UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE – UFCSPA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

Masurquede de Azevedo Coimbra

Análise química de esteroides anabolizantes androgênicos apreendidos pela Secretaria da Receita Federal em correspondências veiculadas no Rio Grande do Sul.

Porto Alegre
2021

Masurquede de Azevedo Coimbra

Análise química de esteroides anabolizantes androgênicos apreendidos pela Secretaria da Receita Federal em correspondências veiculadas no Rio Grande do Sul.

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre como requisito para a obtenção do grau de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Tiago Franco de Oliveira
Coorientadoras: Profa. Dra. Sandra Manoela Dias Macedo e Profa. Dra. Sarah Carobini Werner de Souza Eller de Oliveira

Porto Alegre

2021

Catalogação na Publicação

Coimbra, Masurquede de Azevedo
Análise química de esteroides anabolizantes androgênicos apreendidos pela Secretaria da Receita Federal em correspondências veiculadas no Rio Grande do Sul / Masurquede de Azevedo Coimbra. -- 2021.
90 p. : il. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) -- Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, 2021.

Orientador(a): Prof. Dr. Tiago Franco de Oliveira ; coorientador(a): Profa. Dra. Sandra Manoela Dias Macedo , Profa. Dra. Sarah Carobini Werner de Souza Eller de Oliveira.

1. Esteroides Anabolizantes Androgênicos. 2. Falsificação de Medicamentos. 3. Adulterações. 4. Técnicas Analíticas. 5. Espectrometria de Massas. I. Título.

Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da UFCSPA com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Posso ter todas as técnicas do mundo e ainda assim usá-las insensatamente. É preciso possuir, de antemão, a sabedoria em seu sentido ético para tirar o melhor proveito possível da técnica. Desse modo, quando questionado a respeito do bem, o técnico tende a responder de acordo com a opinião dominante, ou seja, de forma não crítica. Ele facilmente se torna um servo da ideologia, não guardião da mente livre
William Desmond

"Aprendi pouco.
Mas gostei de aprender.
E continuo aprendendo".
Juremir Machado, em Cotidiano.

AGRADECIMENTOS

À Deus pela oportunidade dessa passagem pela vida terrena;

Minha esposa Viviane Maura Rubert e nosso pequeno e amável filho Anthony;

A minha mãe Izaurina de Azevedo por me dizer que estudar era a coisa mais importante que deveria fazer e o que poderia me deixar como herança;

Ao meu orientador Professor Dr. Tiago Franco de Oliveira pela oportunidade de realizar um trabalho de mestrado em seu grupo de pesquisa de Espectrometria de Massas, onde tive ainda a oportunidade de unir minhas três áreas de graduação e por compreender as necessidades de tempo de quem tenta fazer uma pós-graduação à nível de mestrado trabalhando numa pandemia;

Às minhas coorientadoras professoras Sandra Macedo e Sarah Eller, que mesmo com dezenas de atividades como professoras e pesquisadoras encontraram tempo para apoio e orientação;

Ao pós-doutorando Fábio da Silva Barbosa pela ajuda nas análises espectrométricas, discussões técnicas e leituras de referências;

À colega de pós-graduação Camila Schidt pela ajuda nas análises espectrométricas e conversas no laboratório;

Ao professor Dr. Alexandre Fuentefria e seu Laboratório de Pesquisa em Micologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, pelas idéias e oportunidades de utilizar suas instalações para análise da presença de fungos nas amostras, e ainda ter tido a oportunidade de relembrar alguns fundamentos da Micologia e Microbiologia Clínica;

À pós doutora Gabriella da Rosa Monte Machado pela disponibilidade na realização das avaliações de esterelidade e microbiologia;

À coordenação, funcionários, professores e professoras da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA) que tive a oportunidade de conhecer;

Aos meus professores e professoras, por despertar a necessidade de buscar conhecimento e pelo incentivo ao trabalho.

RESUMO

A presença de esteroides anabólicos androgênicos (EAAs) em produtos comerciais ilegais tem sido apontada como uma ameaça global para a saúde pública. Devido à correlação com efeitos toxicológicos adversos, há um interesse crescente na implementação de métodos simples para a determinação de EAAs em produtos apreendidos. Este trabalho explorou o desenvolvimento de uma abordagem de espectrometria de massas para caracterizar as formulações ilegais de óleo contendo EAAs. A otimização do preparo da amostra foi realizada através de um desenho simplex-centróide e a melhor condição foi descrita a seguir: uma alíquota de 5 µL de amostra foi adicionada com 995 µL de acetonitrila e água (75:25, v/v). A solução foi agitada com vórtice e centrifugada. Em seguida, foram adicionados 10 µL de sobrenadante com 35 µL de acetonitrila e água e 5 µL de testosterona-d_3. Uma alíquota de 5 µL foi injetada no sistema analítico. O método desenvolvido foi validado e aplicado com sucesso em 115 amostras apreendidas. A testosterona e seus ésteres tiveram a maior incidência, encontrada em mais de 50% das amostras. Além disso, também foram encontrados fármacos como boldenona, metandienona e trembolona, onde a baixa qualidade das amostras foi evidenciada pela grande variação na concentração dos fármacos, sempre quantificada em subdoses. Por fim, pelo menos um EAAs foi detectado em cada amostra analisada. Os resultados estatísticos foram agrupados por análise de componentes principais, para melhor compreensão do perfil das amostras apreendidas. Concomitantemente, testes foram realizados para determinar a esterilidade das soluções testadas. Este trabalho estabeleceu com sucesso um método rápido e simples para determinação de EAAs e pode ser aplicado para verificar o perfil de amostras apreendidas.

Palavras-chave: EAAs, falsificação de medicamentos, adulteração, técnicas analíticas.

ABSTRACT

The presence of anabolic-androgenic steroids (AAS) in illegal commercial products has been pointed as a global threat for public health. Due the correlation with adverse toxicological effects, there is a growing interest in the implementation of straightforward methods for the determination of AAS in seized products. This work exploited the development of a mass spectrometry approach to characterize the illegal oil formulations containing AAS. The optimization of sample preparation was performed through a simplex-centroid design and the best condition was described as follow: an aliquot of 5 μL of sample were added with 995 μL of acetonitrile and water (75:25, v/v). The solution was vortexed and centrifuged. After that, 10 μL of supernatant were added with 35 μL of acetonitrile and water and 5 μL of testosterone-d_3. An aliquot of 5 μL was injected into the analytical system. The method developed was validated and successfully applied in 115 seized samples. Testosterone and its esters had the highest incidence, found in more than 50% of the samples. Besides that, drugs such as boldenone, methandienone, and trenbolone have also been found, where the low quality of the samples was evidenced by the wide variation in the concentration of the drugs, always quantified in sub-doses. Finally, at least one AAS was detected in each sample analyzed. The statistical results were grouped by principal components analysis, to better understand the profile of the seized samples. Concomitantly, tests were performed to determine the sterility of the tested solutions. This work successfully established a fast and simple method for determination of AAS and can be applied to verify the profile of seized samples.

Keywords: AAS, drug falsification, adulteration, analytical techniques.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIH	Autorização de Internação Hospitalar
AR	Receptor de androgênio, do inglês: *Androgen Receptor*
AREs	Elementos de resposta a andrógenos, do inglês: *Androgen Response Elements*
DHT	Diidrotestosterona
DPF	Departamento de Polícia Federal
DSC	Calorimetria de varredura diferencial, do inglês: *Differential Scanning Calorimetry*
EAAs	Esteroides anabólicos androgênicos
GC-MS	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas, do inglês: *Gas Chromatography coupled with Mass Spectrometry*
GH	Hormônio de crescimento humano, do inglês: *human growth hormone*
HCA	Análise hierárquica de agrupamentos, do inglês: *Hierachical Cluster Analysis*
IGF-I	Fator de crescimento semelhante à insulina 1, do inglês: *Insulin-like growth factor 1*
LC-MS/MS	Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas sequencial, do inglês: *Liquid Chromatography – Tandem Mass Spectrometry*
MCR	Resolução multivariada de curvas, do inglês: *Multivariate Curve Resolution*
m/z	Razão massa/carga
PARAFAC	Análise de fatores paralelos, do inglês: *Parallel Factor Analysis*
PCA	Análise de componentes principais, do inglês: *Principal Component Analisys*
PCR	Regressão por componentes principais, do inglês: *Principal Component Regression*
PLS-DA	Análise discriminante dos mínimos quadrados parcias, do inglês: *Partial Least Squares Discriminante Analysis*
RMN ^{1}H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
SIMCA	Modelagem suave independente de analogia de classe, do inglês: *Soft Independent Modeling of Class Analogy*

LISTA DE FIGURAS

SUMÁRIO

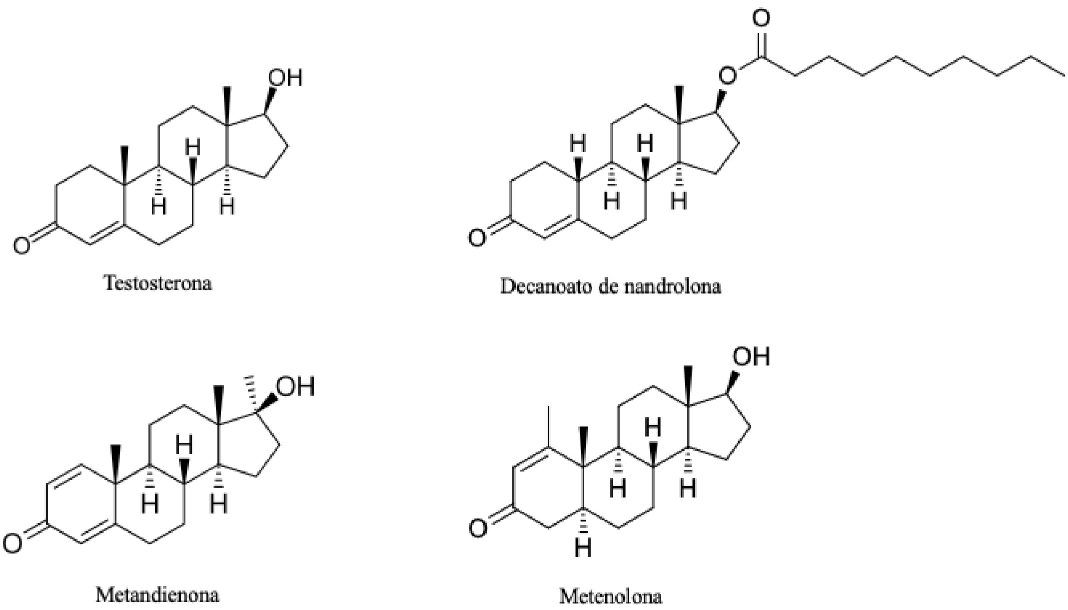
1. INTRODUÇÃO

1. 1. Esteroides Anabólicos Androgênicos

Os esteroides anabólicos androgênicos (EAAs), comumente conhecidos como esteroides anabolizantes, são um grande grupo de moléculas que incluem andrógenos produzidos endogenamente, como a testosterona, bem como outros derivados (ROMAN *et al.*, 2018; ALBANO *et al.*, 2021). Esses compostos apresentam estruturas químicas constituídas por quatro anéis com 17 átomos de carbono e, com exceção do ácido retinóico, são derivados do colesterol, formando 4 classes principais de esteroides hormônios naturais: andrógenos, corticoides, estrogênios e progestogênios. Os andrógenos contribuem para o desenvolvimento e manutenção de características sexuais secundárias masculinas. Os corticoides incluem os mineralocorticoides e glicocorticoides. O mineralocorticoide aldosterona, regula a pressão sanguínea, já o cortisol, glicocorticoide, age como imunossupressor e regula o aumento da glicose no sangue. Os estrogênios contribuem para o desenvolvimento e manutenção de características sexuais secundárias femininas, e a progesterona, progestogênios, regula as mudanças cíclicas do endométrio no útero e a manutenção da gravidez (BARCELOUX & PALMER, 2012).

A maioria dos EAAs sintéticos são derivados da testosterona ou de seus derivados, com modificações químicas no esqueleto androstano, introduzidas para melhorar as condições de biodisponibilidade e prolongar a duração de ação, enquanto outras modificações reduzem os efeitos androgênicos, aumentando a eficácia do esteroide sintético. As modificações da molécula testosterona incluem três métodos: esterificação no grupo C17β-hidroxila, alquilação na posição C17α e modificações no núcleo do esteroide (BARCELOUX, 2012). Testosterona, decanoato de nandrolona, metandienona e metenolona são os andrógenos mais comumente utilizados (PATANÈ *et al.,* 2020). Suas estruturas químicas são ilustradas na **Figura 1**.

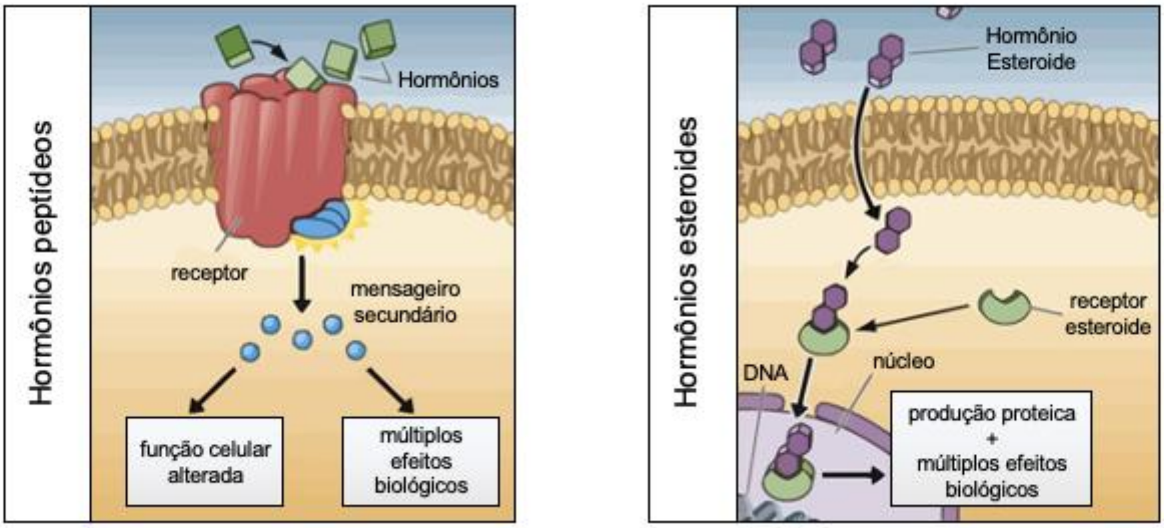
Figura 1 Estruturas químicas dos compostos testosterona, decanoato de nandrolona, metandienona e metenolona, andrógenos mais comumente utilizados.



Fonte: Adaptado (PATANÉ e*t al.*, 2020).

Os efeitos anabólicos androgênicos estão relacionados à ação de sinalização do receptor de androgênio (AR), comumente distribuídos em tecidos e órgãos humanos. Eles promovem seus efeitos por meio de três mecanismos de ação, elencados como (*i*) ligação direta ao receptor de andrógeno; (*ii*) via diidrotestosterona (DHT) produzida pela ação da 5-α-redutase e (*iii*) via receptores de estrogênio por meio do estradiol produzido pela aromatase CYP19. Em particular, a testosterona livre é transportada para o citoplasma da célula do tecido alvo; a ligação ao AR ocorre diretamente ou após a conversão em 5-α- DHT pela enzima citoplasmática 5-α-redutase. No núcleo da célula, livre ou ligada, a testosterona se liga às sequências de nucleotídeos específicas do DNA cromossômico, ativando a transcrição de genes responsivos específicos, com influência significativa na síntese proteica (ALBANO *et al.*, 2021). Após a dimerização, o complexo se liga a áreas promotoras específicas de genes-alvo chamados de elementos de resposta a andrógenos (AREs), influenciando o processo de transcrição. O mecanismo geral de ação esta ilustrado na **Figura 2**.

Figura 2 Mecanismo geral de ação de hormônios e de esteroides sintéticos.



Fonte: Adaptado (ALBANO e*t al.*, 2021).

Na prática clínica seu uso é recomendado para o tratamento de hipogonadismo, distúrbios metabólicos, queimaduras, anemia, insuficiência da medula óssea, insuficiência renal crônica e síndrome da imunodeficiência adquirida (CUNHA *et al.*, 2004; HE; WU; LU, 2018). No entanto, o uso indevido de formulações contendo EAAs é comumente observado em atletas profissionais e não profissionais sendo motivado pela busca do aumento da massa muscular, força e resistência, a diminuição da gordura corporal e recuperação mais rápida após exercícios físicos intensos (PIACENTINO *et al.*, 2015; HE; WU; LU, 2018).

Inicialmente, a testosterona foi isolada na década de 1930, e logo a seguir, numerosos andrógenos sintéticos foram rapidamente desenvolvidos a partir desse hormônio, consolidando a problemática do consumo indiscriminado desses compostos. Os atletas logo descobriram os efeitos anabólicos desses hormônios, e os EAAs se espalharam rapidamente pelo atletismo. Mas foi somente na década de 1980 que o uso generalizado dos EAAs emergiu do mundo atlético de elite para da população em geral. Hoje, a grande maioria dos usuários de EAAs não são atletas competitivos, mas sim homens (e mulheres) jovens e de meia idade que usam esses medicamentos buscando, principalmente, uma melhor aparência física pessoal com fins estéticos. O abuso de EAAs se tornou predominante na Escandinávia, Estados Unidos e Brasil, entretanto, permanece reduzido em países asiáticos, como China, Coréia e Japão (GEN KANAYAMA & HARRISON, 2018).

Na década de 1980, os EAAs podiam ser comprados facilmente com receita médica em farmácias dos Estados Unidos. No entanto, mesmo sem receita médica, a posse ou a venda era apenas uma contravenção na legislação americana. A explosão do consumo de EAAs foi suficiente para despertar preocupações regulatórias. Assim, em 1990, o Congresso dos Estados Unidos aprovou a lei de tráfico de Esteroides, reclassificando os EAAs como compostos sob a jurisdição do *Drug Enforcement Administration* (DEA). Após esse ato, o uso do EAAs se tornou mais restrito, não diminuindo e sendo marginalizado, principalmente decorrente do fácil acesso aos produtos de contravenção obtidos via *internet* (GEN KANAYAMA & HARRISON, 2018).

Esse fenômeno continua até os dias de hoje, com milhares de fornecedores na China, sudeste da Ásia, países do antigo bloco oriental e América Latina (PIROLA *et al*., 2010; CORDARO; LOMBARDO; COSENTINO, 2011; BRENNAN; KANAYAMA; POPE, 2013). Embora seja ilegal importar essas substâncias, o enorme volume de vendas pela *internet* tornou o controle extremamente difícil. Também, a partir dos anos 80, o uso dos EAAs para melhoria da aparência pessoal foi bastante potencializado nos países ocidentais, ou seja, uma atenção crescente ao culto do corpo masculino musculoso (GEN KANAYAMA & HARRISON, 2018), e logo após alguns anos a estética corporal feminina.

Muito provavelmente, uma das forças motrizes dessa tendência tem sido a publicidade crescente de indústrias que buscam lucrar com as inseguranças dos homens sobre sua aparência corporal - especialmente aos bilhões de dólares da indústria e empresas de suplementos nutricionais que vendem outros produtos para ganhos musculares, perda de gordura e condicionamento físico. Para os jovens que crescem nesse clima, o apelo dos EAAs que são dramaticamente eficazes e com poucos efeitos colaterais graves de curto prazo ou podem se tornar irresistível (POPE, PHILLIPS; OLIVARDIA, 2000; POPE *et al*., 2014).

1. 2. Informações Epidemiológicas

Buckley e Gostin administraram questionários anônimos para 3403 alunos nos últimos anos de estudo (12º ano), do sexo masculino em 46 escolas públicas e privadas americanas. Os investigadores relataram que 6,6% dos entrevistados reconheceram uso de esteroides, e cerca de 27% dos usuários de esteroides relataram que sua principal razão para uso era para melhorar a aparência pessoal, e não para quaisquer fins atléticos (BUCKLEY & GOSTIN, 2013). Vários outros estudos americanos de prevalência foram seguidos por POPE; KATZ; CHAMPOUX, 1988; ADALF & SMART, 1992, com um estudo indicando uma prevalência de uso de esteroides de até 11% em estudantes do ensino médio do sexo masculino. Uma pesquisa para monitoramento futuro avaliou o uso de esteroides entre estudantes do ensino médio americanos a partir de 1991 e os Centros dos Estados Unidos para o Controle de Doenças e Vigilância de Comportamento de Riscos para Jovens. O sistema avaliou o uso de esteroides por estudantes no ensino médio a cada dois anos, também a partir de 1991 (MIECH *et al.*, 2016).

