

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**DETERMINAÇÃO DE FÁRMACOS SINTÉTICOS EM
FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS EMPREGANDO
MÉTODOS ELETROQUÍMICOS E DE SEPARAÇÃO**

TESE DE DOUTORADO

Mariele Martini

**Santa Maria, RS, Brasil
2014**

DETERMINAÇÃO DE FÁRMACOS SINTÉTICOS EM FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS EMPREGANDO MÉTODOS ELETROQUÍMICOS E DE SEPARAÇÃO

Mariele Martini

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Química, Área de Concentração em Química Analítica, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutora em Química.**

Orientador: Prof. Dr. Leandro Machado de Carvalho

Santa Maria, RS, Brasil

2014

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Naturais e Exatas
Programa de Pós-Graduação em Química**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Tese de Doutorado

**DETERMINAÇÃO DE FÁRMACOS SINTÉTICOS EM FORMULAÇÕES
FARMACÊUTICAS EMPREGANDO MÉTODOS ELETROQUÍMICOS E
DE SEPARAÇÃO**

elaborada por
Mariele Martini

como requisito parcial para a obtenção do grau de
Doutora em Química

COMISSÃO EXAMINADORA:

Prof. Dr. Leandro Machado de Carvalho
(Presidente/Orientador)

Prof. Dr. Diogo de Oliveira Silva (UNIFESP)

Prof^a. Dr^a. Jacqueline Arguello da Silva (UFRGS)

Prof^a. Dr^a. Clarice Madalena Bueno Rolim (UFSM)

Prof. Dr. Paulo Cícero do Nascimento (UFSM)

Santa Maria, 14 de março de 2014.

“Enquanto estivermos tentando, estaremos felizes, lutando pela definição do indefinido, pela conquista do impossível, pelo limite do ilimitado, pela ilusão de viver. Quando o impossível torna-se um desafio, a satisfação está no esforço e não apenas na realização final.”

(Gandhi)

A meu Pai Paulo Juarez Martini a minha mãe Rosane Jussana Martini, que me deram a vida e me ensinaram a vivê-la com dignidade, não bastaria um obrigado. A vocês, que iluminaram os meus caminhos obscuros com afeto e dedicação para que eu pudesse trilhar sem medo e cheia de esperanças, não bastaria um muito obrigado.

A vocês, que se doaram inteiros e renunciaram aos seus sonhos, para que, muitas vezes, eu pudesse realizar os meus.

A vocês, meus pais por natureza, por opção e amor, não bastaria dizer, que não tenho palavras para agradecer tudo isso.

Mas é o que me acontece agora, quando procuro arduamente uma forma verbal de exprimir uma emoção ímpar. Uma emoção que jamais seria traduzida por palavras.

Amo vocês!

A minha querida vó Lidia Rieger, que Deus a abençoe cada dia mais.

Que me de a bênção de sempre tê-la comigo, me dando muito amor, me passando experiências, me aconselhando, sempre com muita paciência.

Muito obrigado por tudo, pelo carinho, pelos cuidados, pela ajuda e pela companhia.

Te amo muito.

A minha irmã Litcheri Martini (*in memoriam*), você sempre esta presente em minha vida em meu pensamento e em meu coração. Sei que onde quer que esteja tenho certeza que esta zelando por mim.

Te amo muito.

AGRADECIMENTOS

A elaboração deste trabalho não teria sido possível sem a colaboração, estímulo e empenho de diversas pessoas. Gostaria de expressar toda a minha gratidão e apreço a todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para que esta tarefa se tornasse uma realidade. A todos quero manifestar os meus sinceros agradecimentos.

Em primeiro lugar gostaria de agradecer ao meu orientador o Professor Doutor Leandro Machado de Carvalho, pela oportunidade, incentivo, ajuda e apoio. Como professor foi o expoente máximo, abriu-me horizontes, ensinou-me principalmente a pensar. Foi, e é fundamental na transmissão de experiências, na criação e solidificação de saberes e nos meus pequenos sucessos. Tenho uma grande admiração pelo profissional que você é.

Gostaria de agradecer ao Professor Doutor Antônio Doménech-Carbó, meu orientador na Espanha, que foi muito mais que um professor, foi um pai. Obrigado pelo carinho, pela ajuda, pela paciência e pelos ensinamentos. É uma pessoa que admiro muito, pelo seu caráter e humildade além de ser um excelente profissional e uma pessoa maravilhosa.

A todos os colegas e amigos do LACHEM, pela convivência, pelo carinho, ajuda, apoio e pelos momentos de descontração vividos durante todo esse período.

Gostaria de agradecer a Gabriela Zemolin, pela ajuda e dedicação durante o doutorado, te agradeço de coração.

Gostaria de agradecer em especial a Ana Paula Lançanova Moreira, Larissa Sabo Muller, Géssica Silveira, Luciana Gobo, Gabriela Zemolin e a Monique Jung, pela amizade, pelo carinho, pela ajuda, pelo apoio durante todos esses anos. Vocês são muito especiais para mim, e como diz a frase “Amigos são a família que nos permitiram escolher” William Shakespeare.

Aos meus pais Paulo Juarez Martini e Rosane Jussana Martini e a minha Vó Lidia Rieger que sempre me apoiaram em cada etapa de minha vida, me ajudando e me incentivando em tudo, meu muito obrigado a vocês por mais esta conquista.

A todos os funcionários e professores que colaboraram indiretamente para o desenvolvimento deste trabalho.

À Universidade Federal de Santa Maria, pela oportunidade oferecida de realizar o curso de doutorado.

“A DEUS, por iluminar meus caminhos, me dando força e coragem de seguir em frente!”

RESUMO

Tese de doutorado
Programa de Pós-Graduação em Química
Universidade Federal de Santa Maria

DETERMINAÇÃO DE FÁRMACOS SINTÉTICOS EM FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS EMPREGANDO MÉTODOS ELETROQUÍMICOS E DE SEPARAÇÃO

AUTORA: MARIELE MARTINI

ORIENTADOR: LEANDRO MACHADO DE CARVALHO

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 14 de março de 2014.

A adulteração de formulações farmacêuticas naturais com fármacos sintéticos tem aumentado muito nos últimos anos. Os casos de adulteração têm sido relatados na literatura, comprovando que existe uma maior preocupação com relação a este problema, o que implica no desenvolvimento de métodos analíticos capazes de detectá-los. Este trabalho descreve o desenvolvimento de três métodos para a determinação de fármacos sintéticos da classe dos anorexígenos, antidepressivos, ansiolíticos, diuréticos e laxantes em formulações naturais. Foram desenvolvidos dois métodos para os *screening* de amostras, usando voltametria de micropartículas imobilizadas (VIM) e voltametria de redissolução catódica (AdCSV). E um método de separação para identificação e quantificação de 16 fármacos de cinco classes diferentes, anorexígenos (anfepiramina e sibutramina e femproporex), antidepressivos (bupropiona, fluoxetina, paroxetina e sertralina), ansiolíticos (alprazolam, bromazepam, flurazepam, lorazepam, clordiazepóxido, diazepam, midazolam e clonazepam), diurético (furosemida) e laxantes (fenolftaleína e bisacodil), usando cromatografia de par iônico (IPC). As condições otimizadas para a separação, eluente: tetrahydrofurano/acetonitrila/água, (5/10/85), contendo 0,14 mol L⁻¹ de dodecil sulfato de sódio, em pH 4,0, fluxo inicial de 1,2 mL/minuto, usando coluna C18. A concentração do eluente e o fluxo variaram durante a aplicação do gradiente. O método VIM foi aplicado no *screening* de 49 amostras de formulações farmacêuticas e dentre estas, 15 apresentaram adulteração por fármacos da classe dos anorexígenos, ansiolíticos e diuréticos. O método AdCSV foi aplicado no *screening* de 99 amostras e destas, 5 apresentaram adulteração por fármacos da classe dos ansiolíticos e laxantes. O método de separação foi aplicado em 18 amostras e destas, 3 apresentaram adulteração pela fenolftaleína da classe dos laxantes. Os dois métodos de *screening* desenvolvidos mostram-se eficientes para o rastreio de amostras, apresentando vantagens como, rapidez e baixo consumo de reagentes. O método de separação foi validado nos parâmetros de linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, seletividade, precisão e exatidão analítica, podendo ser empregado na determinação destas substâncias como adulterantes em formulações farmacêuticas naturais.

Palavras-chaves: Adulterantes, formulações farmacêuticas, eletroquímica, cromatografia líquida.

ABSTRACT

Thesis Doctorate in Chemistry
Postgraduate in Chemistry
Federal University of Santa Maria

DETERMINATION OF SYNTHETIC DRUG IN PHARMACEUTICAL FORMULATION EMPLOYING ELECTROCHEMICAL METHODS AND SEPARATION

AUTORA: MARIELE MARTINI

ORIENTADOR: LEANDRO MACHADO DE CARVALHO

Date and Local of Defense: Santa Maria, March 14th, 2014.

The adulteration of natural pharmaceutical formulations using synthetic drugs has increased in the last years. Adulterations have been reported in the literature, which proves the increasing concern regarding this issue, and thus raising the development of analytic methodologies that are able to detect adulterations. This study describes the development of three methodologies for the determination of five synthetic drugs classes (anorexics, antidepressants, anxiolytics, diuretic, and laxatives) in natural formulations. Two methods were developed for screening samples using voltammetry of immobilized microparticles (VIM), and cathodic stripping voltammetry (AdCSV). Another method was developed for the separation and identification of 16 drugs of 5 different classes - anorexics (amfepramone, sibutramine, and femproporex), antidepressants (bupropion, fluoxetine, paroxetine, and sertraline), anxiolytics (alprazolam, bromazepam, flurazepam, lorazepam, chlordiazepoxide, diazepam, midazolam, and clonazepam), diuretic (furosemide), and laxatives (phenolphthalein and bisacodyl) - using ion-pair chromatography (IPC). The optimized conditions for the separation were as follows, eluent: tetrahydrofuran/acetonitrile/water (5/10/85) with 0.14 mol L⁻¹ of dodecyl sodium sulfate, in pH 4, initial flow of 1.2 mL min⁻¹, using a C18 column. The eluent's concentration and flow varied during the application of the gradient. The IMV method was applied in the screening of 49 pharmaceutical formulation samples, and 15 presented adulterations with anorectic, anxiolytic, and diuretic drugs. The CSV method was used in the screening of 99 samples, and 5 presented adulterations with anxiolytic and laxative drugs. The separation method was applied in 18 samples, and 3 presented adulterations with phenolphthalein (laxative). Both screening methods developed here were efficient in tracking samples, presenting advantages, such as speed and low reagent consumption. The separation method was validated according to linearity, detection limit, quantification limit, selectivity, precision, and analytic accuracy. Therefore, this method can be used to determine the adulterations presented here in natural pharmaceutical formulations.

Keywords: Adulterants, pharmaceutical formulations, electrochemical, liquid chromatography

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Casos de adulteração de formulações farmacêuticas naturais de 1974 à 2013. Fonte: Scopus. 42
- Figura 2** - Adulterantes sintéticos de diferentes classes farmacológicas comumente encontrados em formulações à base de plantas medicinais (CARVALHO *et al*, 2011(b)). 43
- Figura 3** - Fluxograma com as possíveis classes de fármacos sintéticos encontrados como adulterantes em formulações farmacêuticas naturais emagrecedoras e os métodos analíticos disponíveis para a sua determinação (CARVALHO *et al.*, 2011 (a)). 45
- Figura 4** - Representação estrutural do surfactante aniônico Dodecil Sulfato de Sódio (SDS). 50
- Figura 5**- Representação esquemática do mecanismo de separação na cromatografia de par iônico. 50
- Figura 6** - Desenho esquemático do sistema eletródico de três fases: interface eletrodo/composto/solução, no qual o eletrodo de trabalho contém uma partícula aderida à sua superfície. As setas horizontal e vertical representam as transferências iônica e eletrônica entre as fases ocorrendo simultaneamente (CARVALHO *et al.*, 2010). 53
- Figura 7** - Foto do equipamento CH 660I. Número: (1) eletrodo auxiliar, (2) eletrodo de trabalho e (3) eletrodo de referência. 61
- Figura 8** - Procedimento utilizado para polir o eletrodo de grafite em lixa. 62
- Figura 9** - Procedimento utilizado para polir o eletrodo de grafite em folha de ofício. 62
- Figura 10** - Procedimento para aplicação da amostra no eletrodo (friccionar o eletrodo sobre a amostra). 62
- Figura 11** - Foto do equipamento Processador 693 VA Processor (Metrohm) em conjunto com 694 VA Stand (Metrohm). 63
- Figura 12** - Foto do cromatógrafo Knauer o qual consiste de uma bomba Smartline 1000 acoplado a um gestor Smartline 5000, e um detector de espectrofotômetro UV multicanal com base no sistema de arranjo de díodos (Smartline UV Detector 2600). 65

- Figura 13** - SWV para o diazepam imerso em tampão acetato de sódio aquoso 0.25 molar, a pH 4,75. Varredura de potencial iniciada em: a) +1,05 V no sentido negativo, b) -1,05 V no sentido positivo (sentido da varredura é marcado por setas). Incremento de potencial de 4 mV, amplitude de onda quadrada de 25 mV, frequência de 5 Hz. 73
- Figura 14** - SWV pigo imerso em tampão acetato de sódio aquoso 0.25 molar, a pH 4,75, sem a presença dos analitos. Varredura de potencial iniciada em: a) +1,05 V no sentido negativo, b) -1,05 V no sentido positivo (sentido da varredura é marcado por setas). Incremento de potencial de 4 mV, amplitude de onda de 25 mV, frequência de 5 Hz. 74
- Figura 15** - SWV para clonazepam imerso em solução aquosa de tampão acetato 0.25 M. (a) Aplicação de um potencial constante de 1,05 V, varredura no sentido negativo, (b) aplicação de um potencial constante de -1,05 V, varredura na direção positiva. Incremento potencial de 4 mV; amplitude onda de 25 mV; frequência de 5 Hz. 76
- Figura 16** - Critérios de diagnósticos para identificar diferentes classes de adulterantes em formulações à base de plantas utilizando SWV. Os símbolos \leftarrow e \rightarrow indicam os voltamogramas registrados em um potencial de -1,05 V no sentido positivo e de +1,05 V no sentido negativo, respectivamente. 79
- Figura 17** - SWV iniciada em 1,05 V no sentido positivo para PIGE modificado com: (a) amostra 15, (b) amostra 20 e (c) padrão de lorazepam. Eletrólito tampão acetato 0.25 M. Incremento de potencial 4 mV; amplitude de onda de 25 mV, frequência de 5 Hz, voltamogramas obtidos após a aplicação de um potencial redutor (-1,05 V) durante 90 s, a frequência de 5 Hz. 81
- Figura 18** - SWV iniciada em 1,05 V no sentido positivo para PIGE modificado com: (a) padrão do femproporex, (b) amostra 37, (c) amostra 19. Eletrólito tampão acetato 0.25 M. Incremento de potencial 4 mV; amplitude de onda de 25 mV, frequência de 5 Hz, voltamogramas obtidos após a aplicação de um potencial redutor (-1,05 V) durante 90 s, a frequência de 5 Hz. 82
- Figura 19** - SWV iniciada em 1,05 V no sentido positivo para PIGE modificado com: (a) amostra 7, (b) padrão furosemida, (c) amostra 12. Eletrólito tampão acetato 0.25 M. Incremento de potencial 4 mV; amplitude de onda de 25 mV, frequência de 5 Hz, voltamogramas obtidos após a aplicação de um potencial redutor (-1,05 V) durante 90 s, a frequência de 5 Hz. 83
- Figura 20** - SWV para a amostra de ervas enriquecida com diazepam e sepiolita (a) índigo, (b), azul da Prússia, (c) ferroceno, ligado ao pigo imerso em tampão acetato

de sódio aquoso 0,25 M, em pH 4,75. Potencial iniciado em 1,05 V. Incremento de potencial de 4 mV, amplitude de onda de 25 mV, frequência de 5 Hz. 84

Figura 21 - SWV para a amostra de plantas enriquecida com clordiazepóxido (x), sepiolita e índigo em contato com tampão acetato de sódio aquoso 0,25 M, em pH 4,75. Potencial iniciado em 1,05 V. Incremento de potencial de 4 mV, amplitude de 25 mV, frequência de 5 Hz. (a-c) Três linhas de base possíveis para medições de corrente de pico..... 85

Figura 22 - Influência do pH no comportamento voltamétrico dos ansiolíticos, antidepressivos e anorexígeno estudados em tampão Ringer 0,1 mol L⁻¹. 87

Figura 23 - Estudo do potencial de deposição; V= 50 mV s⁻¹, T_d= 15 s. Solução de medida: 10 mL de tampão Ringer 0,1 mol L⁻¹, pH 10. clonazepam, bromazepam e bupropiona 2 mg L⁻¹; flurazepam, alprazolam, midazolam, diazepam, clordiazepóxido, medazepam, lorazepam e fluoxetina 0,4 mg L⁻¹; anfepramona 4 mg L⁻¹. 88

Figura 24 - Estudo do tempo de deposição para os 12 fármacos estudados; clonazepam, bromazepam e bupropiona 2 mg L⁻¹; flurazepam, alprazolam, midazolam, diazepam, clordiazepóxido, medazepam, lorazepam e fluoxetina 0,4 mg L⁻¹; anfepramona 4 mg L⁻¹. Solução de medida: 10 mL de tampão Ringer 0,1 mol L⁻¹. 89

Figura 25 - Sinais voltamétricos da mistura dos 12 fármacos. Tampão Ringer 0,1 mol L⁻¹, V= 50 mV s⁻¹, T_d= 15 s, E_d = -0.1 V. 90

Figura 26 – Voltamograma do eletrólito de trabalho sem a presença dos analitos. Tampão Ringer 0,1 mol L⁻¹, V= 50 mV s⁻¹, T_d= 15 s, E_d = -0.1 V..... 91

Figura 27 - Critérios de diagnóstico para a identificação sequencial de diferentes classes de adulterantes em formulações à base de plantas usando AdCSV. 94

Figura 28 - Amostra 26 adulterada com clonazepam. Composição da amostra, esta descrito na tabela 17. Tampão Ringer 0,1 mol L⁻¹, pH 10,0, V = 50 mV s⁻¹, T_d = 15 s, E_d = - 0.1 V. 99

Figura 29 - Amostra 87 adulterada com fenolftaleína. Composição da amostra, esta descrito na tabela 17. Tampão Ringer 0,1 mol L⁻¹, pH 10,0, V = 50 mV s⁻¹, T_d = 15 s, E_d = - 0.1 V. 100

Figura 30 - Amostra 88 adulterada com fenolftaleína. Composição da amostra, esta descrito na tabela 17. Tampão Ringer 0,1 mol L⁻¹, pH 10,0, V = 50 mV s⁻¹, T_d = 15 s, E_d = - 0.1 V. 100

Figura 31 - Cromatograma com os 14 fármacos, alprazolam, clonazepam, lorazepam, midazolam e diazepam (20 mgL ⁻¹), bromazepam e flurazepam (50 mgL ⁻¹), anfepramona, clordiazepóxido, fluoxetina, sibutramina, sertralina, paroxetina e bupropiona (200 mgL ⁻¹). Condições: THF:ACN:H ₂ O (10:30:60) em pH 4,0, fluxo 0,5 mL/minuto.....	104
Figura 32 - Cromatograma (A) 8 ansiolíticos, 1-midazolam; 2-flurazepam; 3-clordiazepóxido; 4-bromazepam; 5-alprazolam; 6-lorazepam; 7-clonazepam; 8-diazepam. (B) 1-paroxetina; 2-sertralina; 3-sibutramina; 4-fluoxetina; 5-bupropiona; 6-anfepramona. Condições: alprazolam, clonazepam, lorazepam, midazolam e diazepam (20 mgL ⁻¹), bromazepam e flurazepam (50 mgL ⁻¹), anfepramona, clordiazepóxido, fluoxetina, sibutramina, sertralina, paroxetina e bupropiona (200 mgL ⁻¹). Condições: THF:ACN:H ₂ O (10:30:60) em pH 4,0, fluxo 0,5 mL/minuto.	105
Figura 33 - Cromatograma com os 14 fármacos, alprazolam, clonazepam, lorazepam, midazolam e diazepam (20 mg L ⁻¹), bromazepam e flurazepam (50 mg L ⁻¹), anfepramona, clordiazepóxido, fluoxetina, sibutramina, sertralina, paroxetina e bupropiona (200 mg L ⁻¹). Condições: THF:ACN:H ₂ O (10:30:60) em pH 4,0, SDS 0,14 mol L ⁻¹ , fluxo 0,5 mL/minuto.	106
Figura 34 – Cromatograma com os 16 fármacos, alprazolam, clonazepam, lorazepam e diazepam (20 mgL ⁻¹), bromazepam e flurazepam (50 mgL ⁻¹), anfepramona, clordiazepóxido, fluoxetina, furosemida, bisacodil, fenolftaleína, sibutramina, sertralina, paroxetina e bupropiona (200 mgL ⁻¹). Condições otimizadas estão descritas na Tabela 20, pH 4,0, contendo SDS 0,14 mol L ⁻¹ ; coluna C18.	109
Figura 35 – Cromatograma com o eluente, sem a presença dos analitos em estudos. Condições otimizadas estão descritas na Tabela 20, pH 4,0, contendo SDS 0,14 mol L ⁻¹ ; coluna C18.....	110
Figura 36 – Cromatograma com a amostra 88 adulterada com a fenolftaleína. Condições otimizadas estão descritas na Tabela 20, pH 4,0, contendo SDS 0,14 mol L ⁻¹ ; coluna C18.	117
Figura 37 - Cromatograma com a amostra 87 adulterada com a fenolftaleína. Condições otimizadas estão descritas na Tabela 20, pH 4,0, contendo SDS 0,14 mol L ⁻¹ ; coluna C18.	117
Figura 38 - Cromatograma com a amostra 73 adulterada com a fenolftaleína. Condições otimizadas estão descritas na Tabela 20, pH 4,0, contendo SDS 0,14 mol L ⁻¹ ; coluna C18.	118
Figura 39 – Esquema comparativo dos três métodos desenvolvidos para análise de adulteração.	122

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Anorexígenos pesquisados, com seus respectivos nomes comerciais, doses diárias, estruturas e pKa.	28
Tabela 2 - Ansiolíticos pesquisados, com suas respectivas doses diárias, nomes comerciais, estruturas e pKa.	29
Tabela 3 - Antidepressivos pesquisados, com suas respectivas doses diárias, nomes comerciais, estruturas e pKa.	32
Tabela 4 - Laxantes e diurético pesquisados, com suas respectivas doses diárias, nomes comerciais, estruturas e pKa.	34
Tabela 5 – Fármacos de diferentes classes farmacológicas comumente encontradas em formulações à base de plantas medicinais.	37
Tabela 6 – Cromatografia de par iônico para a determinação de fármacos da classe dos ansiolíticos, antidepressivos e diuréticos.	51
Tabela 7 – Métodos eletroquímicos para a determinação da fármacos da classe dos anorexígenos, ansiolíticos, antidepressivos e diuréticos usando HMDE.	55
Tabela 8 - Reagentes utilizados no desenvolvimento do trabalho.	59
Tabela 9 - Fármacos estudados como adulterantes e interferentes no desenvolvimento do trabalho.	59
Tabela 10 – Composição das formulações, origem e métodos aplicados.	66
Tabela 11 - Potenciais de pico de cada analito por VIM.	78
Tabela 13 – Amostras adulteradas com o respectivo adulterante encontrado.	80
Tabela 14 - Resultados obtidos para a faixa linear e o coeficiente de determinação para os 12 fármacos.	95
Tabela 15 - Precisão e exatidão dos fármacos estudados.	96
Tabela 16 - Limites de detecção e quantificação dos fármacos sintéticos estudados.	98
Tabela 17 - Determinação quantitativa de fármacos sintéticos em amostras reais.	101

Tabela 18 – Proporções dos solventes e pH estudados.	103
Tabela 19 – Pka e tempo de retenção dos fármacos em estudo <i>versus</i> potencial de ionização.	107
Tabela 20 – Condições otimizadas do gradiente, eluente contendo 0,14 mol L ⁻¹ SDS, pH 4,0.	108
Tabela 21 – Faixa linear de trabalho e coeficiente de determinação dos 16 fármacos.	112
Tabela 22 – Resultados encontrados para a precisão e exatidão.	113
Tabela 23 – Valores encontrados para o limite de detecção e para o limite de quantificação.	114
Tabela 24 - Determinação quantitativa de drogas sintéticas em amostras reais. ...	116
Tabela 25 – Comparação da análise das amostras adulteradas pelos três métodos desenvolvidos.	121

LISTA DE SIGLAS E ABREVIações

VIM	Voltametria de Micropartículas Imobilizadas
AdCSV	Voltametria Adsorviva de Redissolução Catódica
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
OMS	Organização Mundial da Saúde
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ADT	Antidepressivos tricíclicos
ISRS	Inibidores seletivos de recaptção da serotonina
GC	Cromatografia gasosa
CE	Eletroforese capilar
CZE	Eletroforese capilar de zona
MEKC	Cromatografia capilar eletrocínética micelar
SWV	Voltametria de onda quadrada
HMDE	Eletrodo de mercúrio de gota pendente
DAD	Detector de arranjo de diodos
PIGE	Eletrodo de grafite impregnado com parafina
DPV	Voltametria de pulso diferencial
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
SDS	Dodecil sulfato de sódio
THF	Tetrahidrofurano
ACN	Acetonitrila
MeOH	Metanol
IPC	Cromatografia de par iônico

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
2 OBJETIVOS	22
2.1 Objetivo Geral	22
2.2 Objetivos Específicos	22
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	24
3.1 Plantas medicinais usadas como emagrecedoras.....	25
3.2 Fármacos sintéticos usados em formulações emagrecedoras	27
3.2.1 Anorexígenos	27
3.2.2 Ansiolíticos	28
3.2.3 Antidepressivos	31
3.2.4 Laxantes	33
3.2.5 Diuréticos.....	34
3.3 Casos de adulteração de formulações naturais	35
3.4 Métodos analíticos para determinação de adulterantes em formulações farmacêuticas	44
3.5 Cromatografia de Par Iônico (IPC)	48
3.6 Voltametria de Micropartículas Imobilizadas (VIM)	51
3.7 Voltametria de Redissolução catódica (AdCSV).....	54
4. MATERIAL E MÉTODOS	57
4.1 Instrumentação	57
4.2 Reagentes e Soluções	58
4.3 Procedimentos analíticos	60
4.3.1 Determinações por voltametria de micropartículas imobilizadas	60
4.3.2 Determinações por voltametria de redissolução catódica.....	63
4.3.3 Determinações por cromatografia de par iônico com detector DAD	64
4.3.4 Amostras de formulações farmacêuticas naturais.....	65
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	72
5.1 Voltametria de Micropartículas Imobilizadas (VIM)	72
5.1.1 Comportamento voltamétrico dos fármacos no eletrodo de grafite	72

5.1.1.1	Influência do pH e do eletrólito suporte.....	72
5.1.1.2	Estudo da frequência	74
5.1.1.3	Estudo do tempo de eletrólise	75
5.1.1.4	Estudo qualitativo	77
5.1.1.5	Aplicação em amostras reais de formulações farmacêuticas naturais	79
5.1.1.6	Estudo quantitativo	83
5.2	Voltametria de redissolução catódica	86
5.2.1	Comportamento voltamétrico dos fármacos no HMDE	86
5.2.1.1	Influência do pH	86
5.2.1.2	Estudo do potencial de deposição	88
5.2.1.3	Estudo do tempo de deposição.....	89
5.2.2	Validação do método.....	91
5.2.2.1	Especificidade do método	91
5.2.2.2	Linearidade	94
5.2.2.3	Precisão e exatidão	95
5.2.2.4	Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)	96
5.2.3	Aplicação analítica	98
5.3	Cromatografia Líquida de Par Iônico (IPC)	102
5.3.1	Otimização do método	102
5.3.2	Validação método	111
5.3.2.1	Especificidade do método	111
5.3.2.2	Precisão e exatidão do método	112
5.3.2.3	Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)	114
5.3.3	Aplicação analítica	115
6	ANÁLISE COMPARATIVA DOS MÉTODOS DESENVOLVIDOS.....	119
7	CONCLUSÕES.....	123
8	REFERÊNCIAS	125

1 INTRODUÇÃO

A obesidade é reconhecida como uma doença mundial, que afeta milhões de pessoas, e constitui-se já em um problema de saúde pública (CORREIA, 2008). Em virtude disso, a população tem buscado, cada vez mais, tratamentos alternativos para esse problema, sobretudo à base de formulações farmacêuticas manipuladas a partir de extratos de plantas medicinais. Nesse sentido, a crescente procura por produtos naturais se deve principalmente à falsa imagem de que, por serem naturais, não causam efeitos adversos nem danos à saúde. A grande disponibilidade e variedade desses produtos no mercado, além do fácil acesso, possibilitam o maior consumo dos mesmos. No entanto, estudos científicos realizados têm revelado a presença de substâncias sintéticas não declaradas adicionadas aos produtos chamados “naturais” (CARVALHO et al., 2010 (b); ALMEIDA et al., 2000; SOMBRA et al., 2005), conferindo a estes um maior efeito, a exemplo de anorexígenos em formulações para emagrecimento.

As possibilidades de adulteração para formulações emagrecedoras são vastas uma vez que existem diferentes classes de medicamentos que podem ser empregadas para esse fim, sejam elas específicas para perder peso ou com ação coadjuvante como é o caso de diuréticos e laxantes. Estes, apesar de não serem tão efetivos na redução de peso, merecem atenção especial em virtude dos riscos que podem causar a saúde.

É relevante destacar que os casos de adulteração infringem a lei de muitos países, uma vez que as formulações são registradas em desacordo com a sua real composição, o que pode levar ao aparecimento de efeitos imprevisíveis, causados por essas substâncias à saúde do usuário, tanto por seus efeitos isolados como pela ocorrência da interação com as demais substâncias presentes (LIANG et al., 2006; CIANCHINO et al., 2008).

