o mesmo método de ensaio, sobre uma mesma amostra, fazendo variar as condições de medição, tais como:

- Diferentes laboratórios;
- Diferentes operadores;
- Diferentes equipamentos;
- Com/sem longos intervalos de tempo.

Sempre que possível, deve ser avaliada a reprodutibilidade do método de análise usado, por diferentes laboratórios (Huber, 2010).

### 1.7.3 Exatidão

A ICH define a exatidão de um procedimento analítico como “a aproximação da concordância entre o valor obtido através do novo método e um valor de referência, aceite como verdadeiro” (ICH, 2005).

O valor utilizado como referência pode ser obtido através de vários meios:

1. Através de um método analítico já validado, assumindo os resultados obtidos pela análise da mesma substância, nas mesmas concentrações, como valor de referência.
2. Através da análise de um material de referência certificado, similar às amostras que se pretendem analisar, utilizando o método que se pretende validar.  
Sempre que o material de referência certificado não se encontre disponível para a amostra pretendida, devemos avaliar o valor de referência, através da análise de uma matriz semelhante à nossa amostra, fortificada com o analito de interesse numa concentração conhecida.

Este último procedimento também é semelhante ao usado para verificar o fator de recuperação de um determinado analito (Huber, 2010).

### 1.7.4 Linearidade

A linearidade de um procedimento analítico é definida pela ICH como “a capacidade (dentro de uma gama de trabalho) de obter resultados (sinal analítico) que tenham uma relação diretamente proporcional à concentração do analito na amostra em estudo” (ICH, 2005).

Normalmente é demonstrada a linearidade de uma dada gama de trabalho, recorrendo à relação entre o sinal detetado em função da concentração do analito, designada por equação da reta ou curva de calibração.

A equação da reta é expressa pela equação:

$$Y = mx + b$$

Sendo,

- $Y$  - Valor do sinal detetado;
- $m$  - Declive da reta;

- $x$  - Valor da concentração da amostra;
- $b$  - Valor de interceção da reta com a ordenada na origem.

A determinação matemática da linearidade pode ser determinada pela estimativa dos coeficientes ( $x$  e  $b$ ) obtidos pela regressão linear efetuada na equação da reta. A partir destes coeficientes podemos determinar matematicamente o coeficiente de correlação ( $R^2$ ), que indica a estimativa da qualidade linear obtida pela curva de calibração. Quanto mais próximo de 1 for o valor do  $R^2$ , menor será a dispersão dos pontos experimentais presente na curva de calibração e menor será a incerteza associada aos coeficientes de regressão (Huber, 2010; Ribani et al., 2004). É aceitável que um método apresente uma linearidade com um coeficiente de correlação na ordem dos 0,99 (Ribani et al., 2004).

A determinação da linearidade deve ser realizada recorrendo a 5 concentrações diferentes do padrão do analito em estudo, replicadas pelo menos 5 a 6 vezes (Huber, 2010).

#### 1.7.5 Gama de trabalho

Define-se gama de trabalho como o intervalo existente entre a concentração máxima e mínima de um dado analito de uma amostra, para o qual se demonstra existir num determinado procedimento analítico, um nível aceitável de linearidade, precisão e exatidão.

Normalmente a gama de trabalho está dependente do tipo de metodologia analítica aplicada, sendo muitas das vezes escolhida através do estudo gráfico da linearidade. Para a validação de um procedimento analítico a ICH exige que a gama de trabalho ronde os 80-120% da percentagem de concentração em teste (ICH, 2005).

#### 1.7.6 Limite de deteção

A ICH define limite de deteção (LOD) como “a menor concentração do analito em estudo, que pode ser detetada e distinguida do nível de ruído do sistema, mas que não é necessariamente quantificada” (ICH, 2005). O LOD pode ser determinado através dos seguintes métodos:

1. **Baseado na avaliação visual.** Este método consiste na determinação do LOD através da análise de amostras com concentrações conhecidas do

analito em estudo, estabelecendo um nível mínimo para o qual o analito é detetado através da observação dada pelo sistema (e.g. cromatograma).

2. **Baseado na relação entre o sinal-ruído.** O LOD é determinado pelo rácio entre o sinal e o ruído, isto é, medindo os sinais obtidos através de amostras contendo baixas concentrações de analito, e analisando-as comparativamente ao sinal obtido por amostras em branco (amostras que não contêm o analito de interesse), estabelecendo posteriormente uma concentração mínima com a qual o analito pode ser determinado. A razão entre o sinal e o ruído deve estar compreendida num rácio de 3:1 ou 2:1.
3. **Baseado na relação entre o desvio padrão da resposta e a curva de calibração.** Este método expressa o LOD através da seguinte expressão:

$$LOD = \frac{3,3 \times \sigma}{m}$$

Sendo,  $m$  – declive da curva de calibração referente ao coeficiente de regressão do analito de interesse e  $\sigma$  a estimativa do desvio padrão do sinal detetado, que pode ser determinado através da:

- Amostra em branco, calculando o desvio padrão do sinal dado relativamente a um número de amostras em branco;
- Do estudo da curva de calibração específica do analito, constituída por amostras com uma gama dentro do LOD. Que posteriormente são utilizados os valores do desvio padrão relativo referentes à regressão linear ou ao desvio padrão da interceção com o eixo dos Y.

No caso da determinação do LOD através dos métodos baseados na avaliação visual ou relação entre sinal e ruído é aceitável a apresentação de cromatogramas, para comprovar a veracidade dos factos (ICH, 2005)

### 1.7.7 Limite de quantificação

A ICH define limite de quantificação (LOQ) como “a concentração mais baixa de determinado analito que pode ser quantificada através do método analítico, com um nível

de precisão e exatidão aceitável“ (ICH, 2005). O LOQ pode ser determinado através dos seguintes métodos:

1. **Baseado na avaliação visual.** Consiste na determinação do LOQ através da análise de amostras com concentrações conhecidas do analito em estudo, estabelecendo um nível mínimo para o qual o analito é quantificado através da observação dada pelo sistema (e.g. cromatograma).
2. **Baseado na relação entre o sinal-ruído.** O LOQ é determinado pelo rácio entre o sinal e o ruído, isto é, medindo os sinais obtidos através de amostras contendo baixas concentrações de analito, e analisando-as comparativamente ao sinal obtido por amostras em branco, estabelece-se uma concentração mínima para a qual o analito pode ser quantificado. A razão típica entre o sinal e o ruído está depreendida num rácio de 10:1.
3. **Baseado na relação entre o desvio padrão da resposta e a curva de calibração.** Este método expressa o LOQ através da expressão:

$$LOQ = \frac{10 \times \sigma}{m}$$

Sendo,  $m$  – declive da curva de calibração referente ao coeficiente de regressão do analito de interesse e  $\sigma$  a estimativa do desvio padrão do sinal detetado baseado:

- Na amostra em branco, calculando o desvio padrão do sinal dado relativamente a um número de amostras em branco;
- No estudo numa curva de calibração específica, constituída por amostras com uma gama dentro do LOQ. Que posteriormente são utilizadas os valores do desvio padrão relativo referente à regressão linear ou ao desvio padrão da interceção com o eixo dos Y.

### 1.7.8 Sensibilidade

A sensibilidade de um método é muitas vezes confundida com o limite de deteção, sendo que a ICH define sensibilidade como “a capacidade do método analítico para diferenciar pequenas alterações na concentração do analito em estudo” (ICH, 2015). A sensibilidade é normalmente representada pelo declive, correspondente ao coeficiente de regressão da curva de calibração, do analito em estudo.

### 1.7.9 Recuperação

A recuperação é definida como a relação da quantidade de analito de interesse, que é extraída e passivelmente de ser quantificada em função da quantidade de analito de interesse presente ou adicionado na amostra.

Através da realização de testes de recuperação é possível verificar se a concentração do analito de interesse presente na amostra é afetada pelo procedimento de extração utilizado.

O teste de recuperação deve ser realizado recorrendo a 3 concentrações conhecidas do analito em estudo, distribuídas equitativamente entre o limite de quantificação e a concentração mais elevada da gama de trabalho utilizada para o dado analito. A ICH recomenda que a recuperação de um dado analito deve ser avaliada usando um mínimo de 9 determinações, sobre um nível mínimo correspondente a 3 concentrações definidas dentro da gama de trabalho do analito em estudo (e.g. 3 concentrações replicadas 3 vezes). Através da quantificação do analito na amostra fortificada, e sabendo a quantidade de analito adicionado verifica-se os níveis recuperação ou perda provocados pelo procedimento extrativo através da seguinte expressão:

$$\text{Recuperação}(\%) = \frac{\text{Concentração}_{\text{Fortificada}} - \text{Concentração}_{\text{Matrix}}}{\text{Concentração}_{\text{Adicionada}}} * 100$$

Sendo:  $\text{Concentração}_{\text{Fortificada}}$ , corresponde à concentração medida na amostra fortificada;  $\text{Concentração}_{\text{Matrix}}$ , concentração medida na amostra não fortificada;  $\text{Concentração}_{\text{Adicionada}}$ , concentração de analito adicionada.

## 1.8 Objetivos do trabalho

Pelo exposto, e dado que a presença de adulterantes sintéticos em SABP é um risco de saúde pública que tem causado preocupações crescentes dado o aumento do número de casos descritos na bibliografia, o presente trabalho visou o desenvolvimento de uma técnica analítica que permita a análise precisa, rápida, eficiente e economicamente viável, para o rastreio de inibidores da PDE-5 adicionados aos SABP.

Refira-se que os inibidores da PDE-5 são utilizados como medicamento para o tratamento da disfunção erétil, pelo que a sua presença em SABP é considerada como adulteração, sendo assim ilegal segundo a Diretiva 2002/46/EC da União Europeia.

Assim, este trabalho teve como objetivos:

- A otimização e validação de um método de HPLC-DAD-FLD, para a análise de inibidores da PDE-5 adicionados ilegalmente aos SABP;
- Aplicação da metodologia desenvolvida a amostras comercializadas em Portugal. Em particular, proceder à deteção e quantificação de possíveis inibidores da PDE-5 presentes em 12 SABP que alegam a melhoria do desempenho sexual, disponíveis no mercado português.

## **2. Materiais e Métodos**

## 2.1 Reagentes e padrões

Para este estudo foram utilizados cinco padrões de inibidores da PDE-5 (Citrato de Sildenafil (SIL); Hidroclorato de Vardenafil (VAR); Tadalafil (TAD); Acetildenafil (ACE); Tiosildenafil (THS), sendo que dois destes correspondem a análogos do Sildenafil (Acetildenafil e Tiosildenafil). Foi também adquirido o padrão de Hidroclorato de Iohimbina (YOH) (substância ativa encontrada na planta tradicionalmente conhecida por pau-de-cabinda), devido a alegações sobre a semelhança do efeito farmacológico desta com os inibidores da PDE-5. As características e origem dos padrões utilizados encontram-se descritas na Tabela 1.

**Tabela 1** – Características dos padrões utilizados neste trabalho

| Nome  | Fórmula Molecular  | Número CAS <sup>a</sup> | Grau de Pureza (%) | Fornecedor   |
|---|--|-------------------------|--------------------|--|
| <b>Citrato de Sildenafil (CRS)<sup>b</sup></b>      | C <sub>28</sub> H <sub>38</sub> N <sub>6</sub> O <sub>11</sub> S             | 171599-83-0             | ≥98,8%             | European Directorate for the Quality of Medicines and Healthcare, France |
| <b>Hidroclorato de Vardenafil (CRS)<sup>b</sup></b> | C <sub>23</sub> H <sub>33</sub> ClN <sub>6</sub> O <sub>4</sub> S            | 330808-88-3             | ≥90,5%             | European Directorate for the quality of medicines e Healthcare, France   |
| <b>Tadalafil (CRS)<sup>b</sup></b>                  | C <sub>22</sub> H <sub>19</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub>                | 171596-29-5             | ≥99,9%             | European Directorate for the quality of medicines e Healthcare, France   |
| <b>Hidroclorato de Iohimbina</b>                    | C <sub>21</sub> H <sub>27</sub> ClN <sub>2</sub> O <sub>3</sub>              | 65-19-0                 | ≥98%               | Sigma-Aldrich, USA   |
| <b>Acetildenafil</b>                                | C <sub>25</sub> H <sub>34</sub> N <sub>6</sub> O <sub>3</sub>                | 831217-01-7             | ≥98%               | Cayman Chemical, USA   |
| <b>Tiosildenafil</b>                                | C <sub>22</sub> H <sub>30</sub> N <sub>6</sub> O <sub>3</sub> S <sub>2</sub> | 479073-79-5             | ≥98%               | Cayman Chemical, USA   |

<sup>a</sup>CRS - Substância Química de Referência

<sup>b</sup>Número CAS- *Chemical abstracts service*

Os reagentes utilizados para este estudo foram: metanol (chromasolv®, HPLC grade ≥ 99.9%, Sigma-Aldrich, EUA), acetonitrilo (chromasolv®, HPLC grade ≥ 99.9%, Sigma-Aldrich, EUA) e acetato de amónio (ACS-Reag., ≥ 98%, Carlo Erba, França). A água ultrapura usada proveio de um sistema de purificação de água Seralpur PRO 90 CN.

## 2.2 Amostras

No mercado português os SABP para a melhoria do desempenho sexual, são comercializados essencialmente em supermercados, ervanárias, lojas de produtos naturais, farmácias, na internet e através das televidas.

As amostras utilizadas neste estudo foram gentilmente cedidas pela Autoridade de Segurança Alimentar e Económica (ASAE), devidamente seladas e identificadas.

Por razões legais os nomes das amostras, independentemente do resultado, não serão divulgados, procedendo-se assim à codificação do nome das amostras (SA1-SA12).

Na Tabela 2 encontram-se descritas as características dos 12 SABP que foram analisados durante este trabalho.

## 2.3 Preparação de soluções

### 2.3.1 Solução padrão individual

Foram preparadas 6 soluções padrão individuais correspondentes aos 6 padrões de inibidores da PDE-5 adquiridos, com uma concentração de 2mg/mL. As soluções foram feitas pesando 10mg de cada padrão de inibidores da PDE-5 numa balança analítica (AG204, Mettler Toledo), onde individualmente foram transferidos para vials de 10mL âmbar, dissolvendo-se em seguida em 5 mL de uma solução de acetonitrilo (ACN)/ metanol (MeOH) na proporção de 50:50 v/v, obtendo-se assim uma concentração de 2mg/mL. Todas as 6 soluções padrão individual foram armazenadas no congelador a uma temperatura de -20°C até à sua utilização.

### 2.3.2 Solução padrão de trabalho

Para a preparação da solução padrão de trabalho, retirou-se 200µL de cada solução padrão individual para um único vial âmbar de 10 mL, diluindo posteriormente com um volume de 800µL de ACN/MeOH (50:50 v/v), preparando assim uma solução com a mistura de todos os padrões de inibidores da PDE-5 (SIL; VAR; TAD; ACE; THS; YOH) com uma concentração de 200µg/mL. A solução padrão de trabalho foi também armazenada no congelador a uma temperatura de -20°C até à sua utilização. A partir desta solução foram preparadas as restantes diluições sucessivas em ACN/MeOH (50:50 v/v), correspondentes à gama de concentrações (5; 10; 25; 50; 100; 150; 200 µg/mL)

utilizadas para a verificação dos parâmetros de linearidade do método analítico em estudo.

### 2.3.3 Preparação da fase móvel usada na técnica analítica de HPLC-DAD-FLD

A fase móvel utilizada no método de HPLC-DAD-FLD tem como base dois eluentes (A e B), sendo o eluente A constituído por uma solução de acetato de amónio em água ultra pura com uma concentração de 50mM a pH 7, e o eluente B constituído por uma solução de ACN/MeOH na proporção de 50:50 (v/v).

Todos os eluentes foram desgaseificados num sistema de vácuo com agitação contínua durante 15 minutos antes de serem utilizados no sistema de HPLC.

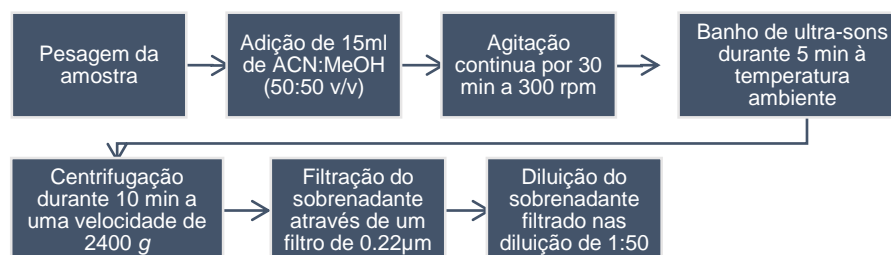
### 2.4 Extração das amostras

Procedeu-se à extração das amostras pesando o conteúdo de uma cápsula; um comprimido ou uma tira sublingual, numa balança analítica (AG204, Mettler Toledo), para um tubo de falcon, sendo adicionado posteriormente 15 mL solvente, composto por uma mistura de ACN:MeOH (50:50 v/v). As amostras foram agitadas num agitador automático (Edmund Buhler GmbH) durante 30 minutos a cerca de 300 rotações por minuto (rpm) à temperatura ambiente.

