

AVALIAÇÃO QUÍMICA E TOXICOLÓGICA DE FORMULAÇÕES DE AGENTES ANABÓLICOS APREENDIDAS PELA POLICIA FEDERAL

LUCAS BERNEIRA¹; LUAN PASSOS¹; CAROLINE VERGARA¹; NATALIA GOULART¹; THALIA MACHADO¹; CLAUDIO DE PEREIRA².

¹Universidade Federal de Pelotas – lucas.berneira@hotmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – claudiochemistry@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

Os esteroides anabolizantes androgênicos (EAAs) compreendem uma classe química de derivados sintéticos da testosterona que são conhecidos pelo seu uso ilícito por atletas profissionais e recreativos. Estes compostos podem ser encontrados em várias formulações incluindo, por exemplo, soluções oleosas, suspensões aquosas ou comprimidos (BERNEIRA et al., 2019). Devido ao seu amplo uso ilícito e seu risco à saúde, os agentes anabólicos são controlados em todo o mundo nos quais sua distribuição e consumo ilegal são caracterizados como crime (BERNEIRA et al., 2020a).

Nos últimos anos, as formulações de EAAs têm sido extensivamente apreendidas por órgãos de segurança pública. A maioria destas formulações são materiais falsificados que, de acordo com a Organização Mundial da Saúde, podem ser compostos de drogas erroneamente rotuladas e/ou quimicamente adulteradas (NEVES e CALDAS, 2017). É sabido que os agentes anabólicos falsificados ampliam os efeitos colaterais associados ao uso de esteroides sintéticos que incluem, por exemplo, lesão hepática, insuficiência cardíaca, distúrbios psicológicos, risco de infecção entre outras possíveis reações fisiológicas adversas (VAN AMSTERDAM et al., 2010).

Uma vez apreendidos, os EAAs são submetidos a procedimentos analíticos para que sua constituição química seja estabelecida e, assim, sejam determinados compostos que tenham possíveis danos à saúde do usuário (BERNEIRA et al., 2020b). De acordo com a literatura, técnicas como Cromatografia Gasosa e a Espectrometria de Massas são as ferramentas analíticas mais comumente utilizadas para a análise de formulações de EAAs (BERNEIRA et al., 2020c). Além disso, os agentes anabólicos podem ter sua ação biológica estudada por modelos *in vitro* e *in vivo* conforme descrito por ZELEROTH et al. (2019) e BASILE et al (2019). No entanto, os modelos relatados nesses estudos se utilizam de esteroides isolados de forma que não avaliam o efeito em conjunto da formulação com o EAA.

Conforme mencionado anteriormente, a análise das formulações o AASs são importantes para verificar os riscos à saúde associados ao uso dessas substâncias. Cabe ressaltar que estudos anteriores não avaliaram o efeito toxicológico das formulações de forma que potenciais riscos à saúde causados por formulações ainda são raramente estudadas pela literatura (ZELEROTH et al., 2019). Nesse sentido, os objetivos deste estudo foram de analisar formulações de agentes anabólicos apreendidas pela Polícia Federal por Cromatografia Gasosa-Espectrometria de Massas (GC-MS) e determinar sua citotoxicidade por meio de ensaio de viabilidade celular.

2. METODOLOGIA

2.1. AMOSTRAGEM E ANÁLISE QUÍMICA

As amostras foram obtidas na Polícia Federal após uma apreensão realizada no estado do Rio Grande do Sul em 2019. Para a análise

cromatográfica, 25 µL das formulações foram diluídas em 1 mL de clorofórmio seguindo o método de NEVES e CALDAS. (2017). As amostras foram agitadas por 1 min e posteriormente injetadas em um cromatógrafo a gás acoplado a um espectrômetro de massas de modelo QP2020 (Shimadzu, Kyoto, Japão) usando fluxo de gás hélio e uma coluna capilar RTx-5MS (Restek, Bellefonte, EUA). A identificação dos constituintes das amostras foi através da biblioteca NIST-17. As análises foram realizadas em triplicata ($n=3$).