Os adulterantes mais encontrados nas formulações farmacêuticas para fins emagrecedores são os anorexígenos derivados das anfetaminas. Dessa forma estima-se que 80% dos anfetamínicos produzidos legalmente destinam-se às terapias de redução de peso, e 25% dos casos relatados de abuso de anfetamínicos resultam do consumo excessivo de prescrições médicas (OGA et al., 2008). Além

dos anorexígenos, os ansiolíticos e antidepressivos são também identificados como adulterantes isolados ou associados a estes nessas formulações (AZEREDO et al., 2005).

Os anorexígenos femproporex, anfepramona e mazindol são as principais substâncias identificadas como adulterantes em formulações “naturais” emagrecedoras até o momento, por apresentarem a capacidade de induzir a falta ou a perda de apetite, aumentar a sensação de saciedade e reduzir a absorção intestinal de gordura. Porém, apresentam vários efeitos colaterais como humor instável, dor de cabeça, depressão nervosa, irritabilidade e até dependência química (NAPPO et al., 1993). Já os ansiolíticos como o diazepam, bromazepam, flurazepam, midazolam, entre outros, são frequentemente associados às formulações como adulterantes por minimizarem os efeitos colaterais apresentados pelos anorexígenos, sendo assim capazes de mascarar a presença destes. Seu efeito ansiolítico auxilia também na diminuição da ansiedade, característica em certos casos de pacientes obesos (NAPPO et al., 1993; CHAVES et al., 1994; PIRNAY et al., 2002; GUNNAR et al., 2005). Assim como os antidepressivos destacando-se a fluoxetina, que além de eficazes na depressão podem ser utilizados no tratamento de distúrbios alimentares como transtorno obsessivo compulsivo e bulimia (SILVA, 2006). Outra classe comumente identificada nos casos de adulteração são os laxantes, os quais promovem a defecação e melhoram a obstipação (SILVA, 2006). O bisacodil, produto análogo à fenolftaleína, é atualmente o principal laxante comercializado no Brasil e apresenta ação laxativa estimulante ou irritativa da mucosa. Já os diuréticos, muito utilizados em casos de adulteração de formulações naturais com fins emagrecedores, são fármacos que tem a propriedade de causar aumento do volume urinário e cujo mecanismo básico é a inibição da reabsorção tubular de sódio e água (SILVA, 2006).

Dentro do contexto da contaminação de medicamentos a base de plantas medicinais, a existência de métodos analíticos capazes de identificar de maneira seletiva e de quantificar possíveis ou prováveis adulterantes orgânicos é de grande relevância tanto do ponto de vista clínico como toxicológico. Sendo assim, os métodos analíticos devem ser capazes de determinar de maneira seletiva e quantitativa a presença de adulterantes orgânicos na presença de outros como

interferentes, os quais pertencem normalmente à outra classe de droga combinada na formulação.

Esse trabalho apresenta uma contribuição para o conhecimento da adulteração de formulações naturais comercializadas no Brasil para tratamento da obesidade a partir do desenvolvimento de novos métodos para a análise dos principais adulterantes pertencentes a cinco classes farmacológicas. Os métodos desenvolvidos foram aplicados no estudo da adulteração de 102 amostras adquiridas em diferentes farmácias de manipulação em nove estados brasileiros.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Tendo em vista a crescente procura por produtos naturais com fins emagrecedores e a necessidade de métodos analíticos eficientes para a identificação e quantificação de possíveis adulterantes, esse trabalho tem como objetivo principal o desenvolvimento de métodos analíticos para a determinação de fármacos de diferentes classes (anorexígenos, ansiolíticos, antidepressivos, laxantes e diuréticos) em formulações farmacêuticas manipuladas a partir de plantas medicinais.

2.2 Objetivos Específicos

- Desenvolvimento de um método para screening de amostras de formulações farmacêuticas naturais em estado sólido, usando Voltametria de Micropartículas Imobilizadas (VIM), para a determinação de anorexígenos, ansiolíticos, antidepressivos e diuréticos.

- Desenvolvimento de um método para screening de amostras de formulações farmacêuticas naturais solubilizadas, usando Voltametria de Redissolução Catódica (AdCSV), para a determinação de anorexígenos antidepressivos e ansiolíticos.

- Desenvolvimento de um método de separação para identificação e quantificação de possíveis adulterantes em formulações farmacêuticas naturais usando Cromatografia de Par Iônico (IPC), com detecção por arranjo de diodos (DAD), para a determinação de anorexígenos, antidepressivos, ansiolíticos, diuréticos e laxantes.

- Estudar a interferência da matriz vegetal e de outras classes farmacológicas que podem estar presentes como adulterantes em formulações emagrecedoras à base de plantas medicinais.

- Aplicar os métodos analíticos desenvolvidos na determinação de adulterantes em formulações farmacêuticas naturais com fins emagrecedores, sendo que, estas foram adquiridas em diferentes estados brasileiros (RS, SC, PR, SP, RJ, MG, CE, GO DF).

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A obesidade é considerada, pela Organização Mundial da Saúde (OMS) um dos dez principais problemas de saúde pública do mundo. A situação é tão alarmante que a doença passou a ser vista como epidêmica. Considerada por muitos autores, como uma doença multifatorial, a obesidade possui interação com fatores sociais, ambientais, genéticos, psicológicos e hábitos de vida. (FRANCISCHI et al., 2000). O estilo de vida pouco ativo, decorrente da industrialização, pode ser considerado outro fator contribuinte para o desenvolvimento da obesidade, pois, à medida que se diminui o gasto energético nas atividades diárias e nas atividades de lazer, aumenta-se o consumo alimentar, a tendência é o aumento do peso corporal (FRANCISCHI et al., 2000).

Por razões estéticas e para melhorar a qualidade de vida, as pessoas buscam tratamentos de redução de peso que devem ter como base a reeducação alimentar e mudanças no estilo de vida. Porém, o insucesso com esse tipo de tratamento ou mesmo o desejo em obter rápidos resultados leva a população a recorrer ao uso de medicamentos emagrecedores, como os anorexígenos (CUNHA et al., 2002). O uso destes medicamentos, no entanto, tem sido cuidadosamente revisto devido aos riscos a que expõe a saúde do usuário, como graves problemas cardiopulmonares e no sistema nervoso central, causando inclusive dependência (MANCINI; HALPERN, 2006).

Com isso, muitos pacientes procuram meios alternativos para perder peso. Como é o caso dos tratamentos naturais, como a fitoterapia, que tem crescido consideravelmente nos últimos tempos, principalmente, sob o forte apelo de que por se tratar de produtos de origem natural não oferecem risco à saúde do usuário (SOMBRA et al., 2005). Estima-se que o Brasil movimenta anualmente 160 milhões de dólares com a venda de produtos à base de formulações naturais (CARVALHO et al., 2008).

No Brasil o órgão responsável pela regulamentação de produtos fitoterápicos é a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e, segundo ANVISA, fitoterápico é “todo medicamento tecnicamente obtido e elaborado empregando-se

exclusivamente matérias-primas vegetais com finalidade profilática, curativa ou para fins de diagnósticos, com benefício para o usuário” (JUNIOR et al., 2005).

A Resolução RDC nº 48 de 16 de março de 2004 da ANVISA, visa à normatização para registro de medicamentos fitoterápicos e determina os aspectos essenciais ao registro, como identificação botânica das espécies vegetais utilizadas, padrão de qualidade, identidade, provas de eficácia e segurança que validem as indicações terapêuticas propostas (BRASIL, 2004).

3.1 Plantas medicinais usadas como emagrecedoras

O uso de plantas medicinais na terapêutica é muito antigo, e está intimamente relacionado com a própria evolução do homem. Para utilizarem as plantas como medicamentos, os homens antigos valiam-se de suas próprias experiências empíricas de acerto e erro, e da observação do uso de plantas pelos animais (FETROW, 2000). A fitoterapia é caracterizada pelo tratamento de estados patológicos através da utilização de substratos naturais de origem botânica.

De acordo com a OMS cerca de 80% da população mundial faz uso de algum tipo de erva ou planta para tratar doença ou aliviar sintomas. Outros dados da OMS constataam que a população mundial vem aumentando o consumo de plantas medicinais significativamente, sendo que este uso tem sido incentivado pela própria entidade, quando submetidos a pesquisas que comprovem sua eficácia, posologia e outros (BRASIL, 2006).

O uso de produtos derivado de plantas vegetais tem se tornando crescente, inclusive como adjuvantes no tratamento da obesidade. Geralmente, as plantas utilizadas para perda de peso agem de duas formas, ou como estimulantes do metabolismo ou como moderadores do apetite, reduzindo a ingestão calórica. São muitas as plantas medicinais indicadas para este fim. Algumas delas serão enfatizadas aqui, sendo as mais frequentemente citadas na literatura como emagrecedoras.

O *Fucus vesiculosus* ou fucus como é conhecido popularmente é uma alga com alto conteúdo em iodo, possuindo um efeito estimulador da tiroide que pode

levar a um aumento da taxa metabólica basal. Provoca uma sensação de saciedade e diminui a absorção de gorduras, açúcares e sais biliares (SANTOS, 2007).

A Porangaba (*Cordia ecalyculata Vell*) é amplamente utilizada no Brasil como inibidor do apetite e perda de peso. Atualmente tem sido utilizada devido aos seus benefícios na perda da gordura abdominal, sendo denominada “erva anti-barriga”. Entre os constituintes químicos presentes em sua composição, destacam-se alcalóides como a cafeína, a alantoína e ácido elantóico; glicosídeos como consolidina; taninos e pigmentos, além de compostos inorgânicos como o potássio (ASSONUMA, 2009).

A Cascara Sagrada (*Rhamnus purshiana*) é uma erva medicinal utilizada pelos nativos norte-americanos desde a antiguidade cujo efeito esperado é o laxativo. Ela age provocando uma irritação intestinal que ocasiona o aumento dos movimentos peristálticos, promovendo assim a evacuação (LÔBO, 2012).

A Caralluma (*Caralluma fimbriata*) é um cacto comestível, é utilizado como alimento há mais de 2000 anos. É um alimento considerado revigorante e supressor do apetite. Consumida in natura, em saladas, refogados e caldos ou desidratada, a Caralluma era utilizada na antiga Índia nas peregrinações por sua suposta propriedade de reduzir o cansaço e a fome (KURIAN et al., 2007).

A Garcínia (*Garcinia Cambogia*) é uma planta nativa do sudeste da Ásia. A casca seca tem sido amplamente utilizada há séculos por todo o Sudeste Asiático como conservante de alimentos, aromatizante e de ação carminativa. Atualmente, está sendo utilizado como ingrediente em suplementos dietéticos para perda de peso em diversos produtos fitoterápicos. Seu principal componente ativo é o ácido hidroxicítrico (HCA), provável atuante na perda de peso corporal (SAITO et al., 2005)

A laranja amarga (*Citrus aurantium*) de origem oriental é um fitoterápico conhecido por ser substituto da efedrina e auxiliar na perda de peso dos praticantes de atividades físicas, entretanto, sem os efeitos colaterais da efedrina (GOUGEON et al., 2005).

O feijão branco (*Phaseolus vulgaris*) é amplamente consumido pela população brasileira como alimento. Recentemente a variedade branca, crua, devido ao componente ativo da faseolamina, inibidor da atividade da enzima alfa-amilase (responsável pela hidrólise de carboidratos) e, conseqüentemente, reduzindo a

biodisponibilidade intestinal de carboidratos, vem sendo consumido como produto emagrecedor (CELLENO et al., 2007).

A principal alegação das propriedades terapêuticas da *Gymnema sylvestre* (Gimena) está relacionada ao “glucomarim”, um peptídeo isolado, que parece bloquear o estímulo ao sabor doce da glicose e da sacarose, ligando-se temporariamente aos receptores linguais que sinalizam o sabor doce amargo, inibindo o desejo de ingerir doces (PREUSS et al., 2004).

O chá verde, ou chá preto ou chá da china, são apresentações comercialmente diferentes das folhas de *Camellia sinensis* L.. Esta espécie é uma árvore muito ramosa, originária da Ásia Continental e da Indonésia e é cultivada em mais de 30 países. O uso do chá verde teve origem há mais de 5000 anos, em ritos cerimoniais, refeições diárias e para fins medicinais (Cooper et al., 2005). A planta foi introduzida no mercado farmacêutico europeu como auxiliar em regimes dietéticos, pela sua ação lipolítica e diurética e, externamente, como antipruriginoso e emoliente em afecções dermatológicas (SIMÕES et al., 2004)

São varias as opções de plantas medicinais para o tratamento da obesidade, mas o tratamento geralmente é longo e nem sempre o usuário obtém o resultado esperado. A fim de potencializar o efeito destes produtos naturais e de satisfazer o publico alvo, substâncias sintéticas são adicionadas a estas formulações comercializadas como naturais.

3.2 Fármacos sintéticos usados em formulações emagrecedoras

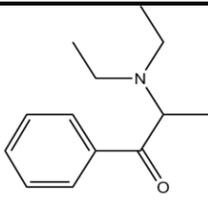
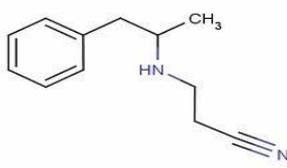
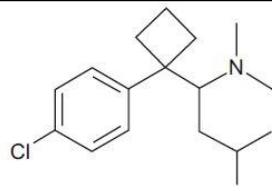
3.2.1 Anorexígenos

Os anorexígenos ou supressores do apetite promovem perdas de peso reduzindo o apetite e aumentando a sensação de plenitude. Os anorexígenos derivados das anfetaminas são os mais utilizados, os quais reduzem o apetite por aumento da serotonina ou das catecolaminas, neurotransmissores, que afetam o estado emocional e o apetite (NAPPO et al., 1993; CUNHA et al., 2002).

Os anorexígenos anfepramona, femproporex e mazindol tiveram a sua venda, comércio, manipulação e uso proibido no final de 2011, por apresentarem graves riscos cardiopulmonares e do sistema nervoso central (BRASIL, 2011).

Os anorexígenos estudados neste trabalho estão listados na Tabela 1, com suas respectivas doses diárias, nomes comercialmente disponíveis, pKa, além da sua estrutura química.

Tabela 1 - Anorexígenos pesquisados, com seus respectivos nomes comerciais, doses diárias, estruturas e pKa.

Fármaco Sintético	Nome comercial	Doses diárias (mg)^a	Estrutura	pK_a
Anfepramona	-	25-75		-
Femproporex	-	25		-
Sibutramina	Sibutran [®] Reductil [®] Meridia [®]	10		9,69 Kornhuber, 2008

^a Dose diária recomendada por médicos (DEF, 2007/2008)

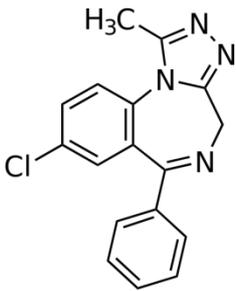
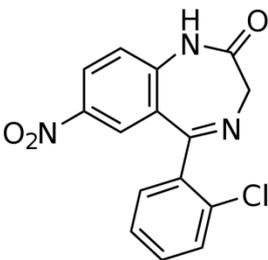
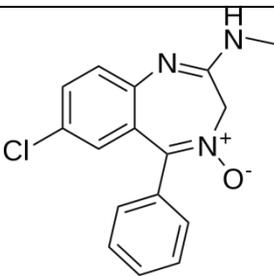
3.2.2 Ansiolíticos

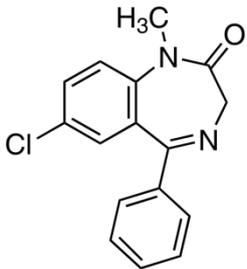
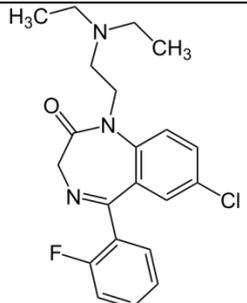
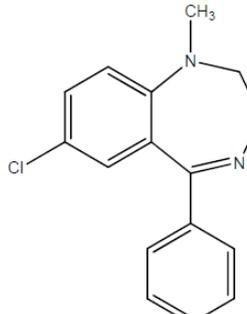
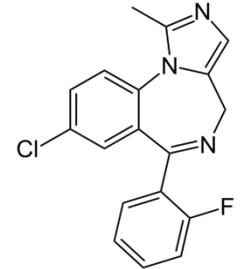
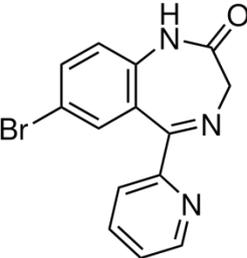
Os ansiolíticos estão entre os fármacos mais prescritos e utilizados em todo o mundo. Apresentam efeitos sedativos, ansiolíticos e hipnóticos. São, ainda,

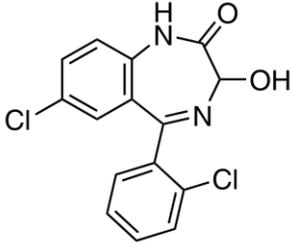
relaxantes musculares, anticonvulsivantes, produzem dependência e reações de abstinência. Os mesmos são associados a substâncias emagrecedoras, a fim de diminuir seus efeitos colaterais (CUNHA et al., 2002).

Os ansiolíticos estudados se encontram na Tabela 2, com suas respectivas doses diárias, nomes comercialmente disponíveis, pKa, além da sua estrutura química.

Tabela 2 - Ansiolíticos pesquisados, com suas respectivas doses diárias, nomes comerciais, estruturas e pKa.

Fármaco Sintético	Nome comercial	Doses diárias (mg)	Estrutura	pKa
Alprazolam	Frontal [®]	0,75 - 1,5		2,4 Newton, 1978
Clonazepam	Rivotril [®]	0,5 – 2,0		1,50 Newton, 1978
Clordiazepóxido	Librium [®]	15 - 40		4,80 Newton, 1978

Diazepam	Valium®	4 - 40		3,33 Newton, 1978
Flurazepam	Dalmadorm®	40 - 100		8,2 Newton, 1978
Medazepam	Serenium®	10		6,20 Newton, 1978
Midazolam	Dormonid®	7,5 -15		1,70 Newton, 1978
Bromazepam	Lexotam®	1,5- 15		2,9 Newton, 1978

Lorazepam	Lorax [®]	2-3		1,3 Newton, 1978
-----------	--------------------	-----	--	------------------------

^a Dose diária recomendada por médicos (DEF, 2007/2008)

3.2.3 Antidepressivos

Os antidepressivos foram descobertos no final da década de 50 e, desde lá, novas classes de antidepressivos estão sendo estudadas. Eles são classificados de acordo com sua estrutura química ou suas propriedades farmacológicas. As classes de antidepressivos mais conhecidas são tricíclicos (ADT) e os inibidores seletivos de recaptação da serotonina (ISRS), entretanto, existe uma variedade de substâncias com diferentes mecanismos de ação que são utilizadas no tratamento da depressão e eventualmente em outros transtornos psiquiátricos (MORENO et al., 1999; PEIXOTO et al., 2008).

Tricíclicos (ADTs)

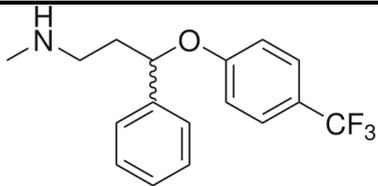
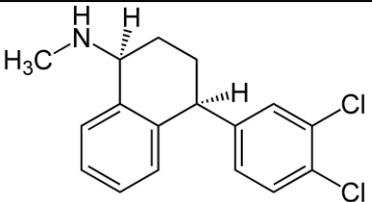
Os antidepressivos tricíclicos estão entre os primeiros antidepressivos descobertos, os quais foram descobertos a partir de observações clínicas. Os ADT bloqueiam as bombas de recaptação da serotonina, noradrenalina e dopamina. São considerados fármacos de escolha em depressões graves e em pacientes hospitalizados. Os efeitos colaterais mais comuns causados pelos ADT são: boca seca, visão turva, retenção urinária, aumento da frequência cardíaca, tremores das mãos e sedação (MORENO et al., 1999; PEIXOTO et al., 2008). São exemplos conhecidos como amitriptilina, clomipramina, imipramina dentre outros.

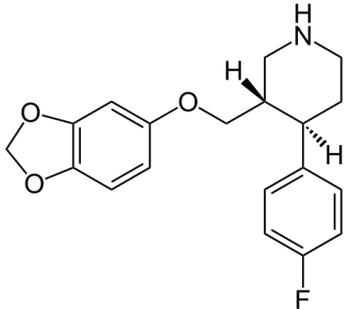
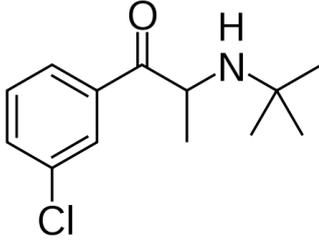
Inibidores seletivos de recaptação da serotonina (ISRS)

Os ISRS começaram a ser utilizados no início da década de 80 para tratamento da depressão, e vem ocupando o lugar dos ADT em razão do seu melhor perfil de efeitos colaterais. Os ISRS inibem de forma potente e seletiva a recaptação da serotonina. Seus efeitos colaterais mais frequentemente relatados são: náuseas, vômitos, diarreia, ansiedade, insônia, nervosismo, alteração do sono, fadiga, perda ou ganho de peso, tremores e disfunções sexuais (MORENO et al., 1999; PEIXOTO et al., 2008).

As doses diárias recomendadas, nomes comerciais, estruturas e o pKa dos antidepressivos estudados estão na Tabela 3.

Tabela 3 - Antidepressivos pesquisados, com suas respectivas doses diárias, nomes comerciais, estruturas e pKa.

Fármaco Sintético	Nome comercial	Doses diárias (mg)	Estrutura	pKa
Fluoxetina	Prozac®	20-60		9,50 Kornhuber, 2008
Sertralina	Zoloft®	50-200		9,16 Kornhuber, 2008

Paroxetina	Aropax [®]	20-60		9,51 Kornhuber, 2008
Bupropiona	Wellbutrin [®]	200 - 450		7,16 Kornhuber, 2008

^a Dose diária recomendada por médicos (DEF, 2007/2008)

3.2.4 Laxantes

Os laxantes são medicamentos que promovem a defecação e melhoram a obstipação. São classificados de acordo com o mecanismo de ação e propriedades químicas dos fármacos. A importância desses fármacos deve-se mais a difusão do seu uso na automedicação do que pelo seu papel no tratamento médico da constipação (SILVA, 2006).

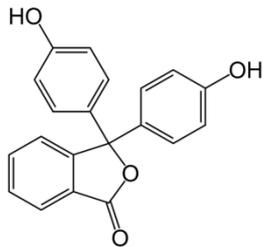
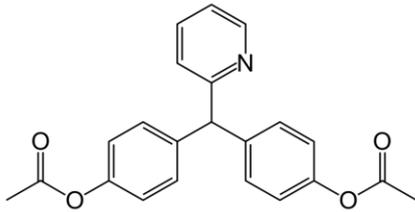
A fenoltaleína, bastante utilizada como laxante, foi retirada do mercado em 2002 por apresentar propriedades cancerígenas (BRASIL, 2002). O bisacodil, produto análogo à fenoltaleína, é atualmente o principal laxante comercializado no Brasil e apresenta ação laxativa estimulante ou irritativa da mucosa (SILVA, 2006). O abuso no uso de laxativos ocorre quando são administrados sem indicação médica ou em sobredoses, frequentemente em casos em que se deseja perder peso ou em pacientes com anorexia/bulimia nervosa.

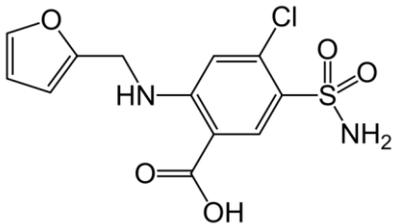
3.2.5 Diuréticos

Os diuréticos são fármacos que tem a propriedade de causar aumento do volume urinário e cujo mecanismo básico é a inibição da reabsorção tubular de sódio e água. Os diuréticos podem ser classificados de acordo com suas estruturas químicas, eficácia, mecanismos e/ou local de ação (SILVA, 2006). Os fármacos mais comumente utilizados pertencem à classe dos tiazídicos (hidroclorotiazida, clortalidona), diuréticos de alça (furosemida) e poupadores de potássio (amilorida) (SILVA, 2006).

Os laxantes e o diurético que serão avaliados neste trabalho estão mostrados na Tabela 4, com as suas respectivas doses diárias, nomes comerciais, estruturas e pKa.

Tabela 4 - Laxantes e diurético pesquisados, com suas respectivas doses diárias, nomes comerciais, estruturas e pKa.

Fármaco Sintético	Nome comercial	Doses diárias (mg)	Estrutura	pK _a
Fenolftaleína	-	50-200		9,7 Newton, 1978
Bisacodil	Dulcolax ®	5-10		4,69 Newton, 1978

Furosemida	Lasix [®]	20-40		4,7 Newton, 1978
------------	--------------------	-------	--	------------------------

^a Dose diária recomendada por médicos (DEF, 2007/2008)

3.3 Casos de adulteração de formulações naturais

A origem da adulteração foi iniciada nos EUA, com a mudança cultural da imagem corporal no final do século 19 e início do século 20, levando ao aumento da demanda da prescrição de medicamentos para perda de peso. Neste contexto, médicos passaram a prescrever uma ampla variedade de combinações para perda de peso por mais de um século. O uso moderno de dietas para redução de peso pode ser atribuída à década de 1890, quando os médicos começaram a utilizar remédios para tratamento da tireóide combinado com outros fármacos (COHEN et al., 2012).

Por volta de 1940, os efeitos dos anorexígenos recém-descobertos das anfetaminas gerou um enorme interesse em combinação com médicos e empresas farmacêuticas. As anfetaminas produziam efeitos adversos, de modo que as pílulas eram produzidas em combinação com outros fármacos, a fim de minimizar seus efeitos. As cápsulas e comprimidos eram coloridos, comumente sendo referidos como pílulas da dieta do arco-íris, combinando então anfetaminas, diuréticos, laxantes, e hormônios da tireóide para a perda de peso. Além disso, ansiolíticos, barbitúricos, potássio, corticosteróides e antidepressivos eram utilizados para suprimir a insônia, palpitações, ansiedade e outros efeitos colaterais comuns que os medicamentos para perda de peso causam. O marketing das empresas farmacêuticas com as pílulas do arco-íris era grande, usando uma variedade de promoção e técnicas não convencionais para convencer milhares de médicos a prescreverem as pílulas para perda de peso. Ao longo dos anos, mortes e lesões foram ligadas ao uso destas pílulas, sendo que o órgão responsável pelo controle de

medicamentos nos EUA, Food and Drug Administration (FDA), retirou as pílulas do arco-íris do mercado no final dos anos 1960 (COHEN et al., 2012).

Subsequentemente, esta combinação de pílulas dietéticas se popularizou na Espanha e no Brasil em 1980 e 1990. As pílulas do arco-íris mais uma vez retornaram aos Estados Unidos, agora sob o disfarce de suplementos dietéticos para perda de peso, expondo a frágil fronteira entre o desejo do público que têm acesso à auto-medicação e a necessidade de proteger e promover a saúde pública (COHEN et al., 2012). Neste contexto, acompanham este crescimento os casos de adulteração das formulações naturais com fármacos sintéticos não declarados, promovendo a estes efeitos milagrosos e satisfazendo às expectativas do público alvo através de um tratamento eficaz a curto prazo e “sem danos à saúde”.

Com o propósito de investigar possíveis adulterações, estudos no Brasil (Almeida et al., 2000) envolveram o desenvolvimento de um método analítico para a determinação de anfepramona, femproporex e diazepam em cápsulas rotuladas como produtos naturais utilizadas para o tratamento da obesidade. O trabalho foi aplicado na análise de vinte amostras, das quais 40% apresentaram diazepam, anfepramona ou femproporex como adulterantes.

Com o mesmo intuito de analisar a presença de benzodiazepínicos e anorexígenos em formulações naturais destinadas a regimes de emagrecimento, Auricchio, em 1991 empregaram técnicas de cromatografia em camada delgada e espectrofotometria na região do ultravioleta na análise de setenta e quatro amostras. Apesar de estarem identificadas como medicamento natural ou homeopático, 50% das amostras encontravam-se associadas a anorexígenos e benzodiazepínicos. A mesma técnica de cromatografia em camada delgada foi empregada também por Cunha, (2002), na análise de 40 amostras, para avaliar a incidência de fármacos anorexígenos sintéticos em “produtos naturais” para emagrecimento. Neste estudo, 18% das amostras apresentaram adulteração com fármacos sintéticos não declarados na formulação, como anfepramona, femproporex, fluoxetina e benzocaína, um anestésico local.

A determinação de benzodiazepínicos e anfepramona por voltametria foi realizada por Correia, (2008), possibilitando o desenvolvimento de um método alternativo para o controle e fiscalização da adulteração em formulações

fitoterápicas. Em trabalho recente publicado por Doménech-Carbó, (2013), foi desenvolvido um método usando voltametria de micropartículas imobilizadas para um *screening* rápido em amostras sólidas de formulações farmacêuticas naturais, o método foi desenvolvido para a determinação de cinco classes de fármacos sintéticos (anorexígenos, ansiolíticos, antidepressivos, diuréticos e hipoglicêmicos), os quais são os mais prováveis em casos de adulteração em formulações com fins emagrecedores. O método foi aplicado em 18 amostras, das quais 16 apresentaram provável adulteração, por ansiolíticos, anorexígenos e diuréticos.

A Tabela 5 mostra alguns casos de adulteração com fármacos sintéticos de diferentes classes, comumente encontrados em formulações farmacêuticas naturais, os quais foram relatados em duas revisões realizadas por CARVALHO, em 2011 (a) e (b). Essas revisões descrevem os casos de adulteração até o presente momento, assim como os métodos analíticos utilizados para esses estudos.

Tabela 5 – Fármacos de diferentes classes farmacológicas comumente encontradas em formulações à base de plantas medicinais.