Em outro estudo, 78,4% dos 500 homens que usavam EAAs eram considerados fisiculturistas ou atletas não competitivos (PARKINSON & EVANS, 2006). Em outra pesquisa, 70,4% dos 506 usuários masculinos de EAAs foram classificados simplesmente como “praticantes de atividades recreativas” (IP *et al.*, 2011). Em um outro estudo americano (POPE; KANAYAMA; HUDSON, 2012), 94 usuários de EAAs entre 18 e 40 anos, recrutados por anúncios em ginásios, foram questionados em entrevista pessoal se haviam usado o EAAs para melhorar seu desempenho em um esporte competitivo. Apenas 6% responderam que usaram o EAAs exclusivamente para fins atléticos competitivos, com outros 14% respondendo que usaram o EAAs parcialmente para atletismo competitivo e 80% dos usuários que responderam nunca usaram o EAAs para atletismo competitivo.

Apesar dessas descobertas, a maioria do público em geral e até mesmo os da comunidade médica, ainda considera o uso de EAAs como um problema de doping apenas entre atletas profissionais. A população de usuários não atletas é muito maior, e permanecem amplamente ocultos e surpreendentemente, não são assim identificados. Alguns trabalhos já descrevem que existem várias razões para isso. Primeiro, o uso do EAAs geralmente é de início tardio como abuso para essas substâncias.

Os pesquisadores descobriram que o início mediano do primeiro uso de EAAs nos estudos foi de cerca de 22 anos, com apenas 13,1% dos usuários relatando que iniciaram o uso aos 18 anos e apenas 2,2% a partir dos 16 anos. Os mesmos pesquisadores também examinaram dados de 5 estudos internacionais adicionais que avaliaram a idade de início do uso de EAAs e encontraram uma distribuição etária semelhante. Assim, o usuário típico de EAAs, mesmo quando está no estágio inicial de uso do EAAs, não é um estudante, mas um jovem adulto, que não está mais sob a vigilância de pais, professores ou outros indivíduos supervisores e, portanto, continua não identificado (GEN KANAYAMA & HARRISON, 2018).

A prevalência exata do consumo de EAAs em qualquer país é difícil de ser confirmada e até estimada, principalmente devido a sua ilegalidade. Em Portugal, por exemplo, 10% das amostras recolhidas pela Autoridade Antidopagem tiveram resultados positivos para EAAs em 2014 (IPDJ, 2014), ao passo que um estudo de MASSADA e colaboradores em 2011 referiram que, 63,6% dos praticantes de musculação dos ginásios da cidade do Porto já tinham utilizado EAAs.

Um estudo na Finlândia com indivíduos suspeitos de utilizar EAAs encontraram risco de morte de 4,6. Os casos prematuros de morte foram associados a suicídios, infarto agudo do miocárdio e linfoma de Hodgkin's (PÄRSSINEN *et al*., 2000).

Outro estudo de coorte com 1.463 suecos, logo depois encontraram que indivíduos usuários de EAAs possuem 2,2 mais risco de hospitalização por consumo abusivo e 2,1 mais risco por desordens psiquiátricas (PETERSON *et al*., 2006).

No Brasil Júnior em 2013 descreveu as principais características da morbidade pelo uso de EAA no Brasil, no período de 2000 a 2010 através das informações obtidas do banco de dados informatizados do Ministério da Saúde a partir das Autorizações de Internações Hospitalares (AIHs), instrumento obrigatório a ser preenchido pelos hospitais para a internação de pacientes, que permite o pagamento pelo Sistema Único de Saúde aos hospitais o número de internações ano a ano para o período de 2000 a 2010 em decorrência dos EAAs é apresentado na **Figura 3**.

Na época do estudo, a AIH era responsável por 80% da assistência médico-hospitalar prestada a população brasileira, com cerca de 1.000.000 de internações por mês em 6.380 unidades hospitalares existentes.

Esse autor utilizou para avaliar as internações o diagnóstico principal e secundário das hospitalizações com os seguintes códigos: E28.1 utilizado para excesso de andrógeno, E34.5 para síndrome de resistência a andrógenos, T38.7 intoxicação por andrógenos e anabolizantes congêneres e Y42.7 para efeitos adversos de andrógenos e anabolizantes congêneres, todas essas descrições são do Código Internacional de Doenças 10.

Esse estudo poderia ser repetido atualmente, atualizando as informações para o período de 2011 a 2020, pois talvez esse quadro já tenha mudado, pela maior disponibilidade e consumo dos EAAs, ou melhoria dos registros de dados nas AIHs.

Figura 3 Tabela de hospitalizações por causas relacionadas aos EAAs (N°,% e Taxa de internação por 1.000.000 de habitantes), Brasil, 2000 a 2010.

Ano	Todas as causas	Ingestão de EAA		
		Nº	%	Taxa
2000	12.426.137	18	0,0001	0,1
2001	12.227.236	16	0,0001	0,1
2002	12.233.702	224	0,0018	1,3
2003	12.094.875	188	0,0016	1,1
2004	11.953.856	218	0,0018	1,2
2005	11.861.494	219	0,0018	1,2
2006	11.528.552	152	0,0013	0,8
2007	11.739.258	224	0,0019	1,2
2008	11.107.155	12	0,0001	0,1
2009	11.511.559	20	0,0002	0,1
2010	11.724.834	28	0,0002	0,1

Fonte: JÚNIOR, 2013.

No período de 2000 a 2010 as hospitalizações por EAA foram responsáveis por apenas 0,001% do total de internações no Brasil. No estudo foram contabilizadas 1.319 internações (média = 119,9, DP = 99,01). A síndrome de resistência a andrógenos foi a principal causa, correspondendo a 55,8% do total de internações, a intoxicação por andrógenos e anabolizantes congêneres e excesso de andrógenos participaram com, respectivamente, 41,35% e 2,6% do total de internações (JÚNIOR, 2013).

Em torno de 1% dos pacientes evoluíram para óbito e o tempo máximo de internação foi de 47 dias (média = 3,8 e DP = 4,7). Os estados de Minas Gerais, Maranhão e Espírito Santo apresentaram as maiores taxas de internações por 1.000.000 de habitantes, nos anos de 2002 a 2007. As circunstâncias relativas às condições do modo de vida foram a principal causa associada de morbidade por ingestão de andrógenos (11,9%) (JÚNIOR, 2013).

A taxa de hospitalização por uso de EAA no Brasil nesse período (2000 a 2010) foi baixa, isso pode ser explicado pelo sub-registro de casos, uma vez que não existe o preenchimento de AIH nos atendimentos de pronto-socorro e esse agravo não é de notificação compulsória (JÚNIOR, 2013).

A subnotificação, o sub-registro, a falta de completitude dos campos e a cobertura do sistema são elementos que comprometem as estimativas de parâmetros clínico-epidemiológicos distorcendo, muitas vezes a interpretação por parte de gestores e profissionais de saúde sobre a relevância e magnitude das doenças (JÚNIOR, 2013).

Estimativas logo após esse estudo, em 2014 no Brasil indicaram a prevalência do consumo de EAAs variando de 2,1% a 31,6% dos entrevistados, decorrente da região e características dos entrevistados, as academias são os locais de maior incidência do uso (ABRAHIN; DE SOUZA; SANTOS, 2014). Esses dados foram evidenciados em estudos realizados nas cidades de Belo Horizonte, São Paulo, João Pessoa e Goiânia que mostraram um consumo elevado por parte de indivíduos jovens do sexo masculino. Em relação à obtenção dos EAAs, os estudos em Minas Gerais e São Paulo revelaram que grande parte dos indivíduos os adquiria sem receitas médicas, os próprios estudos mostraram certo desconhecimento em relação aos efeitos adversos que podem ser causados a quem os utiliza (ARAÚJO; ANDREOLO; SILVA, 2002; SILVA & MOREAU, 2003; DOMINGUES & MARINS, 2007 e NOGUEIRA, *et.al.*, 2015).

A prevalência do uso de EAA pode chegar a 31,6% dependendo da região do Brasil, sendo de 11,1% em praticantes de musculação na cidade de Porto Alegre, Rio Grande do Sul (SILVA *et al.*, 2007; ABRAHIN; DE SOUZA; SANTOS, 2014).

De acordo com produtos rotulados apreendidos pela Receita Federal no Rio Grande do Sul os EAAs chegam ao Brasil provenientes de diversos países como Estados Unidos, Alemanha, Índia, Rússia, Reino Unido, México e principalmente do Paraguai possivelmente pela condição de amplo comércio e facilidade de acesso fronteiriço. No Brasil, ocorre uso indevido dessas formulações pelo livre comércio na *internet* ou pela manipulação, que utilizam sais ilegalmente importados, como oxandrolona, estanozolol e testosterona que muitas vezes nem rótulos recebem. Além, do abuso de substâncias destinadas ao uso veterinário, principalmente para equinos de competição, presentes também nas apreensões realizadas pela Receita Federal no Rio Grande do Sul.

É preocupante a compra desses produtos ilegais fabricados em outros países ou no Brasil, pois na maior parte das vezes não apresentam bula. São produtos de fácil adulteração ou falsificação vendidos em ampolas não esterilizadas.

Ainda são poucas as publicações por órgãos oficiais que demonstram a real situação do uso indevido dos EAA no Brasil e suas consequências físicas e psíquicas.

1. 3. Efeitos dos Esteroides Anabólicos Androgênicos

A literatura científica vem a tempo associando os EAAs a uma série de malefícios que acometem seus usuários, porém, é difícil predizer com exatidão que os efeitos colaterais promovidos pelo uso e, além disso, a natureza da associação entre EAA e os desfechos hospitalares ou óbitos necessitam ser melhores esclarecidos, uma vez que existem poucos dados sobre os efeitos dessas substâncias ao longo da vida dos usuários.

Muitas informações disponíveis sobre os efeitos adversos de EAAs são publicadas sob a forma de estudo de casos de pacientes quando bem diagnosticados e registrados (BRINQUINHO *et. al.*, 2017).

Adicionalmente, o consumo de EAAs, mesmo em grandes doses, raramente causam uma intoxicação aguda que necessite de atendimento de emergência. Assim, milhares de consumidores podem existir em uma determinada comunidade permanecendo ocultos. Além disso, deve-se lembrar de que o uso generalizado de EAAs na população em geral não se consolidou até meados dos anos 80, consequentemente a grande maioria dos usuários tem idade inferior a 50 anos. A maioria desses indivíduos não envelheceu o suficiente para desenvolver grandes complicações decorrente do uso prolongado de EAAs que possam levá-los a busca de atendimento à saúde, por causa dos graves efeitos adversos como cardiomiopatia, doença aterosclerótica e hipogonadismo prolongado que raramente se expressam antes da meia-idade (POPE *et al.*, 2014).

Uma característica do consumo dos EAAs tem sido a prevalência crescente de indivíduos que desenvolveram uma provável síndrome de dependência (WOOD, 2008; KANAYAMA *et al.*, 2009a; KANAYAMA *et al.*, 2009b; KANAYAMA *et al.*, 2009c; KANAYAMA *et al.*, 2010; POPE *et al.*, 2010; HILDEBRANDT; YEHUDA; ALFANO, 2011a; HILDEBRANDT; YEHUDA; ALFANO, 2011b; IP *et al.*, 2012). Já no final dos anos 80, foram descritos os primeiros relatos associados a dependência de EAAs (HAYS; LITTLETON; STILLNER, 1990; BROWER *et al.;* 1991). Entretanto, nos dias atuais esse fenômeno se tornou amplamente estudado e reconhecido. Uma análise de dados agrupados de 10 estudos internacionais sugeriu que cerca de 30% dos usuários podem desenvolver dependência, uma prevalência muito maior do que a observada para a maioria dos outros medicamentos indutores de dependência (POPE *et al.*, 2014).

Foram associados ao consumo destes produtos uma variedade de diferentes doenças cardiovasculares (SOUZA *et al.*, 2018; SOUZA *et al.*, 2019), doenças hepáticas, incluindo peliose hepática, hiperplasia hepatocelular e carcinomas (HARTGENS & KUIPERS, 2004), hipertensão, dislipidemia, infertilidade, atrofia testicular, acne (MIDDLEBROOK & SCHOENER, 2019), além de um espectro de efeitos comportamentais correlacionados com hiperandrogenismo (CUNNINGHAM; LUMIA; MCGINNIS, 2004).

Os EAAs podem causar dependência por meio de suas propriedades de sensação de prazer, embora não produza recompensa à maneira de drogas clássicas de abuso, como álcool, opiáceos ou cocaína. Não há dúvida de que esses medicamentos produzem sentimentos satisfatórios de autoconfiança e até sentimentos de invencibilidade em muitos usuários (POPE *et al.*, 2014).

Concomitantemente, consumidores de EAAs apresentam a tendência crescente de utilizar outros compostos associados aos esteroides que incluem o hormônio de crescimento humano (GH) e o fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF-I). Essas substâncias também se encontram disponíveis para compra na *internet* e são administrados em doses suprafisiológicas, promovendo os efeitos anabólicos desejados por seus consumidores (GIBNEY; HEALY; SONKSEN, 2007; HOLT & SONKSEN, 2008; BRENNAN *et al.*, 2011; POPE *et al.*, 2014; SAGOE *et al.*, 2015). Um estudo constatou que 27% dos usuários de EAAs também relataram uma história de uso de GH e / ou IGF-I (BRENNAN *et al.*, 2011).

Outro hormônio também consumido em associação com os esteroides é a insulina. Antes de 2000, o abuso de insulina por fisiculturistas não diabéticos era muito raro (EVANS, 1997), mas estudos relatam uso de insulina em 5% a 25% dos usuários de EAAs (PERRY *et al.*, 2005; BAKER *et al.*, 2006; PARKINSON & EVANS, 2006; COHEN *et al.*, 2007; HILDEBRANDT *et al.*, 2007; IP *et al.*, 2012a). Assim, é importante reconhecer que os EAAs representam apenas uma das muitas classes diferentes de medicamentos (embora seja a classe mais importante) usada por fisiculturistas recreativos e por atletas do século XXI. Vários trabalhos já abordam esse fenômeno da polifarmácia com mais detalhes por usuários de EAAs (DODGE & HOAGLAND, 2011; HILDEBRANDT; YEHUDA; ALFANO, 2011a; IP *et al.*, 2011; SAGOE *et al.*, 2015).

Os compostos sintéticos e semissintéticos são produzidos com base na estrutura química da testosterona, objetivando-se obter produtos ativos quando administrados via oral, aumentar a razão entre o efeito anabólico e a atividade androgênica, ou prolongar o tempo de permanência no organismo. Uma das vias mais utilizadas na administração de EAA é a parenteral, em que os compostos são injetados diretamente na corrente sanguínea, possibilitando elevada biodisponibilidade. Geralmente, são consumidos sem prescrição médica, em doses mais elevadas do que o usual, por tempo prolongado e concomitantemente com outros fármacos (OGA; CAMARGO; BATISTUZZO, 2014).

Devido ao complexo padrão de uso, a presença de adulterantes e outros aditivos, ao abuso de produtos veterinários contendo EAA e o consumo associado a outros fármacos, a totalidade dos efeitos nocivos ainda permanece desconhecida (OGA; CAMARGO; BATISTUZZO, 2014).

Apesar de esforços substanciais para manter o controle antidoping entre atletas e sua restrição em maior número para não-atletas, há poucas razões para acreditar que leis ou tentativas de imposições alterarão acentuadamente as tendências atuais de sua comercialização. No Brasil, a Portaria nº. 344/1998 determina que a fiscalização na produção, comércio, manipulação e uso dos EAAs seja de responsabilidade das autoridades sanitárias (BRASIL, 1998). As substâncias anabolizantes, bem como seus derivados e precursores, também ficam sujeitas a receita de controle especial em duas vias, constando na Lista C5 da RDC nº. 39/2012 (BRASIL, 2012).

Na Pecuária brasileira a IN nº. 55/2011 em seu Art. 1º proibi a importação, a produção, a comercialização e o uso de substâncias naturais ou artificiais, com atividade anabolizantes hormonais, para fins de crescimento e ganho de peso em bovinos de abate. já no seu Art. 2º ela faculta a importação, a produção, a comercialização e o uso de anabolizantes hormonais ou assemelhados, naturais ou sintéticos, com atividades estrogênica, androgênica e progestagênica, exclusivamente para fins terapêuticos, de sincronização do estro, de transferência de embriões, de melhoramento genético e de pesquisa experimental em medicina veterinária. Mas, a mesma instrução só permite isso mediante prescrição e orientação de médico veterinário em conformidade com a regulamentação específica vigente (BRASIL, 2011).

O uso de produtos contendo EAA só será considerado regular se feito sob prescrição médica e aprovado pelas autoridades competentes. A comercialização de anabolizantes que não siga as regras da legislação vigente irá configurar o crime contra a saúde pública de falsificação, corrupção, adulteração ou alteração de produto destinado a fins terapêuticos ou medicinais, previsto pelo Código Penal, no artigo 273. Além do impacto nos riscos à saúde, a eventual presença nessas formulações de adulterantes ou aditivos classificados como psicotrópicos ou entorpecentes também terá impacto no processo penal, uma vez que restaria configurado o crime de tráfico de drogas (BRASIL, 1998).

Em apreensões da Polícia Federal observou-se uma taxa de falsificação de 42% dos anabolizantes analisados, sendo ainda maior no subgrupo das soluções oleosas, com 65% de falsificações (NEVES & CALDAS, 2017). Essas altas taxas trazem impactos não só na esfera da saúde e na esfera penal, mas também no sistema econômico, movimentando bilhões de dólares anualmente (BLACKSTONE; FUHR; POCIASK, 2014).

Mesmo diante desses números, nenhum alerta foi emitido pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária nesse sentido, o que sugere ignorância desse cenário ou deficiência na caracterização dos compostos, levando à subnotificação dos casos de fraudes.

O abuso de tais formulações representa um risco à saúde dos consumidores, uma vez que além dos efeitos tóxicos bem documentados causados pelos EAA, os usuários também são expostos à toxicidade de adulterantes e aditivos eventualmente presentes nas formulações. Esse risco é ainda maior quando se leva em conta o uso de produtos fraudulentos, de origem internacional ou laboratórios clandestinos, situações em que as condições operacionais e sanitárias fogem da fiscalização (NEVES & CALDAS, 2017).

A falta de metodologias adequadas para identificação dessas substâncias e seus aditivos, aliada à escassez de pessoal qualificado para realização dessas análises tornam-se um entrave na celeridade do processo penal. A identificação inequívoca desses compostos permite a produção da prova material essencial para a boa condução das investigações criminais, além de fornecer subsídios para ações de saúde pública na prevenção e tratamento do uso abusivo de esteroides anabolizantes. Nesse contexto, torna-se necessário o desenvolvimento de metodologias analíticas para a correta identificação dos esteroides anabolizantes e seus aditivos.

1. 4. Análises Químicas

Atualmente, as técnicas mais utilizadas para análise de formulações possivelmente contendo EAAs incluem a cromatografia em camada delgada e a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS) (MUSHARRAF & GULZAR, 2012; BERNEIRA *et al.*, 2019). O acoplamento ao espectrômetro de massas permite detectar a razão massa/carga (*m/z*) de uma substância, auxiliando assim na elucidação estrutural química. Isso ocorre através da ionização da amostra e posterior seleção dos íons de interesse seguido de detecção (KALOGERA *et al*., 2013; LANÇAS,

2013; IGLESIAS, 2016; LACERDA JR, 2018). Metodologias empregando GC-MS foram utilizadas para analisar a presença de EAAs em 40 preparações anabólicas obtidas no mercado negro (a menção a esta palavra se refere a ilícito) da Alemanha (RITSCH & MUSSHOFF, 2000). Na Itália, Pellegrini e seus colaboradores em 2012 utilizaram essa técnica para analisar 15 preparações farmacêuticas diversas do mercado negro (ilícito), 4 na forma de comprimidos, 7 soluções oleosas e 4 suspensões injetáveis intramuscular.

Posteriormente, Neves e Caldas em 2017, desenvolveram um método de GC-MS para analisar 345 amostras de medicamentos e suplementos alimentares aprendidos pelo Departamento de Polícia Federal (DPF) entre os anos de 2011 e 2016, onde foram monitorados dois íons específicos para cada um dos 14 EAAs avaliados em suplementos alimentares (NEVES & CALDAS, 2017).