Após agitação, as amostras foram submetidas a uma extração por ultrassons (Fungilab, Espanha) durante 5 minutos à temperatura ambiente. Seguiu-se uma fase de limpeza da amostra através de centrifugação (Heraeus Megafuge 16, Thermo Scientific) durante 10 minutos a 2400 g. Para finalizar o procedimento de extração, o sobrenadante foi filtrado através de um filtro de seringa de 0,22 µm (FilterBio®) e posteriormente diluído em ACN/MeOH (50:50 v/v) na concentração de 1:50 antes de ser injetado no sistema de HPLC.

Todas as amostras foram submetidas a extração em triplicado e cada extrato obtido analisado individualmente.

A Figura 1 apresenta o esquema do procedimento de extração realizado nas amostras.



**Figura 1** – Esquema do procedimento de extração efetuado nas amostras de SABP

**Tabela 2 - Características dos SABP em estudo**

| <b>Código da Amostra</b> | <b>Tipo de Formulação</b> | <b>Quantidade por embalagem</b> | <b>Ingredientes descritos no rótulo</b>  | <b>Validade</b> |
|--------------------------|---------------------------|---------------------------------|--|-----------------|
| <b>SA1</b>               | Cápsula                   | 12                              | Extratos de: Bombyx Mori L; Wild Yam; Ginseng da Sibéria; Salgueiro Branco; Jujuba; Pimenta Caiena   | 04/2017         |
| <b>SA2</b>               | Cápsula                   | 10                              | Extratos de Raiz do Ártico (Rhodiola Rosea); Feno-grego (Trigonella foenum-graecum); Ginseng Siberiano (Eleutherococcus Senticosus); Noz moscada (Myrisca Frangrans); Açafrão (Crocus Sativus); Erva-leiteira (Polygala Comosa); Pinheiro (Pinus Estris); Alcaçuz (Glycyrrhiza Glabra); Urtiga comum (Urtica Dioica); Excipientes: gelatina, glicerol, corantes E133 e E171  | 06/2016         |
| <b>SA3</b>               | Cápsula                   | 4                               | Gelatina: Turnera difusa, Anti-Aglomerante: Maltodextrina de Milho, L-Arginina, Anti-Aglomerante: Fosfato tricálcio, Pausinystalia macroceras, Yohimbe, Tribulus terrestris; Ginkgo biloba, L-Lisina; Estabilizador: Amido de Trigo, Óxido de Zinco, Vitamina B <sub>3</sub> , Extrato seco concentrado de Schisandra chinensis; Anti-Aglomerante: Estereato de Magnésio, Silicato de Magnésio, Vitamina B <sub>6</sub>          | 03/2017         |
| <b>SA4</b>               | Cápsula                   | 3                               | Extratos de: Ginseng da Sibéria; Salgueiro Branco; Jujuba; Pimenta Caiena; Urtiga; Semente de Abóbora; Avena Sativa. Celulose e Estearato de Magnésio.   | 09/2017         |
| <b>SA5</b>               | Cápsula                   | 8                               | Gelatina: Turnera difusa, Damiana; Anti-Aglomerante: Maltodextrina de Milho, L-arginina, Anti-Aglomerante: Fosfato tricálcio, Pausinystalia macróceras, Yohimbe, Tribulus terrestres, Tribulus, Ginkgo biloba, L-Lisina; Estabilizador: Amido de Trigo, Óxido de Zinco, Vitamina B <sub>3</sub> ; Extrato seco concentrado de Schisandra; Anti-Aglomerante: Estereato de Magnésio, Silicato de Magnésio, Vitamina B <sub>6</sub> | 09/2016         |

|             |                 |    |  |         |
|-------------|-----------------|----|--|---------|
| <b>SA6</b>  | Cápsula         | 10 | Gelificante: Celulose microcristalina; Anti aglomerante: Fosfato tricálcio; Mucuna pruriens - Extrato Seco, Epimedium pubescens - Extrato Seco, Damiana - Extrato Seco; Tribulus terrestres, Saw palmetto - Extrato Seco; Erythroxyllum catuaba; Gelificante: Crospovidona; Anti aglomerante: Estearato de Magnésio, Silicato de magnésio  | 10/2017 |
| <b>SA7</b>  | Cápsula         | 10 | Anti aglomerante: Fosfato tricálcio; Pausinystalia macróceras, Pau de cabinda; Extrato seco de Epimedium grandiflorum; Estabilizador: Amido de Trigo, Ferula assa-foetida, Ginkho biloba, Extrato seco de Tribullus terrestris; Agente corante; Gelificante: Croscarmelosa sódica, Turnera aphrodisiaca, Damiana, Crospovidona; Celulose microcristalina Anti Aglomerante: Estearato de Magnésio; Silicato de magnésio | 11/2017 |
| <b>SA8</b>  | Tira Sublingual | 6  | Extrato de Feno Grego; Ginseng vermelho; L-arginina; Constarch; Alignate de sódio; Malitol; Mentol; Celulose; Lecitins; Brithant blue; Aspartam.   | 03/2015 |
| <b>SA9</b>  | Cápsula         | 10 | Extratos de: Catuaba; Maca; Muira Puama; Panax Ginseng; Momordica Charantina; Ginkgo Biloba; Cayenne   | 01/2017 |
| <b>SA10</b> | Cápsula         | 2  | Extratos de: Euterpe Oleracea; Muira Puama; Turnera Diffusa; Mucuna Pruriens; Curculiginis Rhizoma; Saw Palmetto; Catuaba; Panax Ginseng   | 01/2017 |
| <b>SA11</b> | Cápsula         | 10 | Epimedium; Eurycoma longifolia; Erva-Pinheira-De-Rosa; Ginseng; Extrato raízes do selo-de-salomão; Cistanche deserticola; Extrato de falsa-canforeira  | 07/2015 |
| <b>SA12</b> | Comprimido      | 30 | Lepidiummeyerii, Maca, Ferulaasafoetida, Fécula; Ginkgobiloba; Gelificante: Celulose microcristalina, Proantocianidinas; Anti-aglomerante: Fosfato tricálcio; Estabilizador: Amido de Trigo; Panax ginseng, Ginseng Coreano Capparisspinosa, Alcaparra; Tribullusterrestris, Abrolho; Gelificante: Croscarmelose sódica; Anti-Aglomerante: Estearato de Magnésio, Silicato de Magnésio; Ácido Fólico                   | 12/2016 |

## 2.5 Condições de fluorescência dos inibidores da PDE-5

As características de fluorescência dos diferentes inibidores da PDE-5 usados como padrões neste trabalho, foram obtidas através da medição dos comprimentos de onda para o qual existe um máximo de excitação ( $\lambda_{\text{exci}}$ ) e emissão ( $\lambda_{\text{emis}}$ ). Esta análise foi realizada num Espectrofluorímetro Jasco FP-6500 (Easton,MD,EUA), onde os diferentes padrões de inibidores da PDE-5 foram analisados na forma de solução com a concentração de 1mg/mL. A Tabela 3 apresenta os comprimentos de onda de excitação e emissão obtidos para os diferentes inibidores da PDE-5 analisados. Os dados foram depois usados para programar o detetor de fluorescência usado na técnica de HPLC-DAD-FLD.

**Tabela 3** – Características de fluorescência dos padrões em estudo

| Nome do composto | $\lambda_{\text{exci}}$ | $\lambda_{\text{emis}}$ |
|------------------|-------------------------|-------------------------|
| Sildenafil       | 358                     | 403                     |
| Vardenafil       | 347                     | 469                     |
| Tadalafil        | 307                     | 328                     |
| Iohimbina        | 299                     | 333                     |
| Acetildenafil    | nd                      | nd                      |
| Tiosildenafil    | nd                      | nd                      |

nd - não determinado

## 2.6 Análise cromatográfica

A análise cromatográfica foi feita utilizando um equipamento HPLC marca Jasco, composto pelos seguintes módulos:

- Bomba Pu-1580, Jasco, Japão;
- Unidade de mistura quaternária LG-1580-04, Jasco, Japão;
- Desgaseificador DG-2080-53, Jasco, Japão;
- Injetor automático de amostras AS-2057 Plus, Jasco, Japão;
- Forno de coluna Modelo 7981, Jonas chromatography, EUA;
- Detetor DAD MD-910, Jasco, Japão;

- Detetor fluorescência FP-2020Plus, Jasco, Japão;

A coluna cromatográfica utilizada foi uma YMC-Triart C18 (YMC Co., Ltd., Japão) de fase reversa, com 3 $\mu$ m tamanho de partícula, 250mm de comprimento e 4,6 mm de diâmetro. A recolha e tratamento de dados cromatográficos foram realizados recorrendo ao *software* Borwin versão 1.5 (JMBS, França). Os compostos presentes nas amostras foram identificados com base no tempo de retenção e espectro UV, por comparação com os obtidos para as substâncias padrão. Posteriormente à identificação, a quantificação dos analitos presentes nas amostras, foi realizada com base nas curvas de calibração determinadas para cada substância padrão.

### 2.6.1 Condições cromatográficas

As condições cromatográficas e o gradiente de eluição otimizado, usado para a análise das amostras encontram-se respetivamente descritos na Tabela 4 e 5.

**Tabela 4** – Condições cromatográficas aplicadas ao método de HPLC usado

| Parâmetros  | Condições   |
|---|---|
| Fase móvel  | Eluente A - Acetato de amónio /Água ultra pura<br>(Concentração 50mM e pH7)<br>Eluente B - Metanol/ Acetonitrilo (50:50 v/v)  |
| Fluxo   | 0,45 mL/min   |
| Temperatura do forno da coluna                                  | 30 $\pm$ 0.1 °C   |
| Volume de injeção   | 20 $\mu$ L  |
| Tempo de análise  | 35 min  |
| Deteção UV (Comprimento de Onda)                                | 290 nm  |
| Deteção FLD ( $\lambda_{exc}$ e $\lambda_{emis}$ ) <sup>a</sup> | 0 -11,8 min $\rightarrow$ $\lambda_{exc}$ 307; $\lambda_{emis}$ 403<br>11,8 – 12,6 min $\rightarrow$ $\lambda_{exc}$ 299; $\lambda_{emis}$ 333<br>12,6 – 16,5 min $\rightarrow$ $\lambda_{exc}$ 358; $\lambda_{emis}$ 403<br>16,5 – 18,00 min $\rightarrow$ $\lambda_{exc}$ 347; $\lambda_{emis}$ 469<br>18,00 -35,00 min $\rightarrow$ $\lambda_{exc}$ 358; $\lambda_{emis}$ 403 |
| Modo de separação   | Fase Reversa  |

<sup>a</sup> $\lambda_{exc}$  – Comprimento de onda referente ao máximo de absorção do composto;

<sup>a</sup> $\lambda_{emis}$  – comprimento de onda referente ao máximo de emissão do composto.

**Tabela 5** – Programa de gradiente usado para análise das amostras

| Tempo (min) | Eluente A (%) | Eluente B (%) |
|-------------|---------------|---------------|
| 0           | 30            | 70            |
| 15          | 20            | 80            |
| 25          | 2             | 98            |
| 27,5        | 2             | 98            |
| 30          | 30            | 70            |
| 35          | 30            | 70            |

### 2.7 Validação do método

Neste trabalho foram analisados os diversos parâmetros necessários para efetuar a validação *in-house* do método, como referido na secção 1.7 deste trabalho, nomeadamente; gama de trabalho; linearidade; precisão (repetibilidade, precisão intermédia); limite de deteção; limite de quantificação e exatidão (ensaios de recuperação).

## **3. Resultados e Discussão**

O trabalho experimental realizado teve como objetivo a otimização e validação de um método analítico de HPLC-DAD-FLD, para a deteção de SABP adulterados com inibidores da PDE-5, verificando assim a viabilidade analítica do método para a identificação e quantificação de SABP potencialmente adulterados, presentes no mercado português.

Como referido anteriormente, os SABP apresentam uma matriz complexa que dificulta a pesquisa de adulterantes presentes na sua composição. A aplicação de uma técnica de HPLC antes da deteção dos adulterantes, permite a separação dos componentes fitoquímicos existentes na matriz dos SABP, reduzindo as interferências ou supressões de sinal, relativamente aos compostos de interesse que se pretende detetar.

Ao longo do estudo, foram experimentadas diferentes condições cromatográficas para o sistema utilizado de forma a obter uma melhor resposta/separação dos compostos num curto espaço de tempo. Deste modo, para otimização do método analítico em estudo, recorreu-se à alteração/otimização do gradiente da mistura de eluentes da fase móvel, com o objetivo de criar uma melhor separação dos inibidores da PDE-5, com um tempo de retenção mais curto, minimizando assim o tempo da corrida e os gastos inerentes.

Após a pesquisa de eventuais métodos cromatográficos utilizando um sistema de deteção por fluorescência, observamos que não é comum a aplicação deste tipo de deteção em inibidores da PDE-5. Desta forma, realizou-se o estudo das características de fluorescência dos padrões de inibidores da PDE-5 utilizados no trabalho, visando a aplicação e otimização da deteção destes compostos através de um sistema HPLC-DAD-FLD.

### **3.1. Identificação e quantificação dos adulterantes nas amostras de SABP**

Utilizando as condições cromatográficas otimizadas, foram injetadas, individualmente, as soluções padrão correspondentes aos diferentes padrões de inibidores da PDE-5 (SIL, VAR, TAD, YOH, ACE e THS), tendo-se obtido os tempos de retenção relativos à deteção por DAD e FLD para os diferentes compostos (Tabela 6). Foram também obtidos, a partir do detetor de DAD, os espectros UV (Figuras 2- 7) correspondentes aos padrões de inibidores da PDE-5 utilizados.

A identificação dos adulterantes nas amostras de SABP foi realizada, analisando comparativamente os tempos de retenção dos picos dos cromatogramas obtidos a partir da solução padrão de trabalho, através da deteção por DAD e FLD, com os picos dos cromatogramas obtidos pelas amostras de SABP. Posteriormente, também foram

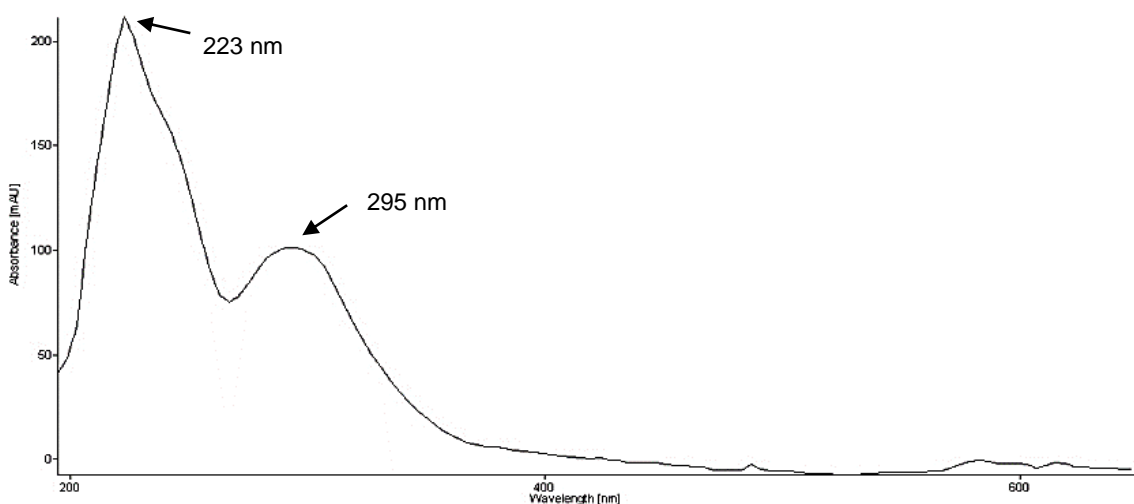
comparados os espectros UV obtidos pelos picos do cromatograma das amostras com os espectros UV correspondentes aos padrões.

Posteriormente à identificação, foi realizada a quantificação dos analitos presentes nas amostras, com base na regressão linear das curvas de calibração determinadas pela relação entre as áreas obtidas e as concentrações da solução padrão de trabalho, através dos diferentes tipos de deteção (DAD e FLD).