Adulterantes encontrados	Formulação farmacêutica	Origem da formulação	Ocorrência / Registro	Ref.
Acetaminofen, aminofilina, borneol, canfor, clorfeniramina, diazepam, efedrina, 5-florouracil, furazolidona, ácido mefenâmico, 4-metil-5-tiazoletanol, fenacetina, pulegone, resibufogenina	Medicina Chinesa	China	USA	Au, 2000
Acetaminofen, amitriptilina, ácido benzoico, betametasona, cafeína, clordiazepóxido, clorfeniramina, clomipramina, diazepam, dipirona, efedrina, fenfluramina, ibuprofeno, nordazepam, fentermina, fenilbutazona	Preparação a base de ervas	-	Arábia Saudita	Bogusz, 2002
Acetaminofen, antihistamínicos e	Remédio a	Africa	-	Snyman,

nonsteroidal, diazepam, diclofenaco, hidroclorotiazida, indometacin, propofol, trimetadione	base de ervas			2005
Acetaminofen, berberina, clofeniramina, cyproheptadina, dexametasona, diclofenaco, diazepam, dipirona, efedrina, fluocinonida, hidroclorotiazida, ibuprofeno, indometacin, phenformin, prednisolona, prometazina, tetrahydropalmatina, teofilina	Medicina Chinesa	China	Singapura	Koh, 2000
Acetaminofen, clorfeniramina, codeina, ciproheptadina, dexametasona, diazepam, diclofenaco, dipirona, fluocinonida, guaifenesin, hidroclorotiazida, ibuprofeno, indometacin, fenformina, prednisolona, prometazina, sildenafil, teofilina	Produto da Medicina Chinesa	-	-	Yee, 2005
Acetaminofen, clorzoxazona, diazepam, cloridrato, etaverina, tiamina	Yi Chung Tai Medical Manufactory Co.	Taiwan	-	Offerhaus, 1979
Alprazolam, estazolam, cloridrato fenfluramina, glibenclamida, gliclazida, glipizida, cloridrato metformin, metiltestosterona, fenolftaleína, cloridrato sibutramina, sildenafil, tadalafil, triazolam	Suplemento dietético a base de ervas	-	-	Chen, 2010
Altiazida, anfetamina, desmetilsibutramina, dexametazone-21-acetate, efedrina, fenfluramina, furosemida, hidroclorotiazida, fenobarbital, fenolftaleína, fentermina, fentoin, ácido salicílico, sibutramina,	Produto para perda de peso	—	Holanda	RIVM, 2011

spironolactona, sinefrina, triamterene, yohimbine					
Aminopirina, clordiazepóxido, corticosteroids, diazepam, hidroclorotiazida, indometacina, fenilbutazona	Produto a base de ervas	USA	-	Vander, 1994	
<i>N</i> -bisdesmetil-sibutramina, <i>N</i> - desmetil-sibutramina, espironolactona, fenolftaleína, sibutramina	-	-	Hong Kong	Chen, 1995	
Bumetanida, clordiazepóxido, femproporex, fluoxetina, furosemida, sibutramina, sildenafil, tadalafil, vardenafil	Produto a base de ervas	-	-	Cohen, 2002	
Bumetanide, fenitoina, fenolftaleína, rimonaban, sibutramina	Suplemento dietético	-	USA	Manera, 2009	
Clorzoxazona, diazepam, etoxibenzamida, indometacina	Medicina Tradicional Chinesa	China	-	Tsene, 1997	
Efedrina, furosemida, norefedrina	Produto a base de ervas	-	Argentina	Cianchino, 2008	
Clordiazepóxido, clormetiazol, clorfeniramina, diclofenaco, difenidramina, hidroclorotiazida, prometazina, sildenafil, triamterene	Medicina Tradicional Chinesa	China	USA	Miller, 2007	
Clordiazepóxido, clorfeniramina, hidrolorotiazida, maleate, prednisolona, tiamine disulfide	Nan Lien Pharmaceutica I Co.	Singapura	-	Offerhaus, 1979	
Clordiazepóxido, femproporex	Pílula dietética	Brasil	USA	Cohen, 2009	
Clordiazepóxido, hidroclorotiazida, indometacina	Sun Wuen Trading Co.	Hong Kong	-	Cairns, 1987	
Clobenzorex, diazepam	Cápsula a base de ervas	China	-	Ku, 1996	

Dexametasona, diazepam, diclofenaco, hidroclorotiazida, indometacina, ácido mefenamico	Nan Kien Pharmaceutica I	Hong Kong	-	Ku, 1996
Dexamethasone, diazepam, hidroclorotiazida, indometacina,	Chuei-Fong-Tou-Geu-Wan	-	-	Offerhaus, 1979
Diazepam	Nan Lien Pharmaceutica I Co.	Hong Kong	-	Tay, 1989
Diazepam, dexametasona, hidroclorotiazida, indometacina,	Nan Lien Pharmaceutica I Co.	Hong Kong	-	Offerhaus, 1979
Diazepam, dexametasona, hidroclorotiazida, indometacina, ácido mefenamico	Nan Ling Pharmaceutica I Co.	Hong Kong	-	Anonymous, 1989
Diazepam, diclofenaco, hidroclorotiazida, indometacin, ácido mefenâmico	Black Pearl	China	USA	Fraser, 1997
Diazepam, diclofenaco, indometacin, ácido mefenâmico	Cow's Head Brand	-	-	Anderson, 1996
Diazepam, hidroclorotiazida, indometacina, ácido mefenâmico	-	-	-	By, 1989
Diazepam,acido mefenâmico	-	-	-	Gertner, 1995
Diazepam, ácido mefenâmico	Supherb or Black Pearl	-	-	Arthritis, 1991
Diazepam, ácido mefenâmico	Ta Ang Pharmaceutica I Co.	Taiwan	-	Abt, 1995
Diazepam, ácido mefenâmico	Ta Ang Pharmaceutica I Co.	Taiwan	-	Nelson, 1995
Femproporex, fluoxetina	Pílulas dietéticas	Brasil	USA	Cohen, 2009

Glibenclamida, lidocaína, piperidenafil, sibutramina, sildenafil, tadalafil, tiohomosildenafil, tiosildenafil, vardenafil	Produto saúde	Singapura	-	Low, 2009
Fenolftaleína, sibutramina, sinefrina	Suplemento dietético	-	-	Vaysse, 2010
Rimonabant, sibutramina	Remédio de ervas	-	-	Kanan, 2009
Sibutramina	Cápsula para emagrecer Chinesa	China	Alemanha	Moritz, 2008
Sibutramina	LiDa Dai Dai Hua Jiao Nang	China	Alemanha	Jung, 2006
Sibutramina análogo: <i>N</i> -1-[1-(4-clorofenil) ciclobutil]-3-methylbutyl- <i>N</i> -metilamina	Alimento saudável para perda de peso	Taiwan	Taiwan	Lai, 2007

Com o objetivo de verificar o crescimento nos casos de adulteração, realizou-se uma revisão desde as primeiras publicações (1974 a 2013), como mostrado na Figura 1. Pode-se observar um aumento considerável nos casos de adulteração a partir de 2009, comprovando uma maior preocupação com relação a este problema.

Segundo o trabalho publicado por Pieter Cohen (COHEN et al., 2012), o Brasil parece ser uma nova porta de entrada de formulações emagrecedoras nos EUA, principalmente se considerarmos as vendas facilitadas de formulações pela internet. Além disso, a facilidade de registro de formulações na ANVISA como suplemento alimentar torna a comercialização mais fácil no Brasil e, portanto, a livre exportação de produtos naturais e a consequente adição de sintéticos (declarados ou não).

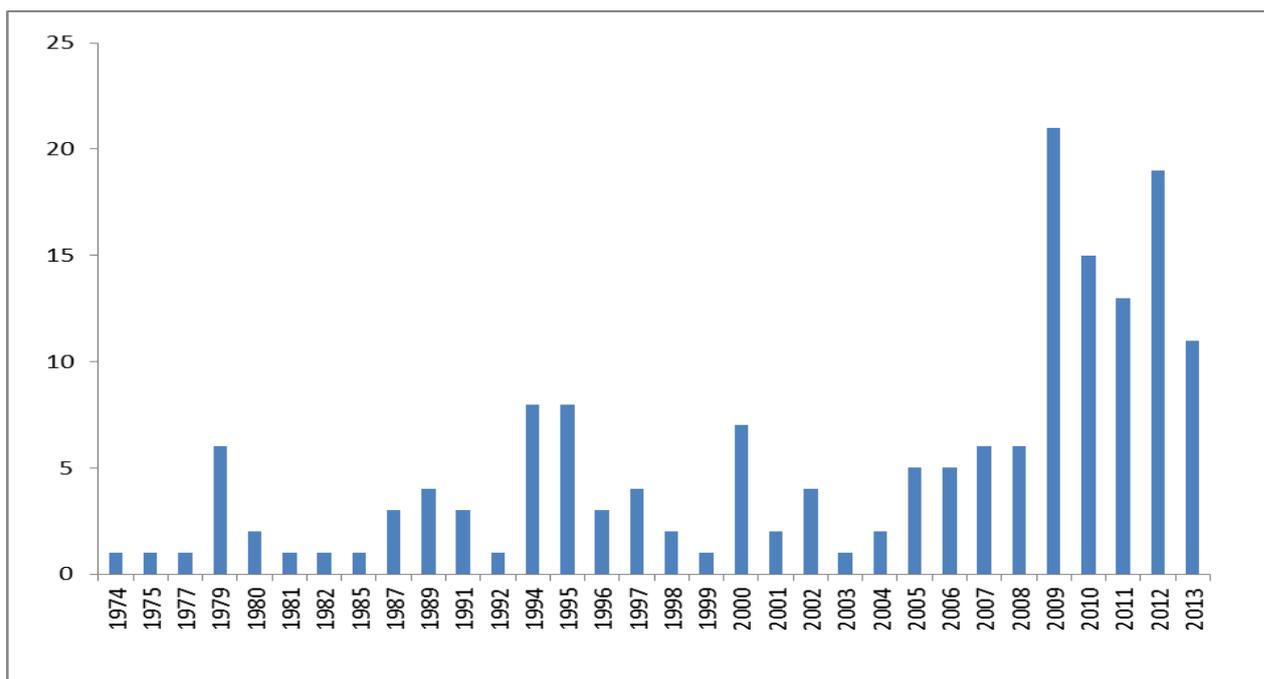


Figura 1 – Casos de adulteração de formulações farmacêuticas naturais de 1974 à 2013. Fonte: Scopus.

Ainda com o mesmo objetivo de verificar os casos de adulteração, mas agora com o propósito de identificar quais as classes e os fármacos mais citados na literatura nos casos de adulteração de formulações farmacêuticas naturais, pode-se visualizar na Figura 2 como são grandes e graves as possibilidades de adulteração, contando com uma infinidade de fármacos de diferentes classes (antiinflamatórios, anorexígenos, ansiolíticos, analgésicos, laxantes entre outros). Além disso, alguns destes fármacos só poderiam ser vendidos com prescrição médica e outros tiveram a sua venda proibida por causar danos à saúde do usuário. Mesmo assim, esses fármacos estão sendo comercializados e adicionados de forma ilegal nas formulações naturais, principalmente pelo fato de não haver uma fiscalização e um controle efetivo desses produtos.

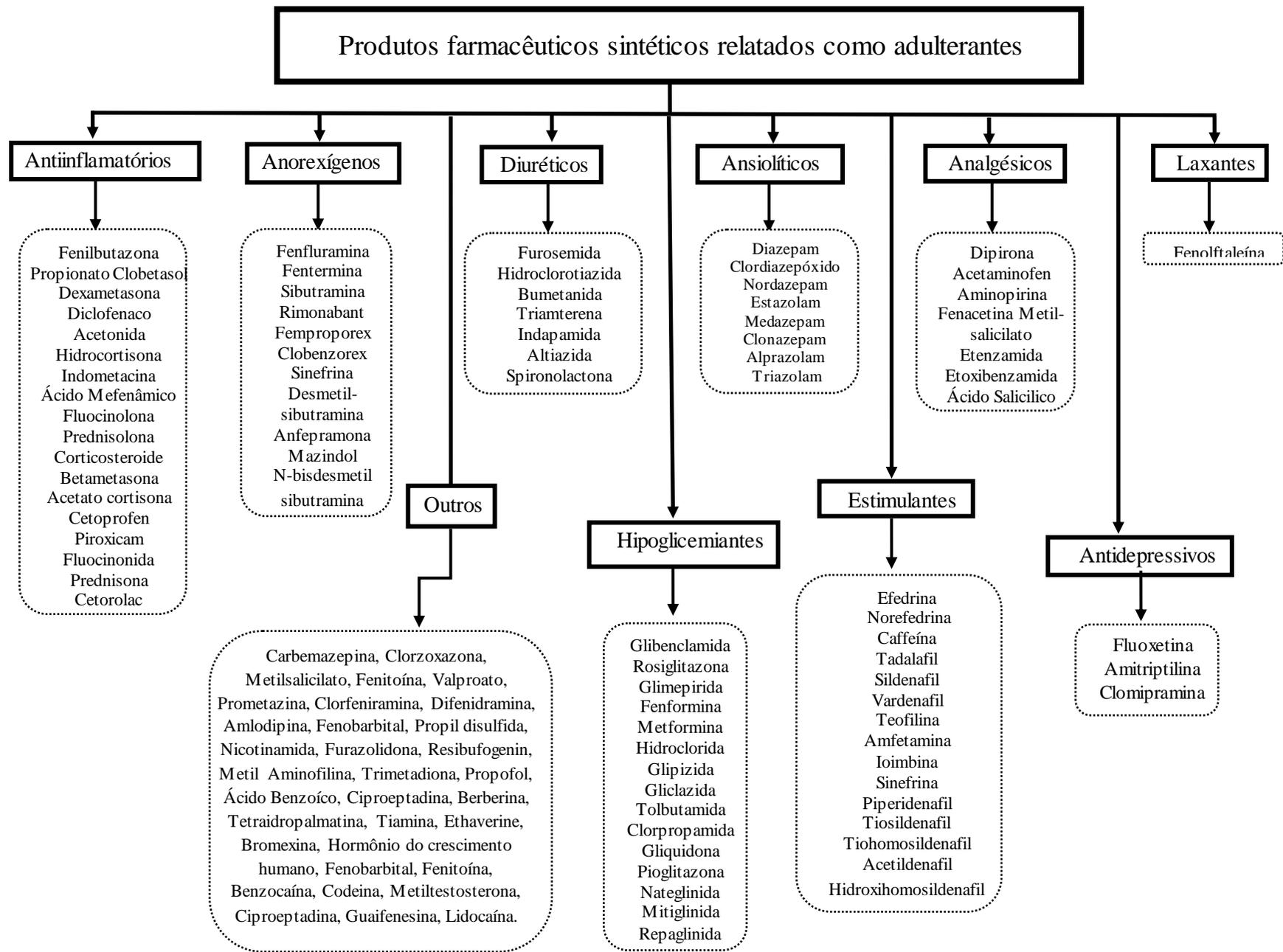


Figura 2 - Adulterantes sintéticos de diferentes classes farmacológicas comumente encontrados em formulações à base de plantas medicinais (CARVALHO *et al*, 2011(b)).

3.4 Métodos analíticos para determinação de adulterantes em formulações farmacêuticas

Considera-se alto o risco que as substâncias sintéticas adicionadas ilegalmente em formulações naturais podem vir a ocasionar à saúde do indivíduo que as utiliza, uma vez que, por desconhecer a sua real composição, o paciente pode associar a outros medicamentos de forma errônea ou ingerí-las em altas doses para obter melhores resultados. Portanto, o desenvolvimento de metodologias analíticas capazes de identificar de maneira seletiva e quantitativa as substâncias sintéticas que possam estar presentes como adulterantes nestas formulações é de extrema relevância, tanto do ponto de vista clínico como toxicológico.

Nesse contexto, a pesquisa envolvida com o desenvolvimento de metodologias analíticas capazes de identificar possíveis espécies adulterantes deve, primeiramente, eleger as prováveis classes de compostos que podem aparecer nessas formulações. Depois de identificadas as prováveis classes, segue-se então para o estudo individualizado dos fármacos mais utilizados em cada classe (p.ex. anorexígeno) na presença de outros possíveis fármacos que podem estar associados (p.ex. ansiolíticos, antidepressivos). O esquema mostra algumas possibilidades de adulteração envolvendo diferentes classes de fármacos. A classificação desenvolvida na Figura 3 baseia-se nos casos de adulteração já relatados na literatura, envolvendo as mais prováveis classes de adulterantes em formulações emagrecedoras. Como se pode observar, um estudo sistemático com relação às possíveis classes de adulterantes pode restringir os analitos a serem estudados por um determinado método analítico. No entanto, os principais requisitos a serem preenchidos por um método de escolha são seletividade e sensibilidade, uma vez que a possibilidade de adulteração é bastante ampla considerando as prováveis classes. Uma vez selecionada a classe de adulterante a ser estudada, todos os demais prováveis adulterantes passam a ser possíveis interferentes na medida do método analítico escolhido. Essas interferências devem ser investigadas de maneira sistemática, para garantir a aplicabilidade do método a amostras reais, em que existe certa imprevisibilidade quanto ao tipo e classe de adulterante a ser encontrado (CARVALHO et al., 2011 (a)).

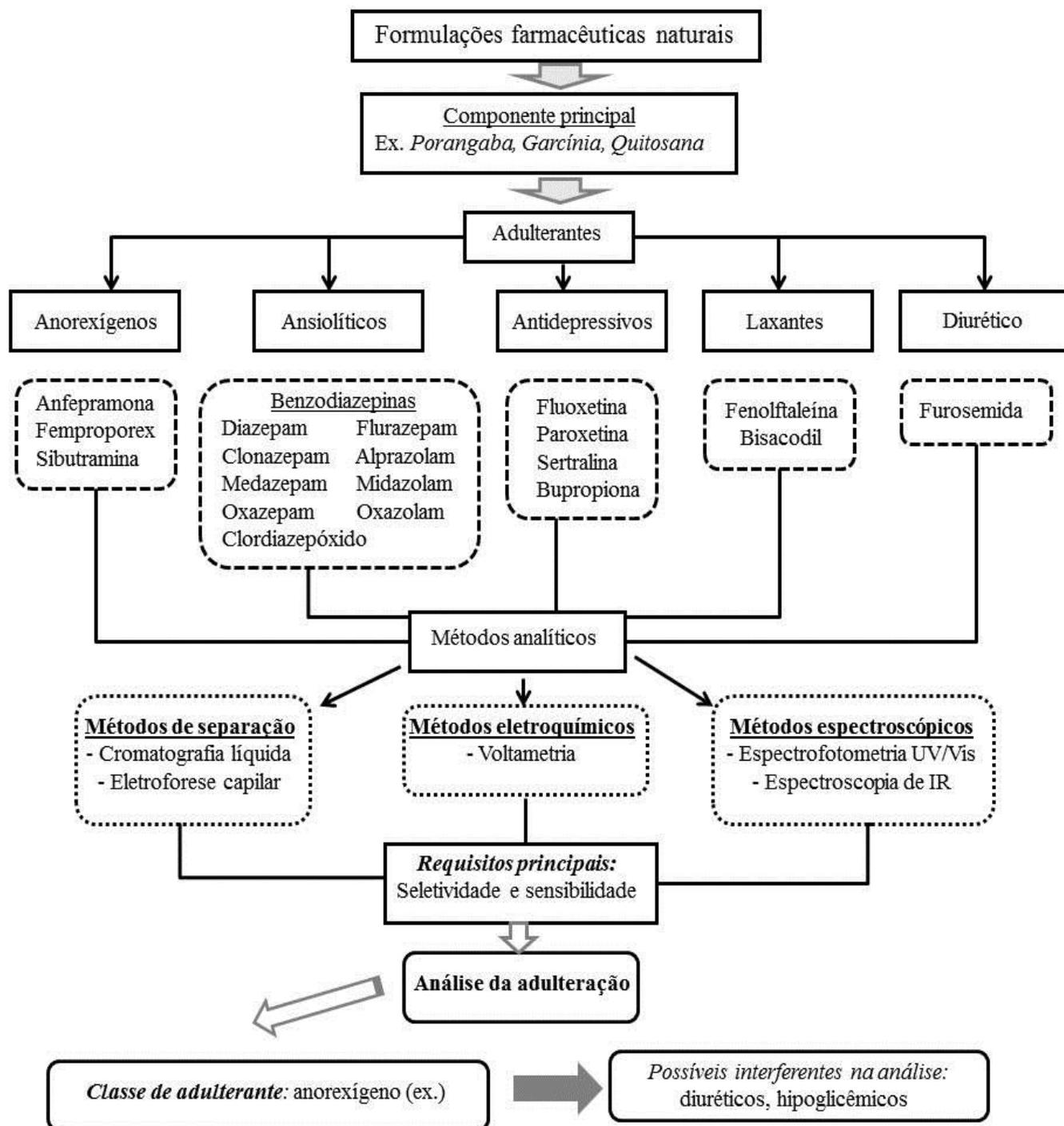


Figura 3 - Fluxograma com as possíveis classes de fármacos sintéticos encontrados como adulterantes em formulações farmacêuticas naturais emagrecedoras e os métodos analíticos disponíveis para a sua determinação (CARVALHO et al., 2011 (a)).

A maioria dos estudos de adulteração em formulações farmacêuticas utiliza métodos cromatográficos para a determinação e identificação de adulterantes. Esses métodos podem ser aplicados a misturas complexas por apresentarem grande poder de separação, o que é importante na análise de destas formulações, que apresentam grande número de substâncias químicas. Além disso, a cromatografia é o método mais conhecido e difundido em todo o mundo, sendo uma realidade quando se trata de análises de rotina.

Dentre as técnicas cromatográficas, a que mais se destaca na identificação e quantificação de adulterantes em formulações farmacêuticas naturais é a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), por ser uma técnica relativamente simples com realização da análise em tempo satisfatório e apresentando resultados sensíveis o suficiente para detectar adulterantes que normalmente são adicionados em baixas concentrações (PARODI et al., 1993; ALMEIDA et al., 1999; KU et al., 1999; ALMEIDA et al., 2000; MIKAMI et al., 2005; LIANG et al., 2006; WANG et al., 2008;).

Apesar de ser tecnicamente semelhante à HPLC, a cromatografia gasosa (GC) não é amplamente empregada na análise de adulterantes principalmente por impossibilitar a determinação de compostos não voláteis, termicamente lábeis ou altamente polares (MCAVOY et al., 1999; LURIE, 1998). Por essas razões, é praticamente inviável empregar GC como método de quantificação e identificação de adulterantes nessas formulações (MCAVOY et al., 1999).

A eletroforese capilar (CE) é uma técnica que vem ganhando espaço entre as técnicas de análise convencionais para a determinação de adulterantes em formulações farmacêuticas naturais para emagrecimento. As vantagens oferecidas como o alto poder de separação e eficiência, o rápido tempo de análise, o baixo consumo de reagentes e amostras fazem da eletroforese capilar uma metodologia atrativa neste tipo de investigação (TAGLIARO et al., 1996; TAVARES, 1997; JAGER et al., 2001; SILVA, 2003; ANASTOS et al., 2005; SILVA et al., 2006; HANCU et al., 2007).

Por ser uma técnica relativamente nova, a CE tem incentivado o desenvolvimento de metodologias em busca do seu aperfeiçoamento, bem como tem permitido a expansão da sua aplicação através de uma instrumentação simples

e robusta (TAGLIARO et al., 1996). Assim, a versatilidade da eletroforese capilar é derivada da existência de diferentes modos de separação, sendo os mais empregados nas análises de adulteração a eletroforese capilar de zona (CZE) e a cromatografia capilar eletrocínética micelar (MEKC).

Dentre os métodos eletroquímicos, os voltamétricos são os mais estudados em se tratando de análises de adulteração em formulações naturais. Os métodos voltamétricos apresentam uma determinação sensível e seletiva para alguns compostos orgânicos, de acordo com o comportamento eletroquímico variado das espécies no eletrodo de trabalho (CORREIA, 2008). Os métodos voltamétricos diferenciam-se de outros métodos como HPLC e CE por possibilitarem a medição em amostras complexas sem a necessidade da total solubilização e de exaustivas etapas de filtrações até a completa separação dos excipientes insolúveis, como é o caso de comprimidos ou cápsulas, formas em que geralmente estão apresentadas as formulações farmacêuticas (CARVALHO et al., 2007). Além disso, os métodos voltamétricos são vantajosos com relação ao custo da análise, quanto à aquisição e manutenção e ao tempo reduzido de análise (CORREIA, 2008; CARVALHO et al., 2007).

Dentre os métodos eletroquímicos temos a voltametria de micropartículas imobilizadas que tem se tornado um método bastante utilizado para ensaios diretos de sólidos devido à facilidade de preparação do eletrodo, evitando a dissolução da amostra, além de possibilitar uma análise rápida e de baixo custo. Além disso, tem sido estudada para uma variedade de compostos, como minerais, compostos orgânicos, pigmentos e fármacos em pó (CARVALHO et al., 2010(b)). A análise de fármacos por VIM tem sido pouco descrita na literatura. Neste contexto, Komorsky-Lovric e colaboradores utilizaram a VIM para a determinação de cocaína em papéis de cédulas de moedas contaminadas (KOMORSKY-LOVRIC et al.,1999) e ciprofloxacina, azitromicina (antibióticos) e 5-aminossalicílico (anti-inflamatórios) em formulações farmacêuticas (KOMORSKY-LOVRIC et al.,2004). Em outro trabalho, a determinação de sinvastatina (qualitativa e quantitativa) foi investigada por Nigovic e colaboradores em formulações farmacêuticas (NIGOVIC, et al.,2008). Ainda no contexto da análise de compostos orgânicos, Doménech-Carbó e colaboradores aplicaram a VIM na identificação de corantes e pigmentos (DOMÉNECH-CARBÓ et

al.,2010 (a,b,c) DOMÉNECH-CARBÓ et al., 2011) e de compostos flavonóides (DOMÉNECH-CARBÓ et al., 2005).

Dentre as metodologias aplicadas em análises para a determinação de adulterantes em formulações farmacêuticas naturais, os métodos espectroscópicos são os menos empregados. Por ser uma técnica relativamente simples, rápida e eficaz em termos de custos, poderia ser aplicada em testes de rotina para investigação de possíveis formulações adulteradas. Contudo, essas metodologias não são suficientemente específicas em relação ao fornecimento de informações em matrizes complexas, sendo necessário etapas de pré-análise para a minimização de interferências (FENG et al., 2007).

3.5 Cromatografia de Par Iônico (IPC)

A técnica de HPLC revelou-se um dos mais eficientes métodos cromatográficos, em virtude do desenvolvimento da instrumentação automatizada. Permitindo a injeção de volumes de amostra cada vez menores e reprodutíveis e a detecção de quantidades mínimas de analito.

Em geral, a técnica de HPLC é um processo dinâmico onde as moléculas dos analitos se movem através de um enchimento poroso, por ação da fase móvel bombeada continuamente e interagem com diferentes afinidades com o material da fase estacionária.

Os sistemas de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência por Fase Reversa é constituído por uma fase estacionária de menor polaridade e uma fase móvel de maior polaridade.

As fases utilizadas em HPLC-RP apresentam inúmeras vantagens, como: diferentes tipos de fases estacionárias estáveis que podem ser empregadas; rápido equilíbrio da coluna após mudança de fase móvel; facilidade de empregar eluição por gradiente; menor tempo de análises e boa reprodutibilidade dos tempos de retenção (TONHI, 2002).

A IPC baseia-se na adição de um contra íon na fase móvel, para promover a formação de analitos carregados. A cromatografia de par iônico (IPC) pode ser

considerada como uma modificação da cromatografia de fase reversa (RPC) para a separação de amostras iônicas. A única diferença em IPC é a adição de um reagente R^+ ou R^- de par iônico na fase móvel, que pode em seguida interagir com eletrólitos fracos ionizados, como ácidos orgânicos (A^-) ou bases orgânicas protonadas (BH^+) em um processo de equilíbrio (SNYDER et al., 2010):

Soluto ionizado		Par iônico
(ácido) $A^- + R^+$	\leftrightarrow	A^-R^+
(base) $BH^+ + R^-$	\leftrightarrow	BH^+R^-
Soluto hidrofílico (menos retido em RPC)		Par iônico hidrofóbico (mais retido em RPC)

A utilização de IPC pode assim criar alterações semelhantes à RPC na retenção da amostra, tal como a mudança do pH da fase móvel, mas com maior controle sobre a retenção de quaisquer solutos ácidos ou básicos e sem a necessidade de valores extremos do pH da fase móvel (por exemplo, pH <2,5 ou > 8) (SNYDER et al., 2010).

A IPC foi introduzida pela primeira vez em 1970, com o objetivo de reduzir a cauda de picos de solutos básicos. Além, da sua capacidade para aumentar a retenção de ácidos e bases ionizados fracamente retidos (SNYDER et al., 2010).

Na cromatografia de par iônico a fase móvel é composta por um tampão aquoso com um solvente orgânico e um composto iônico que contém um contra íon de carga oposta à do analito. Na separação, por exemplo, de moléculas catiônicas, adiciona-se a fase móvel um surfactante aniônico como o dodecil sulfato de sódio (SDS), (Figura 4). Juntamente com os íons do analito de carga oposta, os reagentes de par iônico formam um par de íons não carregado, o qual pode ser retardado na fase estacionária por interações hidrofóbicas. O surfactante se aloja na fase estacionária, transformando efetivamente a fase estacionária em um trocador de íons, como mostrado na Figura 5. O mecanismo de retenção é uma mistura das interações de fase reversa e troca iônica. Para a separação de moléculas aniônicas se utiliza um sal de tetraalquilamônio, e para uma mistura de cátions e ânions na

mesma amostra, se utiliza uma fase móvel de pH mais baixo e um tensoativo por exemplo o dodecil sulfato de sódio, assim o pH suprime a ionização dos ácidos e o reagente retém as bases (SNYDER et al., 2010).

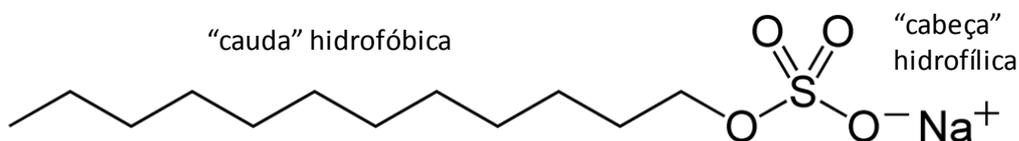


Figura 4 - Representação estrutural do surfactante aniônico Dodecil Sulfato de Sódio (SDS).