Dahmani e colaboradores em 2018 desenvolveram uma metodologia por GC-MS para detectar androsterona, nandrolona, deidroepiandrosterona, 5α-androstano-3β, 17β-diol, dihidrotestosterona, testosterona, acetato de metanolona, metandienona, boldenona e fluoximesterona, em suplementos alimentares. O limite de detecção foi de 10 ng/g para amostras sólidas e 10 ng/ml para amostras líquidas. O método desenvolvido foi então aplicado à pesquisa de esteroides em nove suplementos alimentares tunisianos comerciais, onde uma das amostras foi positiva para metandienona não declarada no rótulo.

As principais dificuldades observadas no desenvolvimento de metodologias analíticas para detecção desses compostos incluem o elevado número de substâncias a serem investigadas, semelhança estrutural, interferência de excipientes e adulterantes e tempo prolongado das análises. Nesse sentido, a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas sequencial (LC-MS/MS) tem se mostrado promissora na identificação de EAAs em amostras biológicas, suplementos alimentares e produtos farmacêuticos tratando-se de uma técnica versátil que pode ser aplicada com diferentes tipos de configurações, conferindo às análises exatidão, sensibilidade, melhor detectabilidade e, consequentemente, confiabilidade e qualidade nos resultados obtidos (MARTELLO; FELLI; CHIAROTTI, 2007; POZO *et al.*, 2008; DESHMUKH *et al.*, 2010).

Em 2008, o estudo conduzido por Thevis e colaboradores empregaram a técnica de LC-MS/MS para realizar a identificação de 17 EAAs em amostras brutas apreendidas na Alemanha (THEVIS *et. al.*, 2008). Já em 2015, Cho e colaboradores empregaram

LC-MS/MS para a detecção de 26 EAAs em 19 medicamentos na forma farmacêutica de comprimidos sólidos (3) e injetáveis (16) comprados pela *internet* ou no mercado negro durante o ano de 2014, onde majoritariamente foram encontrados testosterona, 17-propionato de testosterona e boldenona, os autores relatam ainda que a técnica ainda não tinha sido empregada para análise e quantificação de um número tão grande de EAAs (CHO *et al.*, 2015).

Doue *et al.* em 2014 identificaram e quantificaram 21 EAAs em preparações comerciais oleosas, usando um espectrômetro de massas tandem com uma preparação mínima das amostras, empregando padrão interno marcado por isótopo para quantificação dos EAAs pelo modo de monitoramento de reação múltipla. Recentemente, Müller e colaboradores publicaram um estudo analítico relatando a determinação simultânea de 32 drogas, incluindo anorexígenos, ansiolíticos, antidepressivos, diuréticos, laxantes e estimulantes com uma separação realizada em 19 minutos para investigar a adulteração de suplementos dietéticos comercializados para perda de peso (MÜLLER *et al.*, 2019).

Paralelamente, a utilização de técnicas por infusão direta nos diferentes sistemas de espectrometria de massas sem o auxílio da cromatografia pode ser empregada para a determinação de EAAs (SAWAYA *et al.*, 2004; ARAÚJO *et al.*, 2005; CATHARINO *et al.*, 2005; MØLLER; CATHARINO; EBERLIN, 2005; MARQUES *et al.*, 2006; CATHARINO *et al.*, 2007; DE SOUZA *et al.*, 2007; AMORIM *et al.*, 2009; DE SOUZA *et al.*, 2009; GOLLÜCKE *et al.*, 2009; ROMÃO *et al.*, 2011; PROKUDINA *et al.*, 2015).

A técnica de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ^{1}H) para avaliação da qualidade de formulações contendo anabolizantes foi utilizada em 40 amostras de anabolizantes apreendidos pelo DPF utilizados na forma injetável e cápsula apresentaram os seguintes princípios ativos: propionato de testosterona, fenilpropionato de testosterona, isocaproato detestosterona, decanoato de testosterona, cipionato de testosterona, undecanoato de testosterona, estanozolol, propionato dedrostanolona, acetato de trembolona, oximetolona e metandrostenolona (RIBEIRO *et. al.* 2018).

A análise por RMN ^{1}H permitiu encontrar três tipos de adulterações: à ausência do princípio ativo descrito no rótulo; adulteração com outras substâncias e valores de concentração abaixo dos indicados no rótulo. Metodologias menos refinadas como a calorimetria de varredura diferencial (DSC) junto com outras técnicas analíticas foram empregadas na análise de 8 amostras de EAAs apreendidos e gentilmente cedidas pelo

DPF, com objetivo de verificar se eram EAAs falsificados. Essas amostras eram de três formas farmacêuticas distintas, comprimidos, suspensões aquosas e soluções oleosas, onde a utilização da DSC permitiu a identificação de um determinado composto devido ao seu distinto ponto de fusão e outras propriedades físico-químicas presentes no termograma (BERNEIRA, *et. al.* 2019).

Os métodos e equipamentos utilizados para analisar a presença e quantificar EAAs em matrizes biológicas ou em produtos farmacêuticos adulterados/falsificados tem sido diversificado ao longo das últimas décadas. Os estudos desenvolvidos e publicados para análise de anabolizantes de uma forma geral e em sua maioria são voltados para matrizes biológicas, por exemplo, a detecção de EAAs em sangue ou urina para o controle de doping, portanto, a publicação de artigos envolvendo a análise de anabolizantes em formas farmacêuticas, ainda é reduzida, mas está em processo de crescimento em virtude do aumento de material apreendido em muitos estados brasileiros e em outros países. Independente da metodologia analítica de escolha, os procedimentos desenvolvidos devem atender as mais diversas exigências de aplicações analíticas, assegurando assim a confiabilidade dos resultados obtidos (MORREAU & SIQUIERA, 2016; ANVISA, 2017). Para tanto, todo método desenvolvido deve ser validado de acordo com rígidas especificações técnicas descritas nos guias de validação da área.

1. 5. Validação

No desenvolvimento de um processo de validação pode-se seguir diversos guias internacionais como: *Validation of Analytical Methodology and Calibration of Equipment used for Testing of Illicit Drugs in Seized Materials and Biological Specimens* (UNODC, 2009); o *Guideline on Bioanalytical Method Validation* (AGENCY, 2011), e *Standard Practices for Method Validation in Forensic Toxicology* (SGWTOX, 2013), que abordam as diretrizes internacionais e recomendações de validação de métodos analíticos. E alguns poucos nacionais como: Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos (ANVISA, 2003); Orientação Sobre Validação de Métodos Analíticos (INMETRO, 2011) e a RDC Nº 166 que Dispõem Sobre a Validação de Métodos Analíticos (ANVISA, 2017).

Assim, a validação de um método analítico consiste na realização de vários testes, que incluem a determinação dos alguns parâmetros como: seletividade; limite inferior de detecção e quantificação; linearidade; exatidão; precisão, efeito *carry-over;* efeito matriz e estabilidade da amostra (PETERS & MAURER, 2002; TSAI *et al.*, 2013; MOREAU & SIQUEIRA, 2016; ANVISA, 2017).

1. 6. Análise Multivariada - Quimiometria

O desenvolvimento tecnológico proveniente das descobertas científicas tem ampliado as ordens de grandeza, a capacidade de obter informações de acontecimentos e fenômenos que estão sendo analisados. Uma grande massa de informação deve ser processada antes de ser transformada em conhecimento. Portanto, cada vez mais necessita-se de ferramentas estatísticas que apresentem uma visão mais global de um dado fenômeno, do que aquela abordagem univariada tradicional. A denominação “Análise Multivariada” corresponde a um grande número de métodos e técnicas que utilizam, simultaneamente, todas as variáveis na interpretação teórica do conjunto de dados obtidos (NETO, 2004).

Os métodos multivariados são escolhidos de acordo com os objetivos da pesquisa, pois sabe-se que a análise multivariada é uma análise exploratória de dados, prestando-se a gerar hipóteses, e não tecer confirmações a respeito dos mesmos, o que seria uma técnica confirmatória, como nos testes de hipótese, nos quais se tem uma afirmação a respeito da amostra em estudo (VICINI, 2005).

Com o avanço das técnicas instrumentais e dos microcomputadores no início da década de 1970, tornaram-se necessários tratamentos de dados mais complexos do ponto de vista estatístico, pois novos equipamentos possibilitavam a obtenção rápida de respostas multivariadas a partir de medidas analíticas simples. Portanto, com o interesse de extrair maiores informações dos dados, ferramentas que já eram utilizadas em outras áreas da ciência passaram a ser utilizadas na química, o que deu origem à quimiometria (BRUNS & FAIGLE, 1985).

A quimiometria é uma área emergente que utiliza métodos matemáticos e estatísticos para planejar, selecionar e avaliar condições ótimas ou informações de um experimento, permitindo a utilização máxima de dados químicos (BRUNS & FAIGLE, 1985).

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

1.6.1. Análise de componentes principais

A PCA é uma técnica matemática de análise multivariada, que possibilita investigações com grande número de dados disponíveis, como também, a identificação das medidas responsáveis pelas maiores variações entre os resultados, sem perdas significativas de informações. A PCA é um método quimiométrico exploratório, não supervisionado, isto é, apenas a natureza dos dados químicos é utilizada para se obter informações sobre o comportamento das amostras. Além disso, transforma um conjunto original de variáveis em outro conjunto, os componentes principais de dimensões equivalentes (VICINI, 2005).

Essa transformação, em outro conjunto de variáveis, ocorre com a menor perda de informação possível, sendo que esta também busca eliminar algumas variáveis originais que possua pouca informação. Essa redução de variáveis só será possível se as p variáveis iniciais não forem independentes e possuírem coeficientes de correlação não-nulos (VICINI, 2005).

A meta da análise de componentes principais é abordar aspectos como a geração, a seleção e a interpretação das componentes investigadas. Ainda pretende-se determinar as variáveis de maior influência na formação de cada componente, que serão utilizadas para estudos futuros, tais como de controle de qualidade, estudos ambientais, estudos populacionais entre outros (VICINI, 2005).

A PCA é um dos métodos mais comuns empregados na análise de informações, sendo principalmente utilizada pela sua capacidade de compressão dos dados em função da existência de correlação entre diversas variáveis medidas. Quando aplicamos um algoritmo de PCA num conjunto de variáveis, como por exemplo, espectros no infravermelho, o conjunto original destas variáveis é substituído por um novo conjunto de variáveis denominado de componentes principais (BROWN,1995). A principal característica deste novo conjunto é a ortogonalidade, porém o mesmo é facilmente reconstruído a partir da combinação linear das variáveis originais nesse exemplo os espectros. A PCA é um recurso que constitui a base para o tratamento de dados multivariados, é uma técnica que reduz o número de variáveis (loadings) fazendo combinações lineares das variáveis originais (ROGGO *et. al.*, 2007).

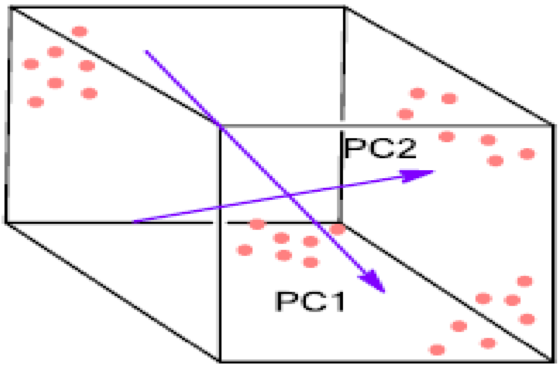
A PCA é a base fundamental da maioria dos métodos modernos para o tratamento de dados multivariados, sendo aplicada para compressão desses dados sem que haja perda de informações importantes. A redução dos dados permite que seu conjunto possa ser representado com menor número de novas variáveis, denominadas de fatores ou componentes principais, que são combinações lineares das variáveis originais. Esta técnica atua decompondo os dados originais, transformando-os em uma soma de matrizes, produtos de vetores chamados de escores e pesos, que podem ser calculados por mínimos quadrados (FERREIRA *et. al.*, 1999; SABIN; FERRÃO; FURTADO, 2004).

Este método é utilizado para extrair informações projetando os dados em um espaço menor, reduzindo, assim, a dimensionalidade do espaço original do conjunto de dados sem afetar as relações entre as amostras e preservando a maior parte da variância. Esse espaço de dimensões reduzidas possui novas variáveis, os componentes principais, que são obtidos a partir de combinações lineares das variáveis originais. Esses componentes descrevem as tendências relativas dos dados analíticos e são calculados em ordem decrescente de importância (FERREIRA, 2015).

A primeira componente principal, PC1 é definida na direção de máxima variância do conjunto de dados. A segunda componente principa, PC2 é definida na direção que descreve a máxima variância no espaço da PC1, de forma que cada componente principal (PC1, PC2, PC3, etc.) seja responsável pela fração sucessiva de variância de dados, consistindo em um sistema de coordenadas ortogonais entre si e, portanto, não correlacionadas. Normalmente as primeiras componentes, explicam a maior parte da variância total contida nos dados e podem ser usadas para representá-las. Na análise exploratória são examinadas as relações entre as amostras e as variáveis, através de gráficos de escores ("scores") e pesos ("loadings") respectivamente, os quais permitem também avaliar a influência de cada variável em cada amostra, encontrando similaridade ou diferenças nos dados (FERREIRA *et. al.*, 1999; SABIN; FERRÃO; FURTADO, 2004).

A primeira componente, PC1 é traçada no sentido de maior variância dos dados, descrevendo a maior quantidade de informação original como ilustra a **Figura 4**. A segunda componente, PC2, por sua vez, tem a direção de máxima variância dos dados no subespaço ortogonal à PC1, descrevendo informação residual, ou seja, que não foi explicada pela primeira componente. E da mesma forma, as demais componentes são sempre direcionadas no sentido de maior variância, ortogonalmente às anteriores (FERREIRA, 2015).

Figura 4 Simulação esquemática de amostras num espaço hiperamostral e indicação das primeiras componentes principais.



Fonte: FERREIRA, 2015.

A seleção do número de componentes principais necessárias para descrever adequadamente o modelo se dá a partir do pseudoposto do conjunto de dados (FERREIRA, 2015).

Do ponto de vista matemático a PCA é descrita pela equação:

$$X = TP^t + E$$

A matriz de dados originais (X) é decomposta em uma matriz de escores (T), que são as projeções das amostras no novo espaço das componentes principais, e uma matriz de pesos/loadings (P), determinados pelo cosseno dos ângulos formados entre as variáveis originais e as novas componentes principais. O símbolo t sobrescrito indica uma matriz transposta. A matriz E é composta pelos resíduos que não foram explicados em nenhuma das PC selecionadas (FERREIRA, 2015).

A partir das informações contidas no novo espaço, é possível projetar os dados das amostras em um gráfico dos escores das componentes principais, permitindo observar a possível presença de agrupamentos naturais entre as amostras. E a interpretação de como as variáveis influenciam nessa discriminação se dá pela análise dos pesos (loadings), sendo possível identificar os fenômenos ou características responsáveis pelo agrupamento dos dados (FERREIRA, 2015).

Os dados podem ser pré-processados a fim de reduzir variações indesejáveis que não contribuem para o modelo e podem influenciar nos resultados finais. Há dois tipos de pré-processamentos, os que são aplicados às amostras, com a finalidade de reduzir o ruído experimental e variações sistemáticas, por exemplo, e os que são aplicados às variáveis, podendo ser destacados a centragem dos dados na média e o autoescalamento.

A centragem dos dados na média consiste em calcular a média de cada coluna da matriz e, posteriormente, subtrair tais valores de cada elemento das respectivas colunas, o que resulta em uma translação de eixos para seus valores médios, preservando a estrutura dos dados. O autoescalamento é iniciado da mesma forma que a centragem na média, porém, após os valores serem subtraídos das colunas, o resultado é dividido pelo desvio padrão dessa coluna. Dados compostos por escalares discretas são normalmente autoescalados, enquanto dados espectrais são apenas centrados na média, já que o autoescalamento torna os dados adimensionais (FERREIRA, 2015).

Resumidamente podemos dizer que com o método PCA é possível (BEEBE, PELL, SEASHOLTZ, 1998):

- demonstrar as diferenças entre as formas das amostras;
- definir quais variáveis contribuem mais para estas diferenças;
- identificar variáveis de forma correlacionadas ou independentemente uma da outra;
- detectar padrão de amostras (agrupamentos);
- diferenciar informações úteis de ruídos;
- identificar amostras anômalas ("outliers"), etc.

1. 7. Microbiologia de Produtos Farmacêuticos

Seguindo ainda no que condiz à qualidade de compostos veiculados como produtos farmacêuticos, estas preparações devem ser excepcionalmente puras, isentas de contaminantes físicos, químicos e de origem biológica. Assim, devem apresentar três propriedades importantes: apirogenicidade; esterilidade e ausência de partículas estranhas (SILVA, 1999). Além da patogenicidade e da possibilidade de trazer riscos para a saúde do consumidor, os medicamentos injetáveis podem apresentar mudanças no seu aspecto físico, na cor, no odor e na sua estabilidade, pela fermentação com formação de gases, turbidez ou depósito e diversas outras contaminações microbianas (HIRAI, 2016).

A simples avaliação microbiológica em produtos constitui uma etapa importante no que se refere à segurança do usuário e à qualidade do produto, visto que a carga microbiana elevada pode acarretar problemas de saúde, a contagem de bactérias, fungos viáveis totais e pesquisa dos patógenos *E. coli*, *Salmonella sp., S. aureus e P. aeruginosa* em 21 amostras demonstrou que 52,0% apresentaram crescimento microbiano e 28,6% apresentaram contaminação fúngica acima dos limites descritos na Farmacopeia Brasileira para preparações de uso tópico (máximo permitido 2×10^1 UFC/g de fungos). Mas, pelo menos nenhuma amostra apresentou os patógenos *E. coli, Salmonella sp., S. aureus* e *P. aeruginosa* pesquisados (OLIVEIRA; ROSSATO; BERTOL, 2016).

De acordo com o Centro de Controle e Prevenção de Doenças dos EUA, um surto de meningite fúngica entre os anos de 2012 e 2013 foi associado às injeções de esteroides contaminadas (SMITH, *et al.*, 2015). Em setembro de 2012, foram notificados 751 pacientes com meningite fúngica, acidente vascular cerebral, infecção espinhal ou paraespinhal ou infecção periférica osteoarticular no EUA, 64 morreram de meningite ou derrame, o que correspondeu a 8,5%. A maioria dos pacientes tinha sido submetida a injeção peridural e algumas à injeção osteoarticular de acetato de metilprednisolona que havia sido fabricado no New England Compounding Centre. Estas injeções de acetato de metilprednisolona estavam contaminadas com o mofo de solo marrom-preto, *Exserohilum rostratum*, além dos óbitos, 233 pacientes tiveram meningite, 7 acidente vascular cerebral, 325 infecção espinhal ou paraespinhal, 151 apresentaram meningite espinhal ou paraspinal e outros 35 infecção articular tipo osteoartrite. O patógeno agressor *Exserohilum rostratum*, é um organismo presente no solo, era antes uma causa muito rara de infecção em humanos (KAUFFMAN & MALANI, 2016).

Estes resultados indicam que muitos produtos disponíveis no mercado apresentam qualidade inadequada, demonstrando falhas no controle de qualidade. Para prevenir esta situação, faz-se necessária fiscalização rigorosa e adoção de medidas regulamentadoras e educacionais aliadas ao seguimento das Boas Práticas de Fabricação pelas indústrias fabricantes (OLIVEIRA; ROSSATO; BERTOL, 2016).

Diante de tudo isso exposto, o comércio e uso ilegal de EAAs é um problema de saúde pública que além dos danos aos seus usuários, trazem gastos onerosos aos cofres públicos. Os indivíduos que realizam o comércio de EAAs estão cometendo infração sanitária, crimes de contrabando e contra a saúde pública. Já os usuários desses produtos, além de estarem colaborando com tais crimes, colocam sua própria saúde em risco, devido a falta de informação da origem desses produtos, composição e registro sanitário.

Esse trabalho empregou a técnica analítica de espectrometria de massas nas análises de 115 amostras de óleo suspeitas de conter esteroides, que foram apreendidas em agências dos correios no estado do Rio Grande do Sul. Propiciando assim, a identificação da composição química dos EAAs apreendidos, discriminando-os em produtos falsificados e/ou adulterados.

Em trabalhos futuros esperamos também realizar a avaliação microbiológica de produtos apreendidos pela Secretaria da Receita Federal no Rio Grande do Sul.

2. REFERÊNCIAS

ABRAHIN, O. S. C.; DE SOUSA, E. C.; SANTOS, A. M. Prevalence of the Use of Anabolic Androgenic Steroids in Brazil: A Systematic Review. **Substance Use & Misuse**, v. 49, n. 9, p. 1156–1162, 2014.

ADALF, E. M.; SMART, R. G. Characteristics of steroid users in an adolescent school population. **Journal of Alcohol and Drug Education,** v. 38, n. 1, p. 43–49, 1992.