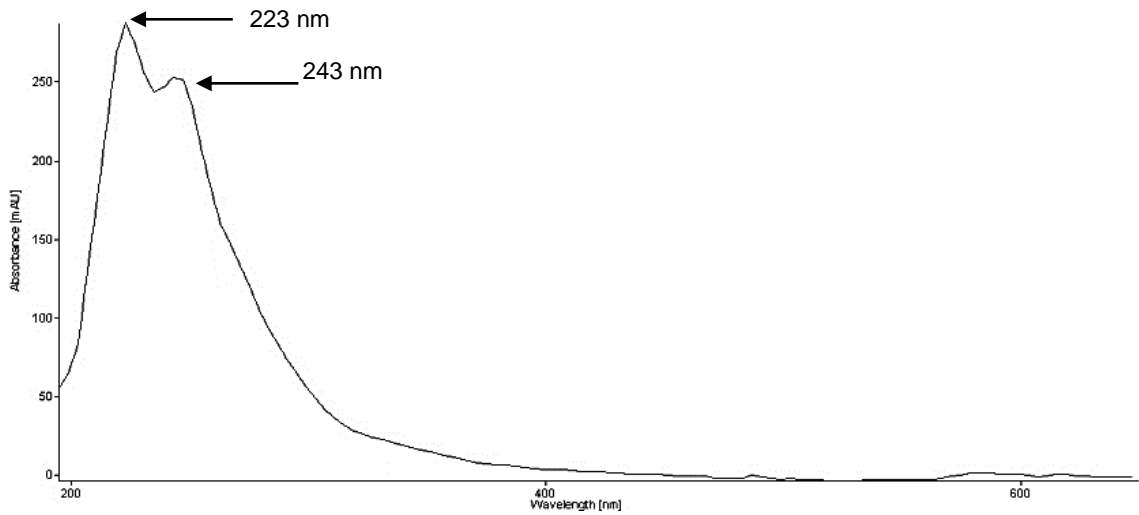
**Tabela 6** – Tempos de retenção dos padrões obtidos pelos sistemas de deteção DAD e FLD

| Padrões       | Tempo de retenção (min) |       |
|---------------|-------------------------|-------|
|               | DAD                     | FLD   |
| Tadalafil     | 10,95                   | 11,18 |
| Iohimbina     | 12,14                   | 12,29 |
| Acetildenafil | 12,81                   | nd    |
| Sildenafil    | 16,01                   | nd    |
| Vardenafil    | 17,06                   | 17,16 |
| Tiosildenafil | 27,95                   | nd    |

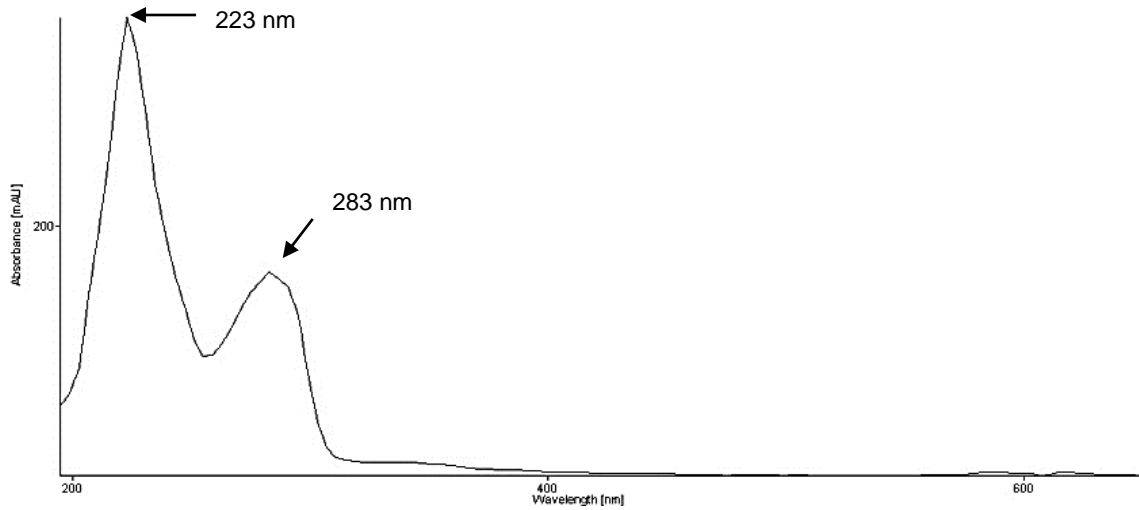
nd - não determinado



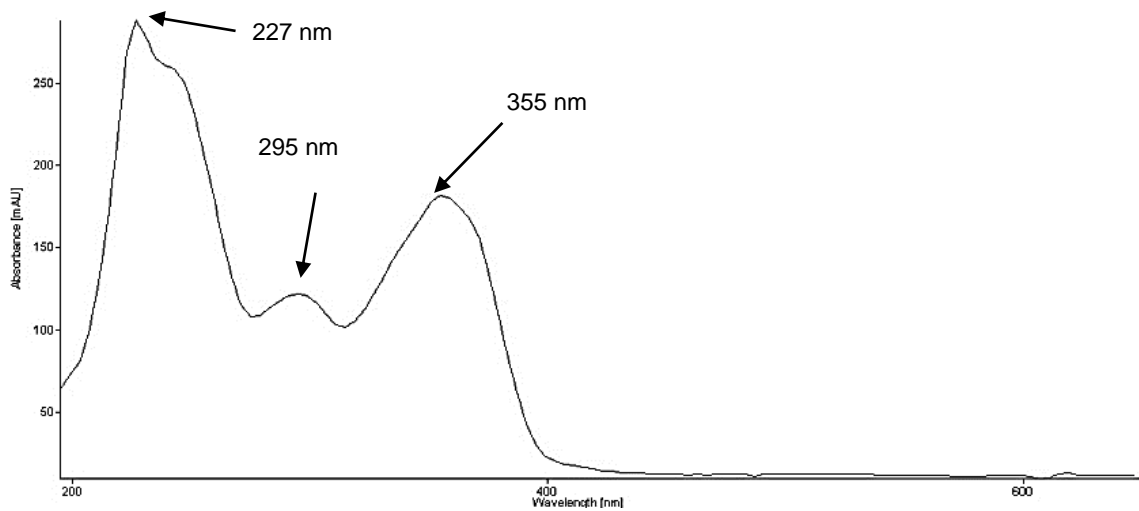
**Figura 2** - Espectro UV obtido pelo padrão de Sildenafil a 290 nm



**Figura 3** – Espectro de UV obtido pelo padrão de Vardenafil a 290nm



**Figura 4** - Espectro UV obtido pelo padrão de Tadalafil a 290nm



**Figura 5** - Espectro UV obtido pelo padrão de Tiosildenafil a 290nm

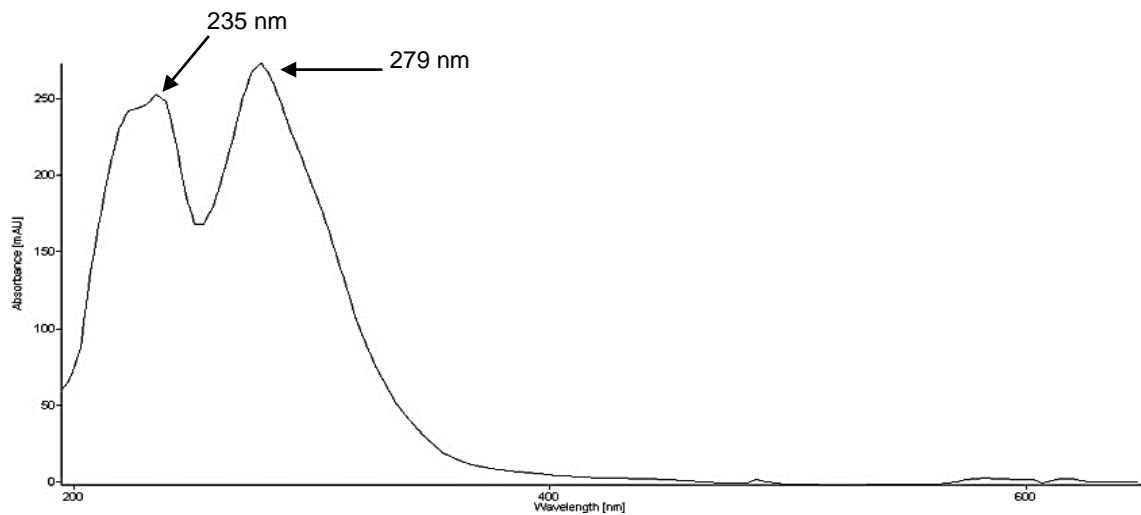


Figura 6 - Espectro UV obtido pelo padrão de Acetildenafil a 290nm

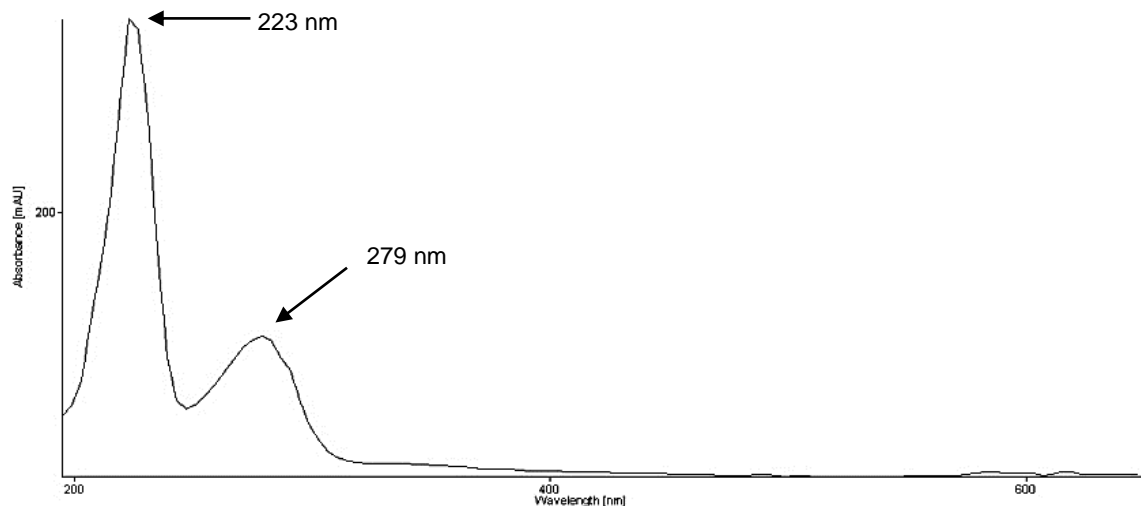


Figura 7 - Espectro UV obtido pelo padrão de Iohimbina a 290nm

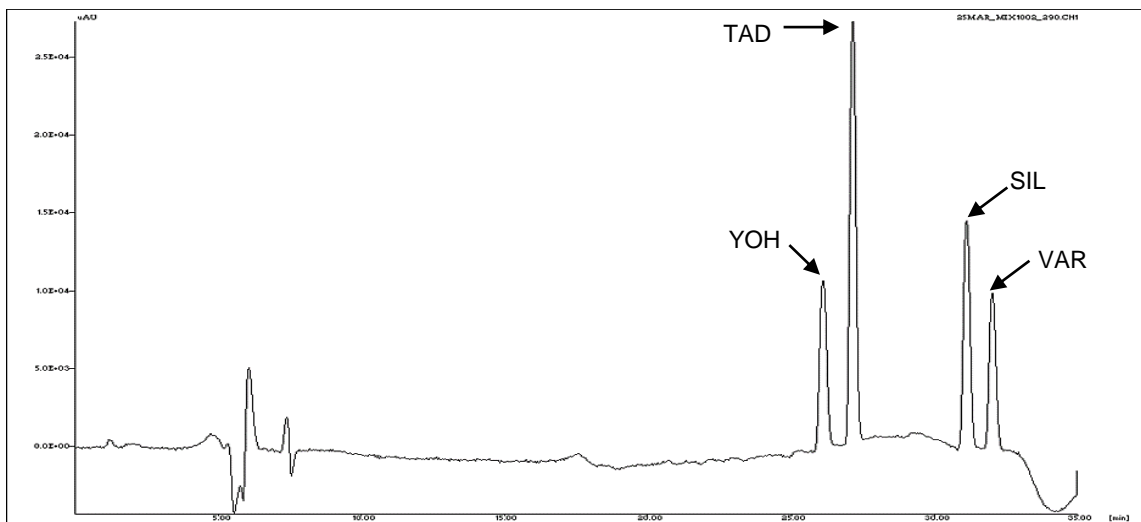
## 3.2 Otimização das condições analíticas

### 3.2.1 Otimização do gradiente dos eluentes

Inicialmente foram selecionados os eluentes com base no trabalho descrito na literatura (Fejos et al., 2014). Posteriormente fez-se a otimização do gradiente da fase móvel, visando a separação eficiente de todos os inibidores da PDE-5 em estudo, com base na coluna cromatográfica utilizada. Para isso preparou-se uma solução contendo a mistura dos padrões de SIL, VAR, TAD e YOH, numa concentração de 100µg/mL, que foi injetada no sistema de HPLC-DAD-FLD.

Os padrões Acetildenafil e Tiosildenafil não foram incluídos nesta injeção, por motivos de logística, pois ainda não tinham sido entregues no laboratório, tendo sido posteriormente incluídos.

A partir da análise do cromatograma (Figura 8), obtido com as condições do gradiente determinado inicialmente, concluiu-se que seria necessário realizar a alteração do gradiente dos eluentes da fase móvel, de modo a permitir a separação dos analitos em estudo dentro de um tempo de corrida aceitável, visando sempre a obtenção da melhor resolução dos picos cromatográficos.

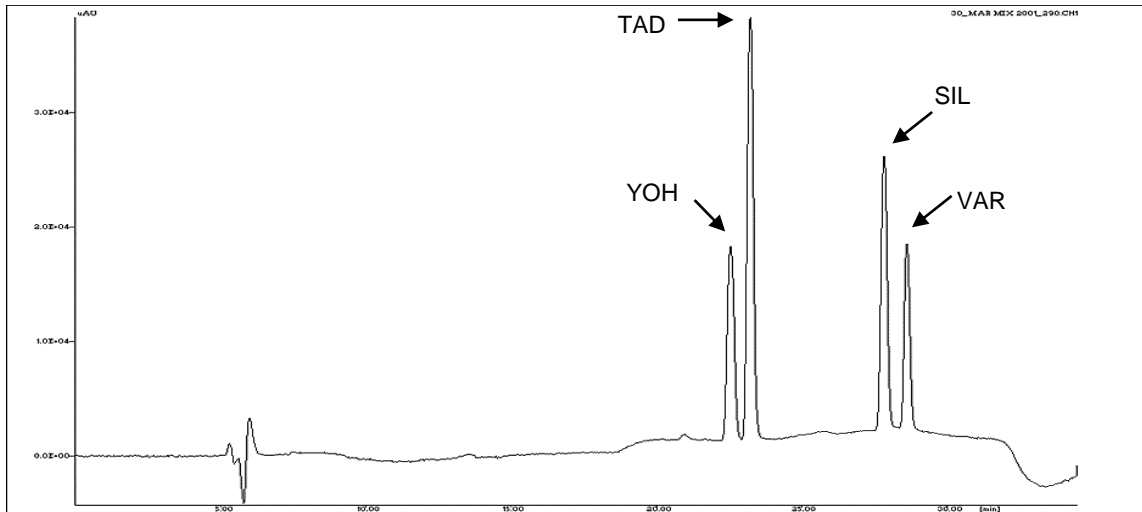


**Figura 8** – Cromatograma obtido pela aplicação do gradiente determinado inicialmente, para os padrões de SIL, VAR, TAD e YOH

Através dos diferentes tempos de retenção obtidos pelos compostos injetados, e analisando comparativamente, ao tempo e percentagem necessária de eluente B, para que estes eluíssem da coluna, desenvolveu-se após algumas tentativas um gradiente *X1*, constituído de modo a que a percentagem de eluente B (fase orgânica) fosse mantida durante mais tempo na corrida, permitindo que os compostos eluíssem mais rapidamente (com um tempo de retenção menor).

Foi assim efetuada uma nova análise dos padrões de SIL, VAR, YOH e TAD na concentração de 100µg/mL, cujo cromatograma pode ser observado na Figura 9.

Apesar de se obter uma boa separação de todos os compostos relativamente ao tempo total da corrida, o tempo de retenção para os diferentes compostos não sofreu alterações significativas, comparativamente ao constatado para o gradiente selecionado inicialmente.