A cromatografia de par iônico é mais complexa do que a cromatografia de fase reversa, pois o equilíbrio entre o surfactante e a fase estacionária é lento e a separação é mais sensível às variações de pH, de temperatura e a concentração do surfactante.

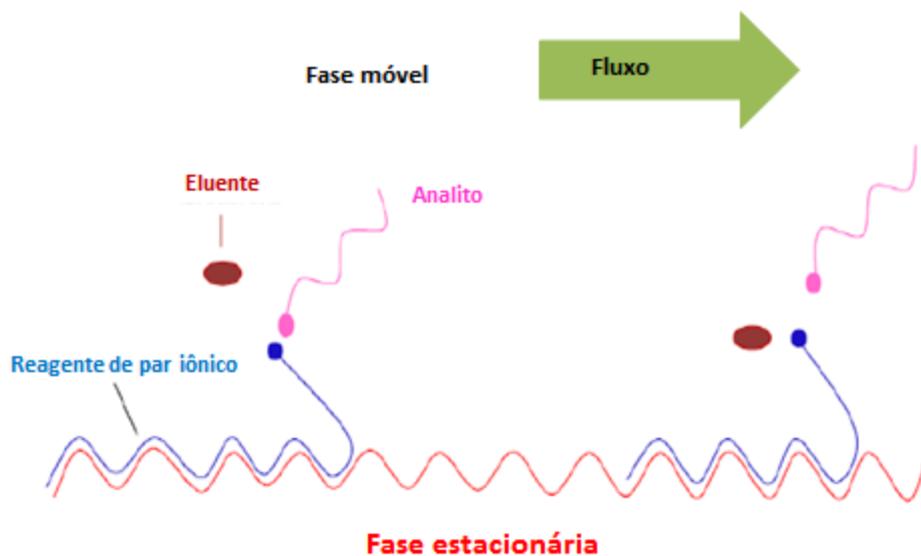


Figura 5- Representação esquemática do mecanismo de separação na cromatografia de par iônico.

Na Tabela 6, estão relatados alguns métodos usando cromatografia de par iônico para a determinação de fármacos das classes dos ansiolíticos, antidepressivos e diuréticos, com o seu respectivo reagente de par iônico.

Tabela 6 – Cromatografia de par iônico para a determinação de fármacos da classe dos ansiolíticos, antidepressivos e diuréticos.

Fármaco	Reagente IPC	Aplicação	Ref.
Diazepam, Oxazepam, Medazepam, Clordiazepóxido, Nitrazepam	Ácido hexanosulfônico	Amostras de plasma de coelho	Kastner, Klimes, 1997
Buspirona	Lauril sulfato de sódio	Plasma de rato	Aparicio, 1988
Hidroclorotiazida	Heptanossulfonato de sódio	Formulações farmacêuticas	Manna, 2001
Hidroclorotiazida, Clortalidona, Furosemida, Amilorida	Dodecil sulfato de sódio	Formulações à base de plantas	Carvalho, 2013
Furosemida	Tetra-n-butilamônio	Soro humano	Okuda, 1996
Amitriptilina Nortriptilina	Heptano-sulfonato de sódio	Plasma	Suckow, 1982

3.6 Voltametria de Micropartículas Imobilizadas (VIM)

A Voltametria de Micropartículas Imobilizadas, foi desenvolvida em 1989 por (Scholz et al., 1989 (a,b)) chamada inicialmente de voltametria abrasiva de redissolução (AbrSV - *Abrasive Stripping Voltammetry*) e, posteriormente, de voltametria de micropartículas imobilizadas (VIM - *Voltammetry of Immobilized Microparticles*) (FIEDLER, SCHOLZ, 2005). Esta técnica eletroanalítica baseia-se na imobilização de micropartículas de uma amostra sólida (menos de 1 µg) sobre a superfície de um eletrodo sólido adequado, o qual é imerso em um eletrólito líquido, e no subsequente registro de um sinal de corrente em função do potencial aplicado

(SCHOLZ et al., 1989 (c,d)). Os voltamogramas obtidos revelam informações sobre a composição química da amostra sólida.

A imobilização de micropartículas tem se tornado um método bastante utilizado para ensaios diretos de sólidos devido à facilidade de preparação do eletrodo, evitando a dissolução da amostra, além de possibilitar uma análise rápida e de baixo custo (Grygar et al., 2002). Além de ser um método indicado para determinações qualitativas e semiquantitativas, também fornece informações sobre a cinética das reações redox de materiais sólidos.

A escolha do eletrodo de trabalho é muito importante, como se trata de amostras em estado sólido, vai depender da habilidade do sólido de aderir-se à superfície do eletrodo. Vários materiais podem ser utilizados como eletrodos sólidos, grafite, grafite impregnado com parafina (PIGE), pasta de carbono, dentre outros. Outro fator a ser levado em conta é a escolha do eletrólito de trabalho, já que este deve apresentar como principal pré-requisito uma baixa solubilidade do composto a ser estudado, na maior parte dos casos, eletrólitos aquosos são utilizados em VIM. Após a escolha do eletrodo e do eletrólito de trabalho, a amostra é imobilizada no eletrodo através do friccionamento do eletrodo sobre a amostra que esta pulverizada sobre uma superfície de vidro ou ágata. Em seguida, o eletrodo é inserido em uma célula eletroquímica contendo os eletrodos de referência e auxiliar (CARVALHO et al., 2010).

As reações eletroquímicas na VIM se processam na interface eletrodo/composto/solução, mostrado na Figura 6. Em contraste com outras aplicações voltamétricas, somente a superfície circular da ponta do eletrodo de trabalho entra em contato com a solução do eletrólito. Isto assegura que as reações de oxi-redução aconteçam somente na junção das três fases (eletrodo/composto sólido/solução do eletrólito), além de garantir que a área superficial do eletrodo seja a mesma de experimento para experimento. Portanto, os compostos eletroativos presentes na amostra imobilizada trocam elétrons com o eletrodo de trabalho e íons com a solução do eletrólito, preservando, assim, o equilíbrio de cargas em cada fase. Além disso, o baixo contato da superfície do eletrodo com a solução do eletrólito minimiza a penetração do eletrólito no corpo do eletrodo, além de diminuir a linha base e aumentar a relação sinal/ruído (CARVALHO et al., 2010).

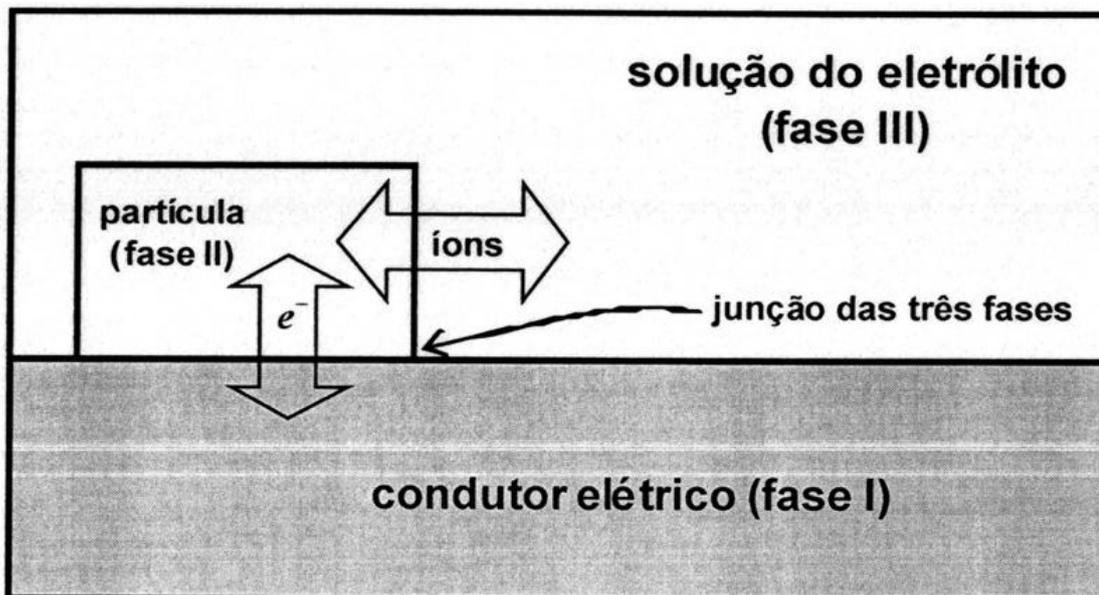


Figura 6 - Desenho esquemático do sistema eletrodico de três fases: interface eletrodo/composto/solução, no qual o eletrodo de trabalho contém uma partícula aderida à sua superfície. As setas horizontal e vertical representam as transferências iônica e eletrônica entre as fases ocorrendo simultaneamente (CARVALHO et al., 2010).

Uma variedade de compostos tem sido estudada, como ligas metálicas, minerais, diferentes óxidos, compostos orgânicos, pigmentos e fármacos em pó. Com a VIM, informações sobre os compostos eletroativos presentes numa amostra sólida são obtidas pela varredura de potenciais e visualização dos picos de corrente, que indicam a ocorrência de reações eletroquímicas. O potencial de pico é característico do composto que reagiu, e a área do pico é proporcional à quantidade da espécie eletroativa. Desta forma, a identificação das espécies eletroativas nas amostras é feita pela comparação dos seus potenciais de pico com os de amostras sintéticas de composição conhecida (CARVALHO et al., 2010).

A técnica de voltametria de micropartículas imobilizadas ainda é pouco aplicada no estudo de fármacos, enquanto que a aplicação de VIM no estudo de adulterantes em formulações farmacêuticas naturais é de caráter inédito.

3.7 Voltametria de Redissolução catódica (AdCSV)

A voltametria de redissolução catódica (AdCSV) tem sido utilizada na determinação de vários compostos orgânicos ou de ânions que formam sais insolúveis com a espécie resultante da oxidação do eléctrodo usualmente de mercúrio (SKOOG, 2007).

A AdCSV é caracterizada por ser realizada em duas etapas diferentes: a etapa de deposição e a etapa de redissolução. A etapa de deposição é feita eletroliticamente aplicando-se o potencial de deposição (E_d) durante um determinado tempo e com agitação da solução. O tempo de deposição (T_d) é escolhido em função da espécie eletroativa durante o qual a espécie de interesse será adsorvida sobre a superfície do electrodo de trabalho. A agitação faz com que o transporte de massa por convecção mantenha a concentração da espécie eletroativa junto à superfície do electrodo igual a do seio da solução. Essa agitação deve ser feita à velocidade constante e controlada com precisão (WANG, 1985). A aplicação de um potencial de deposição positivo resulta na formação de um filme insolúvel na superfície do electrodo. Após o término da etapa de deposição, procede-se a etapa de redissolução, nesta versão, ocorre durante a varredura do potencial no sentido negativo, correspondendo à redução do cátion no electrodo, gerando um sinal analítico. Esse sinal é a corrente originada no processo de redissolução a qual é usada para a determinação da concentração da espécie (OSTERYOUNG e SCHREINER, 1988).

Em voltametria de redissolução, os tempos de deposição variam entre 60 segundos e 30 minutos, dependendo da concentração de espécie em estudo, o tipo de electrodo e a técnica utilizada na redissolução. As soluções menos concentradas e o HMDE requerem tempos de deposição mais elevados, comparativamente com os que são necessários em soluções mais concentradas e no electrodo de mercúrio em filme (este electrodo possui uma maior área de superfície de electrodo por volume do que o HMDE), respectivamente. A redissolução efetua-se normalmente através de da varredura de potencial por pulsos.

A tabela 7 mostra alguns métodos que foram desenvolvidos aplicando voltametria de redissolução com electrodo de mercúrio de gota pendente, os quais

utilizaram as classes de fármacos estudadas neste trabalho, contudo, podemos verificar que a maioria dos métodos desenvolvidos são para dosagem farmacêutica, os únicos métodos que foram aplicados para determinar adulterantes em amostras reais foram desenvolvidos pelo nosso grupo de pesquisa.

Tabela 7 – Métodos eletroquímicos para a determinação da fármacos da classe dos anorexígenos, ansiolíticos, antidepressivos e diuréticos usando HMDE.

Fármaco estudado	Método eletroquímico	Aplicação	Ref
Alprazolam Clordiazepóxido Clonazepam Diazepam Flurazepam Medazepam Midazolam	CSV	Adulterantes em amostras reais	Carvalho et al. 2010
Bromazepam Clonazepam Diazepam Midazolam	SWV	Dosagem farmacêutica	Santos et al. 2002
Buspirona	DPV	Dosagem farmacêutica	Sabry et al. 2004
Clordiazepóxido	SWV; CV	Dosagem farmacêutica	El-Hefnawey et al. 2004
Diazepam Oxazepam Temazepam	CSV	Formulações farmacêuticas, urina	Tyszczuk, 2010
Lorazepam	DPV	Dosagem farmacêutica, urina, plasma	Hammam, 2007
Tetrazepam	DPP; DPV; LSV; SWV	Dosagem farmacêutica, tabletes	Ghoneim et al. 2008
Anfepramona	ACP; CV	Formulação farmacêutica	Carvalho et al. 2007

Anfepramona	CSV	Adulterantes em amostras reais	Carvalho et al. 2010
Fluoxetina	SWV	Dosagem farmacêutica, urina	Nouws et al. 2007
Fluvoxamina	SWV	Dosagem farmacêutica	Nouws et al. 2005
Nitroxazepina	SWV; DPV	Formulação farmacêutica, fluídos biológicos	Jain et al. 2011
Paroxetina	SWV	Dosagem farmacêutica	Nouws et al. 2006
Sertralina	DPP; DPV; SWV; LSV; CV	Dosagem farmacêutica	Vela et al. 2001
Trazodona	DPP; DPV	Dosagem farmacêutica, urina, plasma	El-Enany et al. 2002
Amilorida	DCP; DPV	Formulação farmacêutica	El-Hefnawy et al. 2004
Amilorida	SWV; CV	Dosagem farmacêutica	Hamman, 2004
Spiranolactona	SWV; LSV	Dosagem farmacêutica, urina	Al-Ghamdi et al. 2008

^a :CSV: Voltametria de redissolução; DPP: Polarografia de pulso diferencial; DPV: Voltametria de pulso diferencial; LSV: Voltametria de varredura linear; SWV: Voltametria de onda quadrada CV: Voltametria ciclica; ACP: Polarografia de corrente alternada.

4. MATERIAL E MÉTODOS

A parte experimental deste trabalho de tese foi desenvolvida em três etapas. A primeira envolveu os estudos por voltametria de redissolução no grupo de pesquisa em Química Analítica Clínica (QAClin), nas dependências do LACHEM (UFSM). A segunda etapa envolveu os estudos por Voltametria de Micropartículas Imobilizadas (VIM) na Universidade de Valência na Espanha (Departamento de Química Analítica) no grupo de pesquisa do Prof. Antônio Domenéch-Carbó no período de abril/2012 a abril/2013 (doutorado sanduíche CNPq). A terceira etapa também realizada nas dependências do LACHEM envolveu os estudos por cromatografia de par iônico (IPC) e a aplicação dos métodos desenvolvidos em formulações emagrecedoras comercializadas no Brasil.

4.1 Instrumentação

As análises por voltametria de micropartículas imobilizadas foram realizadas em um equipamento CH 660I (Cambria Scientific, Llwynhendy, Llanelli UK[®]), com um eletrodo de referência Ag/AgCl (3 mol L⁻¹ de NaCl), um eletrodo auxiliar de platina e um eletrodo de trabalho de grafite impregnado com parafina de 2 mm.

As análises por voltametria de redissolução foram realizadas em um equipamento 693 VA Processor (Metrohm[®]) em conjunto com 694 VA Stand (Metrohm[®]), com um eletrodo de referência de Ag / AgCl (3 mol L⁻¹ de KCl), um eletrodo auxiliar de platina e de trabalho – HMDE (eletrodo de mercúrio de gota pendente).

As separações cromatográficas foram realizadas em equipamento HPLC Knauer (Berlim, Alemanha), o qual consistiu de uma bomba Smartline 1000 acoplado a um gestor Smartline 5000, e um detector de espectrofotômetro UV multicanal com base no sistema de arranjo de díodos (Smartline UV Detector 2600) equipado com software (versão 3.3.1) ChromGate[®] (Knauer).

As medidas de absorção molecular foram realizadas em Espectrofotômetro UV-Visível com arranjo de diodos HP 8453 (Hewlett Pachard), utilizando cubeta de quartzo.

Os demais equipamentos utilizados estão listados abaixo:

- Balança analítica Sartorius® (Alemanha) com quatro casas de precisão.
- pHmetro digital Metrohm® 827 pHlab (Suíça) usando eletrodo de vidro combinado.
- Sistema de purificação de água Milli-Q Millipore Synergy® UV (resistividade de 18,2 MΩ.cm a 25°C).
- Sistema de filtração a vácuo com filtro de acetato de celulose 0,45 µm Sartorius® (Alemanha).
- Banho de ultrassom Bandelin Sonorex® RK 510 H (Alemanha).
- Bomba de vácuo Primatec® 131/132 (Brasil).

4.2 Reagentes e Soluções

Todos os reagentes empregados no presente trabalho foram produtos de grau analítico, sendo que suas especificações e respectivos fabricantes estão descritos na Tabela 8.

Os fármacos utilizados como substâncias químicas de referência foram obtidos de diferentes fornecedores, conforme apresentados na Tabela 9.

Tabela 8 - Reagentes utilizados no desenvolvimento do trabalho.

Reagentes	Fabricantes
Acido acético	Merck
Acetato de sódio	Panreac
Fosfato de Potássio Monobásico	Merck
Azul da Prússia	Fluka
Indigo	Fluka
Ferroceno	Fluka
Sepiolita	Fluka
Fosfato de sódio dibásico	Vetec
Hidróxido de sódio	Vetec
Metanol	Tedia
Acetonitrilla	Tedia
Tetrahidrofurano	Tedia
Dodecil sulfato de sódio	Tedia
Ácido fosfórico	Merck

Tabela 9 - Fármacos estudados como adulterantes e interferentes no desenvolvimento do trabalho.

Fármacos	Fornecedores	Pureza (%)
Anfepramona	Genix Ind. Farm. Ltda	98,20
Femproporex	Genix Ind. Farm. Ltda	100,42%
Sibutramina	Deg	99,30%
Diazepam	Deg	98,99
Flurazepam	Deg	99,56
Alprazolam	Deg	100,18
Bromazepam	Opção Fênix Dist. Ins. Ltda	99,82
Clonazepam	Opção Fênix Dist. Ins. Ltda	99,93
Medazepam	Pharma Nostra	98,79
Clordiazepóxido	Opção Fênix Dist. Ins. Ltda	99,57
Midazolam	Pharma Nostra	100,06
Lorazepam	Deg	99,98
Bupropiona	Genix Ind. Farm. Ltda	100,02
Sertralina	Deg	99,26
Paroxetina	Genix Ind. Farm. Ltda	99,94
Fluoxetina	Deg	100,50
Furosemida	Galena	99,22
Espiro lactona	Deg	100,03

Clortalidona	Deg	98,52
Hidroclorotiazida	Deg	99,40
Amilorida	Deg	100,46
Glimepiride	Deg	98,90
Clorpropamida	Deg	99,80
Glibenclamida	Genix Ind. Farm. Ltda	99,55
Fenolftaleína	Deg	99,30
Bisacodil	Deg	101,00

4.3 Procedimentos analíticos

4.3.1 Determinações por voltametria de micropartículas imobilizadas

Todas as determinação voltamétricas foram realizadas no equipamento CH 660I (Figura 7), os 20 fármacos de quatro classes diferentes, anorexígenos (anfepirama, femproporex e sibutramina), ansiolíticos (diazepam, alprazolam, midazolam, clordiazepóxido, lorazepam, bromazepam, flurazepam e clonazepam), antidepressivos (fluoxetina, paroxetina, sertralina e bupropiona) e diuréticos (furosemida, espirolactona, clortalidona, hidroclorotiazida e amilorida) estudados neste trabalho foram determinados por voltametria de onda quadrada (SWV) empregando eletrodo de grafite impregnado com parafina (PIGE) como eletrodo de trabalho. Antes de cada análise todas as soluções foram desaeradas com nitrogênio durante 5 minutos.

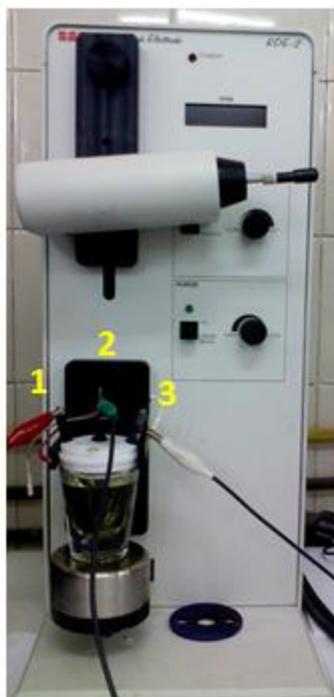


Figura 7 - Foto do equipamento CH 660I. Número: (1) eletrodo auxiliar, (2) eletrodo de trabalho e (3) eletrodo de referência.

A preparação do eletrodo (PIGE) de trabalho esta dividida em duas partes: primeiro a superfície do eletrodo de grafite é renovada com uma lixa 60 mm (Figura 8) afim de, retirar qualquer resíduo anterior que tenha ficado aderido, em segundo, é polida em folha de ofício (Figura 9) para deixar a superfície lisa e sem ranhuras. Finalizada a preparação do eletrodo este pode ser aplicado à amostra, sendo que esta necessita de uma preparação prévia antes de ser aplicada ao eletrodo.

A preparação da amostra que é composta por sólidos consiste no tritramento desta em um almofariz de ágata e pilão. Após a amostra estar totalmente homogeneizada, uma fina camada é pulverizada sobre uma superfície de ágata, em seguida, o eletrodo de grafite é friccionando sobre a amostra onde uma parte desta vai ficar aderida sobre a superfície do eletrodo (Figura 10).



Figura 8 - Procedimento utilizado para polir o eletrodo de grafite em lixa.



Figura 9 - Procedimento utilizado para polir o eletrodo de grafite em folha de ofício.



Figura 10 - Procedimento para aplicação da amostra no eletrodo (friccionar o eletrodo sobre a amostra).

4.3.2 Determinações por voltametria de redissolução catódica

Todas as determinações voltamétricas foram realizadas em Processador 693 VA Processor (Metrohm) em conjunto com 694 VA Stand (Metrohm) como mostrado na Figura 11. O eletrólito de trabalho utilizado foi tampão Ringer 0,1 mol L⁻¹, o qual foi preparado pela mistura de hidróxido de sódio e fosfato de sódio dibásico. Os 16 fármacos de três classes diferentes anorexígenos (anfepramona, femproporex e sibutramina), antidepressivos (bupropiona, paroxetina, sertralina e fluoxetina) e ansiolíticos (alprazolam, bromazepam, midazolam, medazepam, flurazepam, lorazepam, clordiazepóxido, diazepam e clonazepam), estudados no presente trabalho foram determinados pelo método voltamétrico adsorptivo de redissolução catódica (AdCSV) empregando o eletrodo de mercúrio de gota pendente (HMDE) como eletrodo de trabalho. As soluções foram dasaeradas durante 5 minutos com nitrogênio antes de cada análise.



Figura 11 - Foto do equipamento Processador 693 VA Processor (Metrohm) em conjunto com 694 VA Stand (Metrohm).

4.3.3 Determinações por cromatografia de par iônico com detector DAD

As determinações cromatográficas foram realizadas em cromatógrafo Knauer com sistema de eluição por gradiente com detector de arranjo de diodos como mostrado na Figura 12. Utilizou-se uma coluna C18 de dimensões 4,6 mm X 25 mm X 5 μm (Phenomenex) para a determinação dos 18 fármacos de cinco classes diferentes, anorexígenos (anfepramona, femproporex e sibutramina), antidepressivos (bupropiona, fluoxetina, paroxetina e sertralina), ansiolíticos (alprazolam, bromazepam, midazolam, flurazepam, lorazepam, clordiazepóxido, diazepam e clonazepam), diurético (furosemida) e laxantes (fenolftaleína e bisacodil), as separações foram realizadas a uma temperatura de $21^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Diariamente a coluna cromatográfica (C18) foi condicionada com a fase móvel a ser utilizada nos experimentos por aproximadamente 60 minutos, tempo suficiente para a estabilização da linha base. Após esse intervalo de condicionamento, as soluções de trabalho foram injetadas de forma manual utilizando-se alça de injeção de 20 μL . No final do dia a coluna era lavada com água ultra pura por uma hora, em fluxo de 0,8 mL/minuto, solução de acetonitrila:água ultrapura (50:50) por 30 minutos também em fluxo de 0,8 mL/minuto e acetonitrila por 30 minutos a um fluxo de 0,8 mL/minuto, sendo esta última a solução de armazenamento da coluna.

A preparação da fase móvel foi seguida do ajuste do pH com soluções de ácido fosfórico e hidróxido de sódio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e filtração em membrana $0,45 \mu\text{m}$ de acetato de celulose.

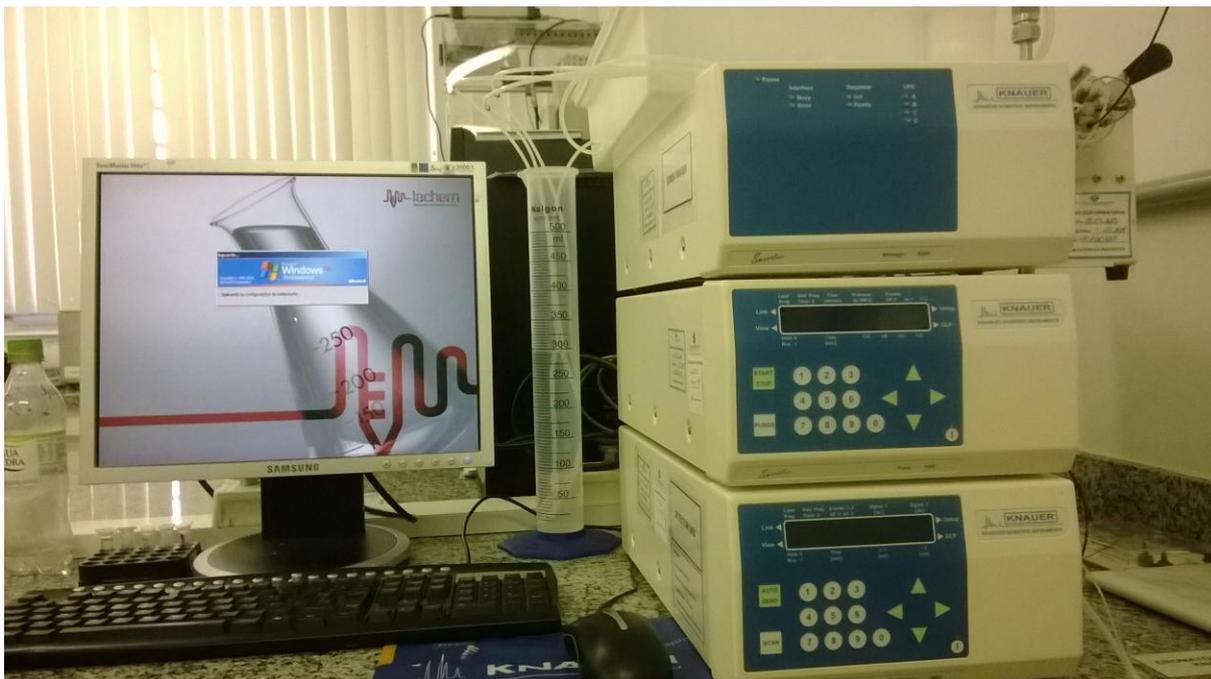


Figura 12 - Foto do cromatógrafo Knauer o qual consiste de uma bomba Smartline 1000 acoplado a um gestor Smartline 5000, e um detector de espectrofotômetro UV multicanal com base no sistema de arranjo de díodos (Smartline UV Detector 2600).

4.3.4 Amostras de formulações farmacêuticas naturais

As formulações farmacêuticas estudadas neste trabalho foram adquiridas em nove estados brasileiros: Rio Grande do Sul (RS), Santa Catarina (SC), Paraná (PR), São Paulo (SP), Rio de Janeiro (RJ), Minas Gerais (MG), Ceará (CE), Goiás (GO) e Distrito Federal (DF). A tabela 10 descreve as 102 amostras que foram analisadas indicando os respectivos métodos aplicados.

Para a análise foi preparado um *pool* de 20 cápsulas, cada cápsula foi pesada individualmente e em seguida misturada, e o peso equivalente ao peso médio de uma cápsula foi utilizado. Esse procedimento foi realizado para cada amostra. Em seguida, para o método de HPLC/DAD, a amostra foi diluída em 25 mL de metanol. Após, o extrato metanólico foi filtrado em algodão seguido por filtração em membrana de acetato de celulose 0,45 μm . Para o método AdCSV a amostra foi

apenas diluída em 25 mL de metanol e não foi filtrada. E para o método VIM, se utilizou a amostra em estado sólido.

Tabela 10 – Composição das formulações, origem e métodos aplicados.