AGENCY, European Medicines. **Guideline on bioanalytical method validation**, 2011.

ALBANO, G. D.; AMICO, F.; COCIMANO, G.; LIBERTO, A.; MAGLIETTA, F.; ESPOSITO, M.; ROSI, G. L.; DI NUNNO, N.; SALERNO, M.; MONTANA, A. Adverse Effects of Anabolic-Androgenic Steroids: A Literature Review. **Healthcare** (Basel). 2021 Jan 19;9(1):97. doi: 10.3390/healthcare9010097. PMID: 33477800; PMCID: PMC7832337.

AMORIM, A. C. L.; HOVELL, A. M. C.; PINTO, A. C.; EBERLIN, M. N.; ARRUDA, N. P.; PEREIRA, E. J.; BIZZO, H. R.; CATHARINO, R. R.; FILHO, Z. B. M.; REZENDE, C. M. Green and Roasted Arabica Coffees Differentiated by Ripeness, Process and Cup Quality via Electrospray Ionization Mass Spectrometry Fingerprinting. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 20, p. 313–321, 2009.

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 899. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos**, 2003.

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 166**. Distrito Federal Brasília: Diário oficial República Federativa do Brasil, 2017.

ARAÚJO, L. R.; ANDREOLO, J.; SILVA, M. S. Utilização de suplemento alimentar e anabolizante por praticantes de musculação nas academias de Goiânia-GO. **Revista Brasileira Ciência e Movimento,** v. 10, p. 13–18, 2002.

ARAÚJO, A. S.; DA ROCHA, L. L.; TOMAZELA, D. M.; SAWAYA, A. C. H. F.; ALMEIDA, R. R.; CATHARINO, R. R.; EBERLIN, M. N. Electrospray ionization mass spectrometry fingerprinting of beer. **Analyst,** v. 130, p. 884–889, 2005.

BAKER, J. S.; GRAHAM, M. R.; DAVIES, B. Steroid and prescription medicine abuse in the health and fitness community: a regional study. **European Journal Internal Medicine,** v. 17, nº 7, p. 479–484, 2006.

BEEBE, K. R.; PELL, R. J.; SEASHOLTZ, B. **Chemometrics – a pratical guide.** New York: Wiley, 1998.

BARCELOUX, D. G.; PALMER, R. B. Anabolic—Androgenic Steroids. **Disease-a-Month**, v. 59, n. 6, p. 226–248, 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 Science International,** v. 296, p. 15–21, 2019.

BLACKSTONE, E. A.; FUHR, J. P., JR.; POCIASK, S. The health and economic effects of counterfeit drugs. **American health & drug benefits**, v. 7, n. 4, p. 216–224, 2014.

BRASIL. Lei nº. 11.343, de 23 de agosto de 2006. **Lei de Tóxicos**. Brasília-DF, 2006.

BRASIL. Portaria SVS/MS nº. 344/1998, de 12 de maio de 1998. **Diário Oficial da União**. Brasília-DF, 1998.

BRASIL. Instrução Normativa MAPA nº. 55 de 1º de dezembro de 2011 anabolizantes hormonais na pecuária brasiliera. **Diário Oficial da União**. Brasília-DF, 2011.

BRASIL. Resolução SVS/MS RDC nº. 39 de 9 de julho de 2019 sobre o controle especial na prescrição de anabolizantes androgênicos. **Diário Oficial da União**. Brasília-DF, 2012.

BRENNAN, B. P; KANAYAMA, G.; POPE, H. G. Performance-enchancing drugs on the web: a growing public-health issue. **American Journal Addictions,** v. 22, 2ª Edition, p. 158–161, 2013.

BRENNAN, B. P.; KANAYAMA, G.; HUDSON, J. I.; POPE JR., H. G. Human growth hormone abuse in male weightlifters. **American Journal Addictions,** v. 20, n. 1, p. 9–13, 2011.

BRINQUINHO, M.; SOUSA, A. A.; RESENDE, J.; VALENTE, J. **Galicia Clínica,** v. 78, n. 2, p. 79–81, 2017.

BROWER, K. J.; BLOW, F. C.; ELIOPULOS, G. A.; BERESFORD, T. P. Anabolic androgenic steroids and suicide. **American Journal Psychiatry,** v. 146, n. 8, p. 1075, 1991.

BROWN, S. Chemical Systems Under Indirect Observation: Latent Properties and Chemometrics. **Applied Spectroscopy,** v. 49, n. 12, p. 14A–31A, 1995.

BRUNS, R. E.; FAIGLE, J. F. G. Quimiometria. Química Nova, v. 8, n. 2, p. 99–105, 1985.

BUCKLEY, G. J.; GOSTIN, L. O. **Countering the Problem of Falsified and Substandard Drugs.** Washington: National Academies Press, 2013.

CATHARINO, R. R.; HADDAD, R.; CABRINI, L. G.; CUNHA, I. B. S.; SAWAYA, A. C. H. F.; EBERLIN, M. N. Characterization of Vegetable Oils by Electrospray Ionization Mass Spectrometry Fingerprinting: Classification, Quality, Adulteration and Aging. **Analytical Chemistry,** v. 77, n. 22, p. 7429–7433, 2005.

CATHARINO, R. R.; MILAGRE, H. M. S.; SARAIVA, S. A.; GARCIA, C. M.; SCHUCHARDT, U.; EBERLIN, M. N. Biodiesel Typification and Quality Control by Direct Infusion Electrospray Ionization Mass Spectrometry Fingerprinting. **Energy Fuels,** v. 21, n. 6, p. 3698–3701, 2007.

CHO, S. H.; PARK, H. J.; LEE, J. H.; DO, J. A.; HEO, S.; JO, J.H.; CHO, S. Determination of anabolic–androgenic steroid adulterants incounterfeit drugs by UHPLC–MS/MS. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis,** v. 111, p. 138–146, 2015.

COHEN, J.; COLLINS, R.; DARKES, J.; GWARTNEY, D. A league of their own: demographics, motivations and patterns of use of 1,955 male adult non-medical anabolic steroid users in the United States. **Journal of the International Society Sports Nutrition,** v. 4, p. 1–14, 2007.

CORDARO, F. G.; LOMBARDO, S.; COSENTINO, M. Selling androgenic anabolic steroids by the pound: identification and analysis of popular websites on the Internet. **Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports**, v. 21, n. 6, p. 247–259, 2011.

CUNHA, T. S.; CUNHA, N. S.; MOURA, M. J. C. S; MARCONDES, F. K. Esteroides anabólicos androgênicos e sua relação com a prática desportiva. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas,** v. 40, n. 2, p. 165–179, 2004.

CUNNINGHAM, R. L.; LUMIA, A. R.; MCGINNIS, M. Y. Androgenic anabolic steroid exposure during adolescence: ramifications for brain development and behavior. **Hormones and Behavior**, v. 64, p. 350–356, 2013.

DA JUSTA NEVES, D. B.; MARCHETI, R. G.; CALDAS, E. D. Incidence of anabolic steroid counterfeiting in Brazil. **Forensic Science International,** v. 228, n. 1-3, p. e81–83, 2013.

DAHMANI, H.; LOUATI, K.; HAJRI, A.; BAHRI, S.; SAFTA, F. Development of an extraction method for anabolic androgenic steroids in dietary supplements and analysis by gas chromatography-mass spectrometry: Application for doping-control. **Steroids,** v. 138, p. 134–160, 2018.

DE SOUZA, P. P.; DE OLIVEIRA, L. C. A.; CATHARINO, R. R.; EBERLIN, M. N.; AUGUSTI, D. V.; SIEBALD, H. G. L.; AUGUSTI, R. Brazilian cachaça: ‘‘Single shot” typification of fresh alembic and industrial samples via electrospray ionization mass spectrometry fingerprinting. **Food Chemistry,** v. 115, n. 3, p. 1064–1068, 2009.

DE SOUZA, P. P.; SIEBALD, H. G. L.; AUGUSTI, D. V.; NETO, W. B.; AMORIM, V. M.; CATHARINO, R. R.; EBERLIN, M. N.; AUGUSTI, R. Electrospray Ionization Mass Spectrometry Fingerprinting of Brazilian Artisan Cachaça Aged in Different Wood Casks. **Journal of Agricultural and Food Chemistry,** n. 55, n. 6, p. 2094–2102, 2007.

DESHMUKH, N.; HUSSAIN, I.; BARKER, J.; PETROCZI, A.; NAUGHTON, D. P. Analysis of anabolic steroids in human hair using LC-MS/MS. **Steroids.** v. 75, n. 10, p. 710–714, 2010.

DODGE, T.; HOAGLAND, M. F. The use of anabolic androgenic steroids and polypharmacy: a review of the literature. **Drug Alcohol Dependence,** v. 114, v. 2 and 3, p. 100–109, 2011.

DOMINGUES, S. F.; MARINS, J. C. B. Utilização de recursos ergogênicos e suplementos alimentares por praticantes de musculação em Belo Horizonte – MG. **Fitness Performance Journal,** v. 6, p. 219–226, 2007.

DOUE, M.; PINEL, G. D.; GUCQUIAU, A.; POUPONNEAU, K.; MONTEAU, F.; BIZEC, B. L. High throughput identification and quantification of anabolic steroid esters by atmospheric solids analysis probe mass spectrometry for efficient screening of drug preparations. **Analytical Chemistry,** v. 86, n. 12, p. 5649–5655, 2014.

EVANS, N. A. Gym and tonic: a profile of 100 male steroid users. **Brazilian Journal Sports Medicine,** v. 31, n. 1, p. 54–58, 1997.

FERREIRA, M. M. C; ANTUNES, A. M.; MELGO, M. S.; VOLPE, P. L. O. Quimiometria I: Calibração multivariada, um tutorial. **Química Nova,** v. 22, n. 5, p. 724–31, 1999.

FERREIRA, M. M. C. **Quimiometria – Conceitos, Métodos e Aplicações,** UNICAMP, Campinas, 2015.

GEN KANAYAMA, M. D.; HARRISON, G. P. History and epidemiology of anabolic androgens in athletes and non-athletes. **Molecular and Cellular Endocrinonoloy,** v. 464, p. 4–13, 2018.

GIBNEY, J.; HEALY, M. L.; SONKSEN, P. H. The growth hormone/insulin-like growth factor-I axis in exercise and sport. **Endocrine Reviews,** v. 28, n. 6, p. 603–624, 2007.

GOLLÜCKE, A. P. B.; CATHARINO, R. R.; DE SOUZA, J. C.; EBERLIN, M. N.; TAVARES, D. Q. Evolution of major phenolic components and radical scavenging activity of grape juices through concentration process and storage. **Food Chemistry,** v. 112, n. 4, p. 868–873, 2009.

HARTGENS, F.; KUIPERS, H. Effects of Androgenic-Anabolic Steroids in Athletes. **Sports Medicine**, v. 34, p. 513–554, 2004.

HAYS, L. R.; LITTLETON, S.; STILLNER, V. Anabolic steroid dependence. **American Journal Psychiatry,** v. 147, n. 1, p. 122, 1990.

HE, G.; WU, Y.; LU, J. Doping control analysis of 13 steroids and structural-like analytes in human urine using Quadrupole-Orbitrap LC–MS/MS with parallel reaction monitoring (PRM) mode. **Steroids**, v. 131, p. 1–6, 2018.

HILDEBRANDT, T.; LAI, J. K.; LANGENBUCHER, J. W.; SCHNEIDER, M.; YEHUDA, R.; PFAFF, D. W. The diagnostic dilemma of pathological appearance and performance enhancing drug use. **Drug Alcohol Depend,** v. 114, n. 1, p. 1–11, 2011.

HILDEBRANDT, T.; LANGENBUCHER, J. W.; CARR, S. J.; SANJUAN, P. Modeling population heterogeneity in appearance- and performance-enhancing drug (APED) use: applications of mixture modeling in 400 regular APED users. **Journal of Abnorm Psychology,** v. 116, n 4, p. 717–733, 2007.

HILDEBRANDT, T.; YEHUDA, R.; ALFANO, L. What can allostasis tell us about anabolic-androgenic steroid addiction? **Development and Psychopathology,** v. 23, n 3, p. 907–919, 2011.

HIRAI, C. **Contaminação microbiana de produtos farmacêuticos.** disponível em https://www.labnetwork.com.br/especiais/contaminacao-microbiana-de-produtos-farmaceuticos/ acessado em 1ºOUT19, 2016.

HOLT, R. I.; SONKSEN, P. H. Growth hormone, IGF-I and insulin and their abuse in sport. **British Journal Pharmacology,** v. 154, n. 3, p. 542–556, 2008.

IGLESIAS, A. H. **Introdução ao acoplamento cromatografia líquida - Espectrometria de Massas.** Waters Technologies do Brasil, 2016.

Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial - INMETRO. **Orientação Sobre Validação de Métodos de Ensaios Químico**s. DOQ-CGCRE-008 Revisão 04 – Julho/2011. Disponível em http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/Cgcre/DOQ/DOQ-Cgcre-8_04.pdf. Acessado em 18DEZ18.

Instituto Português do Desporto e Juventude (IPDJ), 2014.

IP, E .J.; BARNETT, M. J.; TENEROWICZ, M. J.; PERRY, P. J. The Anabolic 500 survey: characteristics of male users versus nonusers of anabolic-androgenic steroids for strength training. **Pharmacotherapy,** v. 31, n. 8, p. 757–766, 2011.

IP, E. J.; BARNETT, M. J.; TENEROWICZ, M. J.; PERRY, P. J. Weightlifting's risky new trend: a case series of 41 insulin users. **Current Sports Medicine Reports,** v. 11, n. 4, p. 176–179, 2012.

IP, E. J.; LU, D. H.; BARNETT, M. J.; TENEROWICZ, M. J.; VO, J. C.; PERRY, P. J. Psychological and physical impact of anabolic androgenic steroid dependence. **Pharmacotherapy,** v. 32, p. 910–919, 2012.

JÚNIOR, S. H. A. S. Hospital morbidity due to anabolic-androgenic steroids (AAS) consumption in Brazil. **Revista Brasileira Medicina Esporte,** v. 19, n. 2, p. 108–111, 2013.

KALOGERA, E.; PISTOS, C.; PROVATOPOULOU, X.; ATHANESELIS, S.; SPILIOPOULOU, C.; GOUNARIS, A. Androgen glucuronides analysis by liquid chromatography tandem-mass spectrometry: Could it raise new perspectives in the diagnostic field of hormone-dependent malignancies? **Journal of Chromatography B,** v. 940, p. 24–34, 2013.

KANAYAMA, G.; BROWER, K. J.; WOOD, R. I.; HUDSON, J. I.; POPE JR. H. G. Issues for DSM-V: clarifying the diagnostic criteria for anabolic-androgenic steroid dependence. **American Journal Psychiatry,** v. 166, n. 6, p. 642–645, 2009.

KANAYAMA, G.; BROWER, K. J.; WOOD, R. I.; HUDSON, J. I.; POPE, H. G. Anabolic androgenic steroid dependence: an emerging disorder. **Addiction,** v. 104, p. 1966–1978, 2009.

KANAYAMA, G.; BROWER, K. J.; WOOD, R. I.; HUDSON, J. I.; POPE, H. G. Treatment of anabolic-androgenic steroid dependence: emerging evidence and its implications. **Drug Alcohol Dependence,** v. 109, p. 6–13, 2010.

KANAYAMA, G.; HUDSON, J. I.; POPE JR., H. G**.** Features of men with anabolic-androgenic steroid dependence: a comparison with nondependent AAS users and with AAS nonusers. **Drug and Alcohol Dependence,** v. 102, p. 130–137, 2009.

KAUFFMAN, C. A.; MALANI, A. N. **Fungal Infections Associated with Contaminated Steroid Injections.** ASMscience.org/MicrobiolSpectrum, 2016.

LACERDA JR, V. **Fundamentos de Espectrometria e Aplicações**. 1. ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 2018.

LANÇAS, F. M. A cromatografia líquida moderna e a espectrometria de massas: Finalmente "compatíveis"? II. A escolha do analisador de massas. **Scientia Chromatographica**, v. 5, n. 1, p. 27–46, 2013.

LISE, M. L. Z.; DA GAMA E SILVA, T. S.; FERIGOLO, M.; BARROS, H. M. T. O abuso de esteróides anabólico-androgênicos em atletismo. **Revista Assistência Médica Brasileira,** v. 45, n. 4, p. 364–370, 1999.

MARQUES, L. A. R.; CATHARINO, R. R.; BRUNS, R. E.; EBERLIN, M. N. Electrospray ionization mass spectrometry fingerprinting of perfumes: rapid classification and counterfeit detection. **Rapid Communications in Mass Spectrometry,** v. 20, p. 3654–3658, 2006.

MARTELLO, S.; FELLI, M.; CHIAROTTI, M. Survey of nutritional supplements for selected illegal anabolic steroids and ephedrine using LC-MS/MS and GC-MS methods, respectively. **Food Addit Contam**, 24, n. 3, p. 258-265, Mar 2007.

MASSADA, M.; RIBEIRO, S.; FERREIRA, V. Consumo de substancias dopantes no desporto recreativo português – um estudo em praticantes de musculação. **Revista Medicina Desportiva,** v. 2, n. 4, p. 19 – 21, 2011.

MIDDLEBROOK, I.; SCHOENER, B. Anabolic Steroid Toxicity. In: StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, StatPearls Publishing LLC., 2019.

MIECH, R. A.; JOHNSTON, L. D.; O'MALLEY, P. M.; BACHMAN, J. G.; SCHULENBERG, J. E. **Monitoring the Future National Survey Results on Drug Use, 1975-2015.** Secondary School Students, Volume I. Institute for Social Research, the University Of Michigan, Ann Arbor, Michigan, 2016.

MØLLER, J. K. S.; CATHARINO, R. R.; EBERLIN, M. N. Electrospray ionization mass spectrometry fingerprinting of whisky: immediate proof of origin and authenticity. **Analyst,** v. 130, n. 6, p. 890–897, 2005.

MOREAU, R. L. M.; SIQUEIRA, M. E. P. B. **Toxicologia Analítica**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2016.

MÜLLER, L. S.; MOREIRA, A. P. L.; MURATT, D. T.; VIANA, C; CARVALHO, L. M. An Ultra-High Performance Liquid Chromatography–Electrospray Tandem Mass Spectrometric Method for Screening and Simultaneous Determination of Anorexic, Anxiolytic, Antidepressant, Diuretic, Laxative and Stimulant Drugs in Dietary Supplements Marketed for Weight Loss. **Journal of Chromatographic, Science,** v. 57, n. 6, p. 528–540, 2019.

MUSHARRAF, S. G.; GULZAR, U. Effective separation and simultaneous analysis of anabolic androgenic steroids (AAS) in their pharmaceutical formulations by a validated TLC densitometry method. **Chemistry Central journal**, 6, n. 1, p. 54-54, 2012.

NETO, M. M. J. Estatística multivariada uma visão didática - metodológica. **Revista de Filosofia e Ensino, 2004. http://www.mat.ufrgs.br/~viali/cursos/ceea/multi/textos/Moita_Neto.pdf**

NEVES, D. B. D. J; CALDAS, E. D. GC-MS quantitative analysis of black market pharmaceutical products containing anabolic androgenic steroids seized by the Brazilian Federal Police. **Forensic Science International,** v. 275, p. 272–281, 2017.

NOGUEIRA, F. R. S.; BRITO, A. F.; VIEIRA, T. I.; DE OLIVEIRA, V. C.; LINKA, R.; GOUVEIA, B. Prevalência de uso de recursos ergogênicos em praticantes de musculação na cidade de João Pessoa, Paraíba. **Revista Brasileira de Ciências do Esporte,** v. 37, p. 56–64, 2015.

OGA, S.; CAMARGO, M. M. D. A.; BATISTUZZO, J. A. D. O. **Fundamentos de Toxicologia**. São Paulo: Atheneu Editora, 2014.

OLIVEIRA, L. S.; ROSSATO, L. G.; BERTOL, C. D. Análise da contaminação microbiológica de diferentes dentifrícios. **Revista de Odontologia UNESP,** v. 45, n. 2, p. 85–89, 2016.

PARKINSON, A. B.; EVANS, N. A. Anabolic androgenic steroids: a survey of 500 users. **Medicine &. Science in Sports & Exercise,** v. 38, n. 4, p. 644–651, 2006.

PARSSINEN, M.; KUJALA, U.; VARTIAINEN, E.; SARNA, S.; SEPPALA, T. Increased premature mortality of competitive powerlifters suspected to have used anabolic agents. **International Journal Sports Medicine,** v. 21, n. 3, p. 225–227, 2000.