2.2. ANÁLISE TOXICOLÓGICA

O ensaio citotóxico das formulações foi realizado utilizando células Madin Darby de rim bovino (MDBK) cultivadas a 37 °C em meio essencial suplementado com soro fetal bovino (10%, v/v) em uma atmosfera contendo 5% de gás carbônico e 95% de ar umidificado. Os experimentos foram realizados em triplicata ($n=3$) e repetidos duas vezes em experimentos independentes utilizando soluções das formulações em meio essencial de 0,5, 0,25, 0,125 e 0,062 mg.mL⁻¹. Os óleos de soja e de amendoim assim como células sem tratamento com agentes anabólicos foram utilizados como controles negativos.

Subsequentemente a este procedimento, as células foram incubadas sob as mesmas condições de temperatura e atmosféricas descritas anteriormente durante 24 h. Após esse período, 50 µL de uma solução aquosa de MTT (1 mg.mL⁻¹) foram aplicados nas placas as quais foram novamente incubadas por 3 h. Posteriormente, o sobrenadante foi removido e os cristais formados foram solubilizados em 100 µL de DMSO sendo, por fim, analisadas em um espectrofotômetro em 540 nm (PICOLI et al., 2015). As diferenças estatísticas nas viabilidades celulares foram avaliadas por Análise de Variância seguida por teste post-hoc de Tukey ($p<0,05$) usando o software Graphpad (La Jolla, EUA).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise cromatográfica (**Figura 1**) indicou que a maioria das formulações eram materiais falsificados, pois os componentes indicados no rótulo não foram detectados na análise química. As exceções foram para os Produtos #1, #2 e #3 nos quais a substância química ativa (estanozolol, ésteres de testosterona e cipionato de testosterona, respectivamente) foi encontrada. Nesse sentido, para o Produto #4 o qual deveria conter decanoato de nandrolona foi detectado undecilenato de boldenona.

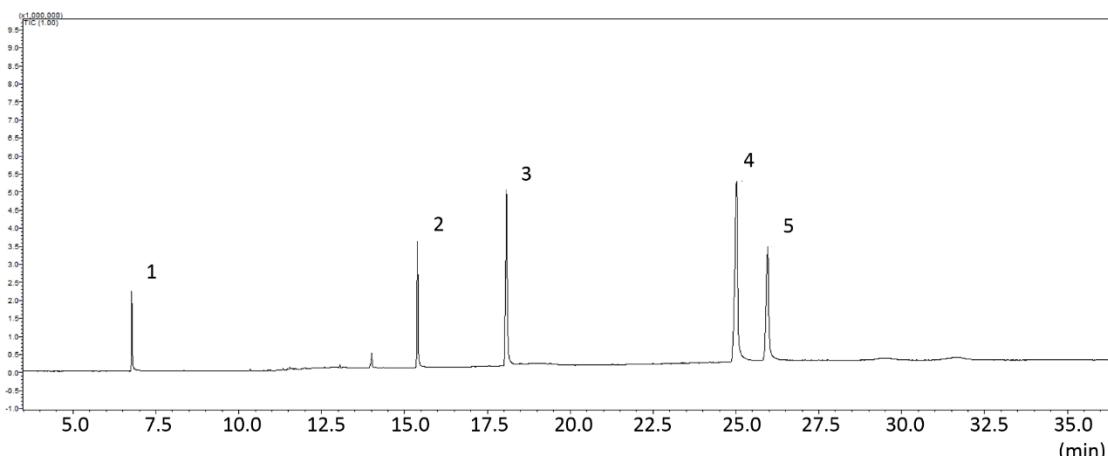


FIGURA 1. Cromatograma representativo do Produto #2 (1 – álcool benzílico; 2 – propionato de testosterona; 3 – isocaproato de testosterona; 4 – decanoato de testosterona; 5 – fenilpropionato de testosterona).