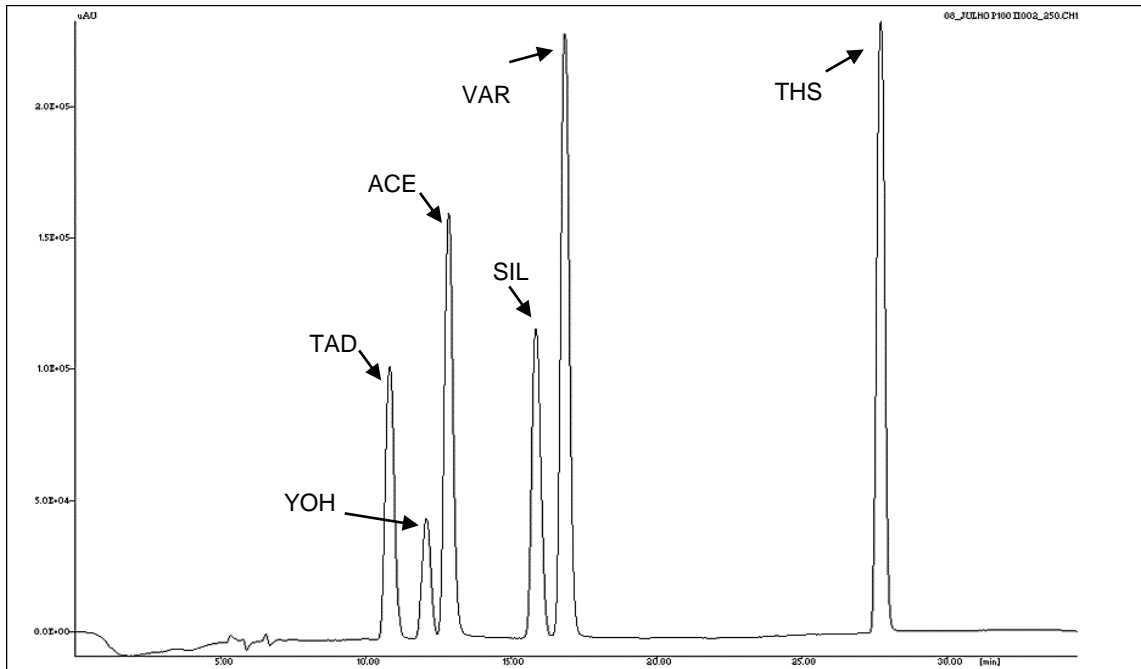
**Figura 9** - Cromatograma obtido pela aplicação do gradiente X1, para os padrões de SIL, VAR, TAD e YOH (detecção a 290 nm)

Com a introdução dos padrões de Acetildenafil e Tiosildenafil, foi necessário introduzir modificações no gradiente que permitissem uma separação eficiente de todos os compostos e ao mesmo tempo reduzisse o tempo total da corrida.

Devido à afinidade descrita (Sacré et al., 2011; Fejos et al., 2014) dos padrões em estudo com solventes orgânicos, foi desenvolvido um gradiente X2, com uma percentagem inicial maior de eluente B (fase orgânica), do que a utilizada nos gradientes anteriores, sendo esta percentagem de eluente B inicial aumentada gradualmente ao longo do tempo da corrida para o máximo de 98%, possibilitando que os compostos eluíssem mais rapidamente da coluna cromatográfica.

Foram incluídos na injeção de teste do gradiente final, os padrões de ACE e THS, aos restantes padrões (SIL, VAR, TAD e YOH). A solução padrão de trabalho foi injetada com uma concentração de 100µg/mL, podendo o cromatograma ser observado na Figura 10.

Verificou-se que o tempo de retenção dos compostos diminuiu significativamente com a aplicação do gradiente X2, sendo que para os compostos TAD, YOH, SIL e VAR o tempo de retenção diminuiu de 24,6 min; 23,8 min; 29,0 min e 29,9 min obtido pelo gradiente inicialmente determinado, para os tempos de retenção de 10,95 min; 12,14 min; 12,81 min e 17,06 min respetivamente, através da aplicação do gradiente X2 (ver capítulo 2.6.1 Tabela 5). No caso dos compostos ACE e THS o tempo de retenção foi de 12,81min e 27,95min, respetivamente.



**Figura 10** - Cromatograma obtido pela aplicação do gradiente X2, para os padrões de SIL, VAR, TAD e YOH (deteção a 290 nm)

Pela da análise dos diferentes gradientes testados, foi escolhido o gradiente X2, como o gradiente a ser utilizado na metodologia analítica aplicada à análise de inibidores da PDE-5 adicionados ilegalmente aos SABP, pois mostrou-se capaz de separar, com uma boa resolução, os picos de todos os compostos da mistura padrão de trabalho com um tempo de corrida satisfatório de 35min.

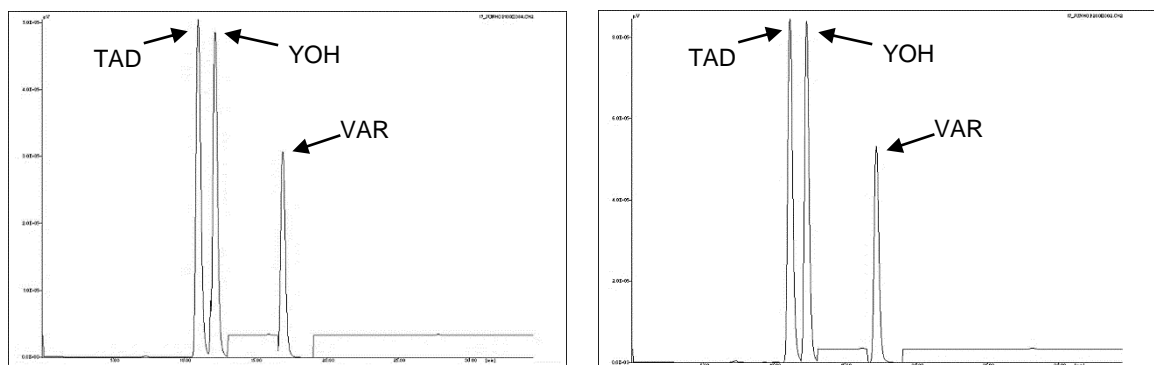
### 3.2.2 Otimização das condições de fluorescência

Como foi descrito anteriormente, a deteção por DAD constitui um dos métodos usados para a identificação e quantificação de inibidores da PDE-5 em SABP. A utilização do detetor FLD prendeu-se com a maior sensibilidade e seletividade deste detetor comparativamente com o DAD bem como com a presença de compostos fitoquímicos na matriz dos SABP que poderiam influenciar a deteção por DAD, podendo levar a uma quantificação errada dos analitos em estudo. Desta forma, a elevada sensibilidade e seletividade associadas à deteção por fluorescência poderá ser uma mais-valia na identificação e quantificação dos inibidores da PDE-5. Contudo, como referido, não existem referências bibliográficas que descrevam a utilização da deteção por fluorescência para a determinação de inibidores da PDE-5, exceto para o VAR, em que é descrita a sua deteção e quantificação através da análise de HPLC-FLD para pequenos volumes de plasma de rato e bÍlis (Cheng et al., 2007).

Pretendendo utilizar o detetor de FLD para a identificação e quantificação dos inibidores da PDE-5, foram inicialmente caracterizados os comprimentos de onda de excitação e emissão para os diferentes padrões do estudo, recorrendo ao procedimento descrito no capítulo 2.5 deste trabalho, sendo os valores obtidos posteriormente utilizados para programar as condições de fluorescência usada.

Para testar as condições de deteção, foi injetada a solução de trabalho com uma concentração de 100µg/mL no sistema de HPLC-DAD-FLD.

Através do cromatograma obtido pela deteção FLD (Figura 11) observou-se a presença de 3 picos, compreendidos no tempo de retenção dos compostos TAD (11,18min), YOH (12,29min) e VAR (17,16min). Constatou-se que para os tempos de retenção para os quais deveriam de estar presentes os picos de SIL, ACE e THS, analisando comparativamente com o cromatograma obtido pela deteção por DAD, para a mesma injeção, verificou-se que estes não foram detetados.



**Figura 11-** Cromatograma obtido pela deteção por FLD para as soluções padrão de trabalho nas concentrações de 100µg/mL (à direita) e 200µg/mL (à esquerda) (deteção a 290 nm)

Considerando que para a obtenção das condições de fluorescência utilizadas, a concentração usada foi de 1g/mL, será possível que a concentração de 100µg/mL injetada, não seja suficiente para evidenciar um sinal que permita a deteção dos compostos SIL, ACE e THS.

Efetou-se uma nova injeção da solução padrão de trabalho com uma concentração de 200µg/mL, pretendendo que o aumento da concentração evidenciasse a deteção por fluorescência para os padrões de SIL, ACE e THS. No entanto, observando o cromatograma obtido (Figura 11), os compostos SIL, ACE e THS não foram detetados, o que poderá significar que a deteção por fluorescência para o SIL e seus análogos, ACE e THS, requer uma concentração superior à utilizada (> 200 µg/mL).

Apesar dos padrões de SIL, ACE e THS não serem detetados por fluorescência, este tipo de deteção foi adotada para os restantes padrões de inibidores da PDE-5 (VAR, TAD e YOH) utilizando as condições descritas no capítulo 2.6.1 (Tabela 4).

### 3.2.3 Otimização do processo de extração das amostras

A generalidade dos SABP, têm uma matriz bastante complexa composta por uma grande variedade de plantas e/ou extratos de plantas, que podem dificultar a pesquisa de adulterantes adicionados ilegalmente a estes suplementos. A presença de compostos fenólicos, típicos de matrizes vegetais, podem apresentar espectros similares ao dos compostos inibidores da PDE-5 em estudo. A otimização da extração destes compostos dos SABP é por isso, essencial reduzir o efeito causado pela matriz dos suplementos e para permitir a deteção mais eficiente de possíveis adulterantes adicionados.

Devido às características dos compostos em estudo, o seu processo de extração passa pelo uso de solventes orgânicos como o metanol e/ou acetone nitrilo ou até misturas aquosas dos mesmos. Essa solução ou suspensão é frequentemente submetida a um processo de agitação, sonicação e centrifugação, sendo posteriormente filtrada e diluída (Savaliya et al., 2010; Song et al., 2012; Vaysse et al., 2012; Jankovics et al., 2013; Lebel et al., 2014).

Para otimizar o processo de extração de inibidores da PDE-5 em SABP empregue neste trabalho foram testados os seguintes condições:

1. **Ensaio de extração com 5 mL ACN/MEOH (50:50) x3** – Uma amostra de SAPB foi extraída 3 vezes consecutivas com 5 mL de solvente orgânico de acordo com o esquema da Figura 1. Após a centrifugação, os sobrenadantes das três extrações foram combinados, filtrados e diluídos antes de serem analisados por HPLC-DAD-FL. Este ensaio foi realizado em duplicado.
2. **Ensaio de extração com com 15 mL ACN/MEOH (50:50) x3** - Uma amostra de SAPB foi extraída uma vez com 15 mL do solvente orgânico de acordo com o esquema da Figura 1. Este ensaio foi realizado em duplicado.

Todos os extratos obtidos por cada réplica foram injetados em triplicado no método analítico usado já com as condições otimizadas. A identificação do adulterante para as amostras acima descritas, foi realizada com base na deteção por DAD. A quantificação tem como base a curva de calibração referente ao adulterante detetado.

Após a observação dos resultados, constatou-se que uma única extração com 15mL era mais eficiente na recuperação do composto em estudo. Os resultados obtidos encontram-se descritos na Tabela 7.

**Tabela 7** – Recuperação (%) obtida de SIL para os diferentes ensaios de extração

| Réplica da amostra | Volume inicial de solvente orgânico para cada extração (mL) |                         |                         | Recuperação |        |
|--------------------|---|-------------------------|-------------------------|-------------|--------|
|                    | 1 <sup>a</sup> Extração                                     | 2 <sup>a</sup> Extração | 3 <sup>o</sup> Extração | Média (%)   | CV (%) |
|                    | 1   | 5                       | 5                       | 5           | 58     |
| 2                  | 15  | -                       | -                       | 90          | 9,8    |

### 3.3 Validação do método

Como foi referido anteriormente no capítulo 1.7, sempre que são otimizadas as condições de um método analítico ou implementadas alterações significativas ao mesmo, deve ser avaliado o seu desempenho com base em parâmetros definidos, que de uma forma geral pretendem demonstrar a qualidade, consistência e fiabilidade dos resultados obtidos pelo método, designando-se assim como validação do método analítico. Por este motivo, procedeu-se assim à validação do método analítico usado para este estudo através da avaliação dos seguintes parâmetros analíticos: gama de trabalho; linearidade; LOD; LOQ; precisão (repetibilidade; precisão intermédia) e ensaios de recuperação.

#### 3.3.1 Gama de Trabalho

A gama de trabalho foi constituída a partir de diluições da solução padrão de trabalho, contendo a mistura dos 6 padrões de inibidores da PDE-5, para as concentrações: 200; 150; 100; 50; 25; 10 e 5 µg/mL.

A avaliação dos parâmetros de validação do método foi realizada com base nas concentrações descritas da gama de trabalho.

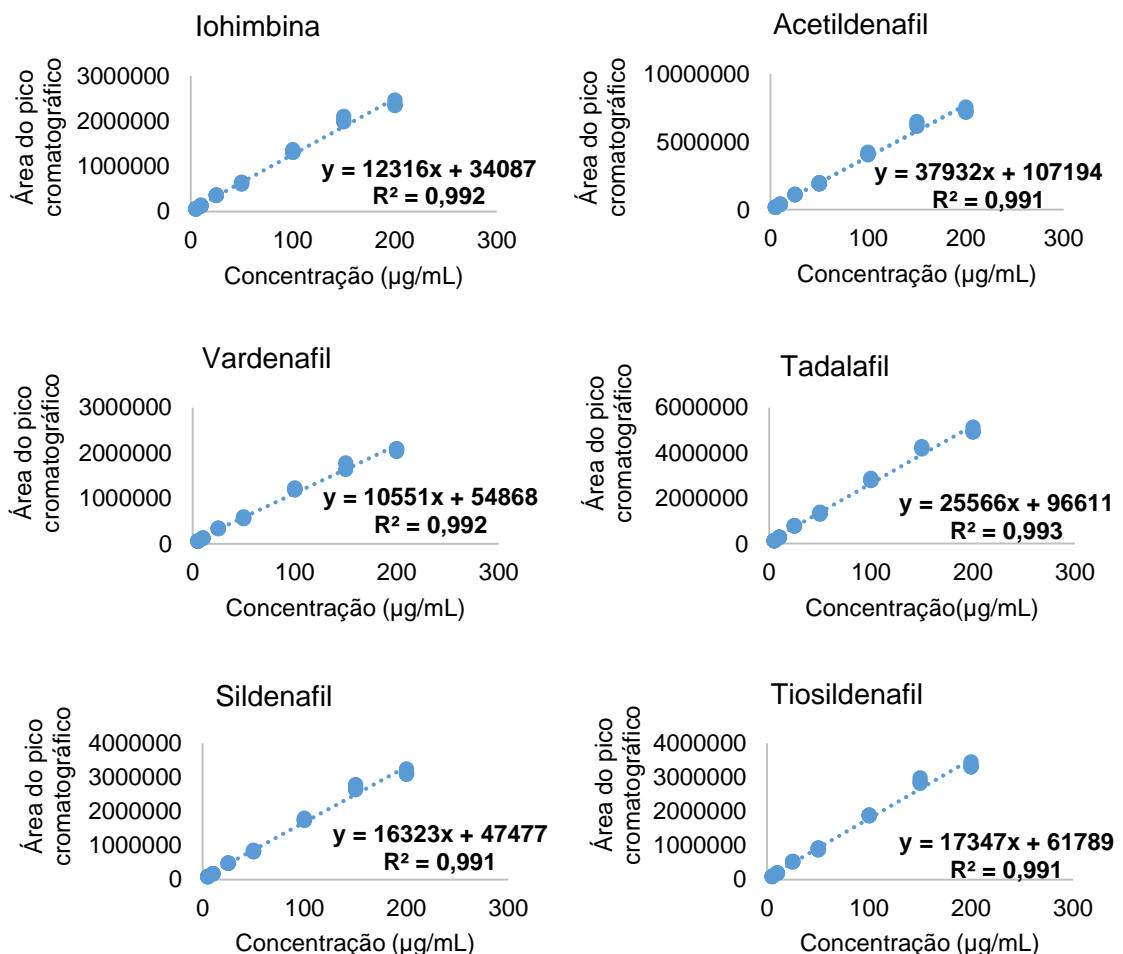
#### 3.3.2 Linearidade

A linearidade do método analítico para os 6 inibidores da PDE-5, foi avaliada na gama de trabalho compreendida entre as concentrações 5 - 200µg/mL. Para tal, foram analisadas no sistema de HPLC-DAD-FLD, 5 soluções de diferentes concentrações utilizando a gama de trabalho anteriormente descrita. Para cada substância padrão, foi obtida a respetiva curva de calibração através de regressão linear entre a área do sinal obtido