PATANÈ, F. G.; LIBERTO, A.; MAGLITTO, A. N. M.; MALANDRINO, P.; ESPOSITO, M.; AMICO, F.; COCIMANO, G.; LI ROSI, G.; CONDORELLI, D.; DI NUNNO, N. Nandrolone Decanoate: Use, Abuse and Side Effects. **Medicina,** v. 56, n. 606, p. 1–24, 2020.

PELLEGRINI, M.; ROTOLO. M. C.; GIOVANNADREA, R. D.; PACIFICI, R.; PICHINI, S. A simple toxicological analysis of anabolic steroid preparations from the black market. **Annales de Toxicologie Analytique,** v. 24, n. 2, p. 67–72, 2012.

PERRY, P. J.; LUND, B. C.; DENINGER, M. J.; KUTSCHER, E. C.; SCHNEIDER, J., Anabolic steroid use in weightlifters and bodybuilders: an internet survey of drug utilization. **Clinical Journal Sport Medicine,** v. 15, n 5, p. 326–330, 2005.

PETERS, F. T.; MAURER, H. H. Bioanalytical method validation and its implications for forensic and clinical toxicology - A review. **Accreditation and Quality Assurance,** v. 7, n. 11, p. 441–449, 2002.

PETERSSON, A.; GARLE, M.; GRANATH, F.; THIBLIN, I. Morbidity and mortality in patients testing positively for the presence of anabolic androgenic steroids in connection with receiving medical care. A controlled retrospective cohort study. **Drug Alcohol Dependence,** v. 81, p. 215–220, 2006.

PIACENTINO, D.; KOTZALIDIS, G. D.; DEL CASALE, A.; AROMATARIO, M. R. et al. Anabolic-androgenic steroid use and psychopathology in athletes. A systematic review. **Current neuropharmacology**, v. 13, n. 1, p. 101–121, 2015.

PIROLA, I.; CAPPELLI, C.; DELBARBA, A.; SCALVINI, T.; AGOSTI, B.; ASSANELLI, D.; BONETTI, A.; CASTELLANO, M. Anabolic steroids purchased on the Internet as a cause of prolonged hypogonadotropic hypogonadism. **Fertility and Sterility,** v. 94, n. 6, p. 2331.e1 2331.e3, 2010.

POPE, H. G.; KANAYAMA, G.; ATHEY, A.; RYAN, E.; HUDSON, J. I.; BAGGISH, A. The lifetime prevalence of anabolic-androgenic steroid use and dependence in Americans: current best estimates. **The American Journal Addictions,** v. 23, p. 371–377, 2014.

POPE, H. G.; KATZ, D. L.; CHAMPOUX, R. Anabolic steroid use among 1010 college men. **Physician Sportsmedicine,** v. 16, p. 75–81, 1988.

POPE, H. G.; KEAN, J.; NASH, A.; KANAYAMA, G.; SAMUEL, D. B.; BICKEL, W. K.; HUDSON, J. I. A diagnostic interview module for anabolic-androgenic steroid dependence: preliminary evidence of reliability and validity. **Experimental and Clinical Psychopharmacology,** v. 18, p. 203–210, 2010.

POPE, H. G.; WOOD, R.; ROGOL, A.; NYBERG, F.; BOWERS, L.; BHASIN, S. Adverse health consequences of performance-enhancing drugs: an Endocrine Society scientific statement. **Endocrine Reviews,** v. 35, p. 341–375, 2014.

POPE, H.; PHILLIPS, K.; OLIVARDIA, R. **The Adonis Complex: the Secret Crisis of Male Body Obsession.** Simon & Schuster, New York, 2000.

POPE, H.; KANAYAMA, G.; HUDSON, J. Risk factors for illicit anabolic-androgenic steroid use in male weightlifters: a cross-sectional cohort study. **Biology Psychiatry,** v. 71, p. 254–261, 2012.

POZO, O. J.; EENOO, P. V.; DEVENTER, K.; DELBEKE, F. T. Detection and characterization of anabolic steroids in doping analysis by LC-MS. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 27, n. 8, p. 657–671, 2008.

PROKUDINA, E. A.; PRCHALOVÁ, J.; VYŠATOVÁ, E.; KUCHAŘ, M.; RAJCHL, A.; LAPČÍK, O. Analysis ofanabolic androgenic steroids by direct analysis in real time ionization with time-of-flight mass spectrometry. **International Journal of Mass Spectrometry,** v. 392, p. 28–33, 2015.

RIBEIRO, M. V. M.; BORALLE, N.; FELIPPE, L. G.; PEZZA, H. R.; PEZZA, L. ^{1}H NMR determination of adulteration of anabolic steroids in seized drugs. **Steroids,** v. 138, p. 47–56, 2018.

RITSCH, M.; MUSSHOFF, F. Dangers and risks of black market anabolic steroid abuse in sports - gas chromatography-mass spectrometry analyses. **Sportverletz Sportschaden,** v. 14, n. 1, p. 1–11, 2000.

ROGGO,Y.; CHALUS, P.; MAURER, L.; LEMA-MARTINEZ, C.; EDMOND, A.; JENT, N. A review of near infrared spectroscopy and chemometrics in pharmaceutical technologies. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis,** v. 44, n. 3, p. 683–700, 2007.

ROMAN, M.; ROMAN, D. L.; OSTAFE, V.; CIORSAC, A.; ISVORAN, A. Computational assessment of pharmacokinetics and biological effects of some anabolic and androgen steroids. **Pharmaceutical Research,** v. 35, 2018.

ROMÃO, W.; LALLI, P. M.; FRANCO, M. F.; SANVIDO, G.; SCHWAB, N. V.; LANARO, R.; COSTA, J. L.; SABINO, B. D.; BUENO, M. I. M. S.; DE AS, G. F.; DARODA, R. J.; DE SOUZA, V.; EBERLIN, M. N. Chemical profile of meta-chlorophenylpiperazine (m-CPP) in ecstasy tablets by easy ambient sonic-spray ionization, X-ray fluorescence, ion mobility mass spectrometry and NMR. **Analytical and Bioanalytical Chemistry,** v. 400, n. 9, p. 3083–3064, 2011.

SABIN, J. G.; FERRÃO, M. F.; FURTADO, J. C. Análise multivariada aplicada na identificação de fármacos antidepressivos. Parte II: Análise por componentes principais (PCA) e o método de classificação SIMCA. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas,** v. 40, n. 3, p. 387–96, 2004.

SAGOE, D.; MCVEIGH, J.; BJORNEBEKK, A.; ESSILFIE, M. S.; ANDREASSEN, C. S.; PALLESEN, S. Polypharmacy among anabolic-androgenic steroid users: a descriptive metasynthesis. **Substance Abuse Treatment, Prevention and Policy,** v. 10, n. 12, 2015.

SAWAYA, A. C. H. F.; TOMAZELA, D. M.; CUNHA, I. B. S.; BANKOVA, V. S.; MARCUCCI, M. C.; CUSTODIO, A. R.; M. N. EBERLIN, Electrospray ionization mass spectrometry fingerprinting of Propolis. **Analyst,** v. 129, p. 739–744, 2004.

Scientific Working Group for Forensic Toxicology (SWGTOX) **Standard Practices for Method Validation in Forensic Toxicology, Journal of Analytical Toxicology**, Volume 37, Issue 7, September 2013, Pages 452–474, https://doi.org/10.1093/jat/bkt054

SILVA, E. V. **Estabilidade de Medicamentos Injetáveis.** Boletim do Centro Brasileiro de Informações sobre Medicamentos, CEBRIM. Conselho Federal de Farmácia – CFF, Ano 3, n. 08, 1999.

SILVA, L. S. M. F.; MOREAU, R. L. M. Uso de esteróides anabólicos androgênicos por praticantes de musculação de grandes academias da cidade de São Paulo. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêutica,** v. 39, p. 327–333, 2003.

SILVA, P. R. P. D.; MACHADO JÚNIOR, L. C.; FIGUEIREDO, V. C.; CIOFFI, A. P. et al. Prevalência do uso de agentes anabólicos em praticantes de musculação de Porto Alegre. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 51, p. 104-110, 2007.

SMITH, R. M.; DERADO, G.; WISE, M. HARRIS, J. R. CHILLER, T.; MELTZER, M. I.; PARK, B. J. Estimated Deaths and Illnesses Averted During Fungal Meningitis Outbreak Associated with Contaminated Steroid Injections, United States, 2012–2013. **Emerging Infectious Diseases,** v. 21, n. 6, 2015.

SOUZA, F. R.; DOS SANTOS, M. R.; PORELLO, R. A.; FONSECA, G. W. P.; SAYEGHA, A. L. C.; LIMA, T. P. Diminished cholesterol efflux mediated by HDL and coronary artery disease in young male anabolic androgenic steroid users. **Atherosclerosis**, v. 283, p. 100–105, 2019.

SOUZA, F. R.; SALES, A. R. K.; DOS SANTOS, M. R.; PORELLO, R. A.; FONSECA, G. W. P.; SAYEGH, A. L. C. Retrograde and oscillatory shear rate in young anabolic androgenic steroid users. **Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports,** v. 29, 422–429, 2018.

THEVIS, M.; SCHRADER, Y.; THOMAS, A.; SIGMUND, G.; GEYER, H.; SCHÄNZER, W. Analysis of confiscated black market drugs using chromatographic and mass spectrometric approaches. **Journal of Analytical Toxicology,** v. 32, p. 232–240, 2008.

TSAI, I. L.; SUN,, H. Y.; CHEN, G. Y.; LIN, S. W. KUO, C. H. Simultaneous quantification of antimicrobial agents for multidrug-resistant bacterial infections in human plasma by ultra-high-pressure liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Talanta,** v. 116, n. 1, p. 593–603, 2013.

UNITED NATIONS OFFICE ON DRUGS AND CRIME. UNODC. **Guidance for the Validation of Analytical Methodology and Calibration of Equipment used for Testing of Illicit Drugs in Seized Materials and Biological Specimens. United Nations:** New York, 2009. Disponível em https://www.unodc.org/documents/scientific/vali- dation_E.pdf.

VICINA, L. **Análise multivariada: Da Teoria à Prática.** Monografia de Especialização, UFSM, 2005.

WOOD, R. I. Anabolic-androgenic steroid dependence? Insights from animals and humans. **Frontiers Neuroendocrinology,** v. 29, n. 4, p. 490–506, 2008.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

O presente trabalho teve como objetivo a condução da análise química de esteroides anabolizantes androgênicos veiculados em solução de oleosa, apreendidos pela Secretaria da Receita Federal no Rio Grande do Sul entre os anos de 2016 e 2017.

3.2. Objetivos Específicos

- Realizar a catalogação dos produtos apreendidos pela Secretaria da Receita Federal transportadas pela Empresa Brasileira de Correios e Telégrafos, analisando os parâmetros: (*i*) rotulagem, (*ii*) procedência de origem e (*iii*) destino postal;
- Desenvolver e validar a metodologia analítica para análise dos compostos, verificando se os anabolizantes apreendidos são falsificados, ou seja, contém outras substâncias não descritas em sua composição.

4. MANUSCRITO

O manuscrito "*Mass spectrometry determination of seized oil-based anabolic-androgenic steroids products*", que conta com a parte experimental analítica desenvolvida, foi submetido para publicação na revista *Forensic Science International* (ISSN *0379-0738*) e está apresentado a seguir. As normas de publicação estão disponíveis no Anexo II. Os dados referentes aos resultados das análises microbiológicas serão publicados posteriormente em um segundo artigo científico.

Mass spectrometry determination of seized oil-based anabolic-androgenic steroids products

Masurquede A. Coimbra[a,*], Fábio S. Barbosa[a,*], Camila Scheid[a], Sandra M.D. Macedo[a],[b], Mauricio Yonamine[c], Josias O. Merib[a], Tiago F. Oliveira[a], Sarah Eller[a]

[a] Pharmacosciences Department, Federal University of Health Sciences of Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil.

[b] Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia Forense (INCT Forense), Porto Alegre, Brazil.

[c] School of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo – SP, 05508-000, Brazil.

*Contributed equally to this article

To whom correspondence should be addressed:

Corresponding Author: Tiago Franco de Oliveira
e-mail: oliveira@ufcspa.edu.br

Corresponding Author: Sarah Eller
e-mail: sarahcarobini@hotmail.com

Abstract

Introduction: The presence of anabolic-androgenic steroids (AAS) in illegal commercial products has been pointed as a global threat for public health. Due the correlation with adverse toxicological effects, there is a growing interest in the implementation of straightforward methods for the determination of AAS in seized products. This work exploited the development of a mass spectrometry approach to characterize the illegal oil formulations containing AAS. **Methods**: The optimization of sample preparation was performed through a simplex-centroid design and the best condition was described as follow: an aliquot of 5 µL of sample were added with 995 µL of acetonitrile and water (75:25, v/v). The solution was vortexed and centrifuged. After that, 10 µL of supernatant were added with 35 µL of acetonitrile and water and 5 µL of testosterone-d_3. An aliquot of 5 µL was injected into the analytical system. **Results:** The method developed was validated and successfully applied in 115 seized samples. Testosterone and its esters had the highest incidence, found in more than 50% of the samples. Besides that, drugs such as boldenone, methandienone, and trenbolone have also been found, where the low quality of the samples was evidenced by the wide variation in the concentration of the drugs, always quantified in sub-doses. Finally, at least one AAS was detected in each sample analyzed. The statistical results were grouped by principal components analysis, to better understand the profile of the seized samples. **Conclusion:** This work successfully established a fast and simple method for determination of AAS and can be applied to verify the profile of seized samples.

KEYWORDS: AAS, seized products, UHPLC-MS/MS, principal component analysis.

1. Introduction

Anabolic-androgenic steroids (AAS) are synthetic derivates of testosterone and therefore hold the potential to be utilized as a supplement to promote enhancement of strength, bodyweight, and performance [1,2]. In consequence, a growing in illegal market of AAS on the internet has been observed in recent years [3]. This fact can enable an uncontrolled sales and distribution. In addition, the clandestine products may contain no active ingredients, different AAS from those stated on the label, or ingredients with no anabolic action [1]. The misuse of these compounds was associated with a series of adverse events, despite the individuals had a misperception that ASS use is safe or that side effects are manageable [4]. Considering the adverse health effects, the consumption of AASs can lead to damage on several organ systems, including cardiovascular, hematologic, psychiatric and neuropsychologic, hormonal and metabolic [4-8]. In this scenario, the early chemical characterization of consumed AAS products is crucial to improve toxicovigilance strategies.

The analytical procedures for determination of counterfeit AAS products can be conducted by several analytical techniques. A number of studies in the literature describe the use of gas chromatography-combustion-isotope ratio mass spectrometry to differentiate between the endogenous of a synthetic preparation by measurement of their differing carbon isotope ($^{13}C/^{12}C$) ratio [9-11]. Other techniques can also be applied such as magnetic nuclear proton resonance [12], Fourier-transform infrared spectroscopy [13], direct analysis in real-time ionization mass spectrometry [14], and enzyme-linked immunoassays [15]. Gas chromatography coupled to mass spectrometry is widely applied in qualitative and quantitative methods being considered the gold standard due to the high sensitivity and specificity [1,16-20]. However, there are few studies for determination of counterfeit AAS products applying ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UHPLC-MS/MS) [21-24]. Furthermore, the use chemometrics tools remains poorly explored to sample preparation optimized conditions. The use of a simplex-centroid design can be observed in sample preparation step in seized products analysis [25]. The statistical model is based in a ternary mixture of solvents, in which different proportions were adopted to generate a mathematical model capable to define the best analytical condition. However, according to our knowledge, no reports were found in the literature describing the use of this optimization strategy to sample preparation of seized oil-based ASS.

In parallel, multivariate statistical analysis potentially provides useful information for correlate the obtained results and characterize the profile of the seized samples. Therefore, this work exploited the development of a UHPLC-MS/MS approach to characterize of the seized oil-based AAS products. The developed method was optimized and applied in 115 seized samples. Finally, the statistical results were grouped by principal components analysis, to better understand the profile of the seized samples.

2. Materials e methods

2.1 Chemicals and reagents

LC-MS-grade methanol and acetonitrile were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Formic acid 98% and dimethyl sulfoxide (DMSO) were purchased from Sigma-Aldrich (Milwaukee, WI, USA), and water was purified using a Milli-Q system (Millipore, Billerica, MA, USA). The analytical standards of trenbolone acetate, boldenone, testosterone enanthate, trenbolone enanthate, stanozolol, methandienone, nandrolone, oxandrolone, testosterone, testosterone cypionate, testosterone propionate and, testosterone-d_3 (internal standard, IS) were obtained from

Cerilliant Corporation (Round Rock, TX, USA). Boldenone undecylenate was purchased from LGC Standards (Teddington, United Kingdom). Stock solutions containing the analytical standards were individually prepared in acetonitrile at a concentration of 100 μg/mL and stored at -20 °C. The stock solutions were mixed and diluted in acetonitrile: water (75:25, v/v) to obtain a working solution containing all compounds at a final concentration of 1 μg/mL.

2.2 Optimization and sample preparation

The optimization of sample preparation was performed through a simplex-centroid design with the solvents; water, DMSO, and acetonitrile. The optimization strategy adopted in this study consisted of a statistical model based on a ternary mixture of solvents, in which different proportions were adopted to generate a mathematical model capable to define the best condition. In our study, the geometric means of the chromatographic peak areas of the analytes in each experiment were used as an analytical response, and these data were evaluated using the software Statistica 8.0 (Statsoft, Tulsa, USA). The solvent proportions used in this study are shown in **Table 1**.

Oily solutions for intramuscular (i.m.) application suspected to contain AAS (n=115) were seized in mailing services by the Department of Federal Revenue of Brazil, between 2016 – 2017, in the Rio Grande do Sul State. The samples were identified and stored at room temperature until analysis. An aliquot of 5 μL of sample were added with 995 μL of acetonitrile and water (75:25, v/v). The solution was then vortexed for 30 seconds and centrifuged at 15,000 rpm for 3 minutes. After that, 10 μL of supernatant were transferred to a new tube and added with 35 μL of acetonitrile and water (75:25, v/v) and 5 µL of testosterone-d_3 (internal standard, IS, 250 ng/mL). An aliquot of 5 µL were injected into the analytical system.

The multivariate analyses were performed using the results of identification of the AAS were clustered using principal component analysis (PCA) using the software Prism 9 (GraphPad Prism Software, San Diego, CA).

2.3 *Instrumentation and analytical conditions*

A Nexera UFLC system coupled to a LCMS-8040 triple quadrupole mass spectrometer (Shimadzu, Kyoto, Japan) was used for the analysis. The electrospray parameters were set in the positive ion mode as follows: capillary voltage, 4500 V; desolvation line temperature, 250 ºC; heating block temperature, 400 ºC; drying gas, 18/L min; and nebulizing gas, 2 L/min. Collision-induced dissociation was obtained with 230 kPa argon pressure. The multiple reaction monitoring (MRM) transitions of all analytes are listed in **Table 2**. The chromatographic separation was performed with an Acquity UPLC® C18 column (2.1 x 50 mm, 1.7 µm particle size) (Waters Corporation, Ireland). The analyses were performed in gradient elution mode with a flow rate of 0.4 mL/min and the gradient mobile phase system consisted of water (solvent A) and acetonitrile (solvent B) both fortified with 0.1% formic acid: 0 – 2.5 min, 10 – 100% of B; 2.5 – 3.5 min, 100% of B; 3.5 – 3.6 min, 100 – 10% of B; 3.6 – 6.5 min, 10% B. The column oven was kept at 50 °C. The data were processed using LabSolutions software (Shimadzu, Kyoto, Japan).

2.4 Method validation

The method was validated according to the United Nations Office on Drugs and Crime (UNODC) guide for Validation of Analytical Methodology and Calibration of

Equipment used for Testing of Illicit Drugs in Seized Materials and Biological Specimens (seized materials - quantitative analysis) [26]. The evaluated parameters were lower limit of quantitation (LLOQ), linearity, carryover, precision (intra and inter-day), and accuracy.

For linearity, a working solution was prepared at six different concentrations, in six replicates. The testosterone enanthate, and testosterone cypionate linearity were evaluated at the concentration range of 300 – 2,000 ng/mL, all others in range of 100 – 2,000 ng/mL. Standard plots (concentration versus area of analyte/internal standard) were constructed, and linearity was evaluated through linear regression analysis through the least square method and the determination coefficients (r^2). Homoscedasticity was evaluated by the variance of the results for each point of the curve using the Cochran C-test. In cases of heteroscedasticity, it was applied weighted least-squares linear regression. The carryover was evaluated by the injection of six blank samples after analyzing the highest concentration of the calibration curve.