Amostras	Composição	Origem	IPC/ DAD	AdCSV	VIM
1	Slendesta 300mg	RS		✓	
2	Fucus, Garcínia Camboja 200mg, Cavalhinha 500mg, Sene 50mg, Fitolaca 150mg	RS		✓	
3	Cáscara sagrada, Centella asiática, Alcachofra, Carqueja, Fucus, Cavalhinha, Sene, Spirullina, Maracujá	RS		✓	
4	Chitosana, Sene, Vitamina C	RS		✓	
5	Cáscara sagrada, Chá verde, Fucus, Garcínia Camboja, Gelatina de algas, Glucomanann, Spirulina	RS		✓	
6	Caralluma fimbriata 500mg	RS		✓	✓
7	Caralluma fimbriata 500mg	RS	✓	✓	✓
8	Pholia Magra 200mg	RS		✓	✓
9	Não declarado	RS		✓	✓
10	Cavalinha, Sene, Centella asiática, Alcachofra, Fucus, Glucomanann	RS		✓	✓
11	Caralluma fimbriata 500mg	RS	✓	✓	✓
12	Slendesta, Caralluma fimbriata	RS		✓	✓
13	Slendesta 300mg	RS		✓	✓
14	Caralluma fimbriata, Citrus aurantium, Faseolamina	RS		✓	✓
15	Caralluma fimbriata 200mg, Cassiolamina 100mg, Cromo picolinato 100µg, Chá branco 100mg, Faseolamina 200mg, Psyllium 200mg, Fucus 100mg, Equisentum arv. 100mg	RS		✓	✓
16	Glucomanann, Garcínia Camboja, Valeriana, Citrus aurantium, Cavalinha, Gymnema sylvestre, Psyllium	RS		✓	✓
17	Caralluma fimbriata 500mg, Citrus aurantium 500mg	RS		✓	✓
18	Caralluma fimbriata 500mg	RS	✓	✓	✓

Amostras	Composição	Origem	IPC/ DAD	AdCSV	VIM
19	Garcinia Camboja 250mg, Chitosana 250 mg	RS		✓	✓
20	Chitosan 400mg, Vitamina C 100mg	RS	✓	✓	✓
21	Não declarado	RS	✓	✓	✓
22	Centella asiática, Algas marinhas (fucus), Guarana, Gelatina	RS		✓	✓
23	Faseolamina 250mg	RS	✓	✓	✓
24	Cáscara sagrada 250mg	RS	✓	✓	✓
25	Slendesta 250mg	RS	✓	✓	✓
26	Faseolamina 400mg	RS	✓	✓	✓
27	Chitosan, Spirulina, Acido cítrico	RS	✓	✓	✓
28	Centella asiática 100mg, alcachofra 100mg, carboximetilcelulose 200mg, cascara sagrada 100mg, spirulina 200mg	RJ	✓	✓	✓
29	Pholia magra 200mg, slendesta 200mg, chá verde 150mg	GO		✓	✓
30	Alcachofra, cascara sagrada, garcinia cambogia, goma guar, cymnema, maracujá, sene	SP		✓	✓
31	Fucus vesiculosus 80mg, centella asiática 80mg, espirulina 80mg, passiflora 50mg, cáscara sagrada 100mg, cafeína 30mg, hidroclorotiazida 10mg	MG		✓	✓
32	Slendesta 300mg	SP		✓	✓
33	Alcachofra, cáscara sagrada, cavallinha, fucus, marapuama 500mg	MG		✓	✓
34	Gelatina , cáscara sagrada, spirulina, cavalinha, psyllum, fucus, marapuama, chapeu de couro, centella asiática 500mg	MG		✓	✓
35	Cáscara sagrada 500mg	MG		✓	✓
36	Centella asiática, spirulina, alcachofra, garcínea	MG		✓	✓
37	Chitosan 500mg	SP		✓	✓
38	Chá vermelho 500mg	SP		✓	✓
39	Caralluma fimbriata 500mg	RS		✓	✓

Amostras	Composição	Origem	IPC/ DAD	AdCSV	VIM
40	Gymnema sylvestre, Faseolamina, Chá Verde, Citrus aurantium, Caralluma fimbriata, Chitosan	RS		✓	✓
41	Pholia magra 300mg	RS		✓	
42	Caralluma fimbriata 500mg	RS		✓	
43	Sene, Fucus, Furosemida, Cáscara sagrada, Garcínia Camboja, Goma Guar	RS	✓	✓	
44	Caralluma fimbriata 500mg	RS		✓	
45	Cáscara sagrada, Spirulina, Magnésio estearato, Algas marinhas (fucus), Carboximetilcelulose, Centella asiática	RS		✓	
46	Caralluma fimbriata 250mg, Glucomanann 250mg, Colágeno 50mg	RS		✓	
47	Pholia magra 500mg	RS		✓	
48	Alcachofra, Fucus, Spirulina, Cáscara sagrada, Centella asiática	RS		✓	
49	Gengibre, Chá Verde, Canela, Pimenta Vermelha	RS		✓	
50	Composto Emagrecedor 220mg	RS		✓	
51	Pholia magra 300mg	RS		✓	
52	Caralluma fimbriata, Citrus aurantium, Faseolamina	RS		✓	
53	Caralluma fimbriata 350mg	RS		✓	
54	Garcínia Camboja 250mg, Citrus aurantium 200mg, Cromo picolinato 100µg	RS		✓	
55	Caraluma fimbriata, faseolamina, garcinea camboja, gymnema silvestre, citrus aurantium	SP		✓	✓
56	Gelatina 100mg, cáscara sagrada 100mg, espirulina 100mg, cavalinha 100mg, psyllium 50mg, marapuama 50mg, fucus 50mg, centella asiática 50mg, garcinea 100mg, quitosana 100mg	MG		✓	✓
57	Caralluma fimbriata 500mg	MG		✓	✓
58	Pholia magra 150mg	SP		✓	✓

Amostras	Composição	Origem	IPC/ DAD	AdCSV	VIM
59	Abacateiro 72mg, fucus 72mg, cáscara sagrada 48mg, centella asiática 48mg, carqueja 36mg, alcachofra 24mg	SP		✓	✓
60	Garcinea, cáscara sagrada, fucus pó, alcachofra, cavalinha, glucomannan, sene em pó, centella asiática, ginko biloba, passiflora	SP		✓	✓
61	Glucomannan 500mg	RS		✓	
62	Composto Emagrecedor	RS		✓	
63	Pholia magra, Garcinia Cambogia, Chá Verde	RS		✓	
64	Cynara scolimus, fucus vesiculosos glucomannan, ramus purshiana, centella asiática, arctostaphylos uva ursi	MG		✓	✓
65	Advantra Z 400mg, fucus 200mg, centella asiática 200mg, chá verde 100mg	GO		✓	✓
66	Spirulina- glucomannan, colágeno, gelatina	DF	✓	✓	✓
67	Hidroclorotiazida, fucus, cáscara sagrada, sene, centella asiática, ranitidina, triptofano, porangaba	DF		✓	✓
68	Sildenafil 450mg	DF		✓	
69	Não declarado	SC		✓	✓
70	Caralluma fimbriata 500mg	SP		✓	✓
71	Garcinia cambogia 500mg	SP		✓	✓
72	Glucomannan, garcinia, spirulina, carqueja, cáscara sagrada, sene, KCl, colágeno	MG		✓	✓
73	Agar agar, vit E, vit C, faseolamina, clorella, gelatina, furosemida	MG	✓	✓	
74	Faseolamina 700mg, citrus aur 500mg, caralluma	SP		✓	
75	Não declarado	CE	✓	✓	
76	Óleo de cártamo	CE		✓	
77	Caralluma 300mg, faseolamina 200mg, glucomannan 200mg, flavo. Abacaxi, goma colágeno	SP		✓	

Amostras	Composição	Origem	IPC/ DAD	AdCSV	VIM
78	Cáscara sagrada, alcachofra, carqueja, fucus, centella asiática	SC		✓	
79	Chitosana, fucus, agar agar, maracuja, cáscara sagrada, cavalinha, garcinia	SC		✓	
80	Chá verde 250mg	SC		✓	
81	Caralluma fimbriata, Citrus aurantium, Faseolamina	RS		✓	✓
82	Caralluma fimbriata, Citrus aurantium, Faseolamina, Chá Verde	RS		✓	
83	Centella asiática, Alcachofra, Spirulina, Carqueja, Cavalinha, Fucus vesiculosus, Maracujá, Sene, Cáscara sagrada	RS		✓	
84	Chitosan 400mg, Vitamina C	RS		✓	
85	Sene350mg	RS		✓	
86	Caralluma fimbriata 500mg, Faseolamina 300mg, Citrus aurantium 300mg	RS		✓	
87	Carnitina 45mg, methionina 50mg, cynara 40mg, l-lisina 20mg, nicotinamida 15mg, picol.cromo 80mcg, bit colina 150mg, betaina 35mg, inositol 80mg, pant. Calcio 10mg, acido fólico 150mg, vit b6 10 mg	RJ	✓	✓	
88	Centella asiática 150mg , cáscara sagrada 5mg CM. Celulose 40mg, asiaticoside 20 mg, fucus vesiculosus90mg , asp. Potássio 5mg , colágeno 100mg, citrus aurantus 80mg	RJ	✓	✓	
89	Pholia magra 50mg, piperina 10mg	PR	✓	✓	
90	Glucomanam 500mg	CE		✓	
91	Glucomanam, alcachofra, hidroclorotiazida, cascara sagrada, centella asiática, marapuama	CE		✓	
92	Pholia magra 300mg	PR		✓	
93	Pholiamagra 300mg	SC		✓	
94	Caralluma 500mg	SC		✓	

Amostras	Composição	Origem	IPC/ DAD	AdCSV	VIM
95	Garcinia 500mg, advantra Z 200mg, cha verde 200mg, benzocaína 30mg, glucomanam 600mg, agar agar	GO		✓	
96	Caraluma fimbriata 500mg	GO		✓	
97	Citrus aurantium 250mg, faseolamina 250mg, caralluma fmbriata EES 300mg	SC		✓	
98	Caralluma ext 200mg, faseolamina ext 100mg, chá branco ext 200mg,	SC		✓	
99	Pholia magra 200mg	SC		✓	
100	Pholia magra 250mg	PR		✓	
101	Alcachofra, Centella asiática, Garcinia Camboja, Cavalinha, Cáscara sagrada, Fucus, Spirulina, Agar-agar	RS	✓	✓	
102	Garcinia Camboja 250mg, Glucomanann 250mg	RS		✓	

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste trabalho foram desenvolvidos três métodos para a determinação de adulterantes em formulações farmacêuticas naturais com fins emagrecedores, sendo que, dois métodos foram desenvolvidos para o *screening* de amostras (VIM e AdCSV) e um método de separação (IPC) para separação e quantificação.

5.1 Voltametria de Micropartículas Imobilizadas (VIM)

5.1.1 Comportamento voltamétrico dos fármacos no eletrodo de grafite

O comportamento eletroquímico de cada fármaco anorexígenos (anfepramona, femproporex e sibutramina), antidepressivos (fluoxetina, sertralina, paroxetina e bupropiona), ansiolíticos (bromazepam, clonazepam, lorazepam, midazolam, diazepam, clordiazepóxido, flurazepam e alprazolam) e diuréticos (hidroclorotiazida, furosemida, clortalidona, amilorida e espirolactona) foi estudado individualmente em diferentes valores de pH e em dois eletrólitos suporte de diferente composição, empregando-se voltametria de onda quadrada (SWV).

5.1.1.1 Influência do pH e do eletrólito suporte

Neste estudo observou-se o sinal voltamétrico de cada fármaco em dois eletrólitos suportes (Acetato e Fosfato), em diferentes concentrações (0.1 a 0.30 M), variando-se o pH de 4 a 10. O procedimento consistiu em adicionar à célula voltamétrica 10 mL do eletrólito suporte e alíquotas de 10-20 µg do fármaco os quais haviam sido imobilizados no eletrodo. As medidas foram feitas por voltametria de onda quadra (SWV) adotando-se a varredura na faixa de potenciais de +1,05 a -1,05

V e de -1,05 a +1,05 V (Figura 13) com um incremento de potencial de 4 mV e amplitude de pulso de 25 mV.

De acordo com os resultados obtidos se verificou que o tampão acetato apresentou uma melhor resposta voltamétrica para as quatro classes de compostos orgânicos estudados. Além disso, se verificou que o pH na faixa de 4 a 6 foi onde se obteve os melhores resultados, então se realizou um estudo mais aprofundado nessa faixa, e o pH 4,75 foi escolhido por apresentar uma linha de base com menor ruído e uma intensidade de pico maior. A Figura 14 mostra um voltamograma do pigo imerso no eletrólito de trabalho sem a presença dos analitos em estudo.

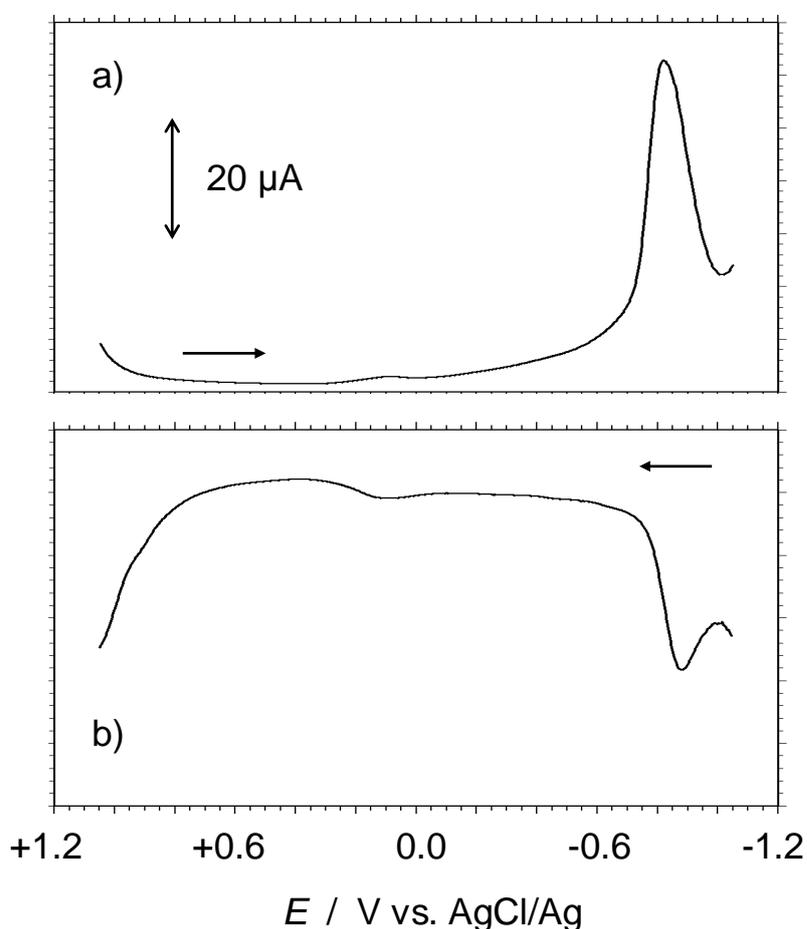


Figura 13 - SWV para o diazepam imerso em tampão acetato de sódio aquoso 0.25 molar, em pH 4,75. Varredura de potencial iniciada em: a) +1,05 V no sentido negativo, b) -1,05 V no sentido positivo (sentido da varredura é marcado por setas). Incremento de potencial de 4 mV, amplitude de onda quadrada de 25 mV, frequência de 5 Hz.

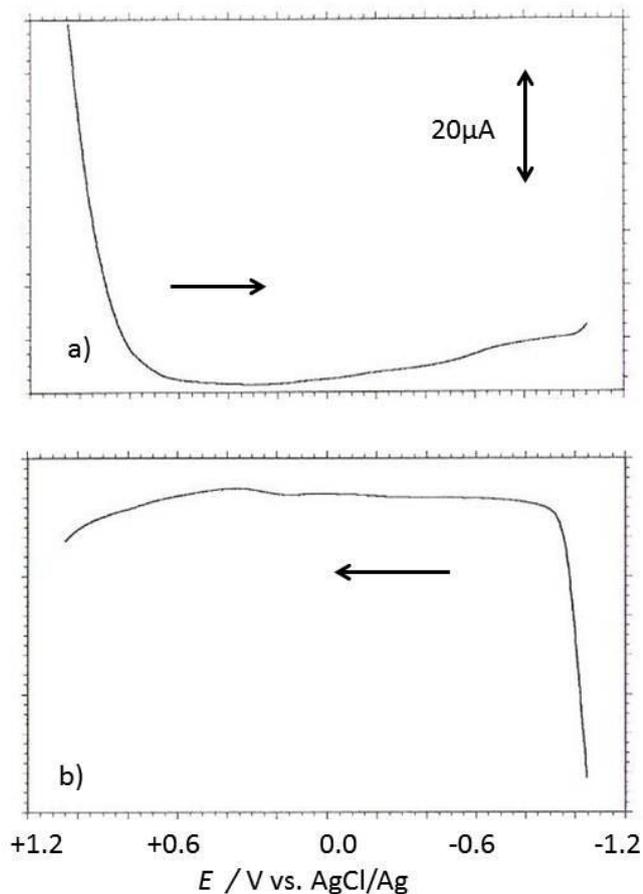


Figura 14 - SWV pigo imerso em tampão acetato de sódio aquoso 0.25 molar, a pH 4,75, sem a presença dos analitos. Varredura de potencial iniciada em: a) +1,05 V no sentido negativo, b) -1,05 V no sentido positivo (sentido da varredura é marcado por setas). Incremento de potencial de 4 mV, amplitude de onda de 25 mV, frequência de 5 Hz.

5.1.1.2 Estudo da frequência

Neste estudo observou-se o efeito da frequência no sinal voltamétrico das quatro classes de fármacos estudados. Diferentes valores de frequência foram estudados (5, 10, 20, 50 e 100 Hz), sendo que, os experimentos realizados em baixas frequências produziram resultados mais interessantes em relação à sensibilidade e resolução de pico, sendo assim, a frequência de 5 Hz foi a selecionada.

5.1.1.3 Estudo do tempo de eletrólise

Com o objetivo de melhorar os sinais voltamétricos para uma melhor identificação dos fármacos, foi realizado um estudo do tempo de eletrólise aplicando-se um potencial constante oxidativo/reduutivo. Primeiramente aplicou-se um potencial constante de 1,05 V durante um determinado tempo, após a aplicação do potencial realizou-se uma varredura no sentido negativo. O mesmo procedimento foi realizado aplicando um potencial redutivo (-1,05 V), após a aplicação do potencial realizou-se a varredura no sentido positivo. Observou-se a influência deste potencial em diferentes tempos de eletrolise (0, 30, 60, 90 e 120s) mostrados na Figura 15. Deve notar-se que a aplicação do potencial constante oxidativo ou redutivo pode produzir uma camada de espécies oxidadas ou reduzidas nos grãos do composto estudado. Assim, pode-se produzir sinais adicionais diferentes daqueles do composto original, enriquecendo assim o conjunto e facilitando a diferenciação entre os fármacos (DOMENECH-CARBO et al., 2013). Potenciais mais negativos do que -1,35 V não são aconselháveis, pois pode ocorrer uma perturbação do depósito de micropartículas devido à evolução de gás hidrogênio.

Nas condições experimentais, os resultados mais relevantes para fins de triagem foram obtidos mediante aplicação de um potencial redutor. À aplicação de um potencial constante de -1,05 V durante 90 s foi selecionado para análise de rotina, pois a eletrólise mais prolongada não apresenta melhora significativa na sensibilidade nem na resolução dos sinais voltamétricos.

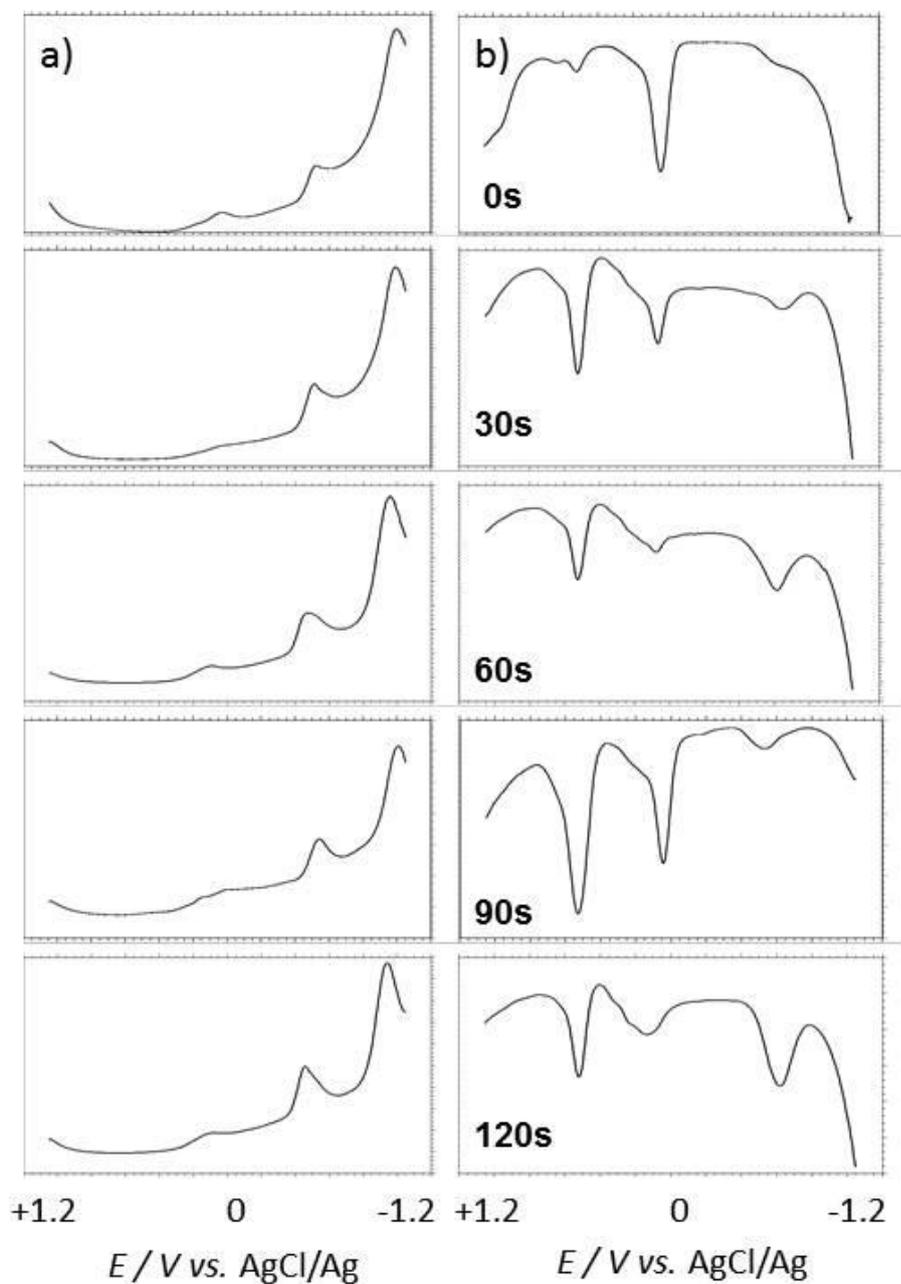


Figura 15 - SWV para clonazepam imerso em solução aquosa de tampão acetato 0.25 M. (a) Aplicação de um potencial constante de 1,05 V, varredura no sentido negativo, (b) aplicação de um potencial constante de -1,05 V, varredura na direção positiva. Incremento potencial de 4 mV; amplitude onda de 25 mV; frequência de 5 Hz.

5.1.1.4 Estudo qualitativo

A aplicação deste método para detectar e identificar adulterantes em amostras de formulações à base de plantas comerciais é favorecida por duas características: (a) no que diz respeito as amostras consistem de um conjunto de grãos de materiais diferentes, a resposta voltamétrica de cada um dos sólidos eletroativos é, em princípio, independente de todos os outros, de modo que os voltamogramas dos compostos registrados simultaneamente devem ser diferentes, (b) ao adicionar um adulterante na formulação fitoterápica este deve produzir sinais muito mais intensos do que os sinais associados ao composto natural.

Para fins de identificação, se realizou um agrupamento dos sinais voltamétricos observados, dependendo do seu potencial de pico, a Tabela 11 resume os dados observados, incluindo os potenciais de pico registados após a aplicação um potencial constante de $-1,05\text{ V}$ durante o 90 s no sentido positivo e a um potencial constante $1,05\text{ V}$ no sentido negativo. Apenas os picos intensos estão reunidos na tabela porque pode-se esperar que, na análise das amostras reais, o aumento das correntes de fundo e da possível presença de interferências minoritárias podem obscurecer os picos menos intensos.

Combinando os resultados resumidos na Tabela 11, com um critério de diagnóstico baseado na análise sequencial dos dados voltamétricos, temos um diagrama esquemático, mostrado na Figura 16, que contém a sequência de diagnóstico com os critérios propostos para discernir entre as diferentes classes de adulterantes. Como pode se verificar, quando se aplica um potencial constante $1,05\text{ V}$ no sentido negativo os fármacos que apresentam um potencial cerca de $-0,8\text{ V}$ são os ansiolíticos e os diuréticos, os anorexígenos e os antidepressivos não apresentam. Agora, aplicando um potencial constante de $-1,05\text{ V}$ no sentido positivo, temos um potencial de $+0,95\text{ V}$ para os diuréticos e um potencial de $-0,9\text{ V}$ para os ansiolíticos. Já os antidepressivos e os anorexígenos possuem potenciais de picos semelhantes, mas podem ser diferenciados entre si, como mostrado na Tabela 11.

Tabela 11 - Potenciais de pico de cada analito por VIM.

	E_p (mV) ^a	E_p (mV) ^b	E_p (mV) ^b	E_p (mV) ^b				
Anfepramona		+200		-550				
Femproporex		+200		-550	-700			
Sibutramina	+850	+200		-550				
Bupropiona		+200	-200	-550				
Fluoxetina		+200		-500	-650			
Sertralina		+200		-500	-650	+100	-250	-650
Paroxetina	+950	+250		-500		+150		
Diazepam	+900	+200		-550	-900			-900
Bromazepam		+150			-600		-600	-900
Clonazepam	+550		0	-550			-450	-950
Lorazepam		+150		-550			-650	-950
Flurazepam	+1000	+200		-550				-900
Midazolam		+250		-400	-850			-850
Alprazolam				-500	-850			-800
Clordiazepóxido		+200		-550	-900			-900
Hidroclorotiazida	+1000	+200		-550		0		-850
Furosemida	+450	+150		-550		+100		-850
	+950							
Clortalidona	+950	+150		-550				-900
Amilorida			0	-550		+200	0	-200
Espiro lactona	+950	+150		-550				

^a Varredura de potencial iniciada em -1,05 V no sentido positivo a uma frequência de 5 Hz.

^b Varredura de potencial iniciada em +1,05 V no sentido negativo a uma frequência de 5 Hz.

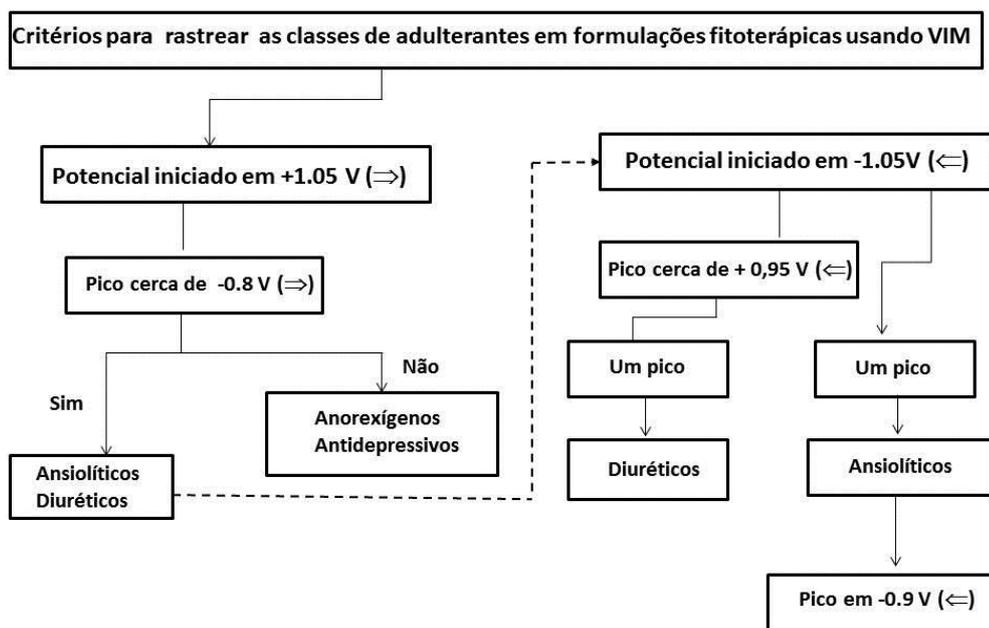


Figura 16 - Critérios de diagnósticos para identificar diferentes classes de adulterantes em formulações à base de plantas utilizando SWV. Os símbolos ⇐ e ⇒ indicam os voltamogramas registrados em um potencial de -1,05 V no sentido positivo e de +1,05 V no sentido negativo, respectivamente.

5.1.1.5 Aplicação em amostras reais de formulações farmacêuticas naturais

O método desenvolvido foi aplicado no *scrennig* de 49 amostras de formulações farmacêuticas naturais, comercializadas em diferentes estados do Brasil. Das 49 amostras estudadas 15 apresentaram provável adulteração por diuréticos, ansiolíticos e anorexígenos, como mostrado na Tabela 13.

Tabela 12 – Amostras adulteradas com o respectivo adulterante encontrado.

Amostra	Composição	Adulterante
7	<i>Caralluma fimbriata</i> 500mg	Furosemida
12	<i>Caralluma fimbriata</i> 500mg	Furosemida
26	<i>Phaseolus vulgaris</i> 400 mg,	Lorazepam
25	Slendesta™ 250mg	Lorazepam
19	<i>Garcinia cambogia</i> 250mg, Chitosan 250mg	Femproporex
20	Chitosan 400mg, Vitamina C 100mg	Lorazepam
36	<i>Centella asiatica</i> , <i>Spirulina maxima</i> , <i>Cynara scolymus</i> , <i>Garcinia cambogia</i>	Furosemida
15	<i>Centella asiatica</i> 100 mg, <i>Cynara scolymus</i> 100 mg, carboxymethylcellulose 200 mg, <i>Rhamnus purshiana</i> 100 mg, <i>Spirulina maxima</i> 200 mg	Lorazepam
22	<i>Centella asiatica</i> , <i>Paullinia cupana Kunth</i> , gelatin	Furosemida
21	Não declarado	Lorazepam
37	Chitosan 500mg	Femproporex
27	Chitosan, <i>Spirulina maxima</i> , citric acid	Lorazepam
39	<i>Caralluma fimbriata</i> 500 mg	Furosemida
34	Gelatin, <i>Rhamnus purshiani</i> , <i>Spirulina maxima</i> , <i>Equisetum arvense</i> L., <i>Plantago psyllium</i> L., <i>Fucus vesiculosus</i> L., <i>Ptychopetalum olacoides</i> B., <i>Echinodorus macrophyllus</i> , <i>Centella asiatica</i>	Furosemida
67	<i>Fucus vesiculosus</i> L, <i>Rhamnus purshiana</i> , <i>Cassia angustifolia</i> , <i>Centella asiatica</i> , ranitidina, triptofano, <i>Cordia Salicifolia</i> , Hidroclorotiazida	Hidroclorotiazida

A Figura 17 mostra um caso de adulteração por um ansiolítico (lorazepam). Na Figura 18 temos um caso de adulteração por um anorexígeno (femproporex) e na Figura 19 temos um caso de adulteração por um diurético (furosemida) nos três casos é possível verificar que os voltamogramas dos adulterantes e das amostras adulteradas são praticamente idênticos, confirmando assim a adulteração.