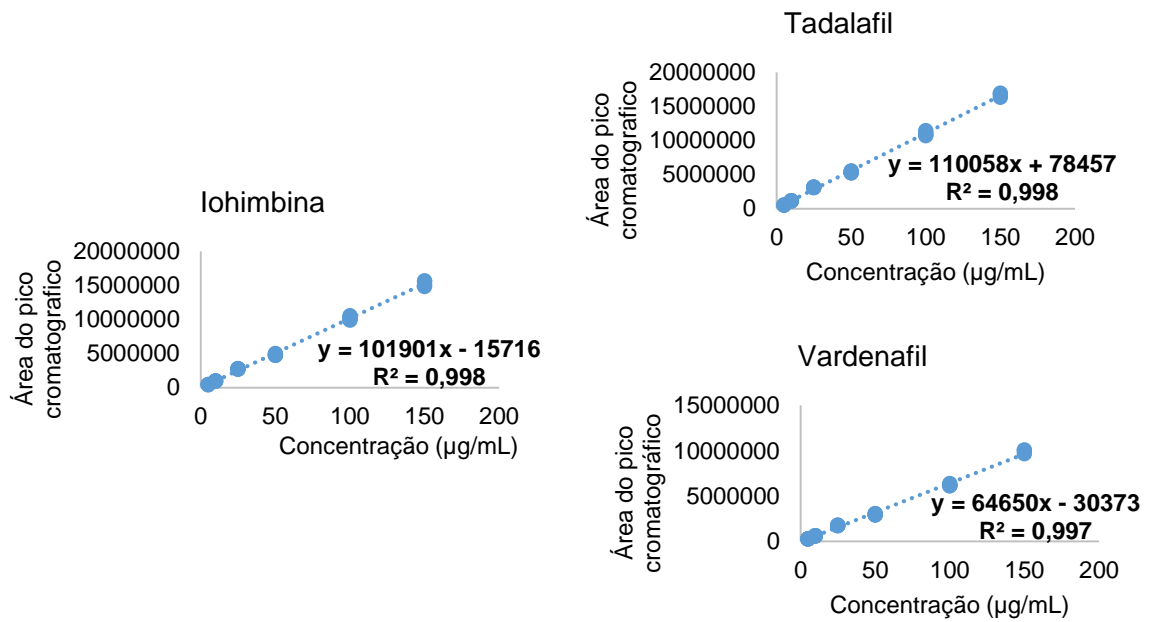
pelelo sistema em função das diferentes concentrações da solução padrão de trabalho, e calculado o coeficiente de correlação quadrático.

Na Figura 12 e 13 apresentam-se as curvas de calibração obtidas para os diferentes compostos através de DAD e FLD, onde se pode observar a equação da reta e o coeficiente de correlação quadrático para cada um dos padrões usados.

Observando os coeficientes de correlação das curvas de calibração apresentadas para os seis padrões utilizados (Figura 12), para todos os compostos foi obtido um  $R^2$  superior a 0,99 demonstrando assim a existência de uma relação diretamente proporcional entre as áreas cromatográficas obtidas nas condições utilizadas e a concentração do analito na amostra em estudo. Como foi descrito no capítulo 3.1.2 deste trabalho, os compostos SIL, ACE e THS, demonstraram não ser detetáveis por fluorescência para a gama de trabalho utilizada, pelo que, apenas foi observada a linearidade dos compostos VAR, YOH e TAD obtidos através da deteção por fluorescência na gama de trabalho de trabalho compreendida na concentração de 5 - 150 $\mu\text{g/mL}$ .



**Figura 12** - Curvas de calibração e respetivos coeficiente de correlação, para os compostos em estudo pela deteção por DAD



**Figura 13** - Curvas de calibração e respetivos coeficiente de correlação, para os compostos em estudo pela deteção FLD

Analisando os  $R^2$  correspondentes das curvas de calibração para os padrões VAR, TAD e YOH, através da deteção por fluorescência (Figura 13), verifica-se que os valores obtidos são superiores a 0,998, demonstrando assim a linearidade do método, ou seja, a capacidade de obter resultados que tenham uma relação diretamente proporcional à concentração do analito em estudo.

### 3.3.3 Limite de deteção e de quantificação

Os limites de deteção e quantificação foram calculados a partir da relação entre o desvio padrão do sinal obtido por amostras em branco em função do declive da respetiva curva de calibração, para cada padrão de inibidores da PDE-5. As expressões matemáticas usadas para o cálculo do limite de deteção e quantificação encontram-se descritas nos capítulos 1.7.6 e 1.7.1 respetivamente.

Na Tabela 10 apresentam-se os LOD e LOQ obtidos para o método otimizado de HPLC-DAD-FLD utilizado neste trabalho.

**Tabela 8** – Limites de deteção e limites de quantificação ( $\mu\text{g/mL}$ ), para os diferentes inibidores da PDE-5 determinados pelo sistema de HPLC-DAD-FLD.

| Inibidores da PDE-5 | Deteção por DAD          |                          | Deteção por FLD          |                          |
|---------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
|                     | LOD ( $\mu\text{g/mL}$ ) | LOQ ( $\mu\text{g/mL}$ ) | LOD ( $\mu\text{g/mL}$ ) | LOQ ( $\mu\text{g/mL}$ ) |
| Tadalafil           | 0,017                    | 0,052                    | $4,64 \times 10^{-4}$    | $1,41 \times 10^{-3}$    |
| Iohimbina           | 0,031                    | 0,094                    | $1,30 \times 10^{-4}$    | $3,95 \times 10^{-4}$    |
| Vardenafil          | 0,047                    | 0,143                    | $1,12 \times 10^{-4}$    | $3,70 \times 10^{-4}$    |
| Sildenafil          | 0,044                    | 0,132                    | nd                       | Nd                       |
| Acetildenafil       | 0,013                    | 0,038                    | nd                       | nd                       |
| Tiosildenafil       | 0,025                    | 0,076                    | nd                       | nd                       |

nd- não determinado

Como expectável os valores obtidos por FLD (LOD:  $1,12 \times 10^{-4}$  –  $4,64 \times 10^{-4}$   $\mu\text{g/mL}$ ; LOQ:  $3,95 \times 10^{-4}$  –  $1,41 \times 10^{-3}$   $\mu\text{g/mL}$ ) foram inferiores aos obtidos com o DAD (LOD: 0,013 – 0,0447  $\mu\text{g/mL}$ ; LOQ: 0,052 – 0,143  $\mu\text{g/mL}$ ).

### 3.3.4 Precisão

A precisão do método utilizado foi avaliada com base nos coeficientes de variação determinados nos ensaios de repetibilidade e precisão intermédia para os diferentes detetores utilizados, nomeadamente DAD e FLD.

Para a deteção por fluorescência apenas foi determinado o CV da repetibilidade e precisão intermédia para os padrões TAD, VAR e YOH, na gama de concentrações que os compostos apresentam linearidade.

### Repetibilidade

Para a determinação da repetibilidade foram injetadas as soluções de trabalho com diferentes concentrações na gama de trabalho. Estas injeções foram replicadas 5 vezes, dentro do mesmo dia, aplicando as mesmas condições cromatográficas para cada concentração avaliada.

Seguidamente, procedeu-se ao cálculo do coeficiente de variação para as áreas dos picos cromatográficos e tempo de retenção de cada padrão, a partir da expressão

apresentada no ponto 1.7.2. Os resultados obtidos encontram-se apresentados nas Tabelas 9 a 12.

Os valores de repetibilidade obtidos para as áreas dos picos cromatográficos e respetivos tempos de retenção, para ambas as deteções (DAD e FLD) encontram-se dentro dos valores satisfatórios, com CV inferiores a 10%.

### **Precisão intermédia**

Este parâmetro de validação do método foi determinado através da realização de ensaios de repetibilidade consistindo na injeção da solução de trabalho contendo a mistura dos padrões de inibidores da PDE-5 em três concentrações diferentes (10; 50; 150 µg/mL) em quatro dias diferentes. O cálculo do coeficiente de variação da precisão intermédia para as áreas dos picos cromatográficos e tempo de retenção de cada padrão, foi determinada a partir da expressão apresentada em 1.7.2. Os resultados obtidos apresentam-se nas Tabelas 9 a 12 para os dois tipos de detetores aplicados no método.

Observando os resultados referentes a precisão intermédia em ambas as deteções observam-se CV inferiores a 10 %, para as áreas dos picos cromatográficos dos padrões analisados. Já a precisão intermédia relativamente ao tempo de retenção apresenta CV próximos de 1,00%. Podemos assim afirmar que a determinação da precisão intermedia encontra-se com valores satisfatórios para a validação de um método de acordo com o trabalho de Ribani et al. (2004).

**Tabela 9** – Repetibilidade e precisão intermédia do método calculada com base na análise das áreas dos picos cromatográficos detetados por DAD para os diferentes padrões de inibidores da PDE-5

| Composto             | Repetibilidade das áreas dos picos (%CV) |          |           | Precisão intermédia das áreas dos picos (%CV) |          |           |
|----------------------|--|----------|-----------|---|----------|-----------|
|                      | 10 µg/mL                                 | 50 µg/mL | 150 µg/mL | 10 µg/mL                                      | 50 µg/mL | 150 µg/mL |
| <b>Tadalafil</b>     | 1,70                                     | 2,32     | 1,66      | 8,84  | 6,69     | 6,95      |
| <b>Iohimbina</b>     | 2,95                                     | 2,69     | 3,04      | 9,57  | 5,13     | 6,92      |
| <b>Acetildenafil</b> | 2,54                                     | 2,34     | 2,96      | 9,78  | 8,53     | 6,79      |
| <b>Sildenafil</b>    | 2,33                                     | 2,20     | 2,90      | 8,93  | 7,17     | 6,64      |
| <b>Vardenafil</b>    | 1,87                                     | 2,66     | 5,89      | 9,23  | 8,66     | 6,57      |
| <b>Tiosildenafil</b> | 1,02                                     | 2,44     | 2,85      | 9,85  | 5,85     | 6,71      |

**Tabela 10** – Repetibilidade e precisão intermédia do método calculadas com base na análise dos tempos de retenção dos picos cromatográficos detetados por DAD para os diferentes padrões de inibidores da PDE-5

| Composto             | Repetibilidade do tempo de retenção (%CV) |          |           | Precisão intermédia do tempo de retenção (%CV) |          |           |
|----------------------|---|----------|-----------|--|----------|-----------|
|                      | 10 µg/mL                                  | 50 µg/mL | 150 µg/mL | 10 µg/mL                                       | 50 µg/mL | 150 µg/mL |
| <b>Tadalafil</b>     | 0,07                                      | 0,06     | 0,08      | 1,35   | 0,96     | 0,87      |
| <b>Iohimbina</b>     | 0,00                                      | 0,06     | 0,11      | 1,08   | 0,89     | 0,82      |
| <b>Acetildenafil</b> | 0,00                                      | 0,06     | 0,16      | 1,11   | 0,99     | 0,76      |
| <b>Sildenafil</b>    | 0,05                                      | 0,06     | 0,17      | 1,15   | 1,13     | 1,04      |
| <b>Vardenafil</b>    | 0,07                                      | 0,06     | 0,17      | 1,14   | 1,19     | 1,11      |
| <b>Tiosildenafil</b> | 0,05                                      | 0,04     | 0,12      | 0,63   | 0,78     | 0,75      |

**Tabela 11** – Repetibilidade e precisão intermédia do método calculadas com base na análise das áreas dos picos cromatográficos para os padrões de Inibidores da PDE-5 detetados por FLD

| Compostos         | Repetibilidade das áreas dos picos (%CV) |          |           | Precisão intermédia das áreas dos picos (%CV) |          |           |
|-------------------|--|----------|-----------|---|----------|-----------|
|                   | 10 µg/mL                                 | 50 µg/mL | 150 µg/mL | 10 µg/mL                                      | 50 µg/mL | 150 µg/mL |
| <b>Tadalafil</b>  | 2,43                                     | 2,50     | 1,94      | 9,84  | 8,84     | 8,03      |
| <b>Iohimbina</b>  | 2,60                                     | 2,53     | 2,67      | 9,95  | 9,92     | 6,05      |
| <b>Vardenafil</b> | 2,44                                     | 2,59     | 2,25      | 9,82  | 8,59     | 8,00      |

**Tabela 12** – Repetibilidade e precisão intermédia do método calculadas com base na análise dos tempos de retenção dos picos cromatográficos para os padrões de Inibidores da PDE-5 detetados por FLD

| Compostos         | Repetibilidade do tempo de retenção (%CV) |          |           | Precisão intermédia do tempo de retenção (%CV) |          |           |
|-------------------|---|----------|-----------|--|----------|-----------|
|                   | 10 µg/mL                                  | 50 µg/mL | 150 µg/mL | 10 µg/mL                                       | 50 µg/mL | 150 µg/mL |
| <b>Tadalafil</b>  | 0,01                                      | 0,05     | 0,18      | 1,29   | 0,94     | 0,87      |
| <b>Iohimbina</b>  | 0,02                                      | 0,03     | 0,17      | 0,98   | 0,91     | 0,81      |
| <b>Vardenafil</b> | 0,02                                      | 0,05     | 0,21      | 1,10   | 1,17     | 1,11      |

### 3.3.5 Ensaio de Recuperação

A exatidão do método foi avaliada através de ensaios de recuperação.

Foram adicionados a 3 amostras de SABP os 6 padrões de inibidores da PDE-5 com 2 níveis de concentração, que posteriormente ao processo de extração descrito no capítulo 2.4 deste trabalho foram injetadas em quadruplicado para cada nível de concentração.

A percentagem de recuperação e o respetivo coeficiente de variação foi calculado a partir das médias das recuperações obtidas para cada padrão de inibidor da PDE-5, e encontram-se descritos na Tabela 13.

**Tabela 13** – Percentagem de recuperação para os diferentes padrões e respetivos coeficientes de variação

| Padrão de Inibidor da PDE-5 | Recuperação |        |
|-----------------------------|-------------|--------|
|                             | Média (%)   | CV (%) |
| Tadalafil                   | 81,5        | 8,0    |
| Iohimbina                   | 76,2        | 10,6   |
| Acetildenafil               | 82,2        | 4,1    |
| Sildenafil                  | 87,0        | 9,0    |
| Vardenafil                  | 76,0        | 11,6   |
| Tiosildenafil               | 91,0        | 23,1   |

Em geral as percentagens de recuperação obtidas encontram-se entre 76,0 – 91,0 % com um coeficiente de variação entre 4,1 – 23,1 %. Para o caso do padrão de THS, obteve-se um coeficiente de variação muito elevado, o que poderá dever-se a erros laboratoriais efetuados ao nível do processo de extração.

Considerando que idealmente as percentagens de recuperação se devem situar entre 80-120%, de uma maneira geral pode considerar-se que as recuperações obtidas são aceitáveis para os vários compostos.

### 3.4 Análise das amostras de Suplementos Alimentares à Base de Plantas

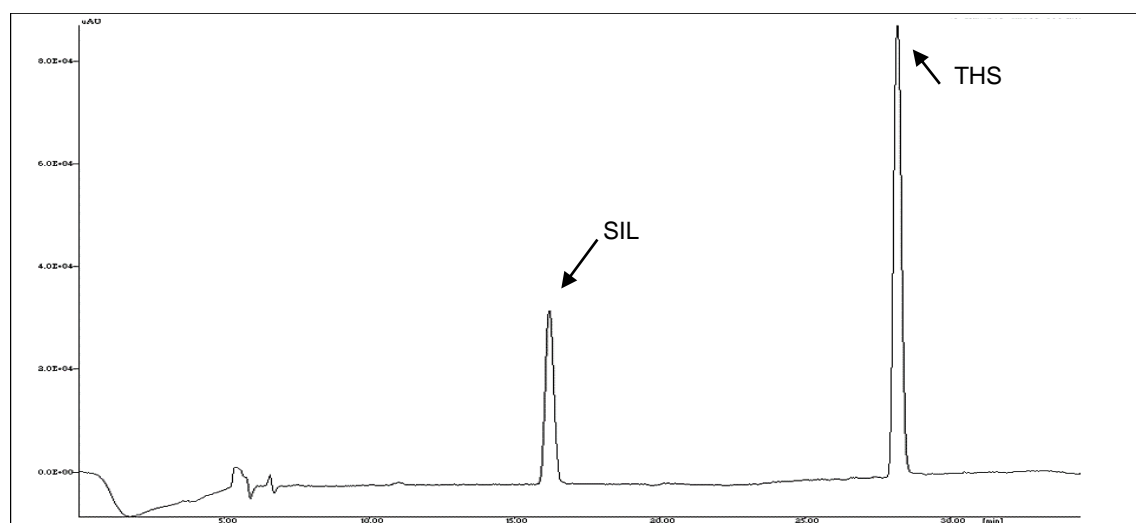
Após a otimização e validação do método analítico, procedeu-se à análise das 12 amostras de SABP descritas na Tabela 2.