Precision (intra and inter-day assay) and accuracy (bias) parameters were evaluated through eighteen determinations, covering the linear range of the analytical method, in three concentration levels: low, medium, and high, with six replicates at each level. The inter-day assay was studied by comparing the assays on three different days. The results obtained were calculated by one-way analysis of variance (ANOVA).

3. Results and Discussion

3.1 Development analytical method

The evaluation of the best solvent used in sample preparation was determined by a simplex-centroid design, using water, acetonitrile, and dimethyl sulfoxide (DMSO). To obtain the response surface graph, we use the geometric mean of all analytes chromatographic areas through a special cubic model. The test results are shown in **Fig. 1**. The best results were obtained by using a mixture of acetonitrile and water (75:25, v/v). The mathematical model used presented a coefficient of determination (R^2) 0.906, which indicates that the experimental results can be well explained with this modeling strategy.

LLOQ for testosterone enanthate and testosterone cypionate was fixed at 60 ng/mL and for other drugs 20 ng/mL. The relative standard deviation (RSD) was calculated using six determinations, and as acceptance criteria, was applied the RSD below 20%. The results obtained for the linearity parameter are presented in **Table 3**. Standard curves were constructed, and the coefficients of determination obtained were in the range of 0.9994 – 0.9949, values above the established acceptance criteria of 0.99. Cochran's C-Test was used to assess linear fit and homoscedasticity. The curves were considered homoscedastic when $C_{calc} < C_{crit}$, and heteroscedastic when $C_{calc} > C_{crit}$. For curves in which the phenomenon of heteroscedasticity was observed, we apply weighted least squares linear regression using the weighting factor $1/y^2$, as shown in **Table 3**.

The results obtained for the precision and accuracy parameters are summarized in **Table 4**. The study was performed at three different levels, low (60 ng/mL), medium (190 ng/mL), and high (320 ng/mL). The results for intra and inter-day precision were calculated using one-way ANOVA, and the results are expressed as relative standard deviation (RSD). For the low level, the RSD below 20% was accepted and for the medium and high levels, the RSD below 15% was accepted. All the analytes studied showed a low dispersion between the obtained values, and the results were considered satisfactory, within the established limits. The accuracy that was calculated using the ratio between measured concentration and nominal concentration *x* 100, also presented satisfactory results for all analytes. Where the results obtained were between 80 – 120% for the low level and 85 – 115% for the medium and high level.

3.2 Analysis of seized samples

The validated method was applied in 115 oil-based ASS seized samples. We observed that all tested material contained at least one of the studied AAS. Among them, only one sample contained only one drug (methandienone), in the concentration of 880 mg/mL. All others were presented as mixtures of two or more AAS. The quantitative analysis showed a considered variation in the concentration, and in all samples, the drugs were quantified at low concentrations compared that label reported. In our study the most found drugs were testosterone and its esters, which in the form of mixtures were present in 53.04% (n=61) of the samples follow by methandienone and trenbolone acetate, detected in 18.26% (n=21) and 10.43% (n=12) of the samples, respectively. The incidence of AAS in the samples is shown in **Fig. 2**. The low quality of the samples is evidenced by the wide variation in the concentration of AAS present. As an example, boldenone undecylenate detected in two samples, ranged from 930 mg/mL to 85 mg/mL.

An exploratory analysis by PCA was performed to understand the composition of the samples. To carry out the analysis, the data were organized in a matrix of 115 lines referring to the samples, and 10 columns referring to the drugs found and their concentrations. To reduce the variation caused by outliers, the sample concentrations were standardized through a pre-treatment [(drug concentration – mean of concentrations)/standard deviation].

The model was able to explain approximately 40% of the sample variation using two main components, PC1 and PC2. The graph of scores PC1 x PC2 for each sample and the graph of Loadings are shown in **Fig. 3**. The scores graph shows a large overlap of the samples, the highest values calculated for PC2 are related to testosterone and its testosterone enanthate and testosterone propionate esters (**Fig. 3**), where the ordering of the samples in the PC2 positive quadrant (PC2 positive; PC1 negative) is due to the presence of these drugs in its composition. The samples grouped close to the zero of the PC1 and PC2 axes are related to the testosterone cypionate contained in more than 20% of the samples. The analysis also showed a cluster of 8 samples (overlapping points) ordered by the presence of nandrolone and acetate and trenbolone enanthate. The highest PC1 values calculated are related to boldenone and boldenone undecylenate, which due to the low incidence in the samples, there are only 2 samples (overlapping points) in the PC1 positive quadrant (PC1 positive; PC2 positive) as shown in **Fig. 3**.

According to Berneira et al. (2019), there has been a considerable increase in the number of seizures of pharmaceutical formulations containing AAS all around the world, and a considerable proportion of these formulations are counterfeit [27]. In Brazil, the increase in the seizure of counterfeit products is evidenced in a series of scientific papers. Neves and collaborators (2013) reported data obtained from the National Institute of Criminalistics of the Brazilian Federal Police Department at about 3676 anabolic products seized. About 37% of the seized products were counterfeit and testosterone, nandrolone, and stanozolol were the most reported substances on the labels. As for drugs not declared on the labels, testosterone and its esters were detected in 582 samples corresponding to 45% [28]. Ribeiro and collaborators (2019) describe three types of adulteration found in the analyzed samples seized by Brazilian Federal Police; absence of the active ingredient, adulteration with other substances, and concentration values below those indicated on the label. The study showed that 20% of the samples did not have the active ingredient described in the label [11]. Neves and

Caldas (2017) evaluated 328 medicine and 17 dietary supplements seized by the Brazilian Federal Police, on which 53% of the evaluated drugs were counterfeit or substandard, and among the 17 dietary supplements, 5 were contaminated with undeclared AASs [18]. Recently, Campos and collaborators (2020) used an LC-QTOF method to determine stanozolol in samples seized by the Brazilian Federal Revenue Service Agency. Analyzes revealed that 90% of the samples were adulterated and 65% of them contained higher doses than indicated on the label [2].

4. Conclusion

In this study, a method for the determination of 12 ASS was proposed and implemented. The method validated by UHPLC-MS/MS proved to be an excellent option for determining these drugs in injectable oil, with a rapid and reproductive analysis. The developed method was successfully applied in the analysis of 115 seized ampoules, without labeling. The statistical analysis by PCA helped in the understanding of the composition profile of the samples. Finally, the method established can be used as a safe alternative by inspection agencies, and the low quality of the material seized puts the health of consumers of black market originated AAS at risk.

Conflict of Interest

There are no financial or other relations that could lead to a conflict of interest.

Funding

This study was financed by the *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior* – Brazil (CAPES) - Finance Code 001.

Acknowledgments

We also thank the Shimadzu Brazil for access to UHPLC-ESI-MS/MS system.

CRediT authorship contribution statement

Masurquede A. Coimbra: Conceptualization, Formal analysis, Methodology, Writing - original draft. **Fábio S. Barbosa**: Conceptualization, Formal analysis, Methodology, Writing - original draft. **Camila Scheid**: Methodology, Validation, Visualization. **Sandra M.D. Macedo**: Conceptualization, Writing - review & editing. **Mauricio Yonamine**: Conceptualization, Writing - review & editing. **Josias O. Merib**: Conceptualization, Visualization, Writing - original draft, Writing - review & editing. **Tiago Franco de Oliveira:** Conceptualization, Project administration, Resources, Writing - original draft, Writing - review & editing. **Sarah Eller**: Conceptualization, Project administration, Supervision, Writing - original draft, Writing - review & editing.

References

[1] P.J. Heinsvig, L.S. Nielsen, C. Lindholst, Development of a method using gas chromatography–mass spectrometry for profiling of oil-based androgenic anabolic steroid products, J. Chromatogr. A. 1620 (2020) 1-10. doi.org/10.1016/j.chroma.2020.460989.

[2] E.R. Campos, S. Eller, L. Birk, M.A. Coimbra, S.M.D. Macedo, M. Yonamine, J.O. Merib, T.F. Oliveira, Analysis of seized stanozolol formulations in South Brazil by liquid chromatography coupled to quadrupole time-of-flight-mass spectrometry, Drug. Anal. Res. 4 (2020) 58 -63. doi.org/10.22456/2527-2616.108853.

[3] C. Weber, M. Kamber, V. Lentillon-Kaestner, O. Krug, M. Thevis, Seizures of doping substances at the Swiss Border-a descriptive investigation, Forensic Sci Int. 257 (2015) 359-368. doi: 10.1016/j.forsciint.2015.10.001.

[4] H.G. Pope Jr., R.I. Wood, A. Rogol, F. Nyberg, L. Bowers, S. Bhasin, adverse health consequences of performance-enhancing drugs: An endocrine society scientific statement, Endocrine Reviews. 35 (2014) 341-375. doi.org/10.1210/er.2013-1058.

[5] F. Hartgens, H. Kuipers, Effects of Androgenic-Anabolic Steroids in Athletes, Sports Med. 34 (2004) 513-554. doi.org/10.2165/00007256-200434080-00003.

[6] M.S. Bahrke, C.E. Yesalis, Abuse of anabolic androgenic steroids and related substances in sport and exercise, Curr. Opin. Pharmacol. 4 (2004) 614-620. doi.org/10.1016/j.coph.2004.05.006.

[7] F.R. De Souza, M.R. Dos Santos, R.A. Porello, G.W.P Fonseca, A.L.C. Sayegh, T.P. Lima, F.D. Ferreira, T.F. Oliveira, M. Yonamine, L. Takayama, R.M.R. Pereira, C.E. Negrão, M. Passarelli, C.E. Rochitte, M.J.N. Alves, Diminished cholesterol efflux mediated by HDL and coronary artery disease in young male anabolic androgenic steroid users, Atherosclerosis. 283 (2019) 100-105. doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2019.02.006.

[8] M. Montisci, R. El Mazloum, G. Cecchetto, C. Terranova, S.D. Ferrara, G. Thiene, C. Basso, Anabolic androgenic steroids abuse and cardiac death in athletes: morphological and toxicological findings in four fatal cases, Forensic Sci. Int. 10 (2012) e13-8. doi: 10.1016/j.forsciint.2011.10.032.

[9] G. Forsdahl, C. Östreicher, M. Koller, G. Gmeiner, Carbon isotope ratio determination and investigation of seized testosterone preparations, Drug Test. Anal. 3 (2011) 814-819. doi:10.1002/dta.373.

[10] L. Brooker, A. Cawley, J. Drury, C. Edey, N. Hasick, C. Goebel, Stable carbon isotope ratio profiling of illicit testosterone preparations-domestic and international seizures, Drug Test. Anal. 6 (2014) 996-1001. doi:10.1002/dta.1533.

[11] A.D. Brailsford, W.N.M Majidin, N. Wojek, D.A. Cowan, C. Walker, IRMS delta values (^{13}C) of nandrolone and testosterone products available in the UK: Implications for anti-doping, Drug Test. Anal. 10 (2018) 1722-1727. doi:10.1002/dta.2530.

[12] M.V. Ribeiro, N. Boralle, L.G. Felippe, H.R. Pezza, L. Pezza, 1H NMR determination of adulteration of anabolic steroids in seized drugs, Steroids. 138 (2019) 47-56. doi.org/10.1016/j.steroids.2018.07.002.

[13] D.B.J. Neves, M. Talhavini, J.W.B. Braga, J.J. Zaccaa, E.D. Caldas, Detection of Counterfeit Durateston® Using Fourier Transform Infrared Spectroscopy and Partial Least Squares - Discriminant Analysis, J. Braz. Chem. Soc. 28 (2017) 1288-1296. doi.org/10.21577/0103-5053.20160293.

[14] E.A. Prokudina, J. Prchalová, E. Vyšatová, M. Kuchař, A. Rajchl, O. Lapčík, Analysis of anabolic androgenic steroids by direct analysis in real time ionization with time-of-flight mass spectrometry, Int. J. Mass. Spectrom. 392 (2015) 28-33. doi.org/10.1016/j.ijms.2015.08.022.

[15] L. Huml, D. Havlová, O. Longin, E. Staňková, B. Holubová, M. Kuchař, E. Prokudina, Z. Rottnerová, T. Zimmermann, P. Drašar, O. Lapčík, M. Jurášek, Stanazolol derived ELISA as a sensitive forensic tool for the detection of multiple 17α-methylated anabolics, Steroids. 155 (2020) 108550. doi:10.1016/j.steroids.2019.108550.

[16] Section, U.N.I.D.C.P.S. Drug characterization / impurity profiling: background and concepts, Manual for use by National Laboratories and Drug Testing Laboratories, UN, 2001.

[17] E. Deconinck, Trends in the analysis of falsified and illegal medicines, Talanta. 203 (2019) 328-329. doi.org/10.1016/j.talanta.2019.05.074.

[18] D.B.J. Neves, E.D. Caldas, GC–MS quantitative analysis of black market pharmaceutical products containing anabolic androgenic steroids seized by the Brazilian Federal Police, Forensic. Sci. Int. 275 (2017) 272-281. doi.org/10.1016/j.forsciint.2017.03.016.

[19] O. Krug, A. Thomas, K. Walpurgis, T. Piper, G. Sigmund, W. Schänzer, T. Laussmann, M. Thevis, Identification of black market products and potential doping agents in Germany 2010-2013, Eur. J. Clin. Pharmacol. 70 (2014) 1303-1311. doi.org/10.1007/s00228-014-1743-5.

[20] V. Coopman, J. Cordonnier, Counterfeit drugs and pharmaceutical preparations seized from the black market among bodybuilders, Ann. Toxicol. Anal. 24 (2012) 73-80. doi.org/10.1051/ata/2012012.

[21] S.H. Cho, H.J. Park, J.H. Lee, et al., Determination of anabolic-androgenicsteroid adulterants in counterfeit drugs by UHPLC-MS/MS. J. PharmBiomed. Anal. 111 (2015) 138-146. doi.org/ 10.1016/j.jpba.2015.03.018.

[22] C. Van Poucke, C. Detavernier, R. Van Cauwenberghe, C. Van Peteghem, Determination of anabolic steroids in dietary supplements by liquid chromatography-tandem mass spectrometry, Anal. Chim. Acta. 586 (2007) 35-42. doi.org/ 10.1016/j.aca.2006.09.050.

[23] C. Weber, O. Krug, M. Kamber, M. Thevis, Qualitative and semiquantitative analysis of doping products seized at the Swiss Border, Subst. Use. Misuse. 40 (2017) 1-12. doi.org/ 10.1080/10826084.2016.1263665.

[24] B. Tircova, Z. Bosakova, P. Kozlik, Development of an ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the determination of anabolic steroids currently available on the black market in the Czech Republic and Slovakia, Drug. Test. Anal. 11 (2019) 355-360. doi: 10.1002/dta.2541.

[25] S. Eller, G.R. Borges, D.S. Ossanes, L. Birk, C. Scheid, M. Yonamine, P. Grossi, J.O. Merib, T.F. Oliveira, A rapid analytical strategy for the determination of ayahuasca alkaloids in non-ritualistic approaches by UHPLC-MS/MS, Forensic Sci, Int. 312 (2020) 110298. doi:10.1016/j.forsciint.2020.110298.

[26] UNODC. Guidance for the Validation of Analytical Methodology and Calibration of Equipment Used for Testing of Illicit Drugs in Seized Materials and Biological Specimens. Austria: United Nations, 2009. ISBN 978-92-1-148243-0, Oct 2009.

[27] L.M. Berneira, S.C. Freitas, C.C. Silva, A.M. Machado, C.M.P. Pereira, M.A.S. Santos, Application of differential scanning calorimetry in the analysis of apprehended formulations of anabolic androgenic steroids, Forensic. Sci. Int. 296 (2019) 15-21. doi.org/10.1016/j.forsciint.2018.12.022.

[28] D.B.J. Neves, R.G.A. Marcheti, E.D. Caldas, Incidence of anabolic steroid counterfeiting in Brazil, Forensic. Sci. Int. 228 (2013) e81-e83. doi.org/10.1016/j.forsciint.2013.02.035.

Figure captions

Figure 1. The triangular surface was obtained from a simplex-centroid design for the optimization of extraction solvent. Using water, acetonitrile (ACN), and DMSO.

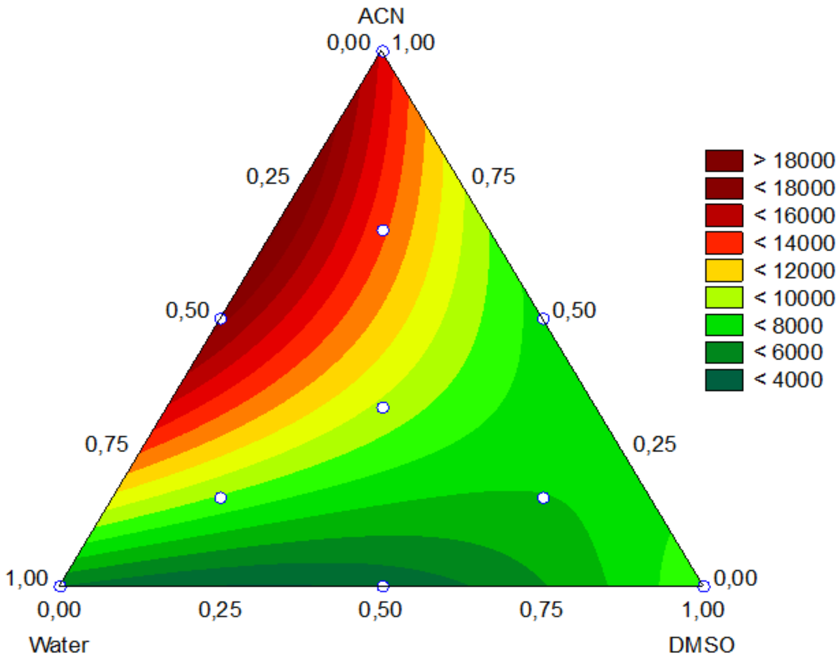


Figure 2. Incidence (in percentage) of AAS in oily solution detected in seized unlabeled flasks by Brazilian Federal Revenue Service. N= 115 ampoules.

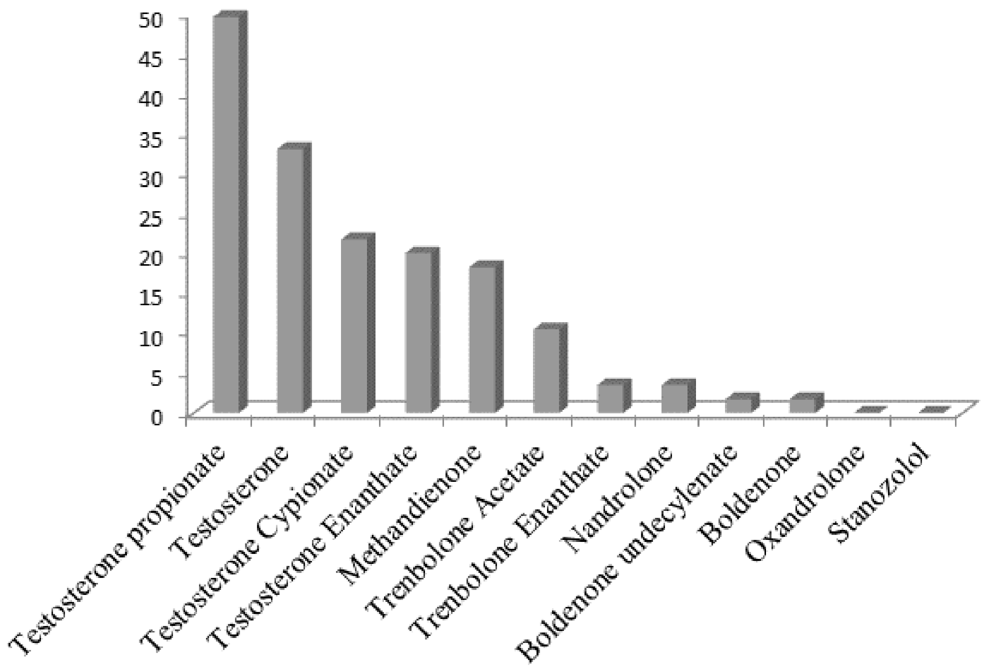


Figure 3. Graph of scores PC1 x PC2, and graph of loadings for the drugs found in the samples.