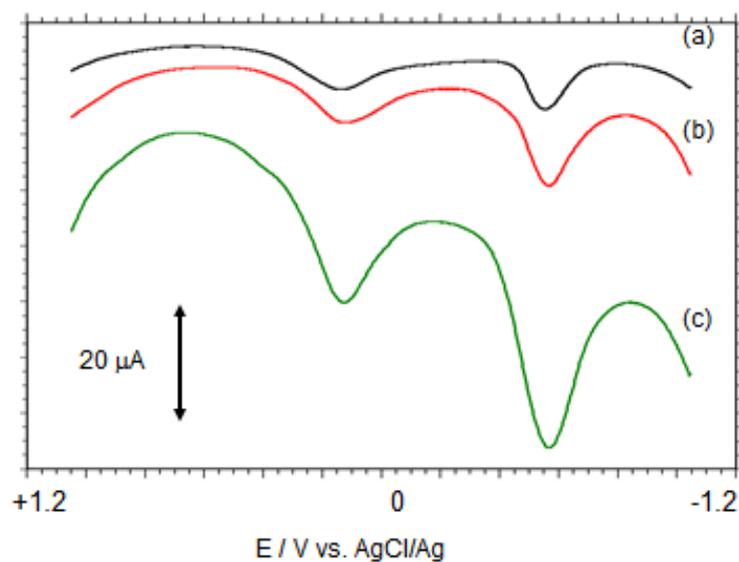


Figura 17 - SWV iniciada em 1,05 V no sentido positivo para PIGE modificado com: (a) amostra 15, (b) amostra 20 e (c) padrão de lorazepam. Eletrólito tampão acetato 0.25 M. Incremento de potencial 4 mV; amplitude de onda de 25 mV, frequência de 5 Hz, voltamogramas obtidos após a aplicação de um potencial redutor (-1,05 V) durante 90 s, a frequência de 5 Hz.

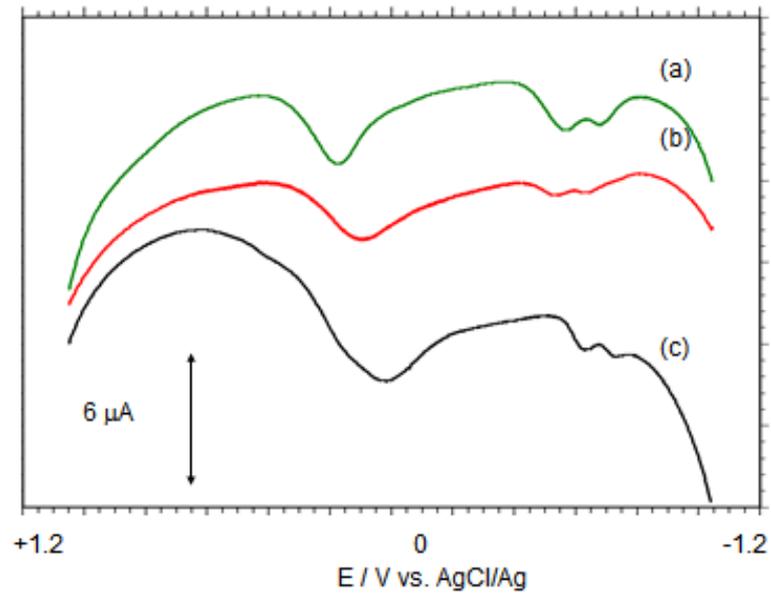


Figura 18 - SWV iniciada em 1,05 V no sentido positivo para PIGE modificado com: (a) padrão do fempoporex, (b) amostra 37, (c) amostra 19. Eletrólito tampão acetato 0.25 M. Incremento de potencial 4 mV; amplitude de onda de 25 mV, frequência de 5 Hz, voltamogramas obtidos após a aplicação de um potencial redutor (-1,05 V) durante 90 s, a frequência de 5 Hz.

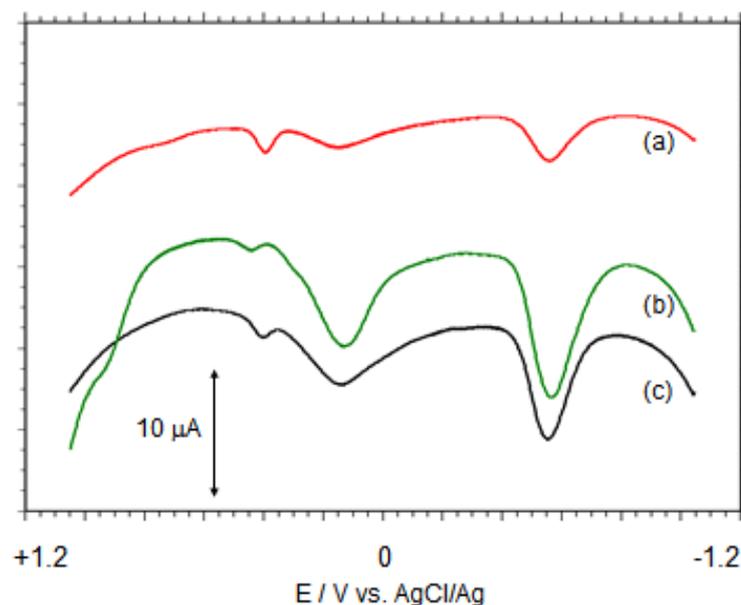


Figura 19 - SWV iniciada em 1,05 V no sentido positivo para PIGE modificado com: (a) amostra 7, (b) padrão furosemida, (c) amostra 12. Eletrólito tampão acetato 0.25 M. Incremento de potencial 4 mV; amplitude de onda de 25 mV, frequência de 5 Hz, voltamogramas obtidos após a aplicação de um potencial redutor (-1,05 V) durante 90 s, a frequência de 5 Hz.

5.1.1.6 Estudo quantitativo

Para fazer a quantificação dos analitos nas amostras em estado sólido foi necessário realizar primeiro um estudo do composto de referência a ser utilizado, sendo que este deve apresentar uma resposta eletroquímica diferente daquela do composto de interesse. Foram selecionadas três substâncias, ferroceno, azul da Prússia e índigo. A Figura 20 compara os três compostos. O índigo foi o composto selecionado por apresentar uma intensidade de sinal maior.

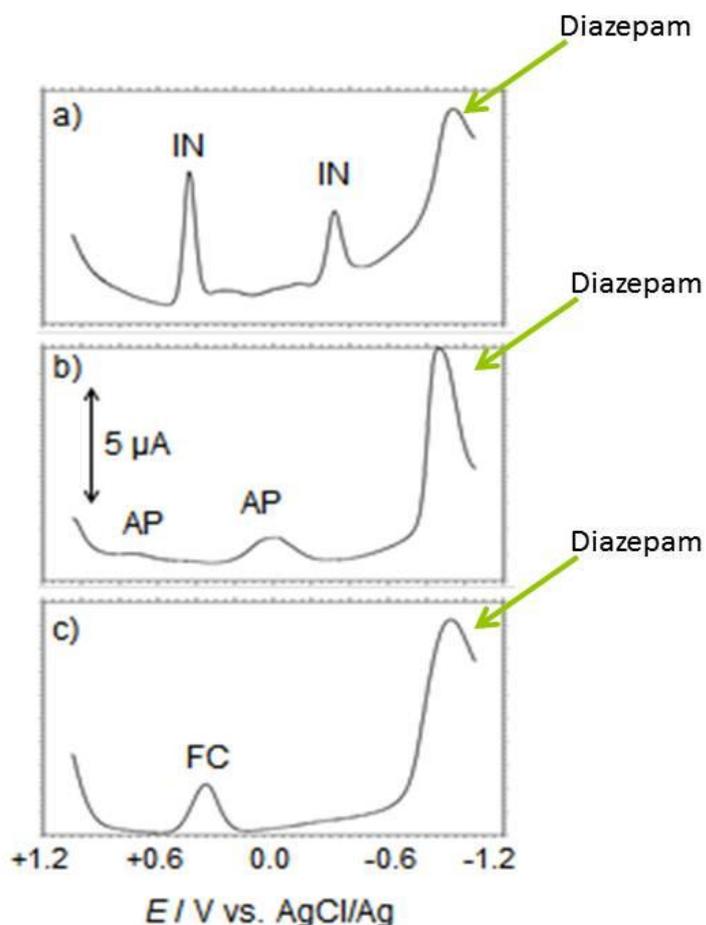


Figura 20 - SWV para a amostra de ervas enriquecida com diazepam e sepiolita (a) índigo, (b), azul da Prússia, (c) ferroceno, ligado ao pigo imerso em tampão acetato de sódio aquoso 0,25 M, em pH 4,75. Potencial iniciado em 1,05 V. Incremento de potencial de 4 mV, amplitude de onda de 25 mV, frequência de 5 Hz.

Para os ensaios de recuperação normalmente é utilizado o método de adição de padrão, mas este apresentou alguns problemas na parte de recuperação da amostra, apresentando valores superiores ao adicionados, como estamos trabalhando com amostras em estado sólido, a completa homegeneização da amostra é complicada.

Então foi proposto um método de diluição do padrão adicionado. A quantificação foi realizada através da diluição da amostra ao invés da sucessiva adição de padrão. A diluição da amostra sólida foi realizada com sepiolita, sendo que

esta não apresenta nenhum pico capaz de interferir na medida.

Foram realizadas três diferentes medidas de intensidade de pico para fazer a quantificação das amostras, como pode se verificar na Figura 21, onde X é analito em estudo e IN1/IN2 é o composto de referência.

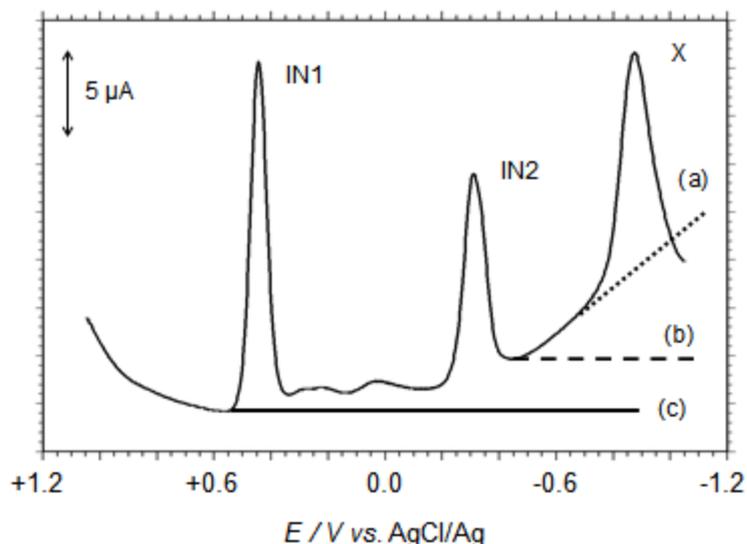


Figura 21 - SWV para a amostra de plantas enriquecida com clordiazepóxido (x), sepiolita e índigo em contato com tampão acetato de sódio aquoso 0,25 M, em pH 4,75. Potencial iniciado em 1,05 V. Incremento de potencial de 4 mV, amplitude de 25 mV, frequência de 5 Hz. (a-c) Três linhas de base possíveis para medições de corrente de pico.

O método de diluição do padrão adicionado foi aplicado para as quantificações de 6 amostras fortificadas com fármacos sintéticos (alprazolam, midazolam, diazepam, paroxetina, bupropiona e sertralina). As recuperações das amostras ficaram na faixa de 83 a 116%. A quantificação das amostras foi realizada apenas para mostrar que é possível quantificar amostras em estado sólido. O escopo deste capítulo do trabalho não envolve essa etapa, uma vez que o método foi desenvolvido com o objetivo de fazer um *screening* das amostras. Apesar de ser possível a quantificação, esta não é viável analiticamente, já que o tempo utilizado para a homogeneização da amostra é grande (DOMÉNECH-CARBÓ et al., 2013).

5.2 Voltametria de redissolução catódica

5.2.1 Comportamento voltamétrico dos fármacos no HMDE

Para otimizar os sinais voltamétricos das três classes de fármacos estudadas anorexígenos (anfepiramina, femproporex e sibutramina), antidepressivos (bupropiona, paroxetina, sertralina e fluoxetina) e ansiolíticos (alprazolam, bromazepam, midazolam, medazepam, flurazepam, lorazepam, clordiazepóxido, diazepam e clonazepam), os parâmetros pH, potencial de deposição e tempo de deposição foram avaliados. O medazepam foi utilizado apenas no método por AdCSV, pois não se conseguiu mais o padrão para utilizar no desenvolvimento dos outros métodos.

5.2.1.1 Influência do pH

Neste estudo observou-se o sinal voltamétrico de cada fármaco em tampão Ringer o qual já foi estudado em trabalho anterior (CORREIA, 2008), variando-se o pH de 6 a 12. O procedimento consistiu em adicionar à célula voltamétrica 10 mL do eletrólito mais 20 mg L⁻¹ dos fármacos em estudo. As medidas foram feitas por voltametria de pulso diferencial (DPV), adotando-se a varredura catódica dos potenciais (50 mV s⁻¹) de -0,1 a -1,9 V e amplitude de pulso de -50 mV. Os resultados são apresentados na Figura 22, que mostra o comportamento do sinal voltamétrico para cada fármaco em função do pH do eletrólito. Um deslocamento do pico voltamétrico de cada fármaco no sentido catódico durante a varredura de potenciais foi observado com o aumento do pH. O deslocamento do pico voltamétrico para valores de potenciais mais negativos com o aumento do pH indica o envolvimento de prótons (H⁺) na reação de transferência de elétrons com o eletrodo (ZUMAN, 1969). Dos 16 fármacos em estudo 4 deles apresentaram intensidade de pico muito pequena que são, o femproporex, sibutramina, paroxetina

e a sertralina, sendo assim, o método foi desenvolvido só com os 12 fármacos restantes.

A Figura 22 indica também a possibilidade de separar os adulterantes estudados em grupos quanto aos seus picos voltamétricos específicos. Obtendo-se sete grupos distintos, grupo 1 com o clonazepam (-0,65 V), o grupo 2 com o bromazepam (-0,9 V), o grupo 3 com o alprazolam, midazolam e flurazepam (-1,1 V), o grupo 4 com o lorazepam, clordiazepóxido, medazepam e diazepam (-1,2 V), o grupo 5 com a bupropiona (-1,4 V), o grupo 6 com a anfepramona (-1,6 V) e o grupo 7 com a fluoxetina (-1,75 V). De acordo com estes resultados, o tampão Ringer em pH 10,0 foi escolhido como eletrólito suporte para as experiências subsequentes, uma vez que permitiu a separação de picos voltamétricos das 12 drogas estudadas em grupos de diferentes classes farmacológicas, assim como o registo dos voltamogramas com uma linha de base de baixo ruído e maior sinal de corrente de pico.

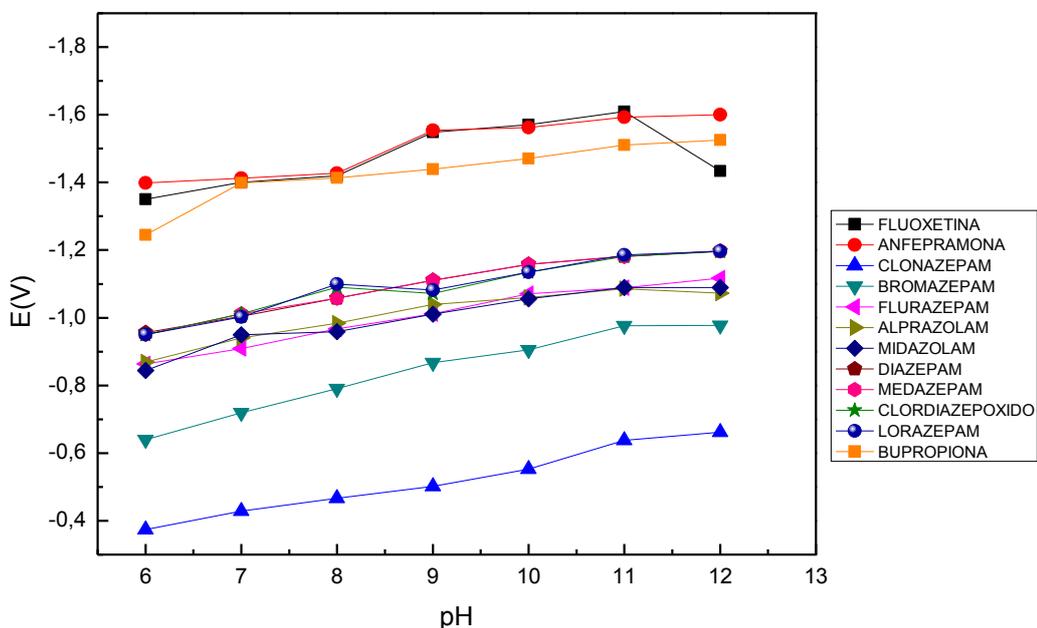


Figura 22 - Influência do pH no comportamento voltamétrico dos ansiolíticos, antidepressivos e anorexígeno estudados em tampão Ringer 0,1 mol L⁻¹.

5.2.1.2 Estudo do potencial de deposição

O potencial de deposição foi estudado em uma faixa de 0,1 a – 1,0 V, já que este influencia diretamente na seletividade e sensibilidade das medidas voltamétricas por AdCSV, o potencial escolhido foi de – 0,1 V. Observou-se que este não influenciou significativamente na corrente de pico em um tempo de deposição de 15 s, este fato está provavelmente relacionado com a fácil adsorção de todos os fármacos no HMDE na gama de potencial de 0,1 a – 1,0 V. O efeito do potencial de deposição no sinal voltamétrico dos fármacos estudados está mostrado na Figura 23.

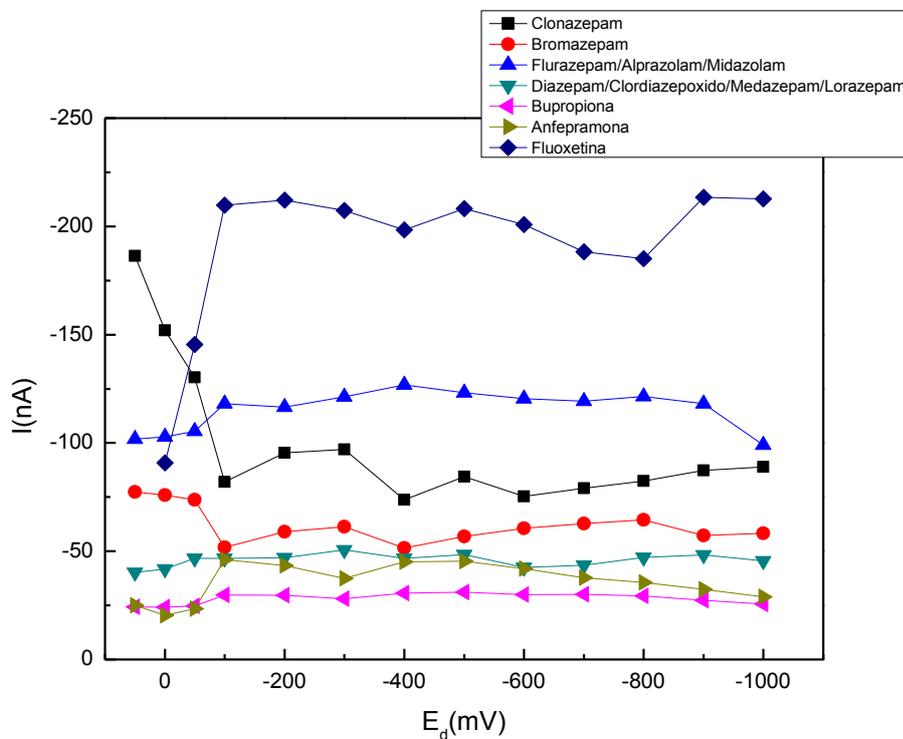


Figura 23 - Estudo do potencial de deposição; $V = 50 \text{ mV s}^{-1}$, $T_d = 15 \text{ s}$. Solução de medida: 10 mL de tampão Ringer $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 10. clonazepam, bromazepam e bupropiona 2 mg L^{-1} ; flurazepam, alprazolam, midazolam, diazepam, clordiazepóxido, medazepam, lorazepam e fluoxetina $0,4 \text{ mg L}^{-1}$; anfepirazona 4 mg L^{-1} .

5.2.1.3 Estudo do tempo de deposição

O tempo de deposição foi estudado em uma faixa de potencial de 0 a 90 s como mostrado na Figura 24, optou-se por um tempo de 15 s já que este não teve uma influência significativa na corrente de pico dos fármacos estudados. Este efeito observado deve-se provavelmente ao fato de a adsorção dos ansiolíticos no HMDE ser relativamente fraca e, ainda, de a corrente de redução resultante ser fortemente influenciada pelas espécies presentes na camada de difusão (não-adsorvidas) (CARVALHO, 2010).

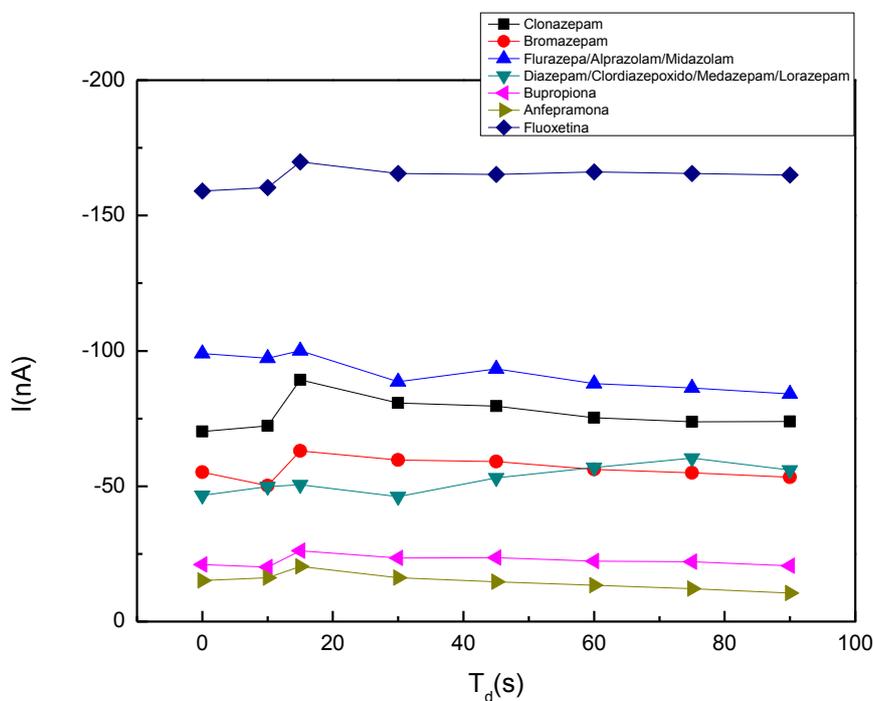


Figura 24 - Estudo do tempo de deposição para os 12 fármacos estudados; clonazepam, bromazepam e bupropiona 2 mg L⁻¹; flurazepam, alprazolam, midazolam, diazepam, clordiazepóxido, medazepam, lorazepam e fluoxetina 0,4 mg L⁻¹; anfepramona 4 mg L⁻¹. Solução de medida: 10 mL de tampão Ringer 0,1 mol L⁻¹.

As condições otimizadas para a determinação dos 12 fármacos estudados por voltametria adsorptiva de redissolução catódica foram as seguintes: eletrólito de trabalho tampão ringer 0,1 mol L⁻¹ (pH 10,0), tempo de deposição de 15 s, potencial de deposição de - 0.1 V, varredura catódica dos potenciais (50 mV s⁻¹) de - 0.1 a -

1.9 V e amplitude de pulso de -50 mV. A Figura 25 mostra o voltamograma com a mistura dos 12 fármacos estudados com as condições otimizadas. A Figura 26 mostra um voltamograma do eletrólito de trabalho sem a presença dos analitos em estudo.

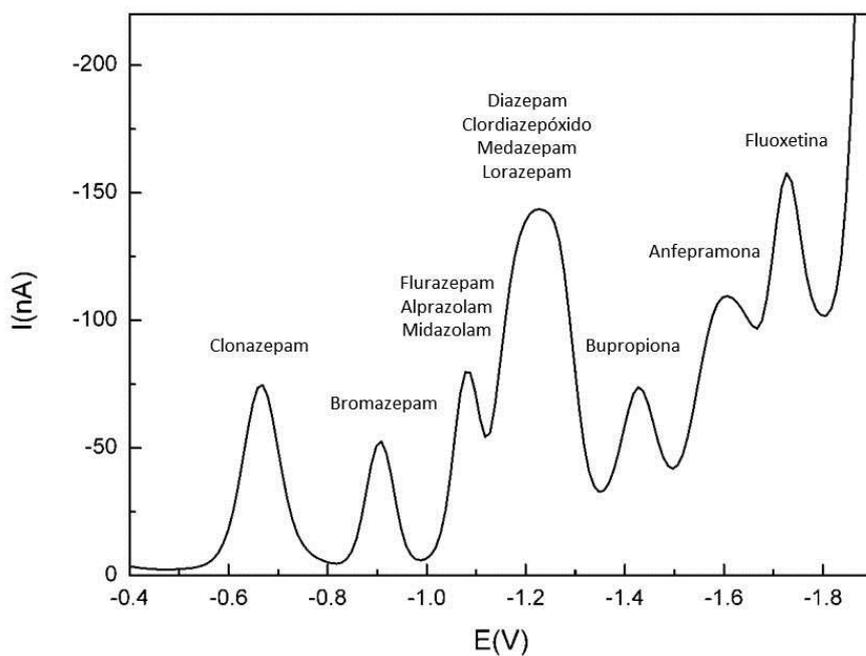


Figura 25 - Sinais voltamétricos da mistura dos 12 fármacos. Tampão Ringer 0,1 mol L⁻¹, $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$, $T_d = 15 \text{ s}$, $E_d = -0.1 \text{ V}$.

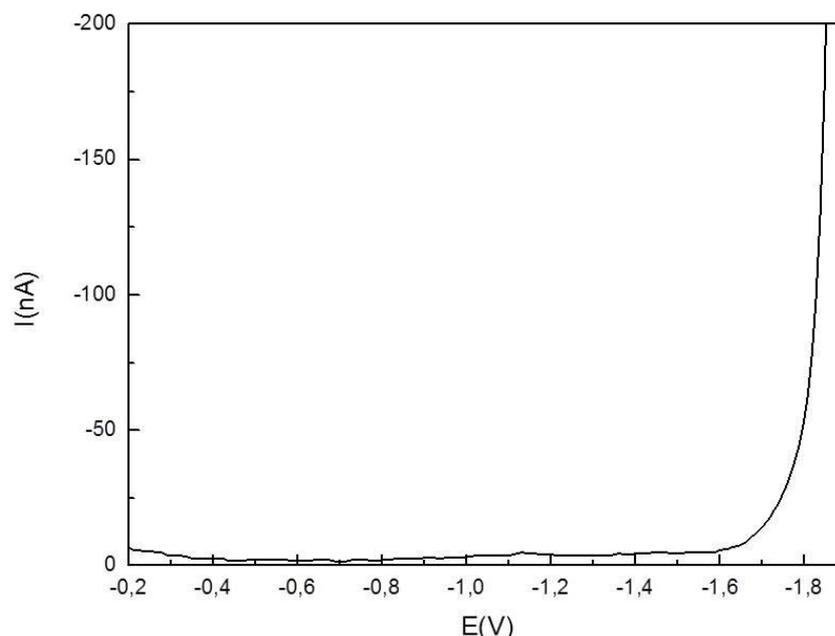


Figura 26 – Voltamograma do eletrólito de trabalho sem a presença dos analitos. Tampão Ringer 0,1 mol L⁻¹, V= 50 mV s⁻¹, T_d= 15 s, E_d = -0.1 V.

5.2.2 Validação do método

5.2.2.1 Especificidade do método

A influência dos outros possíveis adulterantes em formulações para a perda de peso foi investigada para avaliar a real aplicabilidade do método em amostras adulteradas contendo os 12 fármacos estudados. Sendo que, as interferências possíveis poderiam ser causadas por fármacos sintéticos que possuem um comportamento voltamétrico semelhante no HMDE, bem como pelos materiais à base de plantas que contêm compostos naturais eletroativos. Considerando as possíveis interferências de outros fármacos, diuréticos (furosemida, hidroclorotiazida, espironolactona, amilorida e clortalidona) e laxantes (fenolftaleína e bisacodil) foram investigados, já que eles também podem estar presentes como coadjuvantes em formulações para a perda de peso. É importante ressaltar que esses fármacos

diuréticos e laxantes são os medicamentos mais prescritos para estes fins, sendo também fármacos de custos relativamente baixos. Entre os sete possíveis interferentes sintéticos aqui estudados, dois deles apresentaram picos voltamétricos perto do bromazepam e da bupropiona. Assim, fenolftaleína / bromazepam reduzido em $-0,9$ V e espironolactona/bupropiona em $-1,4$ V. Mesmo com estas possíveis interferências, o método é válido, considerando que entre 12 medicamentos analisados, apenas dois deles sofreram interferências de outras classes de drogas, se considerarmos o método voltamétrico proposto apenas para fins de *screening*. Assim, os adulterantes podem ser confirmados por outro método, um método de separação. Considerando-se que o método proposto é de baixo custo, sensível, rápido e não requer etapas de preparação da amostra / limpeza demorada, esta é uma ferramenta muito importante para o estudo da adulteração de produtos naturais para a perda de peso contendo pelo menos 10 adulterantes específicos.