Para cada amostra foram feitas três extrações, sendo que para cada extrato a sua injeção foi realizada em triplicado.

A identificação e quantificação de possíveis adulterantes presentes nos 12 SABP foi feita através do procedimento descrito no capítulo 3.1 deste trabalho.

Na Tabela 14 apresentam-se os resultados das análises às amostras de SABP que se verificou estarem adulteradas com inibidores da PDE-5 com base na análise de *screening* proposta por HPLC-DAD-FLD. Para as amostras não incluídas na Tabela 14, não foi detetado nenhuma das substâncias adulterantes em estudo.

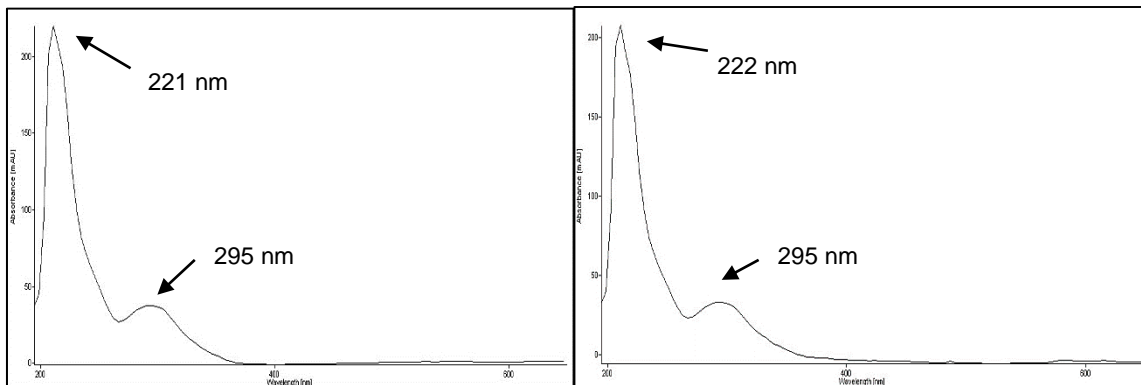
A partir dos cromatogramas das amostras SA1 e SA5 obtidos pela deteção DAD (Figura 14), foram detetados dois picos cromatográficos com tempos de retenção similares aos tempos de retenção apresentados pelos padrões de SIL e THS.



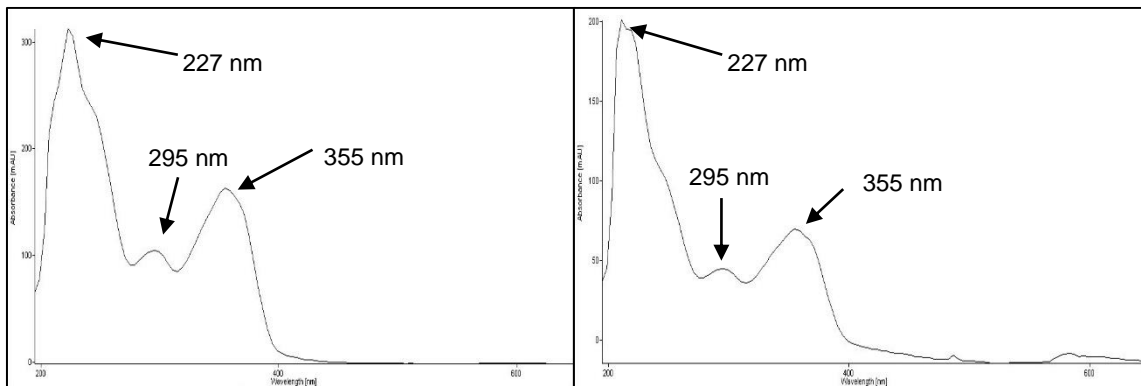
**Figura 14** - Exemplo de um cromatograma obtido para amostra SA1 e SA5 (deteção a 290 nm)

Observando os espectros de UV obtidos para os diferentes picos cromatográficos das amostras SA1 e SA5, verificou-se que para o pico cromatográfico correspondente ao mesmo tempo de retenção do padrão de SIL em ambas as amostras, os espectros UV (Figura 15), obtiveram a mesma estrutura gráfica, e comprimentos de onda para o qual se observa uma máximo de absorção ( $\lambda_{\max}$ ), semelhantes aos apresentados pelo espectro UV do padrão do SIL (Figura 2). O mesmo foi observado para os espectros UV (Figura 16) correspondentes ao pico cromatográfico do composto THS, que mais uma vez por

comparação com o espectro UV do padrão de THS (Figura 5), demonstrou  $\lambda_{\max}$  coincidentes.



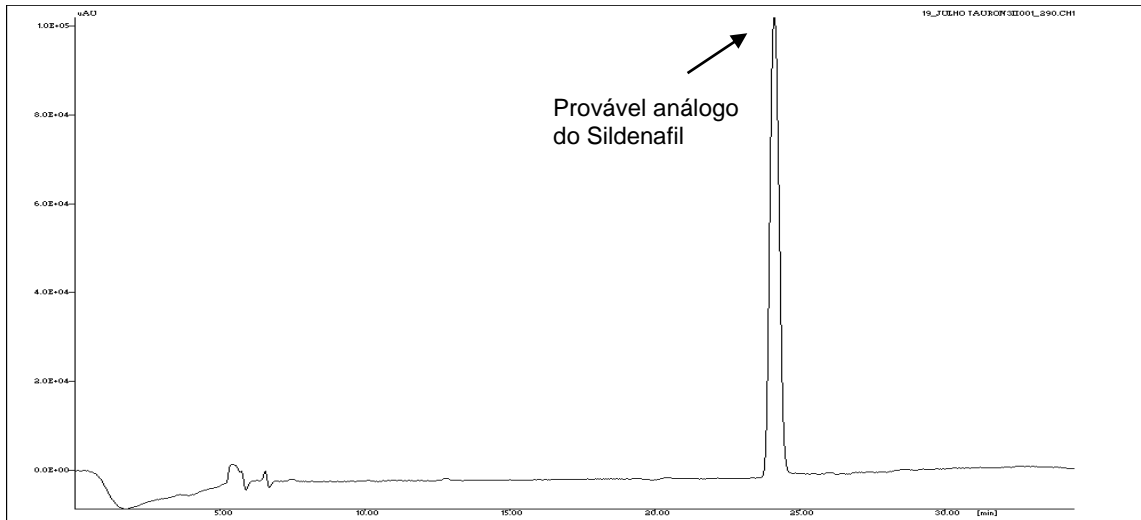
**Figura 15** - Exemplo dos espectros UV obtidos para o pico correspondente ao SIL para as amostras SA1 (esquerda) e SA5 (direita)



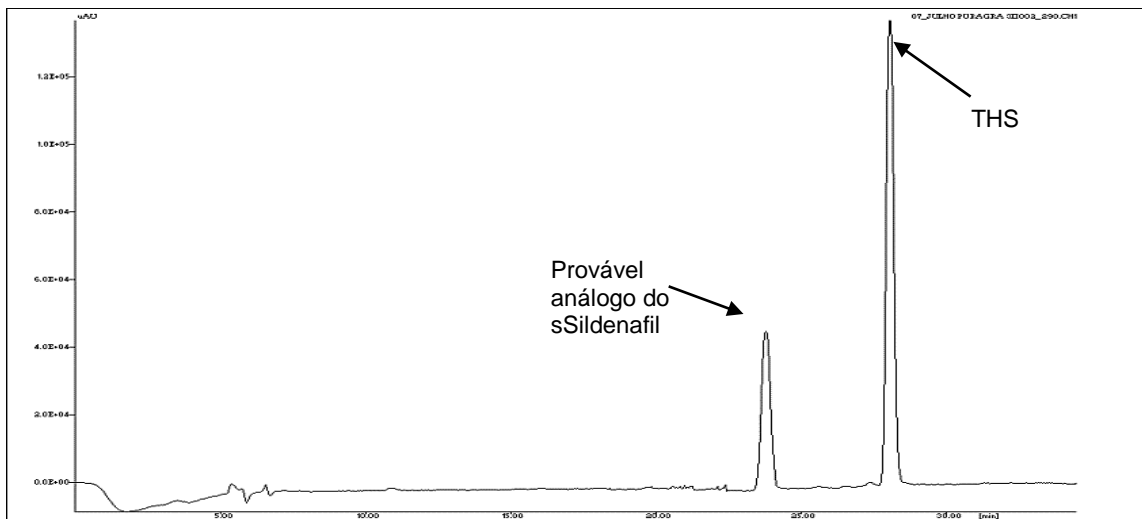
**Figura 16** - Exemplo dos espectros UV obtidos para o pico correspondente ao THS para as amostras SA1 (esquerda) e SA5 (direita)

Na amostra SA4 foi detetado apenas um pico cromatográfico (Figura 17), tendo este um tempo de retenção ( $R_t$  – 23,80 min) diferente de todos os padrões de inibidores da PDE-5 injetados. Na amostra SA11 (Figura 18) este composto também está presente no mesmo tempo de retenção ( $R_t$  – 23,80 min) que a amostra SA4 e quando se observa os espectros de UV (Figura 19) correspondente a este pico cromatográfico para ambas as amostras, verificou-se que os espectros de UV têm uma estrutura gráfica muito semelhante ao espectro UV do padrão do THS (Figura 5). Os comprimentos de onda máximos para o composto presente nas amostras SA4 e SA11 não correspondem totalmente aos comprimentos de onda observados no espectro UV do padrão THS, porém existe uma grande semelhança nos valores dos comprimentos de onda e na estrutura gráfica o que poderá sugerir tratar-se de um composto com uma estrutura molecular muito semelhante ao do composto THS. Tendo em conta que o THS é um análogo estrutural do SIL, e o composto presente nas amostras SA4 e SA11 tem um

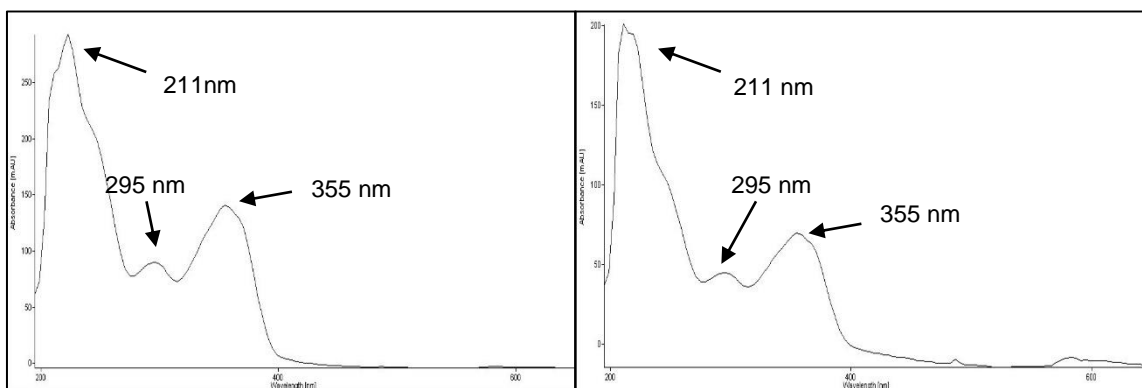
especto UV muito semelhante ao espectro UV do padrão do THS, poderá eventualmente tratar-se também de um análogo do sildenafil (ASIL).



**Figura 17** - Exemplo de um cromatograma obtido para amostra SA4 (deteção a 290 nm)

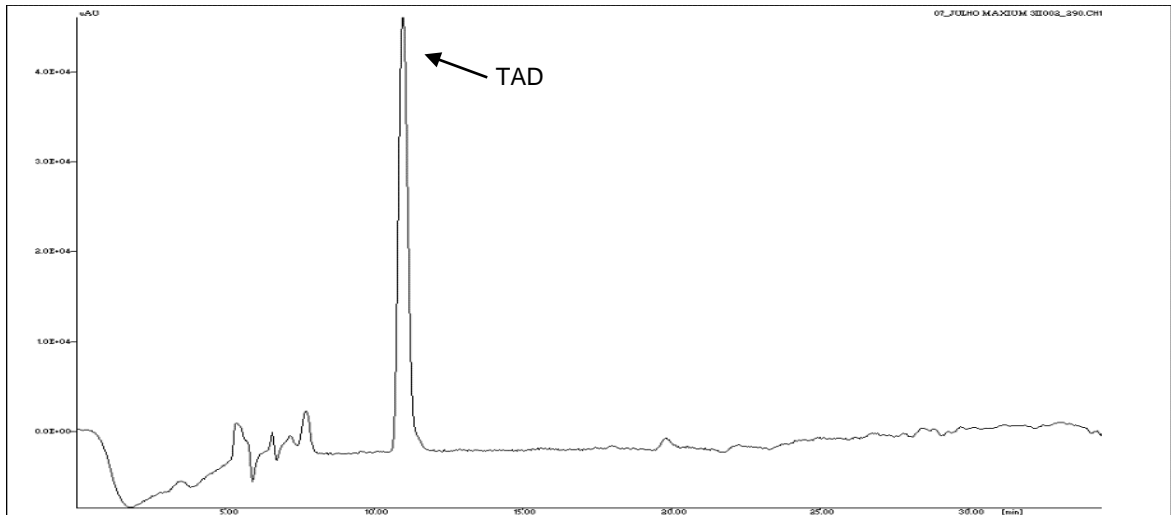


**Figura 18** - Exemplo de um cromatograma obtido para amostra SA11 (deteção a 290 nm)

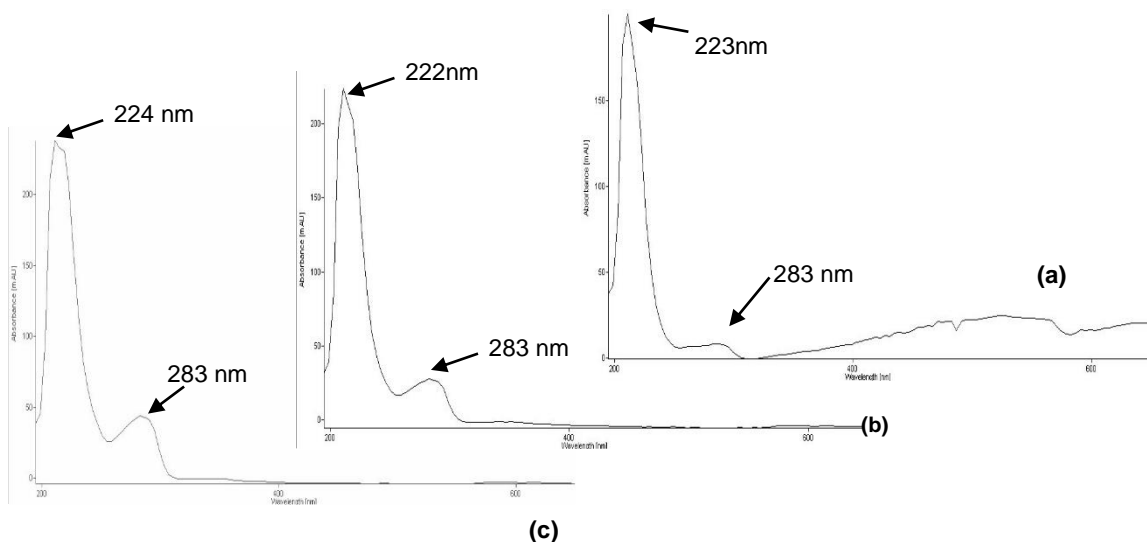


**Figura 19** - Exemplo dos espectros UV obtidos para o pico correspondente ao análogo do Sildenafil (ASIL) para as amostras SA4 (esquerda) e SA11 (direita)

Na amostra SA11 não se deteta apenas um inibidor da PDE-5. Para além do composto não identificado e designado como ASIL, nesta amostra também se detetou um pico cromatográfico com um tempo de retenção e espectro UV semelhante ao do padrão THS. Nas amostras SA8, SA9 e SA10 (Figura 20) foi detetada a presença de um pico cromatográfico com tempo de retenção e UV similar aos apresentados pelo padrão TAD (Figura 4).