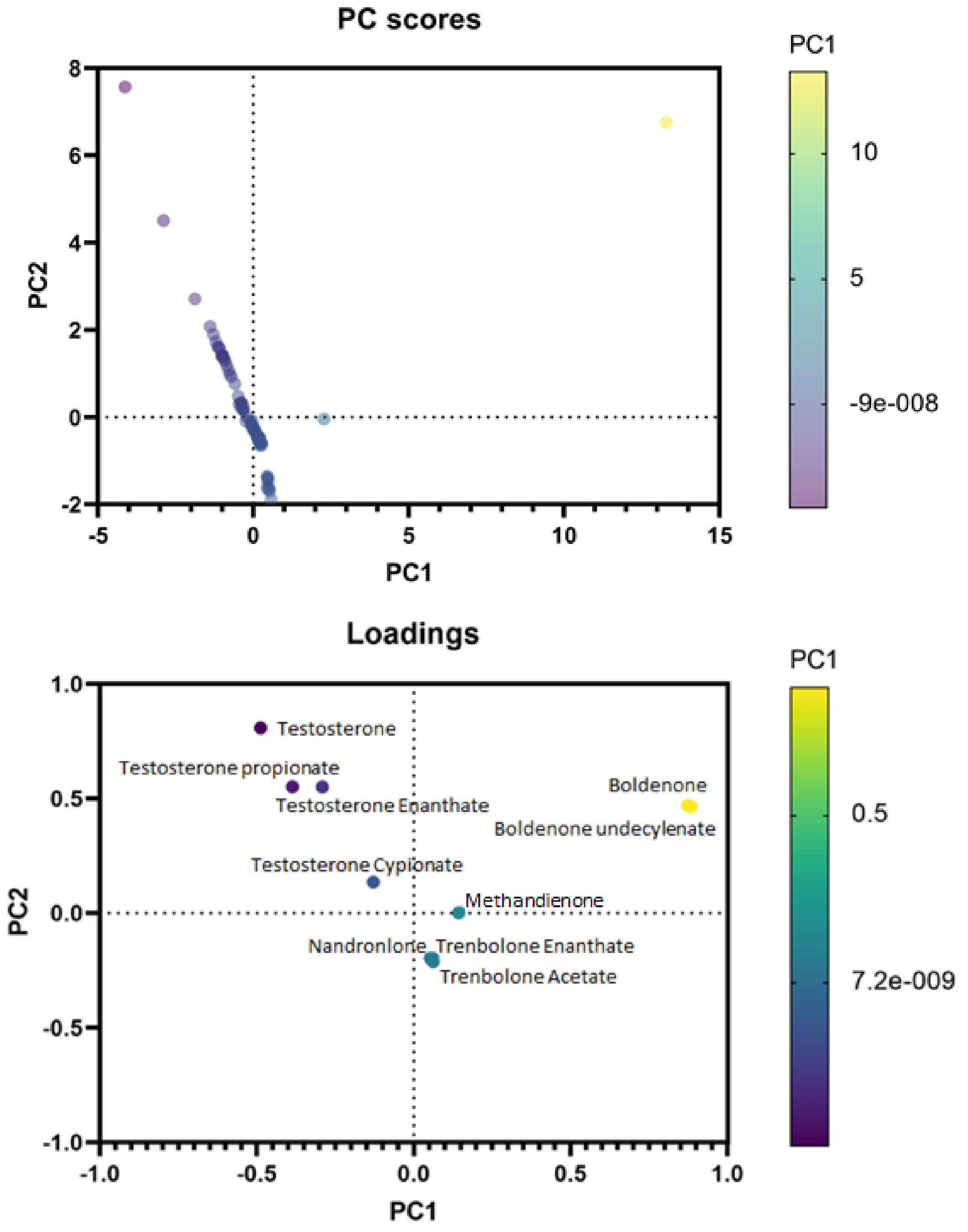
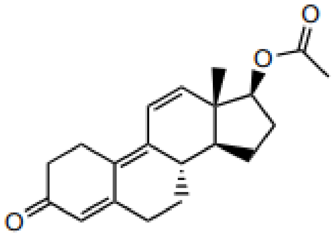
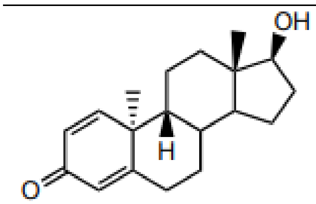
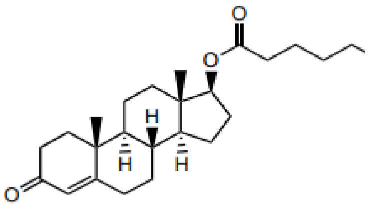
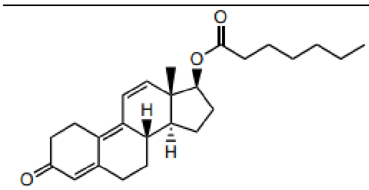
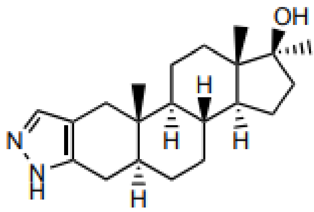
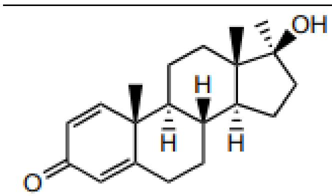
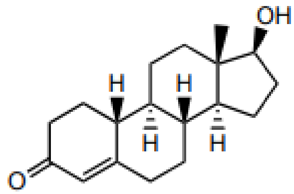
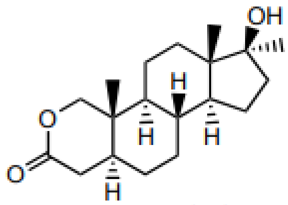
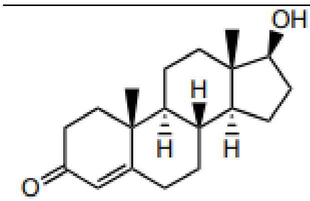
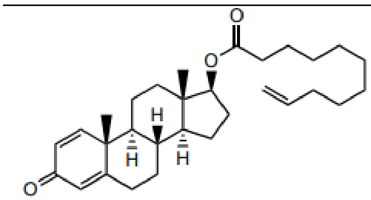
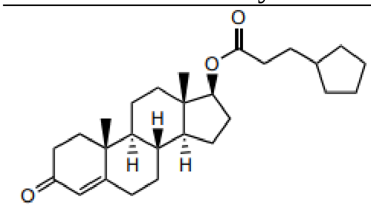
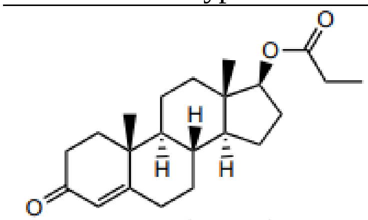
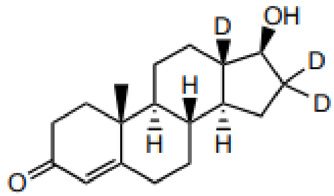


Table 1. Simplex centroid design for the solvent optimization in sample preparation.

Experiment	Water (%)	DMSO (%)	Acetonitrile (%)
1	100	0	0
2	0	100	0
3	0	0	100
4	50	50	0
5	50	0	50
6	0	50	50
7	66.66	16.67	16.67
8	16.67	66.66	16.67
9	16.67	16.67	66.66
10	33.34	33.33	33.33

Table 2. MRM transitions and experimental conditions for tested compounds.

Compound name	RT[a], min	Precursor ion, *m/z*	Product ion, *m/z*	CE[b], eV
 Trenbolone acetate	2.22	312.9	253.15 107.15 133.10	20 33 33
 Boldenone	1.84	287.3	121.10 135.10 77.05	24 14 54
 Testosterone enanthate	3.13	401.3	97.15 108.95 113.15	25 33 21
 Trenbolone enanthate	2.94	383.0	253.20 43.10 133.10	25 47 38
 Stanozolol	1.88	329.0	81.10 95.20 107.00	47 45 44
 Methandienone	1.93	300.9	121.00 149.10 283.30	24 15 11

 Nandrolone	1.88	274.9	109.10 83.10 128.05	25 31 14
 Oxandrolone	1.91	307	289.25 271.20 149.00	12 13 23
 Testosterone	1.95	289.2	97.10 109.10 79.10	25 27 19
 Boldenone undecylenate	3.35	453.3	135.15 269.25 121.10	20 13 28
 Testosterone cypionate	3.18	413.3	79.15 107.10 97.00	40 24 27
 Testosterone propionate	2.58	345	97.05 109 79.1	25 29 52
 Testosterone-d_3	1.95	292	97.00 109.05 79.10	26 25 46

Abbreviations: [a]RT, retention time; [b]CE, collision energy.

Table 3. Analytical results obtained from the linearity of the UHPLC-MS/MS method validated for the determination of 12 testosterone-like compounds in seized drug products.

Compound	Regression equation	r^2	Cochran C-test[a]	Weighting factor
Trenbolone Acetate	y = 0.0063x – 0.075	0.9970	$C_{calc} > C_{crit}$	$1/y^2$
Boldenone	y = 0.0232x – 1.662	0.9968	$C_{calc} < C_{crit}$	-
Testosterone Enanthate	y = 0.0008x – 0.123	0.9972	$C_{calc} < C_{crit}$	-
Trenbolone Enanthate	y = 0.0439x + 5.264	0.9983	$C_{calc} < C_{crit}$	-
Stanozolol	y = 0.0110x – 0.1047	0.9974	$C_{calc} > C_{crit}$	$1/y^2$
Methandienone	y = 0.0241x + 0.2818	0.9965	$C_{calc} > C_{crit}$	$1/y^2$
Nandrolone	y = 0.0028x – 0.0178	0.9994	$C_{calc} < C_{crit}$	-
Oxandrolone	y = 0.0021x + 0.0342	0.9972	$C_{calc} < C_{crit}$	-
Testosterone	y =0.0051x – 0.0010	0.9992	$C_{calc} > C_{crit}$	$1/y^2$
Boldenone undecylenate	y = 0.008x + 0.7963	0.9949	$C_{calc} < C_{crit}$	-
Testosterone Cypionate	y = 0.0026x – 0.0524	0.9987	$C_{calc} < C_{crit}$	-
Testosterone propionate	y = 00395x + 002298	0.9971	$C_{calc} > C_{crit}$	$1/y^2$

[a] $C_{calc} < C_{crit}$ homoscedasticity of residues; $C_{calc} > C_{crit}$ heteroscedasticity of residues.

Table 4. Analytical results obtained from precision and accuracy of the UHPLC-MS/MS method validated for the determination of 12 testosterone-like compounds in seized drug products at three levels: low (300 ng/mL), medium (950 ng/mL), high (1600 ng/mL).

	Level	**Intra-day precision[a] (RSD)**	**Inter-day precision[b] (RSD)**	**Accuracy[c]; RSD**
Trenbolone acetate	Low	10.79	7.73	95.30; 3.23
	Medium	9.42	10.19	90.06; 8.49
	High	9.78	14.60	95.03; 9.52
Boldenone	Low	18.86	12.76	84.75; 4.70
	Medium	10.32	14.21	92.27; 8.42
	High	8.70	10.24	89.51; 6.31
Testosterone enanthate	Low	11.51	13.44	107.5; 6.14
	Medium	12.11	8.79	114.55; 0.93
	High	11.14	2.37	99.85; 3.33
Trenbolone enanthate	Low	18.76	15.03	88.69; 4.06
	Medium	14.98	13.91	95,64; 7.36
	High	14.36	14.51	97.21; 8.42
Stanozolol	Low	7.28	10.89	109.22; 7.10
	Medium	12.84	7.54	105.74; 3.62
	High	10.58	9.07	112.57; 4.74
Methandienone	Low	8.27	12.55	107.86; 8.20
	Medium	8.09	6.96	104.43; 3.65
	High	15.25	10.91	100.93; 4.56
Nandrolone	Low	8.50	6.12	104.97; 2.58
	Medium	8.15	5.55	107.36; 2.08
	High	10.25	8.99	108.80; 4.79
Oxandrolone	Low	12.81	9.06	99.49; 3.69
	Medium	7.54	5.01	94.74; 1.85
	High	10.69	6.20	100.89; 0.44
Testosterone	Low	14.96	12.94	105.80; 6.95
	Medium	12.22	7.55	99.17; 4.23
	High	10.96	10.38	108.73; 5.44
Boldenone undecylenate	Low	14.95	13.78	106.12; 7.65
	Medium	14.57	11.87	106.50; 4.47
	High	12.97	10.74	101.63; 10.78
Testosterone cypionate	Low	17.01	10.96	106.00; 3.44
	Medium	11.49	10.87	104.73; 7.60
	High	9.39	5.56	106.60; 0.89
Testosterone propionate	Low	5.36	11.59	111.22; 6.32
	Medium	4.38	3.78	113.32; 1.81
	High	10.45	9.45	114.63; 3.14

[a]Mean of six independent determinations; [b]Mean obtained from precision in three different days; [c]Six replicates for each level.

5. CONCLUSÕES

Neste trabalho foi proposto e implementado o método para a determinação de 12 EAAs. O método validado pela LC-MS/MS mostrou-se uma excelente opção para a determinação desses fármacos injetáveis oleosos, com uma análise rápida e reprodutiva. O método desenvolvido foi aplicado com sucesso na análise de 115 ampolas apreendidas. A análise estatística por PCA auxiliou no entendimento do perfil de composição das amostras, além disso, os limites de detecção e quantificação obtidos foram satisfatórios.

Por fim, o método estabelecido pode ser utilizado como alternativa segura pelos órgãos fiscalizadores, e a baixa qualidade do material apreendido coloca em risco a saúde dos consumidores do mercado ilegal de EAAs originados.

6. ANEXO - Normas revista científica

FORENSIC SCIENCE INTERNATIONAL
An international journal dedicated to the applications of medicine and science in the administration of justice.

AUTHOR INFORMATION PACK

TABLE OF CONTENTS

ISSN: 0379-0738

DESCRIPTION

Forensic Science International is the flagship journal in the prestigious Forensic Science International family, publishing the most innovative, cutting-edge, and influential contributions across the forensic sciences. Fields include: forensic pathology and histochemistry, chemistry, biochemistry and toxicology, biology, serology, odontology, psychiatry, anthropology, digital forensics, the physical sciences, firearms, and document examination, as well as investigations of value to public health in its broadest sense, and the important marginal area where science and medicine interact with the law.The journal publishes:
Case Reports Commentaries Letters to the Editor Original Research Papers (Regular Papers) Rapid Communications Review Articles Technical Notes
Forensic Science International adheres to strict ethical publication guidelines and actively supports a culture of inclusive and representative publication. For any submission enquiries, please contact the respective Editor.
The Forensic Science International journals offer comprehensive and pioneering coverage within the forensic sciences and beyond, disseminating ground-breaking discoveries, highly specialised research, and foundational science across the family of publications. The FSI portfolio comprises of: Forensic Science InternationalForensic Science International: Animals and EnvironmentsForensic Science International: Digital InvestigationForensic Science International: Genetics Forensic Science International: Genetics Supplement SeriesForensic Science International: Mind and LawForensic
Science International: ReportsForensic Science International: Synergy

AUDIENCE

Pathologists, Anthropologists, Psychiatrists, Biologists, Serologists, Odontologists, Physical Scientists,
Toxicologists, Scientists in Legal and Social Medicine, Questioned Documents and Jurisprudence

IMPACT FACTOR

2020: 2.395 © Clarivate Analytics Journal Citation Reports 2021

ABSTRACTING AND INDEXING

Current Awareness in Biological Sciences
PubMed/Medline

Biological Abstracts
Bulletin Signalétique
Cambridge Scientific Abstracts
Chemical Abstracts
Criminology, Penology and Police Science Abstracts
Current Contents
Embase
National Criminal Justice Reference Service
Science Citation Index Scopus

EDITORIAL BOARD

C. Henssge, Essen, Germany
M. **Houck**, Miami, Florida, United States of America
M.A. Huestis, Baltimore, MD, United States of America
H. Ikegaya, Kyoto, Japan
A.W. Jones, Stockholm, Sweden
Y. Katsumata, Kashiwa, Japan
B. Kneubuehl, Bern, Switzerland
K. Krishan, Chandigarh, India
G. Lau, Singapore, Singapore
C. Lennard, Canberra, NSW, Australia
M. Liebrenz, Bern, Switzerland
A. **Luna Maldonado**, Murcia, Spain
B. **Madea**, Bonn, Germany
H. Maeda, Osaka, Japan
P. Margot, Lausanne, Switzerland
C. **Neumann**, University Park, PA, United States of America
D. **Nuno Vieira**, Coimbra, Portugal
S. Pollak, Freiburg im Breisgau, Germany
M.S. Pollanen, Toronto, ONT, Canada
K. Püschel, Hamburg, Germany
G. Quatrehomme, Nice, France
R. Ramotowski, Washington, DC, United States of America
J. Robertson, Canberra, Australian Capital Territory, Australia
C. Roux, Sydney, NSW, Australia
I.E. Sääksjärvi, Turku, Finland
P. Saukko, Turku, Finland
J. Stevens, Exeter, United Kingdom
M. Steyn, Hatfield, South Africa
F. Tagliaro, Verona, Italy
T. Takatori, Kashiwa, Japan
A. M. Tarone, College Station, Texas, United States of America
A. Thierauf, Freiburg im Breisgau, Germany
D. Ubelaker, Washington, DC, United States of America
Q. Wang, Guangzhou, Guangdong, China
Y. Wang, Shanghai, China
J. Wells, Miami, FL, United States of America
E.J. Wiltshire, Southampton, United Kingdom
X. Xu, Shantou, China
J. Zieba-Palus, Kracow, Poland

GUIDE FOR AUTHORS

Your Paper Your Way

We now differentiate between the requirements for new and revised submissions. You may choose to submit your manuscript as a single Word or PDF file to be used in the refereeing process. Only when your paper is at the revision stage, will you be requested to put your paper in to a 'correct format' for acceptance and provide the items required for the publication of your article. **To find out more, please visit the Preparation section below.**

INTRODUCTION

Forensic Science International is a peer-reviewed, international journal for the publication of original contributions in the many different scientific disciplines comprising the forensic sciences. These fields include, but are not limited to, forensic pathology and histochemistry, toxicology (including drugs, alcohol, etc.), serology, chemistry, biochemistry, biology (including the identification of hairs and fibres), odontology, psychiatry, anthropology, the physical sciences, firearms, and document examination, as well as the many other disciplines where science and medicine interact with the law.

Types of paper

1. Original Research Articles (Regular Papers)
2. Review Articles
3. Rapid Communications
4. Technical Notes
5. Forensic Anthropology Population Data
6. Case Reports
7. Preliminary Communications
8. Letters to the Editor
9. Commentaries

Announcement of Population Data: these types of articles will be published in Forensic Science International: Genetics, only. Please submit these articles via https://www.editorialmanager.com/fsi.

Preliminary Communications(where brief accounts of important new work may be announced with less delay than is inevitable with major papers) may be accepted after correspondence with the appropriate Associate Editor.

Review Articles may be regularly submitted or invited by Editors. However, they will undergo the normal review process of the journal.

Forensic Anthropology Population Data: Although the main focus of the anthropology section of the journal remains on the publication of original research, authors are invited to submit their forensic anthropology population data articles by selecting the "Forensic Anthropology Population Data" article type on the online submission system. When submitting a Forensic Anthropology Population data article, please assure that "Forensic Anthropology Population Data" is included as one of the keywords. These forensic anthropology population data articles involve the application of already published and standardised methods of aging, sexing, determination of ancestry and stature and other well known diagnoses on different populations. This is at the heart of applied forensic anthropology. For example, in order to correctly assess age, stature or even sex of individuals of different ancestry or from different populations, it is fundamental that the method be tested on the specific population one is working on. In building the biological profile of a skeleton in order to aid identification, one needs to calibrate such techniques on the population of interest before applying them. The same may be true in a completely different scenario of anthropology, for example identifying criminals taped on video surveillance systems and aging victims of juvenile pornography. This section is dedicated to forensic anthropological population data and other types of updates (state of the art of particular issues, etc.), particularly concerning the following:

- Sexing

- Aging sub adult skeletal remains
- Aging adult skeletal remains
- Aging living sub adults and adults
- Determining ancestry
- Stature estimation
- Facial reconstruction
- Non metric trait distribution, pathology and trauma
- Positive identification of human skeletal remains
- Positive identification of the living

Forensic Anthropology Population Data articles will be published in abridged form in print (a clear, descriptive summary taken from the abstract), and the full length article will be published online only. Full citation details and a reference to the online article, including e-page numbers, will be published in the relevant print issue of the journal. All submitted manuscripts will be evaluated by a strict peer review process.

Case Reports will be accepted only if they contain some important new information for the readers.

Rapid Communications should describe work of significant interest, whose impact would suffer if publication were not expedited. They should not be longer than 5 printed journal pages (about 10 submitted pages). Authors may suggest that their work is treated as a Rapid Communication, but the final decision on whether it is suitable as such will be taken by the handling Editor. Rapid Communications requiring revision should be resubmitted as a new submission.