Outros compostos investigados como possíveis interferentes neste trabalho estão relacionados com a matéria-prima (planta) presentes nas formulações. Foram, analisadas 21 espécies de ervas que podem ser considerados as mais utilizadas em formulações de medicamentos fitoterápicos comercializados para perda de peso. *Citrus aurantium L.*, *Amorphophallus konjac*, *Plantago psyllium L.*, *Chlorella pyrenoidosa*, *Paullinia cupana Kunth*, *Baccharis trimera*, *Cassia angustifolia*, *Cynara scolymus L.*, *Caralluma fimbriata*, *Cassia nomame*, *Phaseolus vulgaris*, *Centella asiatica*, *Cammelia sinensis*, *Cordia Eucalyculata Vell.*, *Garcinia cambogia*, *Fucus vesiculosus L.*, *Spirulina maxima*, Chitosan, *Rhammus purshiana*, *Ephedra sinica Stapf*. O único material sintético estudado como interferente foi o picolinato de cromo.

Além disso, é muito provável que pelo menos um deles estará presente como produto ativo natural para a perda de peso. Entre as 21 ervas analisadas, apenas sete delas apresentaram picos voltamétricos semelhantes a uma das 10 drogas estudadas. Isso significa que a determinação de adulterantes em formulações contendo essas espécies de ervas podem sofrer interferência dos componentes da matriz. A Figura 27 mostra um diagrama esquemático que contém a sequência de critérios de diagnóstico proposto para discernir entre as diferentes classes de adulterações e matérias-primas que podem interferir na medição voltamétrica. O

grupo 1 (clonazepam) tem um potencial de pico de $-0,65$ V e sofre interferência de *pyrenoidosa Chlorella* e *Cassia angustifolia*. O grupo 4 (diazepam, clordiazepóxido, medazepam e lorazepam) tem um potencial de pico de $-1,2$ V e sofre interferência de *Cassia nomame*, *Ephedra sinica Stapf* e *Rhammus purshiana*. O grupo 5 (bupropiona) e grupo 6 (anfepramona) não sofrem interferência de quaisquer espécies de ervas. De acordo com a Figura 27, a determinação seletiva de adulterantes em formulações à base de plantas deve ter em conta a composição à base de plantas da amostra, em alguns casos. Como exemplo, a determinação do clonazepam como adulterante numa formulação contendo *pyrenoidosa Chlorella* e *Cassia angustifolia* não é possível, uma vez que lhe falta seletividade.

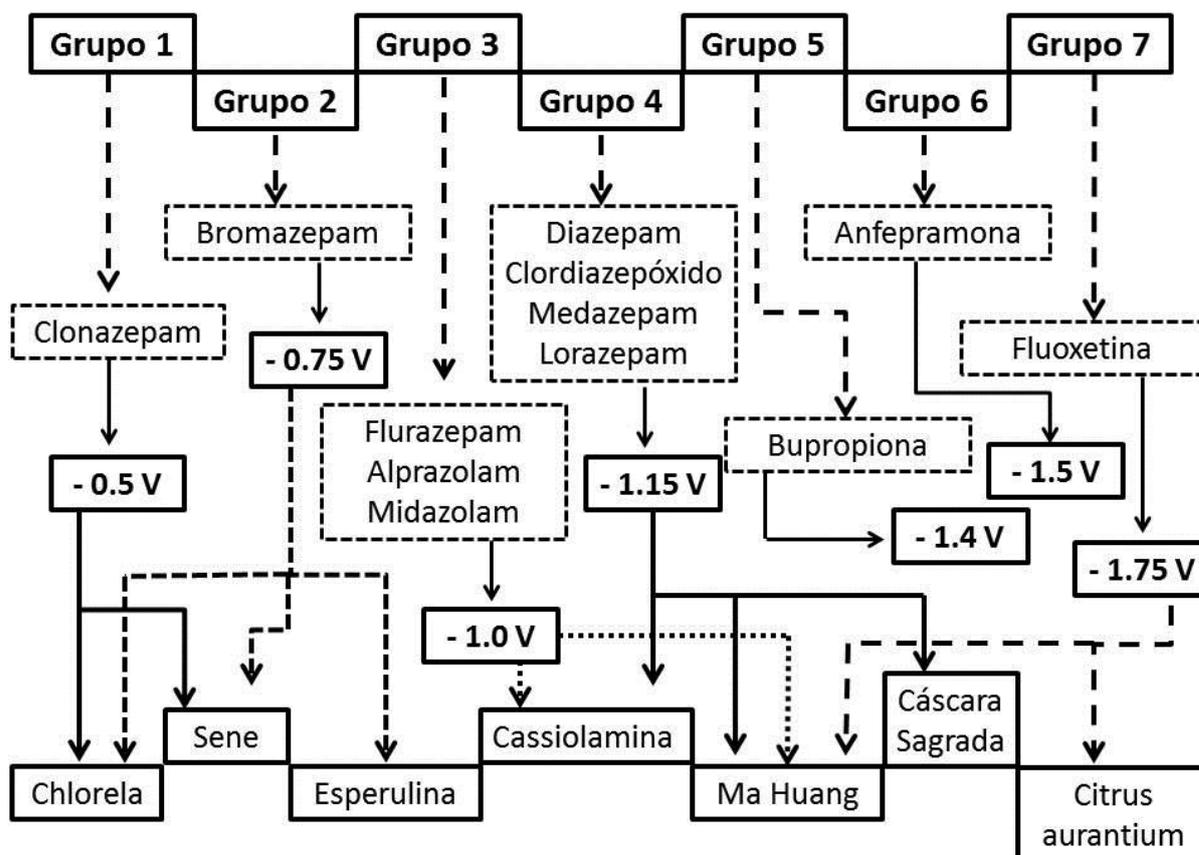


Figura 27 - Critérios de diagnóstico para a identificação sequencial de diferentes classes de adulterantes em formulações à base de plantas usando AdCSV.

5.2.2.2 Linearidade

A linearidade está relacionada com a capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância em exame dentro de uma determinada faixa de aplicação (RIBANI et al., 2004). Neste trabalho, a curva analítica foi feita através da adição de seis pontos, e cada ponto foi adicionado em triplicata, obtendo-se um coeficiente de determinação acima de 0,99 para os doze fármacos sintéticos como mostrado na Tabela 14.

Tabela 13 - Resultados obtidos para a faixa linear e o coeficiente de determinação para os 12 fármacos.

Fármacos	Faixa Linear (mg L ⁻¹)	Coeficiente de determinação (r ²)
Clonazepam	0,4 – 42,4	0,999
Bromazepam	0,4 – 32,4	0,999
Flurazepam	3,2 – 19,2	0,995
Alprazolam	3,2 – 19,2	0,995
Midazolam	3,2 – 19,2	0,995
Diazepam	1,6 – 19,6	0,994
Clordiazepóxido	1,6 – 19,6	0,994
Medazepam	1,6 – 19,6	0,994
Lorazepam	1,6 – 19,6	0,994
Bupropiona	0,4 – 14,4	0,999
Anfepramona	4,0 – 46,0	0,999
Fluoxetina	2,4 – 5,4	0,996

5.2.2.3 Precisão e exatidão

A precisão está relacionada com a repetibilidade da medida, ou seja, a dispersão dos resultados entre ensaios independentes de uma mesma amostra. E isso é calculado através da fórmula abaixo (1), onde (RSD) é o desvio padrão relativo também conhecido como coeficiente de variação (CV), (S) é o desvio padrão absoluto e (\bar{X}) é a media aritmética (RIBANI *et al.*, 2004). A precisão foi calculada neste trabalho, através da adição da mesma concentração cinco vezes, obtendo-se o desvio padrão relativo.

$$RSD (\%) \text{ ou } CV (\%) = \frac{S}{\bar{X}} \times 100 \quad (1)$$

A exatidão representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados em um determinado ensaio e um valor de referência aceito como verdadeiro (RIBANI et al., 2004). A exatidão foi calculada, neste trabalho, através da adição de padrão, adicionando-se cinco vezes a mesma concentração, a equação da reta ($y = ax + b$) foi usada para determinar a recuperação (%), onde a área é representada por (y) e a concentração (x).

Os resultados obtidos para a precisão e a exatidão encontram-se na Tabela 15.

Tabela 14 - Precisão e exatidão dos fármacos estudados.

Fármacos	Precisão (RSD %)	Exatidão (%)
Clonazepam	6,69	100,67
Bromazepam	2,56	105,13
Flurazepam	4,25	93,41
Alprazolam	4,25	93,41
Midazolam	4,25	93,41
Diazepam	5,44	96,06
Clordiazepóxido	5,44	96,06
Medazepam	5,44	96,06
Lorazepam	5,44	96,06
Bupropiona	1,40	98,02
Anfepramona	2,21	88,25
Fluoxetina	2,95	109,07

5.2.2.4 Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)

O limite de detecção representa a menor concentração da substância em exame que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada (RIBANI et al., 2004). O limite de detecção foi calculado através da adição de cinco replicas,

utilizando a fórmula abaixo (2). Onde o desvio padrão é (S), e o coeficiente angular da curva analítica é (b).

$$LD = \frac{3 \times S}{b} \quad (2)$$

O limite de quantificação representa a menor concentração da substância em exame que pode ser determinada com um nível de incerteza aceitável (RIBANI et al., 2004). O limite de quantificação foi determinado através da adição de cinco replicas, utilizando a fórmula abaixo (3). O desvio padrão é representado por (S) e o coeficiente angular da curva analítica por (b).

$$LQ = \frac{10 \times S}{b} \quad (3)$$

Os limites de detecção e quantificação obtidos se encontram na Tabela 16.

Tabela 15 - Limites de detecção e quantificação dos fármacos sintéticos estudados.

Fármacos	Limite de detecção (mg L⁻¹)	Limite de quantificação (mg L⁻¹)
Clonazepam	0,011	0,037
Bromazepam	0,021	0,070
Flurazepam	0,013	0,044
Alprazolam	0,013	0,044
Midazolam	0,013	0,044
Diazepam	0,010	0,033
Clordiazepóxido	0,010	0,033
Medazepam	0,010	0,033
Lorazepam	0,010	0,033
Bupropiona	0,051	0,17
Anfepramona	0,11	0,36
Fluoxetina	0,48	1,58

5.2.3 Aplicação analítica

O método proposto foi empregado para a análise de 99 amostras de formulações à base de plantas comercializadas para o tratamento de obesidade em diferentes estados. Primeiramente foi realizado um *screening* de todas as amostras para identificar a adulteração com qualquer uma das 12 drogas estudadas. Entre as amostras estudadas rastreadas através do método proposto, 5 apresentaram picos voltamétricos bem definidos relativos a pelo menos um dos adulterantes estudado. Nas amostras, foram encontrados os adulterantes o clonazepam e bromazepam. Na Figura 28 pode-se observar o voltamograma obtido para uma amostra contendo o clonazepam como composto não declarado na sua composição. Duas amostras contendo bromazepam como adulterante foram identificadas (Figura 29 a 30). No entanto, a fenoltaleína pode interferir nessa determinação, portanto, utilizou-se um método de separação para poder identificar qual substância estava presente, e

nestas identificamos a presença de fenolftaleína. A Tabela 17 mostra as amostras adulteradas com as suas respectivas composições e o adulterante determinado pelo método de adição de padrão. Se comparada com a dose terapêutica prevista das drogas (DEF, 2007/2008), os adulterantes adicionados as formulação, estão, em concentrações próximas da dose mínima. No entanto, a distribuição dos fármacos entre as cápsulas que contenham espécies de ervas não pode ser considerada homogênea, o que explica os valores determinados acima da dose máxima prescrita em alguns casos.

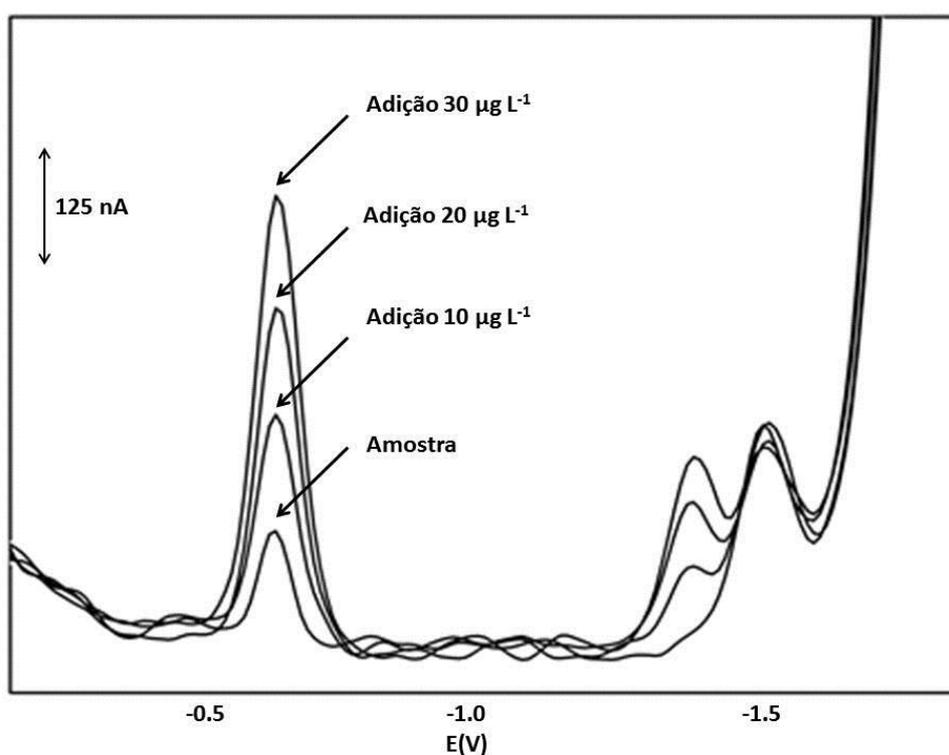


Figura 28 - Amostra 26 adulterada com clonazepam. Composição da amostra, esta descrito na tabela 17. Tampão Ringer $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 10,0, $V = 50 \text{ mV s}^{-1}$, $T_d = 15 \text{ s}$, $E_d = -0.1 \text{ V}$.

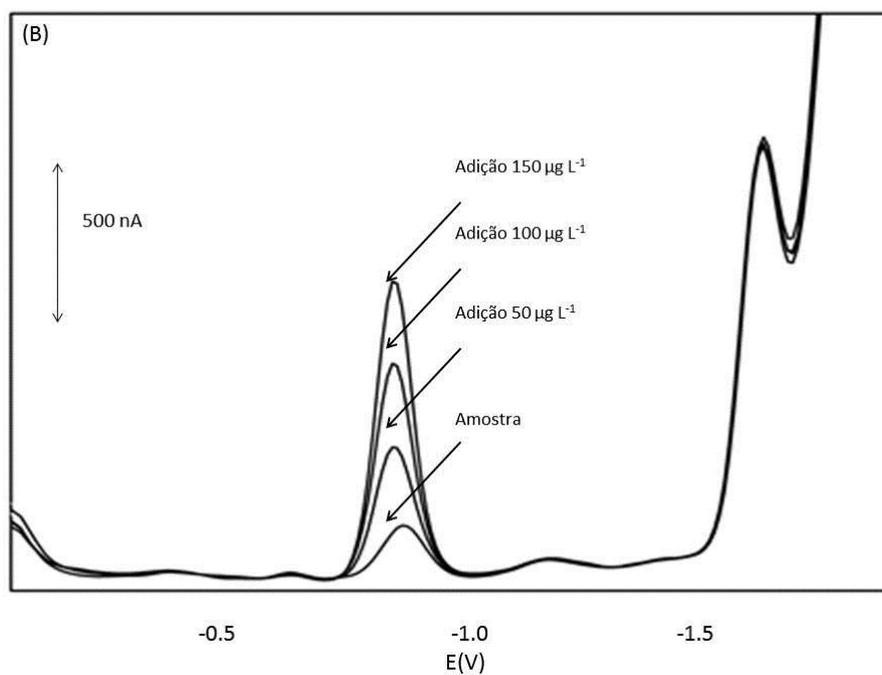


Figura 29 - Amostra 87 adulterada com fenolftaleína. Composição da amostra, esta descrito na tabela 17. Tampão Ringer $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 10,0, $V = 50 \text{ mV s}^{-1}$, $T_d = 15 \text{ s}$, $E_d = -0,1 \text{ V}$.

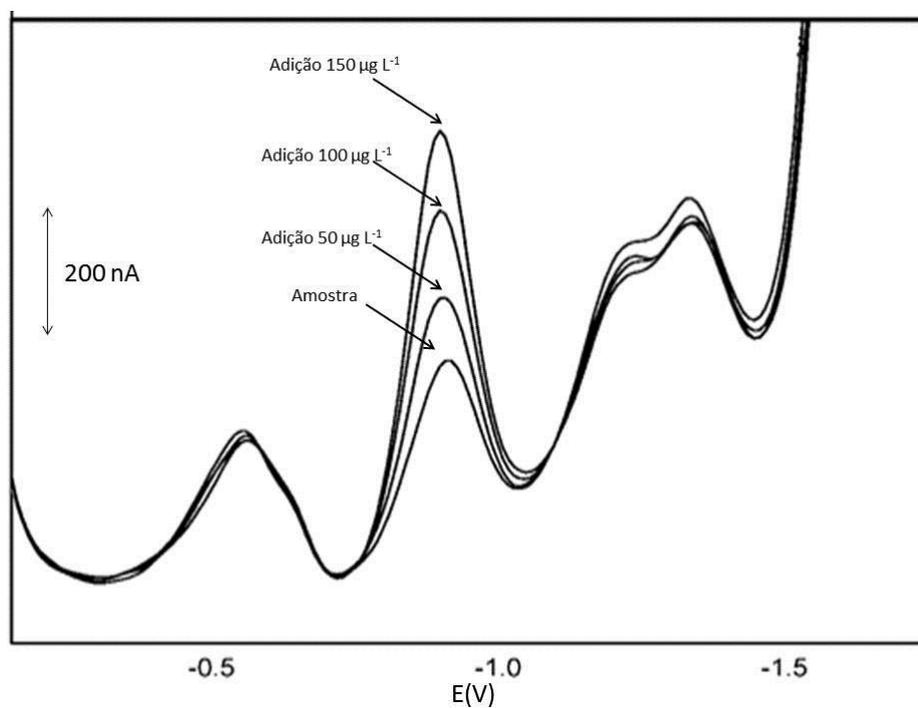


Figura 30 - Amostra 88 adulterada com fenolftaleína. Composição da amostra, esta descrito na tabela 17. Tampão Ringer $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 10,0, $V = 50 \text{ mV s}^{-1}$, $T_d = 15 \text{ s}$, $E_d = -0,1 \text{ V}$.

Tabela 16 - Determinação quantitativa de fármacos sintéticos em amostras reais.

Amostra	Composição	Adulterante	Quantidade (mg g ⁻¹)	Ingestão diária (mg) ^a	Dose terapêutica (mg) ^b
26	<i>Phaseolus vulgaris</i> L 400mg	Clonazepam	0,168	0,335	0,5-2,0
75	Não declarado	Clonazepam	1,849	5,547	0,5-2,0
87	Carnitina 45mg, methionina 50mg,cynara 40mg,l-lisina 20mg, nicotinamida 15mg, picol.cromo 80mcg, bit colina 150mg, betaina 35mg, inositol 80mg, pant. Calcio 10mg, acido fólico 150mg, vit b6 10 mg	Fenolftaleína	3,232	12,928	50-200
88	<i>Centella asiática</i> (L.) 150mg, <i>Rhammus purshiana</i> 5mg CM. cellulose 40mg, asiaticoside 20 mg, <i>Fucus vesiculosus</i> L 90mg , asp. potassium 5mg , collagen 100mg, <i>citrus aurantium</i> L. 80mg	Fenolftaleína	1,546	6,184	50-200
101	<i>Cynara scolymus</i> L., <i>Centella asiática</i> (L.), <i>Garcinia cambogia</i> , <i>Equisetum giganteum</i> L., <i>Rhammus purshiana</i> , <i>Fucus vesiculosus</i> L, <i>Spirulina maxima</i> , <i>Gracilaria confervoides</i> L.	Clonazepam	0,423	1,269	0,5-2,0

^aDose diária indicada pelo fabricante.^bDose diária recomendada por médicos.

5.3 Cromatografia Líquida de Par Iônico (IPC)

5.3.1 Otimização do método

Foram analisados pelo método de IPC proposto 5 classes de fármacos: anorexígenos (anfepiramina e sibutramina e femproporex), antidepressivos (bupropiona, fluoxetina, paroxetina e sertralina), ansiolíticos (alprazolam, bromazepam, flurazepam, lorazepam, clordiazepóxido, diazepam, midazolam e clonazepam), diurético (furosemida) e laxantes (fenolftaleína e bisacodil).

A otimização para a separação desses fármacos envolveu primeiramente o estudo do comprimento de onda adequado a ser utilizado. O comprimento de onda ideal para leitura não é necessariamente aquele no qual o composto apresenta absorção máxima e sim aquele no qual o composto absorve livre de interferentes, assim, analisou-se o espectro de absorção molecular de cada fármaco para a escolha de um comprimento de onda que fosse capaz de detectar satisfatoriamente todos os fármacos em estudo, a partir de soluções metanólicas dos padrões a uma concentração de 10 mg L⁻¹. Após o estudo do comprimento de onda de detecção de cada analito pelo espectrofotômetro HP, optou-se pelo comprimento de onda de 230 nm o qual mostrou-se mais adequado, mas o femproporex foi o único que não teve boa absorção nesse comprimento de onda, então optou-se por retirar o femproporex.

Após o estudo do comprimento de onda, se passou para a otimização da fase móvel, inicialmente foi utilizada a eluição isocrática a fim de verificar qual a melhor fase móvel, o pH 4,0 foi fixado inicialmente, onde em trabalho anterior foi o pH estudado com analitos semelhantes (LIMA, 2009), foram testados acetonitrila (ACN), metanol (MeOH), dodecil sulfato de sódio (SDS) e tetrahidrofurano (THF). Os testes iniciais foram com acetonitrila/água, metanol/água, tetrahidrofurano/água e a mistura de tetrahidrofurano/água/acetonitrila em diferentes proporções, como mostrado na Tabela 18.

Tabela 17 – Proporções dos solventes e pH estudados.

ACN:H₂O	MeOH:H₂O	THF:H₂O	THF:ACN:H₂O
20:80	40:60	25:75 (pH 2,0 a 6,0)	10:30:60 (pH 2,0 a 6,0)
25:75	50:50	30:70 (pH 2,0 a 6,0)	20:20:60 (pH 2,0 a 6,0)
30:70	55:45	40:60 (pH 2,0 a 6,0)	
40:60 (pH 2,0 a 6,0)	60:40 (pH 2,0 a 6,0)		
50:50	65:35		
60:40			

Após a realização do estudo dos solventes se passou para o estudo do pH, foram selecionados as melhores proporções de solventes e se variou o pH de 2,0 a 6,0, como mostrado na Tabela 18. Após o estudo, pode-se verificar que a condição THF:ACN:H₂O (10:30:60) em pH 4,0, fluxo 0,5 mL/minuto foi a melhor, apresentando uma boa estabilidade na linha de base e dentre as condições estudadas foi a que apresentou uma melhor separação, como mostrado na Figura 31. Como pode se visualizar na Figura 31, os 14 fármacos coeluem entre si, então, a fim de poder identificar os fármacos dividiu-se estes em dois grupos, o grupo dos ansiolíticos e o grupo dos anorexígenos e antidepressivos, como mostrado no cromatograma da Figura 32.

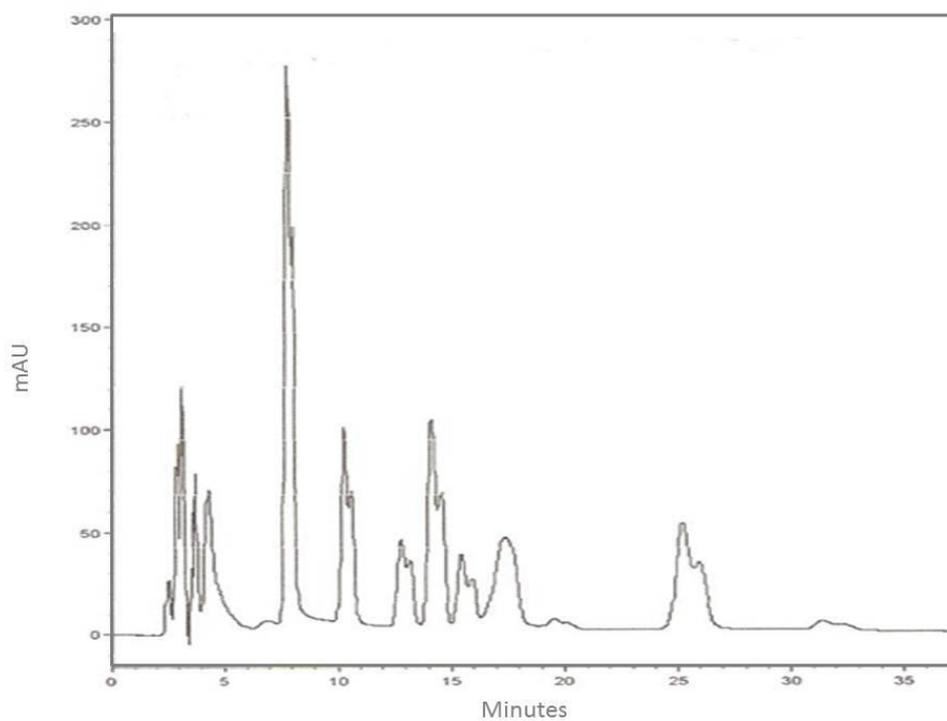


Figura 31 - Cromatograma com os 14 fármacos, alprazolam, clonazepam, lorazepam, midazolam e diazepam (20 mgL^{-1}), bromazepam e flurazepam (50 mgL^{-1}), anfepramona, clordiazepóxido, fluoxetina, sibutramina, sertralina, paroxetina e bupropiona (200 mgL^{-1}). Condições: THF:ACN:H₂O (10:30:60) em pH 4,0, fluxo 0,5 mL/minuto.

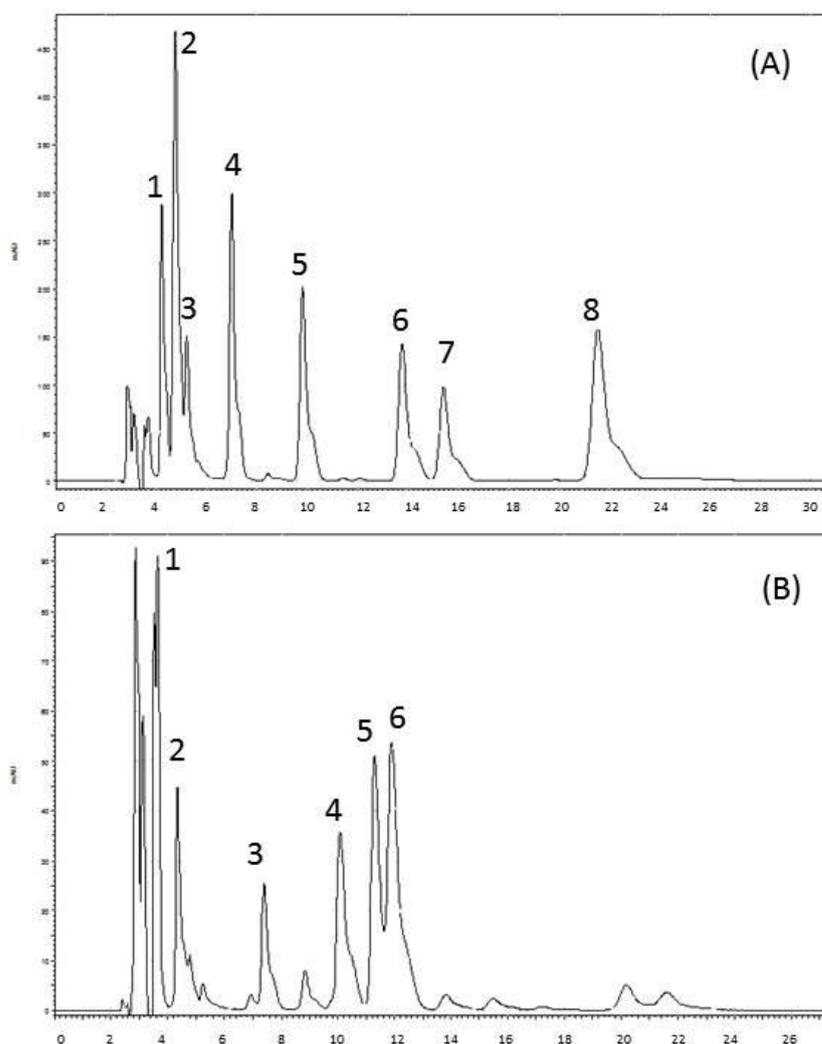


Figura 32 - Cromatograma (A) 8 ansiolíticos, 1-midazolam; 2-flurazepam; 3-clordiazepóxido; 4-bromazepam; 5-alprazolam; 6-lorazepam; 7-clonazepam; 8-diazepam. (B) 1-paroxetina; 2-sertralina; 3-sibutramina; 4-fluoxetina; 5-bupropiona; 6-anfepramona. Condições: alprazolam, clonazepam, lorazepam, midazolam e diazepam (20 mgL^{-1}), bromazepam e flurazepam (50 mgL^{-1}), anfepramona, clordiazepóxido, fluoxetina, sibutramina, sertralina, paroxetina e bupropiona (200 mgL^{-1}). Condições: THF:ACN:H₂O (10:30:60) em pH 4,0, fluxo 0,5 mL/minuto.