Para os Produtos #5 e #6 foi observada a mesma tendência de falsificação de forma que suas formulações continham ésteres de testosterona e propionato de testosterona, respectivamente). Por fim, nenhum ingrediente ativo foi encontrado nos Produtos #7, #8 e #9, que eram compostos apenas por excipientes. Geralmente, álcool benzílico, benzoato de benzila e linóleo de benzila foram os excipientes encontrados na maioria das amostras além dos óleos vegetais de soja e de amendoim.

Estudos anteriores indicam que de um terço à metade das formulações apreendidas de EAAs por órgãos de segurança pública são falsificadas (BERNEIRA et al., 2019; NEVES e CALDAS, 2017). Neste estudo, um terço das amostras foram falsificadas pela presença de outros esteroides sintéticos não declarados na composição ou pela ausência do ingrediente ativo rotulado. Essas formulações ilícitas são conhecidas por causar efeitos nocivos ao usuário devido ao processo de fabricação não atender normas sanitárias ou controle de qualidade (BERNEIRA et al., 2020a).

O ensaio toxicológico de viabilidade celular (**Tabela 1**) indicou que a maioria dos agentes anabólicos apresentou citotoxicidade para células MDBK na máxima concentração testada de $0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$. Geralmente, a toxicidade diminui proporcionalmente à concentração da amostra atingindo uma viabilidade máxima na mínima concentração testada de $0,062 \text{ mg.mL}^{-1}$. Como pode ser observado no ensaio toxicológico, os Produtos #3, #8 e #9 foram as formulações com maior citototoxicidade a $0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ em comparação com as outras amostras. Os óleos de soja e amendoim não influenciaram significativamente a viabilidade celular que se manteve em seu valor máximo.

TABELA 1. Viabilidade celular (%) em função do tratamento com diferentes concentrações de formulações de agentes anabólicos.

Produto	Concentração (mg.mL^{-1})				Viabilidade celular (%)
	0,500	0,250	0,125	0,062	
#1	78.91 ± 1.17^a	100 ± 0.00^b	100 ± 0.00^b	100 ± 0.00^b	
#2	94.40 ± 4.77^a	96.80 ± 0.24^{ab}	98.38 ± 0.62^{ab}	100 ± 0.00^b	
#3	5.67 ± 0.25^a	62.47 ± 0.00^b	91.82 ± 4.78^c	100 ± 0.00^d	
#4	86.82 ± 1.55^a	87.37 ± 4.95^a	94.17 ± 0.00^b	99.79 ± 0.12^b	
#5	77.34 ± 2.03^a	97.16 ± 0.79^b	100 ± 0.00^b	100 ± 0.00^b	
#6	100 ± 0.00^a	100 ± 0.00^a	100 ± 0.00^a	100 ± 0.00^a	
#7	78.91 ± 1.17^a	85.16 ± 3.15^b	89.99 ± 3.73^c	99.30 ± 0.60^d	
#8	0.00 ± 0.00^a	8.05 ± 3.76^b	63.90 ± 3.72^c	100 ± 0.00^d	
#9	0.00 ± 0.00^a	3.79 ± 0.67^a	44.35 ± 3.54^c	85.51 ± 4.60^d	

Resultados expressos em média \pm desvio padrão. Sobrescritos diferentes em cada linha foram estatisticamente diferentes no Teste de Tukey ($p<0,05$).

Tal comportamento observado nas amostras através do ensaio toxicológico também foi previamente encontrado por outros estudos que aplicaram EAAs isolados em culturas de células. Esse dano pode ser causado pela indução direta da apoptose produzida pela exposição da cultura de células aos esteroides sintéticos (BASILE et al., 2013). Além disso, tem sido indicado que o consumo de agentes anabólicos também pode resultar em genotoxicidade e carcinogenicidade dependendo da dose e do tempo de exposição bem como de fatores genéticos e epigenéticos (ZELEROTH et al., 2019).