Technical Notes report new developments, significant advances and novel aspects of experimental and theoretical methods and techniques which are relevant for scientific investigations within the journal scope. Manuscripts of this type should be short (a few pages only). Highly detailed and specific technical information such as computer programme code or user manuals can be included as electronic supplements. The manuscript title must start with "Technical Note:".

Commentaries Commentary articles are designed to allow experts from right across forensics to present their view on a 'hot topic' or emerging field. Commentaries should be between 1000-1500 words and contain fewer than 5 references. Authors may suggest that their work is treated as a Commentary, but the final decision on whether it is suitable as such will be taken by the handling Editor. Commentaries will not appear in the printed version of the journal.

Revisions deadline

Please note that articles that are sent to the author for revision need to be returned within 60 days (and within 20 days for subsequent revisions). A reminder will be sent in the second month. Any articles that are sent after the two month period of revision will be considered a re-submission.

Contact details for submission

Papers for consideration should be submitted by topic. Editors and their topic specialty are listed below.

C. Cattaneo (Co Editors-in-Chief):
Tel: +39 02503 15679
E-mail: cristina.cattaneo@unimi.it

C. Jackowski (Co Editors-in-Chief):
Tel: +41 (0)31 631 84 12
E-mail: Christian.Jackowski@irm.unibe.ch

B. Ludes: Forensic Genetics. E-mail: ludes@unistra.fr

P. Margot: Questioned Documents and Physical Science: ballistics, tool marks, contact traces, drugs analysis, fingerprints and identification, etc.
Tel: +41 21 692 4605
Fax: +41 21 692 4605
E-mail: pierre.margot@unil.ch

O.H. Drummer: Toxicology

Tel: +61 3 9684 4334
Fax: +61 3 9682 7353
E-mail: olaf.drummer@vifm.org
S. Matuszewski: Entomology
Tel: +48 61 82 94 292
E-Mail: szymmat@amu.edu.pl

Submission checklist

You can use this list to carry out a final check of your submission before you send it to the journal for review. Please check the relevant section in this Guide for Authors for more details.

Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address

All necessary files have been uploaded:

Manuscript:

- Include keywords
- All figures (include relevant captions)
- All tables (including titles, description, footnotes)
- Ensure all figure and table citations in the text match the files provided
- Indicate clearly if color should be used for any figures in print

Graphical Abstracts / Highlights files (where applicable)

Supplemental files (where applicable)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell checked' and 'grammar checked'
- All references mentioned in the Reference List are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including theInternet)
- A competing interests statement is provided, even if the authors have no competing interests todeclare
- Journal policies detailed in this guide have been reviewed
- Referee suggestions and contact details provided, based on journal requirements

For further information, visit our Support Center.

BEFORE YOU BEGIN

Ethics in publishing

Please see our information on Ethics in publishing.

The editors reserve the right to reject papers on ethical grounds, regardless of whether requisite local/national ethical guidelines and approvals have been adhered to and confirmed.

Declaration of interest

All authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organizations that could inappropriately influence (bias) their work. Examples of potential competing interests include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/registrations, and grants or other funding. Authors must disclose any interests in two places: 1. A summary declaration of interest statement in the title page file (if double anonymized) or the manuscript file (if single anonymized). If there are no interests to declare then please state this: 'Declarations of interest: none'. 2. Detailed disclosures as part of a separate Declaration of Interest form, which forms part of the journal's official records. It is important for potential interests to be declared in both places and that the information matches. More information.

Additional information

Multiple submissions is not acceptable to the Editor, and any such papers, together with future submissions from the authors, will be rejected outright. Submission also implies that all authors have approved the paper for release and are in agreement with its content.

Submission declaration and verification

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract, a published lecture or academic thesis, see 'Multiple, redundant or concurrent publication' for more information), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyrightholder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection service Crossref Similarity Check.

Use of inclusive language

Inclusive language acknowledges diversity, conveys respect to all people, is sensitive to differences, and promotes equal opportunities. Content should make no assumptions about the beliefs or commitments of any reader; contain nothing which might imply that one individual is superior to another on the grounds of age, gender, race, ethnicity, culture, sexual orientation, disability or health condition; and use inclusive language throughout. Authors should ensure that writing is free from bias, stereotypes, slang, reference to dominant culture and/or cultural assumptions. We advise to seek gender neutrality by using plural nouns ("clinicians, patients/clients") as default/wherever possible to avoid using "he, she," or "he/she." We recommend avoiding the use of descriptors that refer to personal attributes such as age, gender, race, ethnicity, culture, sexual orientation, disability or health condition unless they are relevant and valid. These guidelines are meant as a point of reference to help identify appropriate language but are by no means exhaustive or definitive.

Author contributions

For transparency, we encourage authors to submit an author statement file outlining their individual contributions to the paper using the relevant CRediT roles: Conceptualization; Data curation; Formal analysis; Funding acquisition; Investigation; Methodology; Project administration; Resources; Software; Supervision; Validation; Visualization; Roles/Writing - original draft; Writing - review & editing. Authorship statements should be formatted with the names of authors first and CRediT role(s) following. More details and an example

Changes to authorship

Authors are expected to consider carefully the list and order of authors **before** submitting their manuscript and provide the definitive list of authors at the time of the original submission. Any addition, deletion or rearrangement of author names in the authorship list should be made only **before** the manuscript has been accepted and only if approved by the journal Editor. To request such a change, the Editor must receive the following from the **corresponding author**: (a) the reason for the change in author list and (b) written confirmation (e-mail, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed.

Only in exceptional circumstances will the Editor consider the addition, deletion or rearrangement of authors **after** the manuscript has been accepted. While the Editor considers the request, publication of the manuscript will be suspended. If the manuscript has already been published in an online issue, any requests approved by the Editor will result in a corrigendum.

Article transfer service

This journal is part of our Article Transfer Service. This means that if the Editor feels your article is more suitable in one of our other participating journals, then you may be asked to consider transferring the article to one of those. If you agree, your article will be transferred automatically on your behalf with no need to reformat. Please note that your article will be reviewed again by the new journal. More information.

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (see more information on this). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations. If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases.

For gold open access articles: Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'License Agreement' (more information). Permitted third party reuse of gold open access articles is determined by the author's choice of user license.

Author rights

As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse your work. More information.

Elsevier supports responsible sharing

Find out how you can share your research published in Elsevier journals.

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated.

Open access

Please visit our Open Access page for more information.

Elsevier Researcher Academy

Researcher Academy is a free e-learning platform designed to support early and mid-career researchers throughout their research journey. The "Learn" environment at Researcher Academy offers several interactive modules, webinars, downloadable guides and resources to guide you through the process of writing for research and going through peer review. Feel free to use these free resources to improve your submission and navigate the publication process with ease.

Language (usage and editing services)

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the English Language Editing service available from Elsevier's Author Services.

Submission

Our online submission system guides you stepwise through the process of entering your article details and uploading your files. The system converts your article files to a single PDF file used in the peer-review process. Editable files (e.g., Word, LaTeX) are required to typeset your article for final publication. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, is sent by e-mail.

Submit your article

Please submit your article via https://www.editorialmanager.com/fsi.

PREPARATION

NEW SUBMISSIONS

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts your files to a single PDF file, which is used in the peer-review process.

As part of the Your Paper Your Way service, you may choose to submit your manuscript as a single file to be used in the refereeing process. This can be a PDF file or a Word document, in any format or layout that can be used by referees to evaluate your manuscript. It should contain high enough quality figures for refereeing. If you prefer to do so, you may still provide all or some of the source files at the initial submission. Please note that individual figure files larger than 10 MB must be uploaded separately.

References

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/ book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the article number or pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct.

Formatting requirements

There are no strict formatting requirements but all manuscripts must contain the essential elements needed to convey your manuscript, for example Abstract, Keywords, Introduction, Materials and Methods, Results, Conclusions, Artwork and Tables with Captions.

If your article includes any Videos and/or other Supplementary material, this should be included in your initial submission for peer review purposes. Divide the article into clearly defined sections.

Figures and tables embedded in text

Please ensure the figures and the tables included in the single file are placed next to the relevant text in the manuscript, rather than at the bottom or the top of the file. The corresponding caption should be placed directly below the figure or table.

Peer review

This journal operates a double anonymized review process. All contributions will be initially assessed by the editor for suitability for the journal. Papers deemed suitable are then typically sent to a minimum of two independent expert reviewers to assess the scientific quality of the paper. The Editor is responsible for the final decision regarding acceptance or rejection of articles. The Editor's decision is final. Editors are not involved in decisions about papers which they have written themselves or have been written by family members or colleagues or which relate to products or services in which the editor has an interest. Any such submission is subject to all of the journal's usual procedures, with peer review handled independently of the relevant editor and their research groups. More information on types of peer review.

Double anonymized review

This journal uses double anonymized review, which means the identities of the authors are concealed from the reviewers, and vice versa. More information is available on our website. To facilitate this, please include the following separately:

Title page (with author details): This should include the title, authors' names, affiliations, acknowledgements and any Declaration of Interest statement, and a complete address for the corresponding author including an e-mail address.

Anonymized manuscript (no author details): The main body of the paper (including the references, figures, tables and any acknowledgements) should not include any identifying information, such as the authors' names or affiliations.

REVISED SUBMISSIONS

Use of word processing software

Regardless of the file format of the original submission, at revision you must provide us with an editable file of the entire article. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier). See also the section on Electronic artwork.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

Article structure

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient details to allow the work to be reproduced by an independent researcher. Methods that are already published should be summarized, and indicated by a reference. If quoting directly from a previously published method, use quotation marks and also cite the source. Any modifications to existing methods should also be described.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Essential title page information

- ***Title.*** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- ***Author names and affiliations.*** Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. You can add your name between parentheses in your own script behind the English transliteration. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lowercase superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- ***Corresponding author.*** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. This responsibility includes answering any future queries about Methodology and Materials. **Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.**
- ***Present/permanent address.*** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Highlights

Highlights are mandatory for this journal as they help increase the discoverability of your article via search engines. They consist of a short collection of bullet points that capture the novel results of your research as well as new methods that were used during the study (if any). Please have a look at the examples here: example Highlights.

Highlights should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point).

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

Graphical abstract

Although a graphical abstract is optional, its use is encouraged as it draws more attention to the online article. The graphical abstract should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: Please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5 × 13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. You can view Example Graphical Abstracts on our information site.

Authors can make use of Elsevier's Illustration Services to ensure the best presentation of their images and in accordance with all technical requirements.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Acknowledgements

Please provide Acknowledgements as a separate file and remove this from the manuscript. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Formatting of funding sources

List funding sources in this standard way to facilitate compliance to funder's requirements:

Funding: This work was supported by the National Institutes of Health [grant numbers xxxx, yyyy]; the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [grant number zzzz]; and the United States Institutes of Peace [grant number aaaa].

It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants and awards. When funding is from a block grant or other resources available to a university, college, or other research institution, submit the name of the institute or organization that provided the funding.

If no funding has been provided for the research, please include the following sentence:

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many word processors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article.

Artwork

Electronic artwork General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Preferred fonts: Arial (or Helvetica), Times New Roman (or Times), Symbol, Courier.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.

- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Indicate per figure if it is a single, 1.5 or 2-column fitting image.
- For Word submissions only, you may still provide figures and their captions, and tables within asingle file at the revision stage.
- Please note that individual figure files larger than 10 MB must be provided in separate source files.

A detailed guide on electronic artwork is available.

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

Regardless of the application used, when your electronic artwork is finalized, please 'save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings. Embed the font or save the text as 'graphics'.

TIFF (or JPG): Color or grayscale photographs (halftones): always use a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPG): Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale): a minimum of 500 dpi is required.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); the resolution is too low.
- Supply files that are too low in resolution.
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article**. Please indicate your preference for color: in print or online only. Further information on the preparation of electronic artwork.

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Tables

Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed either next to the relevant text in the article, or on separate page(s) at the end. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules and shading in table cells.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Reference links
Increased discoverability of research and high quality peer review are ensured by online links to the sources cited. In order to allow us to create links to abstracting and indexing services, such as Scopus, CrossRef and PubMed, please ensure that data provided in the references are correct. Please note that incorrect surnames, journal/book titles, publication year and pagination may prevent link creation. When copying references, please be careful as they may already contain errors. Use of the DOI is highly encouraged.
A DOI is guaranteed never to change, so you can use it as a permanent link to any electronic article. An example of a citation using DOI for an article not yet in an issue is: VanDecar J.C., Russo R.M., James D.E., Ambeh W.B., Franke M. (2003). Aseismic continuation of the Lesser Antilles slab beneath northeastern Venezuela. Journal of Geophysical Research, https://doi.org/10.1029/2001JB000884. Please note the format of such citations should be in the same style as all other references in the paper.
Data references
This journal encourages you to cite underlying or relevant datasets in your manuscript by citing them in your text and including a data reference in your Reference List. Data references should include the following elements: author name(s), dataset title, data repository, version (where available), year, and global persistent identifier. Add [dataset] immediately before the reference so we can properly identify it as a data reference. The [dataset] identifier will not appear in your published article.
Reference management software
Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support Citation Style Language styles, such as Mendeley. Using citation plug-ins from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide. If you use reference management software, please ensure that you remove all field codes before submitting the electronic manuscript. More information on how to remove field codes from different reference management software.
Users of Mendeley Desktop can easily install the reference style for this journal by clicking the following link:
http://open.mendeley.com/use-citation-style/forensic-science-international
When preparing your manuscript, you will then be able to select this style using the Mendeley plugins for Microsoft Word or LibreOffice.
Reference formatting
There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/ book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the article number or pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct. If you do wish to format the references yourself they should be arranged according to the following examples:
Reference style
Text: Indicate references by number(s) in square brackets in line with the text. The actual authors can be referred to, but the reference number(s) must always be given.
Example: '..... as demonstrated [3,6]. Barnaby and Jones [8] obtained a different result ....' *List:* Number the references (numbers in square brackets) in the list in the order in which they appear in the text.
Examples:

Reference to a journal publication:
[1] J. van der Geer, J.A.J. Hanraads, R.A. Lupton, The art of writing a scientific article, J. Sci. Commun.
163 (2010) 51–59. https://doi.org/10.1016/j.Sc.2010.00372.
Reference to a journal publication with an article number:
[2] J. van der Geer, J.A.J. Hanraads, R.A. Lupton, 2018. The art of writing a scientific article. Heliyon. 19, e00205. https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2018.e00205.
Reference to a book:
[3] W. Strunk Jr., E.B. White, The Elements of Style, fourth ed., Longman, New York, 2000.
Reference to a chapter in an edited book:
[4] G.R. Mettam, L.B. Adams, How to prepare an electronic version of your article, in: B.S. Jones, R.Z.Smith (Eds.), Introduction to the Electronic Age, E-Publishing Inc., New York, 2009, pp. 281–304.
Reference to a website:
[5] Cancer Research UK, Cancer statistics reports for the UK. http://www.cancerresearchuk.org/aboutcancer/statistics/cancerstatsreport/, 2003 (accessed 13 March 2003).
Reference to a dataset:
[dataset] [6] M. Oguro, S. Imahiro, S. Saito, T. Nakashizuka, Mortality data for Japanese oak wilt disease and surrounding forest compositions, Mendeley Data, v1, 2015. https://doi.org/10.17632/ xwj98nb39r.1. Reference to software:
[7] E. Coon, M. Berndt, A. Jan, D. Svyatsky, A. Atchley, E. Kikinzon, D. Harp, G. Manzini, E. Shelef, K. Lipnikov, R. Garimella, C. Xu, D. Moulton, S. Karra, S. Painter, E. Jafarov, S. Molins, Advanced Terrestrial Simulator (ATS) v0.88 (Version 0.88), Zenodo, March 25, 2020. https://doi.org/10.5281/ zenodo.3727209.

Video

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the file in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 150 MB per file, 1 GB in total. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect. Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our video instruction pages. Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

Data visualization

Include interactive data visualizations in your publication and let your readers interact and engage more closely with your research. Follow the instructions here to find out about available data visualization options and how to include them with your article.

Supplementary material

Supplementary material such as applications, images and sound clips, can be published with your article to enhance it. Submitted supplementary items are published exactly as they are received (Excel or PowerPoint files will appear as such online). Please submit your material together with the article and supply a concise, descriptive caption for each supplementary file. If you wish to make changes to supplementary material during any stage of the process, please make sure to provide an updated file. Do not annotate any corrections on a previous version. Please switch off the 'Track Changes' option in Microsoft Office files as these will appear in the published version.

Research data

This journal encourages and enables you to share data that supports your research publication where appropriate, and enables you to interlink the data with your published articles. Research data refers to the results of observations or experimentation that validate research findings. To facilitate reproducibility and data reuse, this journal also encourages you to share your software, code, models, algorithms, protocols, methods and other useful materials related to the project.

Below are a number of ways in which you can associate data with your article or make a statement about the availability of your data when submitting your manuscript. If you are sharing data in one of these ways, you are encouraged to cite the data in your manuscript and reference list. Please refer to the "References" section for more information about data citation. For more information on depositing, sharing and using research data and other relevant research materials, visit the research data page.

Data linking

If you have made your research data available in a data repository, you can link your article directly to the dataset. Elsevier collaborates with a number of repositories to link articles on ScienceDirect with relevant repositories, giving readers access to underlying data that gives them a better understanding of the research described.

There are different ways to link your datasets to your article. When available, you can directly link your dataset to your article by providing the relevant information in the submission system. For more information, visit the database linking page.

For supported data repositories a repository banner will automatically appear next to your published article on ScienceDirect.

In addition, you can link to relevant data or entities through identifiers within the text of your manuscript, using the following format: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN).

Mendeley Data

This journal supports Mendeley Data, enabling you to deposit any research data (including raw and processed data, video, code, software, algorithms, protocols, and methods) associated with your manuscript in a free-to-use, open access repository. During the submission process, after uploading your manuscript, you will have the opportunity to upload your relevant datasets directly to *Mendeley Data*. The datasets will be listed and directly accessible to readers next to your published article online.

For more information, visit the Mendeley Data for journals page.

Data in Brief

You have the option of converting any or all parts of your supplementary or additional raw data into a data article published in *Data in Brief*. A data article is a new kind of article that ensures that your data are actively reviewed, curated, formatted, indexed, given a DOI and made publicly available to all upon publication (watch this video describing the benefits of publishing your data in *Data in Brief*). You are encouraged to submit your data article for *Data in Brief* as an additional item directly alongside the revised version of your manuscript. If your research article is accepted, your data article will automatically be transferred over to *Data in Brief* where it will be editorially reviewed, published open access and linked to your research article on ScienceDirect. Please note an open access fee is payable for publication in *Data in Brief*. Full details can be found on the Data in Brief website. Please use this template to write your *Data in Brief* data article.

Data statement

To foster transparency, we encourage you to state the availability of your data in your submission. This may be a requirement of your funding body or institution. If your data is unavailable to access or unsuitable to post, you will have the opportunity to indicate why during the submission process, for example by stating that the research data is confidential. The statement will appear with your published article on ScienceDirect. For more information, visit the Data Statement page.

AFTER ACCEPTANCE

Availability of accepted article

This journal makes articles available online as soon as possible after acceptance. This concerns the Journal Pre-proofs (both in HTML and PDF format), which have undergone enhancements after acceptance, such as the addition of a cover page and metadata, and formatting for readability, but are not yet the definitive versions of record. A Digital Object Identifier (DOI) is allocated, thereby making it fully citable and searchable by title, author name(s) and the full text. The article's PDF also carries a disclaimer stating that it is an unedited article. Subsequent production stages will simply replace this version.

Online proof correction

To ensure a fast publication process of the article, we kindly ask authors to provide us with their proof corrections within two days. Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors.

If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF.

We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

Offprints

The corresponding author will, at no cost, receive 25 free paper offprints, or alternatively a customized Share Link providing 50 days free access to the final published version of the article on ScienceDirect. The Share Link can be used for sharing the article via any communication channel, including email and social media. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's Author Services. Corresponding authors who have published their article gold open access do not receive a Share Link as their final published version of the article is available open access on ScienceDirect and can be shared through the article DOI link.

Author orders

When your article is published, you can commemorate your publication with printed author copies of the journal issue, customized full-color posters, extra offprints, and more. Please visit https://webshop.elsevier.com to learn more.

AUTHOR INQUIRIES

Visit the Elsevier Support Center to find the answers you need. Here you will find everything from Frequently Asked Questions to ways to get in touch.

You can also check the status of your submitted article or find out when your accepted article will be published.