**Figura 20** - Exemplo de um cromatograma obtido para amostra SA8,SA9 e SA10  
(deteção a 290 nm)



**Figura 21** - Exemplo dos espectros UV obtidos para o pico correspondentes as amostras SA8 (a), SA9 (b) e SA10 (c)

Através da deteção por fluorescência foi obtido um cromatograma semelhante para as amostras SA8, SA9 e SA10. Em ambas as amostras foi possível determinar um pico cromatográfico com um tempo de retenção de 11,18 min, semelhante ao obtido pelo padrão tadalafil determinado pelo detetor de fluorescência nas condições de fluorescência descritas no capítulo 3.1 deste trabalho. Assim, este adulterante foi quantificado com base na reta de calibração obtida pelo padrão de TAD através da deteção por FLD. Através do método analítico aplicado neste trabalho as amostras SA2, SA3, SA6 e SA12, não apresentaram nenhum pico cromatográfico que correspondesse aos inibidores da PDE-5 avaliados neste estudo. Conclui-se assim que estas amostras não se encontram adulteradas com nenhum inibidor da PDE-5 utilizado como padrão neste estudo.

Após identificação dos adulterantes presentes nas amostras SA1, SA4, SA5 SA8, SA9, SA10 e SA11, procedeu-se à sua quantificação com base na curva de calibração adequada para cada composto (Tabela 14). No caso das amostras SA4 e SA11, uma vez que o espectro do composto não identificado sugere tratar-se de um análogo do sildenafil, procedeu-se à sua quantificação com base na curva de calibração deste padrão.

Observando a Tabela 14 verifica-se que das 12 amostras de SABP analisadas por este método, sete (SA1, SA4, SA5, SA8, SA9, SA10 e SA11) encontram-se adulteradas com inibidores da PDE-5, sendo que em três das sete amostras adulteradas, (SA1, SA5 e SA11) foi detetado mais de que um inibidor da PDE-5. Constatou-se que o SIL, TAD e THS foram os adulterantes predominantes nas 7 amostras para as quais foi detetada a adição ilegal de inibidores da PDE-5.

Comparativamente às dosagens existentes para o medicamento Viagra (25, 50 e 100 mg de princípio ativo), as quantidades determinadas do composto SIL nas amostras SA1 e SA5, 26,9 e 32,3 mg/caps, respetivamente, são da ordem de grandeza das utilizadas no medicamento com a dosagem inferior (25mg), o que permitirá obter um efeito farmacológico similar. Por encontrarmos o SIL em quantidades elevadas, podemos descartar a possibilidade de adulteração não intencional.

De referir, que dosagens semelhantes de SIL foram também descritas em trabalhos anteriores (Gratz et al., 2004; Abourashed et al., 2007; Chen et al., 2009; Zhang et al., 2010; Fejos et al 2014).

A adulteração de SABP com inibidores da PDE-5 impõe elevados risco de saúde para o consumidor, que deste modo desconhecendo a sua adulteração, poderá consumir outros medicamentos que quando são administrados concomitantemente com inibidores da PDE-5 causam efeitos adversos graves como estado de hipotensão que poderá levar a morte.

**Tabela 14** – Resultados das análises às amostras de SABP adulteradas com inibidores da PDE-5, através da análise por HPLC-DAD-FLD

| Código da amostra | Amostra | Nome do Inibidor da PDE-5 detetado na amostra        | Quantidade de inibidor da PDE-5 presente, por cápsula ou tira sublingual (mg) |             |
|-------------------|---------|--|---|-------------|
|                   |         |  | DAD   | FLD         |
| SA1               | 1       | Sildenafil (SIL);<br>Tiosildenafil (THS)             | (SIL) 32,7 ± 0,7<br>(THS) 71,7 ± 0,8  | nd          |
|                   | 2       |  | (SIL) 30,9 ± 1,9<br>(THS) 67,5 ± 4,1  | nd          |
|                   | 3       |  | (SIL) 32,5 ± 0,5<br>(THS) 72,3 ± 0,7  | nd          |
| SA4               | 1       | Análogo do Sildenafil (ASIL)                         | (ASIL) 90,5 ± 2,9   | nd          |
|                   | 2       |  | (ASIL) 82,2 ± 1,8   | nd          |
|                   | 3       |  | (ASIL) 91,3 ± 2,4   | nd          |
| SA5               | 1       | Sildenafil (SIL);<br>Tiosildenafil (THS)             | (SIL) 27,3 ± 0,7<br>(THS) 61,5 ± 1,4  | nd          |
|                   | 2       |  | (SIL) 26,9 ± 0,6<br>(THS) 60,7 ± 1,7  | nd          |
|                   | 3       |  | (SIL) 30,3 ± 1,4<br>(THS) 64,1 ± 0,4  | nd          |
| SA8               | 1       | Tadalafil (TAD)                                      | (TAD) 2,7 ± 0,2   | 1,5 ± 0,1   |
|                   | 2       |  | (TAD) 2,4 ± 0,1   | 1,3 ± 0,2   |
|                   | 3       |  | (TAD) 2,2 ± 0,7   | 1,1 ± 0,4   |
| SA9               | 1       | Tadalafil (TAD)                                      | (TAD) 24,0 ± 0,8  | 21,0 ± 0,88 |
|                   | 2       |  | (TAD) 13,5 ± 0,1  | 10,9 ± 0,18 |
|                   | 3       |  | (TAD) 25,8 ± 0,7  | 22,2 ± 0,61 |
| SA10              | 1       | Tadalafil (TAD)                                      | (TAD) 22,5 ± 0,7  | 20,2 ± 0,7  |
|                   | 2       |  | (TAD) 25,7 ± 1,2  | 20,1 ± 1,1  |
| SA11              | 1       | Tiosildenafil (THS);<br>Análogo do Sildenafil (ASIL) | (THS) 77,2 ± 0,4<br>(ASIL) 33,4 ± 0,4   | nd          |
|                   | 2       |  | (THS) 72,1 ± 1,2<br>(ASIL) 31,5 ± 0,2   | nd          |
|                   | 3       |  | (THS) 92,0 ± 4,3<br>(ASIL) 40,3 ± 2,2   | nd          |

nd - Valor não determinado

Normalmente os indivíduos que apresentam problemas cardiovasculares para os quais são medicados com nitratos, alfa-bloqueadores ou hipertensivos é desaconselhada a toma de inibidores da PDE-5.

Nas amostras SA1 e SA5 e SA11 foi detetado outro tipo de adulterante, correspondente a um dos análogos do Sildenafil, o Tiosildenafil (THS). Ambas as amostras apresentaram quantidades similares (60,7 – 72,3 mg/caps). Considerando que para a maior parte dos análogos dos inibidores da PDE-5 não existem ensaios de farmacocinética e/ou farmacodinâmica, a quantidade presente de THS nas amostras SA1, SA5 e SA11 não pode ser caracterizada com base no efeito que produz, pois não são conhecidos dados sobre a quantidade de composto necessário para se observar o efeito semelhante ao dos medicamentos presentes no mercado. Contudo, verificou-se que a quantidade de THS presente nas amostras SA1, SA5 e SA11 (60,7 – 72,3 mg) é similar a quantidades de THS detetadas em amostras de SABP relatadas por outros autores (Zou et al., 2008). Como referido, nas amostras SA4 e SA11 detetou-se um composto cujo espectro indicia tratar-se de um análogo do SIL, dada a semelhança ao THS.

Para confirmação da identidade deste composto, seria necessário proceder a estudos adicionais, tais como proceder ao seu isolamento e avaliação da estrutura química por RMN e/ou espectrometria de massa de alta resolução. Sendo o método de HPLC-DAD-FL proposto neste trabalho um método de *screening*, refira-se ainda que todos os compostos detetados nas amostras deverão idealmente ser sujeitos a análise por outras técnicas que permitam realizar a sua identificação inequívoca, tal como espectrometria de massa.

Para realizar a identificação deste composto seria necessário proceder ao seu isolamento e a aplicação de outras técnicas analíticas como a ressonância magnética nuclear (RMN) e/ou MS, que permitissem avaliar a estrutura química do composto, podendo assim ser identificado corretamente.

Em ambas as amostras SA1, SA5 e SA11 foi detetada a presença de mais do que um inibidor da PDE-5. Atendendo que as quantidades determinadas ultrapassam a dosagem terapêutica usada pelo medicamento Viagra®, as dosagens existentes nas amostras poderão ser potencialmente perigosas para quem consome este tipo de SABP. Adicionalmente, não são conhecidos/estudados potenciais efeitos adversos causados pela sinergia existente entre inibidores de PDE-5 e/ou seus análogos.

Nas amostras SA9 e SA10 foram determinadas concentrações de TAD na ordem dos 13,5 – 25,8mg/caps. Considerando que o TAD é encontrado em dosagens terapêuticas de 2,5; 5; 10 e 20mg, para o medicamento Cialis® (FDA, 2015a), verifica-se mais uma vez a utilização de quantidades semelhantes às encontradas nas respetivas formulações farmacêuticas, visando a obtenção do efeito fisiológico pretendido pelos consumidores.

Estudos anteriores referem quantidades de TAD ilegalmente adicionadas em SABP similares às detetadas neste trabalho (Gratz et al., 2004; Zhang et al., 2010). Comparativamente às restantes amostras adulteradas com TAD, a amostra SA8 apresenta uma quantidade inferior, o que poderá estar relacionado com o tipo de formulação uma vez que se trata de uma tira sublingual. Considerando as dosagens disponíveis no medicamento Cialis® (compreendidas entre 2,5 – 20mg/ por comprimido) e sabendo que a absorção sublingual é mais eficiente para a administração rápida de fármacos no Homem, a baixa quantidade presente no SABP poderá assim mesmo permitir obter o efeito farmacológico desejado.

## **4. Conclusão**

Este trabalho teve como objetivo o desenvolvimento e validação de um método analítico por HPLC-DAD-FLD com o intuito de analisar a presença de inibidores da PDE-5 adicionados ilegalmente a suplementos alimentares à base de plantas.

Os inibidores da PDE-5 em estudo foram sildenafil, tadalafila, vardenafil, acetildenafil, tiosildenafil e iohimbina.

Desta forma, iniciou-se o estudo com a otimização do gradiente aplicado à fase móvel do sistema, por forma a obter uma boa resolução cromatográfica dos compostos em estudo, num tempo de corrida aceitável. Como foi descrito, não foram encontradas referências bibliográficas que apontem para o uso da deteção por fluorescência na identificação ou quantificação de inibidores da PDE-5 em SABP. Assim, pretendendo-se aplicar este tipo de deteção, procedeu-se à otimização das condições de fluorescência, o qual foi conseguido para os compostos TAD, YOH e VAR. Com base na quantificação dos inibidores da PDE-5 detetados nas amostras que se concluiu estarem adulteradas, verificou-se que os níveis adicionados são da ordem de grandeza da dosagem utilizada nos medicamentos sujeitos a receita médica usados para o tratamento da disfunção erétil. Desta forma, a utilização do detetor FLD, ao qual está associado uma maior seletividade e sensibilidade, não apresenta vantagens significativas face à utilização do DAD. Contudo, a utilização do detetor FLD poderá eventualmente permitir a deteção destes compostos em níveis vestigiais, quando a presença destes resulte de uma contaminação.

Tendo-se procedido ao estudo dos parâmetros de validação do método, tais como a gama de linearidade e curvas de calibração, precisão, exatidão (ensaios de recuperação), limite de deteção e limite de quantificação, verificou-se que de uma forma geral o método demonstrou ser adequado para a deteção e quantificação dos compostos em estudo.

Os resultados obtidos pela avaliação dos parâmetros necessários para a validação do método, confirmam a adequabilidade do procedimento analítico para a identificação e quantificação de inibidores da PDE-5 em SABP. Desta forma, posteriormente o método foi aplicado à análise de amostras comerciais. Das 12 amostras de SABP analisadas pelo método de HPLC-DAD-FLD desenvolvido e validado, verificou-se a adulteração de 7 destas amostras, sendo que os principais inibidores da PDE-5 encontrados foram o SIL, TAD e THS.

Através desta metodologia analítica foi ainda possível detetar a presença de um composto não identificado, o qual pode eventualmente tratar-se de um análogo do SIL uma vez que apresenta similaridades com o espectro UV do padrão de THS, o qual é também um análogo do sildenafil. Para confirmação da identidade deste composto, seria necessário proceder a estudos adicionais, tais como procedeu ao seu isolamento e

avaliação da estrutura química por RMN e/ou espectrometria de massa de alta resolução. Sendo o método de HPLC-DAD-FLD proposto neste trabalho um método de *screening*, refira-se ainda que todos os compostos detetados nas amostras deverão idealmente ser sujeitos a análise por outras técnicas que permitam realizar a sua identificação inequívoca, tal como espectrometria de massa.

As quantidades de adulterantes presentes nos 7 SABP adulterados, foram detetadas em valores de 25,7 (TAD), 92,0 (THS), 32,7 (SIL), 91,3 (ASIL) mg por cápsula ou tira sublingual. De uma forma geral, os níveis detetados nas amostras são similares aqueles usados na dosagem dos medicamentos usados para a disfunção erétil (para o princípio ativo correspondente) o que denota uma adulteração intencional com o propósito de fornecer o efeito desejado/publicitado para o produto em causa.

Através dos resultados obtidos podemos afirmar, mais uma vez, que os suplementos alimentares à base de plantas, nem sempre são seguros pois embora aleguem que são “naturais” muitos deles encontram-se adulterados com substâncias não rotuladas, podendo ser prejudiciais para a saúde dos consumidores. Neste caso em particular, é especialmente perigoso o consumo de SABP adulterados com inibidores da PDE-5 por parte de consumidores com doenças cardiovasculares e que estejam medicados com nitratos ou  $\alpha$ -bloqueadores.

Por último, conclui-se que o método otimizado e validado (HPLC-DAD-FLD) pode ser aplicado em análises de rotina no controlo de qualidade de suplementos alimentares à base de plantas, permitindo o *screening* dos inibidores da PDE-5 incluídos neste estudo. Sendo a espectrometria de massa um método mais moroso e que requer que a análise seja efetuada por técnicos especializados em equipamentos de custo muito superior comparativamente ao equipamento de HPLC-DAD, o método proposto apresenta vantagens ao ser utilizado como método de *screening*, principalmente quando um grande número de amostras tem que ser analisada num curto espaço de tempo, devendo contudo proceder-se à confirmação inequívoca da identidade dos compostos detetados por metodologias adicionais.

## **5. Referências Bibliográficas**

- Abourashed EA, Abdel-Kader MS, Habib AAM. HPTLC determination of sildenafil in pharmaceutical products and aphrodisiac herbal preparations. *J Planar Chromat* 2005. 18:372-376.
- Ariburnu E, Uludag MF, Yalcinkaya H, Yesilada E. Comparative determination of sibutramine as an adulterant in natural slimming products by HPLC and HPTLC densitometry. *J Pharma Biomed Anal* 2012. 64-65:77-81.
- Bechara A, Casabé A, De Bonis W, Helien A, Bertolino MV. Recreational use of phosphodiesterase type 5 inhibitors by healthy young men. *J Sex Med* 2010. 7:3736-3742.
- Cai Y, Cai T, Shi Y, Cheng X, Ma L, Ma S, et al. Simultaneous determination of eight PDE5-is potentially adulterated in herbal dietary supplements with TLC and HPLC-PDA-MS methods. *J Liq Chromatogr R T* 2010. 76:37-41.
- Campbell N, Clark JP, Stecher VJ, Thomas JW, Callanan AC, Donnelly BF, et al. Adulteration of purported herbal and natural sexual performance enhancement dietary supplements with synthetic phosphodiesterase type 5 inhibitors. *J Sex Med* 2013. 10:1842-1849.
- Champagne AB, Emmel KV. Rapid screening test for adulteration in raw materials of dietary supplements. *Vib Spectrosc* 2011. 55:216-223.
- Chen Y, Zhao L, Lu F, Yu Y, Chai Y, Wu Y. Determination of synthetic drugs used to adulterate botanical dietary supplements using QTRAP LC-MS/MS. *Food Addit Contam* 2009. 26:595-603.
- Codevilla CF, Castilhos TD, Bergold AM. A review of analytical methods for the determination of four new phosphodiesterase type 5 inhibitors in biological samples and pharmaceutical preparations. *Braz J Pharm Sci* 2013. 49:1-12.
- Damiano F, Silva C, Gregori A, Vacondio F, Mor M, Menozzi M. et al. Analysis of illicit dietary supplements sold in the italianmarket: Identification of a sildenafil thioderivative as adulterant using UPLC–TOF/MS and GC/MS. *Sci Justice* 2014. 54:228-237.
- Di Lorenzo C, Ceschi A, Kuferschmidt H, Lüde S, Nascimento ED, Dos Santos A, et al. Adverse effects of plant food supplements and botanical preparations: a systematic review with critical evaluation of causality. *Br J Clin Pharmacol* 2014. 79:578-592.
- Directive 2002/46/EC of the European Parliament and of the Council of 10 June 2002 on the Approximation of the Laws of the Member States Relating to Food Supplements. *Off J Eur Comm*. L138:51–57.