Através desse estudo, se observou que concentração de EAAs desempenhou um papel importante na citotoxicidade das amostras. Um padrão

semelhante também foi indicado por ZELLEROTH et al (2019), que aplicou vários agentes anabólicos em concentrações de 100, 30 e 10 µM em células corticais primárias de ratos. Os produtos #7, #8 e #9 que não tiveram suas substâncias químicas ativas detectadas também foram citotóxicos sendo que, nesses casos, seus excipientes ou adulterantes possivelmente causaram redução na viabilidade das células MDBK. Diante disso, os resultados foram condizentes com estudos anteriores os quais indicaram que as formulações falsificadas podem apresentar risco à saúde devido aos seus componentes e concentrações de substâncias incertas (NEVES e CALDAS, 2017; BERNEIRA et al., 2020b).

4. CONCLUSÕES

O presente estudo demonstrou que os agentes anabólicos analisadas geralmente tinham uma constituição diferente da indicada no rótulo bem como apresentaram uma considerável citotoxicidade nas condições testadas. Nesse sentido, se pode concluir que as formulações ilegais de EAAs podem causar extensos danos à saúde do usuário.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BASILE, J.R.; NINMADI, N.O.; ZHOU, H.; YANG, Y.; PAOLI, P.; PROIA, P. Supraphysiological doses of performance enhancing anabolic-androgenic steroids exert direct toxic effects on neuron-like cells. *Front. Cell. Neurosci.* .v.7, p.1–10, 2013.
- BERNEIRA, L.M.; FREITAS, S.C.; SILVA, C.C.; MACHADO, A.M.; PEREIRA, C.M.P.; SANTOS, M.A.Z. Application of differential scanning calorimetry in the analysis of apprehended formulations of anabolic androgenic steroids. *Forensic Sci. Int.* v. 296, p.15–21, 2019.
- BERNEIRA, L.M.; SILVA, C.C.; PASSOS, L.F.; POLETTI, T.; SANTOS, M.A.Z.; PEREIRA, C.M.P. Analytical approaches applied to the analysis of apprehended formulations of anabolic androgenic steroids. *Drug Test. Anal.* 2020a.
- BERNEIRA, L.M.; RITTER, M.; SILVA, C.C.; POLETTI, T.; PASSOS, L.F.; SANTOS, M.A.Z.; PEREIRA, C.M.P. Extraction and identification of formulations of anabolic androgenic steroids: a forensic educational approach. *Quim Nova*. 2020b.
- BERNEIRA, L.M.; SANTOS, M.A.Z.; SILVA, C.C.; PASSOS, L.F.; ORTIZ, R.S.; MACHADO, A.M.; PEREIRA C.M.P. Evaluation of extraction procedures applied to apprehended formulations of agrochemicals. *Chem. Pap.* v.74, p.2759–2768, 2020c.
- NEVES, D.B.J.; CALDAS, E.D. GC–MS quantitative analysis of black market pharmaceutical products containing anabolic androgenic steroids seized by the Brazilian Federal Police. *Forensic Sci. Int.* v.275, p.272–281, 2017.
- PICOLI, T.; BARBOSA, J.S.; VARGAS, G.D.; HUBNER, S.O.; FISCHER, G. Toxicidade e eficiência do dimetilsulfoxíco (DMSO) no congelamento de células Madin-Darby Bovine Kidney (MDBK). *Sci. Anim. Heal.* v.3 p.159–168, 2015.
- VAN AMSTERDAM, J.; OPPERHUIZEN, F.; HARTGENS, F. Van Amsterdam, A. Opperhuizen, F. Hartgens, Adverse health effects of anabolic – androgenic steroids. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* v.57, p.117–123, 2010.
- ZELEROTH, S.; NYLANDER, E.; NYBERG, A.; GRONBACH, A.; HALLBERG, M. Toxic Impact of Anabolic Androgenic Steroids in Primary Rat Cortical Cell Cultures. *Neuroscience*. v. 397, p. 172–183, 2019.