- Directive 2004/24/EC of the European Parliament and of the Council of 31 March 2004 amending, as regards traditional herbal medicinal products, Directive 2001/83/EC on the Community code relating to medicinal products for human use. Off J Eur Comm. L136:85-90.
- Dorsey PJ, Hellstrom WJG. The illicit sale of medications for the treatment of erectile dysfunction. *Medscape Urology* 2007. *In press*
- Dorsey WJG. The illicit sale of medications for the treatment of erectile dysfunction: PDE5 inhibitors: a prime target for counterfeiters. *Science Daily* 2010. *In press*
- Egan B, Hodgkins C, Shepherd R, Timotijevic L, Raats M. An overview of consumer attitudes and beliefs about plant food supplements. *Food Funct* 2011. 2:747-752.
- European Medicines Agency (EMA). European public assessment reports. 2015.
- Eussen SRBM, Verhagen H, Klungel OH, Garssen J, Loveren HV, Kranen HJ, et al. Functional foods and dietary supplements: products at the interface between pharma and nutrition. *Eur J Pharmacol* 2011. 662:2-9.
- Fejos I, Gábor N, Szabolcs B, Jankovics P. Qualitative and quantitative analysis of PDE-5 inhibitors in counterfeit medicines and dietary supplements by HPLC-UV using sildenafil as a sole reference. *J Pharma Biomed Anal* 2014. 98:327-33.
- Food and Drug Administration (FDA). HIGHLIGHTS OF PRESCRIBING INFORMATION Viagra® Disponivel em [http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/label/2008/021368s011lbl.pdf](http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2008/021368s011lbl.pdf) (acedido em 16/10/2015a)
- Food and Drug Administration (FDA). Tainted Supplements CDER. 2015b.
- Garcia-Alvarez A, Egan B, de Klein S, Dima L, Maggi FM., Isoniemi M, et al. Usage of plant food supplements across six european countries: findings from the PlantLIBRA consumer survey. *PLoS one* 2014. 9:e92265.
- Geyer H, Parr MK, Koehler K, Mareck U, Schanzer W, Thevis M. Nutritional supplements cross-contaminated and faked with doping substances. *J Mass Spectrom* 2008. 43:892-902.
- Gilard V, Blayssa S, Tinaugus A, Martins N, Martino R, Malet-Martino M. Detection, identification and quantification by <sup>1</sup>H NMR of adulterants in 150 herbal dietary supplements marketed for improving sexual performance. *J Pharm Biomed Anal* 2015. 102:476-493.
- Gratz SR, Flurer CL, Wolnik K. Analysis of undeclared synthetic phosphodiesterase-5 inhibitors in dietary supplements and herbal matrices by LC-ESI-MS and LC-UV. *J Pharm Biomed Anal* 2004. 36:525-533.

- Gur S, Kadowitz PJ, Gokce A, Sikka SC, Lokman U, Hellstrom JG. Update on drug interactions with phosphodiesterase-5 inhibitors prescribed as first-line therapy for patients with erectile dysfunction or pulmonary hypertension. *Curr Drug Metab* 2013. 14:265-269.
- Harris DC. *Quantitative chemical analysis*. 8<sup>th</sup> ed, W.H. Freeman and Company. 2010
- Hou P, Zou P, Low MY, Chan E, Koh HL. Structural identification of a new acetildenafil analogue from pre-mixed bulk powder intended as a dietary supplement. *Food Addit Contam A* 2006. 23:870-875.
- International Conference on Harmonization (ICH), Q2(R1): Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology. 2005
- Jankovics P, Lohner S, Darcsi A, Németh-Patlotás J, Béni S. Detection and structure elucidation of hydroxythioildenafil as an adulterant in a herbal dietary supplement. *J Pharm Biomed Anal* 2013. 74:83-91.
- Kiertscher E, DiMarco NM. Use and rationale for taking nutritional supplements among collegiate athletes at risk for nutrient deficiencies. *Perform Enhancement Health* 2013. 2:24-29.
- Korkes F, Costa-Matos A, Gasperini R, Reginato PV, Perez MDC. Recreational use of PDE5 inhibitors by young healthy men: Recognizing this issue among medical students. *J Sex Med* 2008. 5:2414-2418.
- Lebel P, Gagnon J, Furtos A, Waldron KC. A rapid, quantitative liquid chromatography-mass spectrometry screening method for 71 active and 11 natural erectile dysfunction ingredients present in potentially adulterated or counterfeit products. *J Chromatogr A* 2014. 1343:143-151.
- Lee ES, Lee JH, Han KM, Kim JW, Hwang IS, Cho S, et al. Simultaneous determination of 38 phosphodiesterase-5 inhibitors in illicit erectile dysfunction products by liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal* 2013a. 83:171-178.
- Lee HM, Kim CS, Jang YM, Kwon SW, Lee B. Separation and structural elucidation of a novel analogue of sildenafil included as an adulterant in a dietary supplement by liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry, infrared spectroscopy and nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J Pharm Biomed Anal* 2011. 54:491-496.
- Lee JH, Kim NS, Han KM, Kim SH, Cho S, Kim WS. Monitoring by LC-MS/MS of 48 compounds of sildenafil, tadalafil, sildenafil and their analogues in illicit health food products in the Korean market advertised as enhancing male sexual performance. *Food Addit Contam A* 2013b. 30:1849-1857.

- Liang Q, Qu J, Luo, Wang GY. Rapid and reliable determination of illegal adulterant in herbal medicines and dietary supplements by LC/MS/MS. *J Pharm Biomed Anal* 2006. 40:305-311.
- Huber L. Validation of analytical methods. Agilent Technologies. 2010
- Ng CS, Law TY, Cheung YK, Ng PC, Choi KK. Development of a screening method for the detection of analogues of sildenafil and vardenafil by the use of liquid chromatograph coupled with triple quadrupole linear ion trap mass spectrometer. *Anal Methods* 2010. 2:890-896.
- Nielsen MW, Hansen EH, Rasmussen NK. Use of natural medicines in the Danish population: a national cross-sectional survey. *Ann Pharmacother* 2005. 39:1534-1538.
- Odoardi S, Castrignano E, Martello S, Chiarotti M, Strano-Rossi S. Determination of anabolic agents in dietary supplements by liquid chromatography-high-resolution mass spectrometry. *Food Addit Contam A* 2015. 32:635-647.
- Ortiz RS, Antunes MV, Linden R. Determinação de citrato de sildenafil e de tadalafila por cromatografia líquida de ultraeficiência com detecção por arranjo de diodos (Clue-Dad). *Quim Nova* 2010. 33:389-93.
- Patel DN, Lin L, Kee C, Ge X, Low M, Koh H. Screening of synthetic PDE-5 inhibitors and their analogues as adulterants: analytical techniques and challenges. *J Pharm Biomed Anal* 2014. 87:176-190.
- Patterson R, Mabe P, Mitchell EN, Cory W. Lifestyle illicit drug seizures: A routine ESI-LC-MS method for the identification of sildenafil and vardenafil. *Forensic Sci Int* 2012. 222:83-88.
- Perkin JE, Wilson WJ, Schuster K, Rodriguez J, Allen-Chabot A. Prevalence of nonvitamin, nonmineral supplement usage among university students. *J Am Diet Assoc* 2002. 102:412-414.
- Petroczi A, Naughton DP, Pearce G, Bloodworth A, Bailey R, McNamee M. Nutritional supplement use by elite young UK athletes: fallacies of advice regarding efficacy. *J Int Soc Sports Nutr* 2008. 5:22.
- Petroczi A, Taylor G, Naughton DP. Mission impossible? Regulatory and enforcement issues to ensure safety of dietary supplements. *Food Chem Toxicol* 2011. 49:393-402.
- Poplawska M, Blazewicz A, Bukowinska K, Fijalek Z. Application of high-performance liquid chromatography with charged aerosol detection for universal quantitation of undeclared phosphodiesterase-5 inhibitors in herbal dietary supplements. *J Pharm Biomed Anal* 2013. 84:232-243.

- Radimer K, Bindewald B, Hughes J, Ervin B, Swanson C, Picciano MF. Dietary supplement use by US adults: data from the National Health and Nutrition Examination Survey, 1999–2000. *Am J Epidemiol* 2004. 160:339-349.
- Rapaka RS, Coates PM. Dietary supplements and related products: A brief summary. *Life Sci* 2006. 78:2026-2032.
- Reeuwijk NM, Venhuis BJ, de Kaste D, Hoogenboom LAP, Rietjens, IMCM, Martena MJ. Sildenafil and analogous phosphodiesterase type 5 (PDE-5) inhibitors in herbal food supplements sampled on the Dutch market. *Food Addit Contam A* 2013. 30:2027-2034.
- Regulation (EC) No 178/2002 of the European Parliament and of the Council of 28 January 2002 laying down the general principles and requirements of food law, establishing the European Food Safety Authority and laying down procedures in matters of food safety. *Off J Eur Comm*. L31:1-24.
- Regulation (EC) No 1881/2006 of the European Parliament and of the Council of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. *Off J Eur Comm*. L364:5-24.
- Regulation (EC) No 258/97 of the European Parliament and of the Council of 27 January 1997 concerning novel foods and novel food ingredients. *Off J Eur Comm*. L43:1-6.
- Regulation (EC) No 852/2004 of the European Parliament and of the Council of 29 April 2004 on the hygiene of foodstuffs. *Off J Eur Comm*. L139:1.
- Ren Y, Wu C, Zhang J. Simultaneous screening and determination of 18 illegal adulterants in herbal medicines and health foods for male sexual potency by ultra-fast liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J Sep Sci* 2012. 35:2847-2857.
- Ribani M, Bottoli C, Collins C, Jardim I, Melo L. Validation for chromatographic and electrophoretic methods. *Quim Nova* 2004. 27:5:777-780.
- Ritchie MR. Use of herbal supplements and nutritional supplements in the UK: what do we know about their pattern of usage? *P Nutr Soc* 2007. 66:479-482.
- Sacré P, Deconinck E, Chiap P, Crommen J, Mansion F, Rozet E, et al. Development and validation of a ultra-high-performance liquid chromatography-UV method for the detection and quantification of erectile dysfunction drugs and some of their analogues found in counterfeit medicines. *J Chromatogr A* 2011. 1218:6439-6447.
- Sanzini E, Badea M, Dos Santos A, Restani P, Sievers H. Quality control of plant food supplements. *Food Funct* 2011. 2:740-746.

- Savaliya AA, Shan RP, Prasad B, Singh S. Screening of indian aphrodisiac ayurvedic/herbal healthcare products for adulteration with sildenafil, tadalafil and/or vardenafil using LC/PDA and extracted ion LC-MS/TOF. *J Pharm Biomed Anal* 2010. 52:406-9.
- Schaffer DM, Gordon NP, Jensen CD, Avins AL. Nonvitamin, nonmineral supplement use over a 12-month period by adult members of a large health maintenance organization. *J Am Diet Assoc* 2003. 103:1500-1505.
- Schnetzler G, Banks I, Kirby M, Zou KH, Symonds T. Characteristics, Behaviors and attitudes of men bypassing the healthcare system when obtaining phosphodiesterase type 5 inhibitors. *J Sex Med* 2010. 7:1237-1246.
- Schramek N, Wollein U, Eisenreich W. Identification of new synthetic PDE-5 inhibitors analogues found as minor components in a dietary supplement. *J Pharm Biomed Anal* 2014. 96:45-53.
- Schwartz BG, Kloner RA. Drug interaction with phosphodiesterase-5 inhibitors used for the treatment of erectile dysfunction or pulmonary hypertension. *Circulation* 2010. 122:88-95.
- Silano V, Coppens P, Larrañaga-Guetaria A, Minghetti P, Roth-Ehrang R. Regulations applicable to plant food supplements and related products in the European Union. *Food Funct* 2011. 2:710-719.
- Singh S, Prasad B, Savaliya AA., Shah R P, Gohil VM, Kaur A. Strategies for characterizing sildenafil, vardenafil, tadalafil and their analogues in herbal dietary supplements, and detecting counterfeit products containing these drugs. *Trac Trend Anal Chem* 2009. 28:13-28.
- Strano-rossi S, Odoardi S, Castrignanò E, Serpelloni G, Chiarotti M. Liquid chromatography–high resolution mass spectrometry (LC–HRMS) determination of stimulants, anorectic drugs and phosphodiesterase 5 inhibitors (PDE5I) in food supplements. *J Pharm Biomed Anal* 2015. 106:144-152.
- Sullivan D, Crowley R. Development and validation of analytical methods for dietary supplements. *Toxicology* 2006. 221: 28-34.
- Toomey VM, Litzau JJ, Flurer CL. Isolation and structural characterization of two tadalafil analogs found in dietary supplements. *J Pharm Biomed Anal* 2012. 59:50-57.
- United States of America. Dietary Supplement Health and Education Act of 1994. 1994.
- Vaclavik L, Krynitsky AJ, Rader JI. Targeted analysis of multiple pharmaceuticals, plant toxins and other secondary metabolites in herbal dietary supplements by ultra-high performance liquid chromatography-quadrupole-orbital ion trap mass spectrometry. *Anal Chim Acta* 2014a. 810:45-60.

- Vaclavik L, Krynitsky AJ, Rader JI. Mass spectrometric analysis of pharmaceutical adulterants in products labeled as botanical dietary supplements or herbal remedies: a review. *Anal Bioanal Chem* 2014b. 406:6767-6790.
- Vargas-Murga L, Garcia-Alvarez A, Roman-Viñas B, Ngo J, Ribas-Barba L, Van den Berg SJPL, et al. Plant food supplement (PFS) market structure in EC member states, methods and techniques for the assessment of individual PFS intake. *Food Funct* 2011. 2:731-739.
- Vaysse J, Gilard V, Balayssac S, Zedde C, Martino R, Malet-Martino M. Identification of a novel sildenafil analogue in an adulterated herbal supplement. *J Pharm Biomed Anal* 2012. 59:58-66.
- Venhuis BJ, de Kaste D. Towards a decade of detecting new analogues of sildenafil, tadalafil and vardenafil in food supplements: A history, analytical aspects and health risks. *J Pharm Biomed Anal* 2012. 69:196-208.
- Venhuis BJ, Vredenburg MV, Kaun N, Maurin JK., Fijalek Z, de Kaste D. The identification of rimonabant polymorphs, sibutramine and analogues of both in counterfeit acomplia bought on the internet. *J Pharm Biomed Anal* 2011b. 54:21-26.
- Venhuis BJ, Zomer G, Hamzink M, Mering HD, Aubin Y, de Kaste, D. The identification of a nitrosated prodrug of the PDE-5 inhibitor aildenafil in a dietary supplement: A viagra with a pop. *J Pharm Biomed Anal* 2011a. 54:735-741.
- Wheatley VM, Spink J. Defining the public health threat of dietary supplement fraud. *Compr Rev Food Sci F* 2013. 12:599-613.
- Wollein U, Eisenreich W, Schramek N. Identification of novel sildenafil-analogues in an adulterated herbal food supplement. *J Pharm Biomed Anal* 2011. 56:705-712.
- Zhang G, Yu Y, Wu X, Li J. Separation and structural elucidation of a new tadalafil analogue diethylaminopretadalafil included as an adulterant in a dietary supplement. *J Pharm Biomed Anal* 2014. 94:210-214.
- Zhang Y, Huang Z, Ding L, Yan H, Wang M, Zhu S. Simultaneous determination of yohimbine, sildenafil, vardenafil and tadalafil in dietary supplements using high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Sep Sci* 2010. 33:2109-2114.
- Zou P, Hou P, Oh SS, Chong YM, Bloodworth BC, Low M, et al. Isolation and identification of thiohomosildenafil and thiosildenafil in health supplements. *J Pharm Biomed Anal* 2008. 47:279-284.