A fim de melhorar o problema de coeluição, optou-se primeiramente pelo estudo do gradiente, varias combinações de solventes foram testadas em diferentes concentrações, mas o problema de coeluição persistiu. Então foi realizado um estudo da formação de par iônico. Para isso, foi adicionado dodecil sulfato de sódio (SDS) à fase móvel. Variou-se as concentrações de 0,065; 0,075; 0,08; 0,8; 0,1; 0,14; 0,15; 0,2 mol L⁻¹. Pode-se verificar que a concentração de 0,14 mol L⁻¹, foi a

que apresentou uma melhor separação, o único inconveniente é que esta condição dobrou o tempo de corrida de 30 minutos para 70 minutos (Figura 33).

Como pode-se verificar na Figura 34, 3 analitos foram adicionados ao cromatograma, a furosemida (diurético) a fenoltaleína e o bisacodil (laxantes). A furosemida foi encontrada em varias amostras pelo método VIM e no método AdCSV teve um laxante (fenoltaleína) como interfere com o bromazepam, se decidiu adicionar este diurético e os dois laxantes que são bastante utilizados em casos de adulteração a fim de poder confirmar a presença dos mesmos.

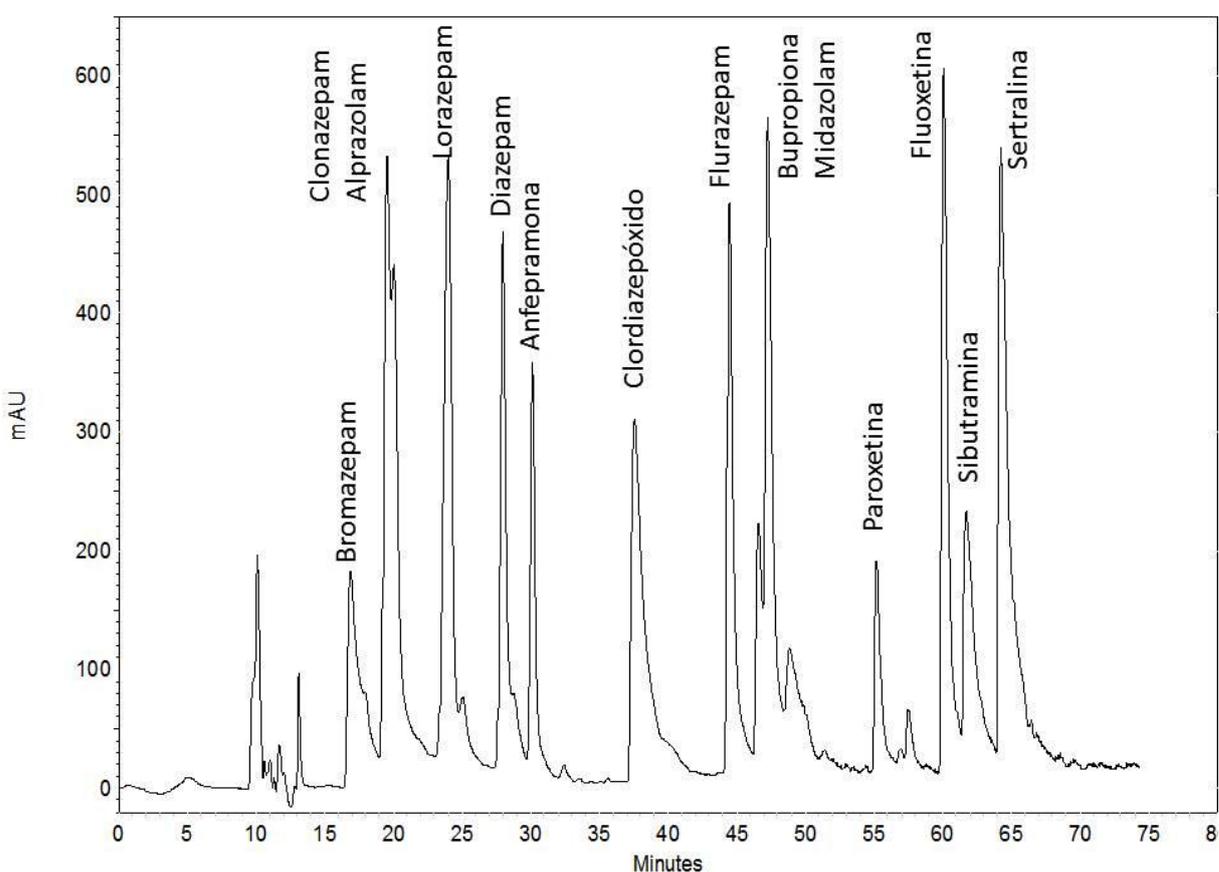


Figura 33 - Cromatograma com os 14 fármacos, alprazolam, clonazepam, lorazepam, midazolam e diazepam (20 mg L^{-1}), bromazepam e flurazepam (50 mg L^{-1}), anfepramona, clordiazepóxido, fluoxetina, sibutramina, sertralina, paroxetina e bupropiona (200 mg L^{-1}). Condições: THF:ACN:H₂O (10:30:60) em pH 4,0, SDS $0,14 \text{ mol L}^{-1}$, fluxo $0,5 \text{ mL/minuto}$.

Para resolver alguns problemas de coeluição ainda existentes e para tentar diminuir o tempo de corrida utilizou-se gradiente. Várias combinações foram realizadas, variando as concentrações dos solventes e do fluxo utilizado, mas não foi possível resolver o problema de coeluição entre a bupropiona e o midazolam, então se optou por retirar o midazolam, pois em casos de adulteração a bupropiona é mais provável que esteja presente que o midazolam, já que este não é um dos ansiolíticos mais utilizados. A condição final esta mostrada na Tabela 20, e o cromatograma na Figura 34. Na Figura 35 temos um cromatograma do eluente sem a presença dos analitos.

Tabela 19 – Condições otimizadas do gradiente, eluente contendo $0,14 \text{ mol L}^{-1}$ SDS, pH 4,0.

THF	ACN	H ₂ O	Fluxo mL/minuto	Tempo corrida (minutos)
5	10	85	1,2	10
10	45	45	2,0	15
15	45	40	2,0	25

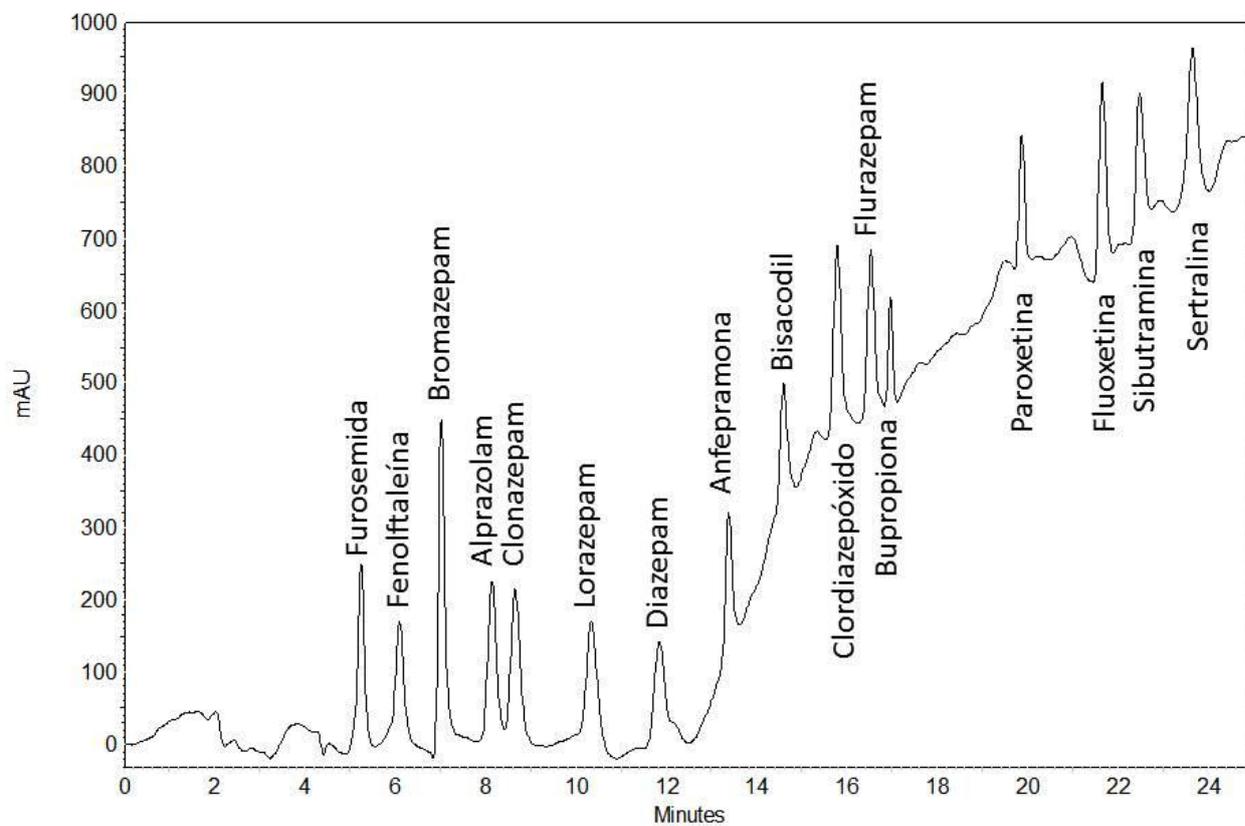


Figura 34 – Cromatograma com os 16 fármacos, alprazolam, clonazepam, lorazepam e diazepam (20 mgL^{-1}), bromazepam e flurazepam (50 mgL^{-1}), anfepramona, clordiazepóxido, fluoxetina, furosemida, bisacodil, fenolftaleína, sibutramina, sertralina, paroxetina e bupropiona (200 mgL^{-1}). Condições otimizadas estão descritas na Tabela 20, pH 4,0, contendo SDS $0,14 \text{ mol L}^{-1}$; coluna C18.

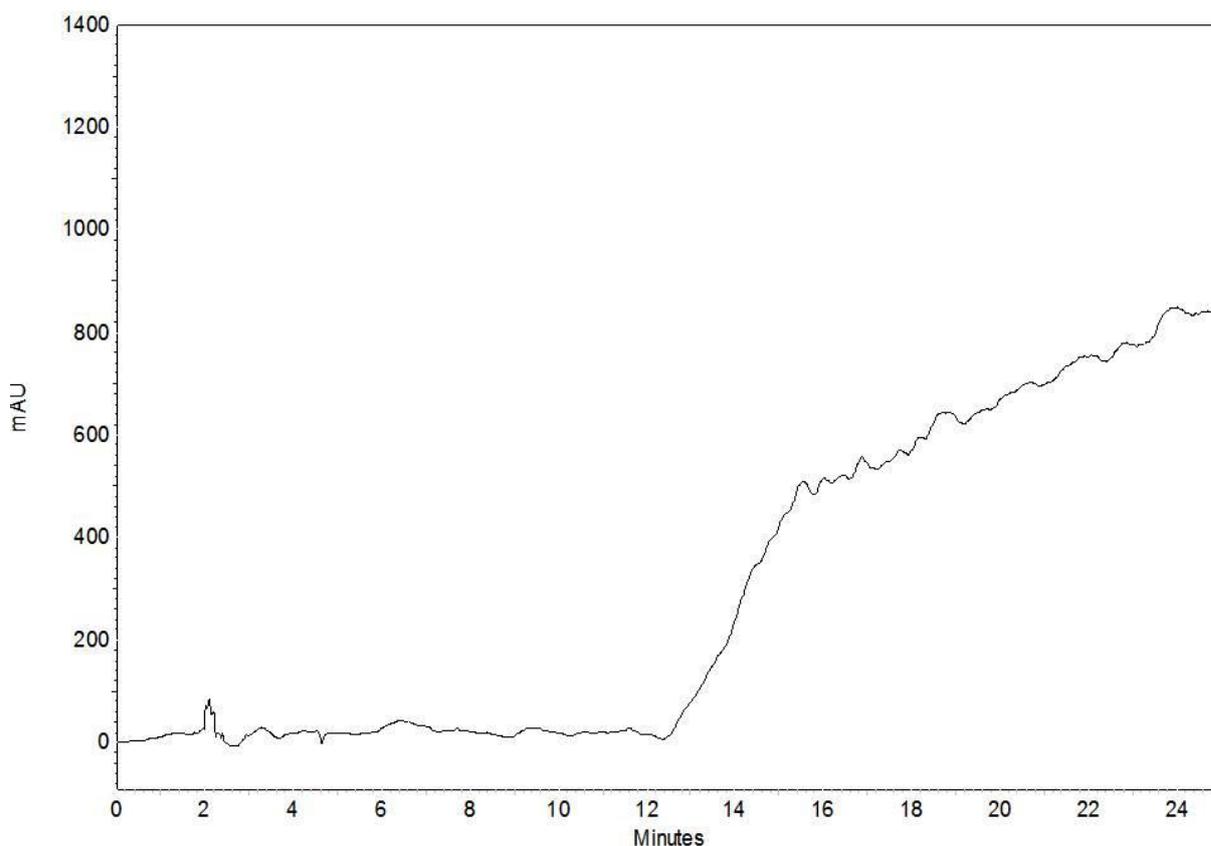


Figura 35 – Cromatograma com o eluente, sem a presença dos analitos em estudos. Condições otimizadas estão descritas na Tabela 20, pH 4,0, contendo SDS $0,14 \text{ mol L}^{-1}$; coluna C18.

Na cromatografia de par iônico segundo SNYDER, (2010) não é aconselhável o uso de gradiente, pois é necessário um tempo de estabilização maior entre cada análise, para que os tempos de retenção sejam reproduzíveis, outro problema é com relação ao acúmulo do tensoativo na coluna, por mais intensa que for a lavagem da coluna, sempre vai ficar um residual do tensoativo (SNYDER et al, 2010), que acaba interferindo na linha de base, como pode-se visualizar na Figura 34, com o tempo de uso da coluna a linha de base vai aumentando, devido ao residual do tensoativo.

5.3.2 Validação método

Assim como o método por AdCSV passou por um processo de validação, também o método por IPC foi avaliado pelos mesmos parâmetros de validação.

5.3.2.1 Especificidade do método

A especificidade do método foi avaliada pela interferência de outros fármacos que poderiam estar presentes em casos de adulteração de formulações fitoterápicas emagrecedoras. Os interferentes estudados são diuréticos (hidroclorotiazida, clortalidona, amilorida, espirolactona) e hipoglicêmicos (clorpropamida, glibenclamida, glimepiride, metformina, glipizida). Dos nove interferentes estudados nenhum interfere no método desenvolvido.

A linearidade do método foi realizada através da construção de curvas analíticas, em seis concentrações de três repetições, obtendo-se um coeficiente de determinação de 0,99 para cada fármaco em estudo. A faixa linear da furosemida é de 5,0 a 250,0 mg L⁻¹, da fenolftaleína e o bromazepam é de 20,0 a 500,0 mg L⁻¹, do alprazolam, clonazepam, lorazepam e do diazepam é de 5,0 a 500,0 mg L⁻¹, anfepramona é de 40 a 1000 mg L⁻¹, do bisacodil, clordiazepóxido, bupropiona, paroxetina, fluoxetina, sibutramina e a sertralina é de 20,0 a 1000,0 mg L⁻¹ e para o flurazepam é de 20,0 a 300,0 mg L⁻¹. A faixa de trabalho escolhida para os 16 fármacos estudados está mostrado na Tabela 21.

Tabela 20 – Faixa linear de trabalho e coeficiente de determinação dos 16 fármacos.

Fármaco sintético	Faixa Linear (mg L ⁻¹)	r ²
Furosemida	5,0-100,0	0,999
Fenolftaleína	5,0-100,0	0,999
Bromazepam	40,0-200,0	0,994
Alprazolam	5,0-100,0	0,999
Clonazepam	5,0-100,0	0,998
Lorazepam	5,0-100,0	0,999
Diazepam	5,0-100,0	0,998
Anfepramona	40,0-200,0	0,995
Bisacodil	40,0-200,0	0,990
Clordiazepóxido	40,0-200,0	0,994
Flurazepam	40,0-200,0	0,991
Bupropiona	40,0-200,0	0,991
Paroxetina	40,0-200,0	0,993
Fluoxetina	40,0-200,0	0,995
Sibutramina	40,0-200,0	0,995
Sertralina	40,0-200,0	0,992

5.3.2.2 Precisão e exatidão do método

A precisão foi calculada, através da injeção da mesma concentração cinco vezes, obtendo-se o desvio padrão relativo. Já a exatidão foi calculada, através da adição de padrão, injetando-se cinco vezes a mesma concentração, a equação da reta ($y = ax + b$) foi usada para determinar recuperação (%), onde a área é representada por (y) e a concentração (x). A fim de verificar a fiabilidade do método a exatidão foi calculada para dois pontos distintos da curva. Como os fármacos absorvem de maneira distinta no comprimento de onda escolhida de 230 nm, foi necessário utilizar concentrações diferentes dos mesmos, por isso estes foram divididos em dois grupos. Grupo 1: ponto 1, 10 mg L⁻¹ para furosemida, clonazepam, diazepam, fenolftaleína, alprazolam e lorazepam, e 80 mg L⁻¹ para bromazepam,

bisacodil, flurazepam, paroxetina, sibutramina, anfepramona, clordiazepóxido, bupropiona, fluoxetina e sertralina. Grupo 2: ponto 2, 20 mg L⁻¹ para furosemida, clonazepam, diazepam, fenolftaleína, alprazolam e lorazepam, e 120 mg L⁻¹ para bromazepam, bisacodil, flurazepam, paroxetina, sibutramina, anfepramona, clordiazepóxido, bupropiona, fluoxetina e sertralina. Os resultados da exatidão e da precisão estão na Tabela 22.

Tabela 21 – Resultados encontrados para a precisão e exatidão.

Fármaco sintético	Precisão (%)	Exatidão % (ponto 1)	Exatidão % (ponto 2)
Furosemida	3,07	86,45	80,85
Fenolftaleína	4,04	95,36	86,20
Bromazepam	2,09	92,54	88,40
Alprazolam	3,42	100,90	83,25
Clonazepam	0,49	111,20	81,60
Lorazepam	5,77	84,00	83,10
Diazepam	5,05	97,00	82,55
Anfepramona	1,66	102,70	96,59
Bisacodil	4,79	82,20	99,39
Clordiazepóxido	3,35	103,32	117,99
Flurazepam	3,25	96,82	82,39
Bupropiona	5,00	94,16	100,70
Paroxetina	0,65	110,01	97,68
Fluoxetina	5,00	89,06	92,60
Sibutramina	3,89	94,53	105,54
Sertralina	5,12	92,04	96,53

5.3.2.3 Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)

O limite de detecção e o limite de quantificação foram calculados através da injeção de cinco replicas. Conforme descrito anteriormente, os resultados estão na Tabela 23.

Tabela 22 – Valores encontrados para o limite de detecção e para o limite de quantificação.

Fármaco sintético	LD (mg L ⁻¹)	LQ (mg L ⁻¹)
Furosemida	0,78	2,59
Fenoltaleína	0,70	2,33
Bromazepam	4,83	16,09
Alprazolam	0,37	1,23
Clonazepam	0,41	1,38
Lorazepam	0,37	1,22
Diazepam	0,99	3,33
Anfepramona	1,89	6,30
Bisacodil	1,92	6,41
Clordiazepóxido	0,73	2,43
Flurazepam	1,63	5,43
Bupropiona	1,70	5,67
Paroxetina	0,62	2,08
Fluoxetina	4,03	13,43
Sibutramina	2,19	7,29
Sertralina	5,18	17,26

5.3.3 Aplicação analítica

Dezoito amostras de formulações farmacêuticas com fins emagrecedores foram analisadas pelo método desenvolvido, com o intuito de verificar casos de adulteração com substâncias sintéticas, as amostras analisadas pelo método estão descritas na Tabela 10. Primeiramente, foi realizado um *screening* em cada uma das dezoito amostras, a fim de identificar a adulteração com algum dos fármacos sintéticos estudados. Foram identificados três casos de adulteração (Tabela 24), todas pela presença de fenolftaleína como mostrados nas Figuras 36, 37 e 38. As amostras 87 e 88 já tinham sido analisadas pelo método AdCSV, as quais só foram confirmadas pelo método cromatográfico.

O adulterante encontrado a fenolftaleína da classe dos laxantes foi retirada do mercado em 2002 por apresentar propriedades cancerígenas, e mesmo assim ela continua sendo utilizada, reforçado assim a importância de um aumento na fiscalização dos produtos naturais.

Tabela 23 - Determinação quantitativa de drogas sintéticas em amostras reais.

Amostra	Composição	Adulterante	Quantidade (mg g ⁻¹)	Ingestão diária (mg) ^a	Dose terapêutica (mg) ^b
73	Agar agar, vit E, vit C, <i>Phaseolus vulgaris</i> , <i>Chlorellapyrenoidosa</i> , furosemida	Fenolftaleína	1,262	2,524	50-200
87	Carnitina 45mg, methionina 50mg,cynara 40mg,l-lisina 20mg, nicotinamida 15mg, picol.cromo 80mcg, bit colina 150mg, betaina 35mg, inositol 80mg, pant. Calcio 10mg, acido fólico 150mg, vit b6 10 mg	Fenolftaleína	9,866	39,464	50-200
88	<i>Centella asiática (L.)</i> 150mg, <i>Rhammus</i> <i>purshiana</i> 5mg CM. cellulose 40mg, asiaticoside 20 mg, <i>Fucus vesiculosus L</i> 90mg , asp. potassium 5mg , collagen 100mg, <i>citrus aurantium L.</i> 80mg	Fenolftaleína	19,73	78,92	50-200

^a Dose diária indicada pelo fabricante.

^b Dose diária recomendada por médicos.

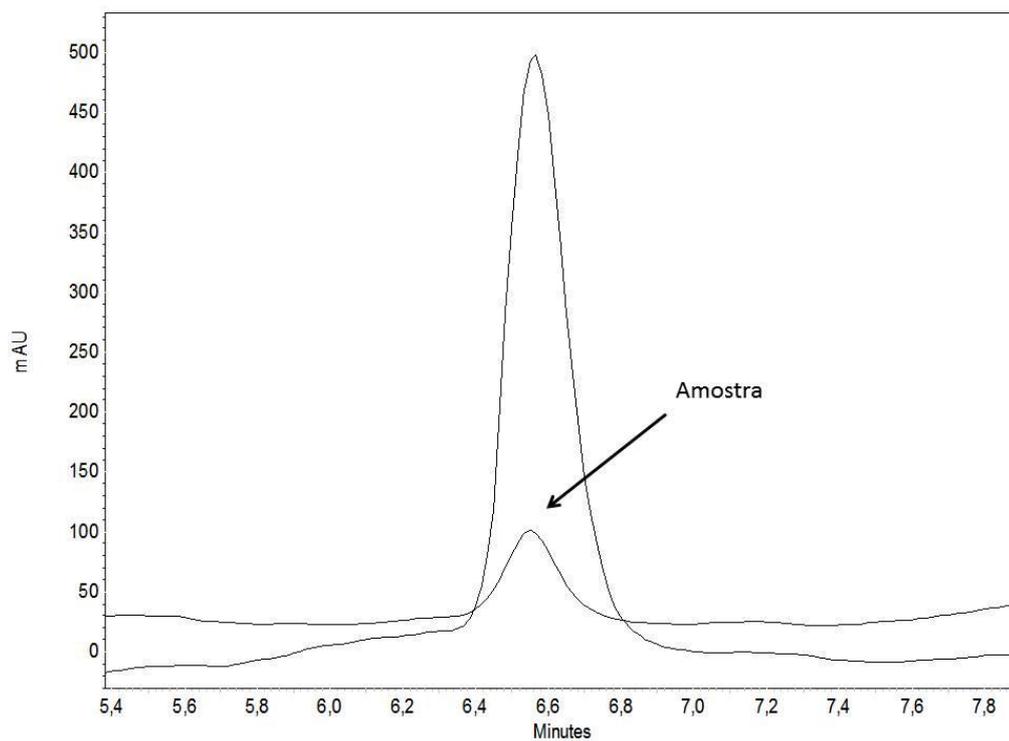


Figura 36 – Cromatograma com a amostra 88 adulterada com a fenolftaleína. Condições otimizadas estão descritas na Tabela 20, pH 4,0, contendo SDS 0,14 mol L⁻¹; coluna C18.

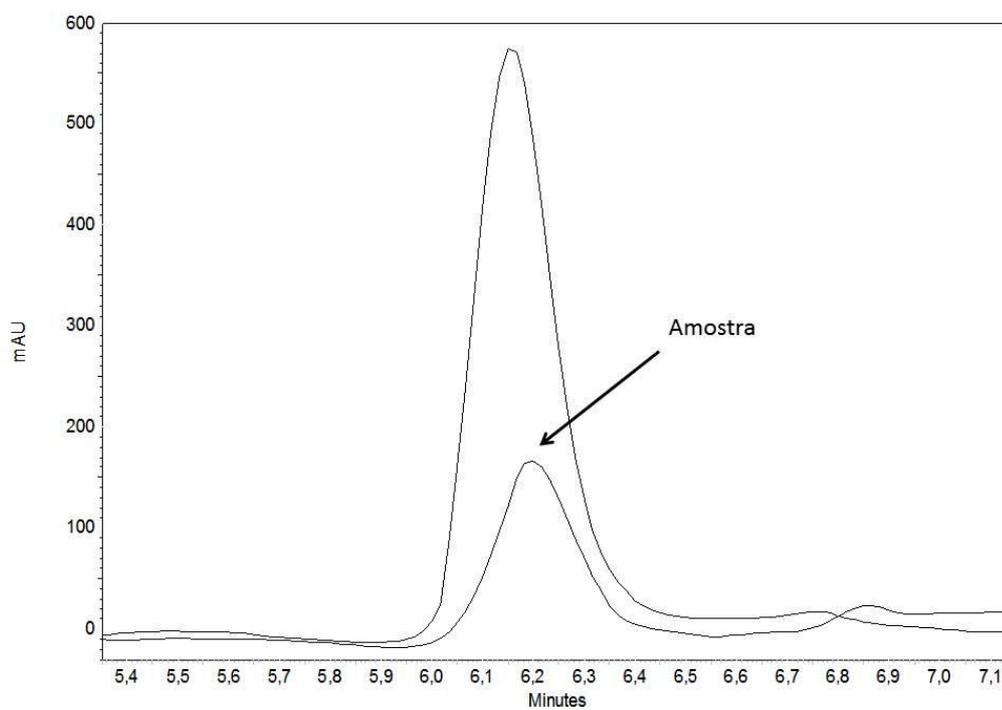


Figura 37 - Cromatograma com a amostra 87 adulterada com a fenolftaleína. Condições otimizadas estão descritas na Tabela 20, pH 4,0, contendo SDS 0,14 mol L⁻¹; coluna C18.

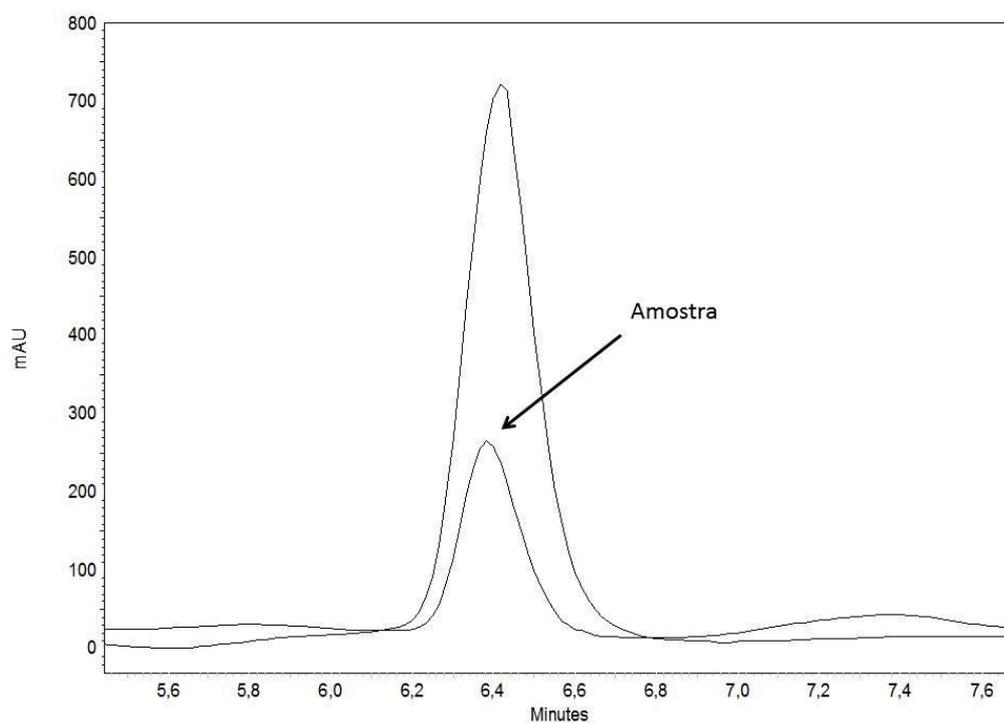


Figura 38 - Cromatograma com a amostra 73 adulterada com a fenolftaleína. Condições otimizadas estão descritas na Tabela 20, pH 4,0, contendo SDS 0,14 mol L⁻¹; coluna C18.

6 ANÁLISE COMPARATIVA DOS MÉTODOS DESENVOLVIDOS

A Figura 39 mostra um esquema resumido dos três métodos desenvolvidos, no qual podemos verificar que os métodos voltamétricos foram desenvolvidos para o *screening* de amostras, já que estes em comparação com o método cromatográfico tem um tempo reduzido de análise (preparo de amostra e medida). O que é de grande importância, pois no estudo de adulterantes em formulações farmacêuticas naturais os métodos de *screening* tem o objetivo de identificar à adulteração, caso seja identificada a adulteração passa-se para o método de separação para a confirmação e quantificação. Além de serem rápidos os métodos voltamétricos desenvolvidos são de baixo custo e utilizam uma pequena quantidade de reagentes comparados com os métodos cromatográficos.

A Tabela 25 faz um comparativo entre os três métodos desenvolvidos indicando as amostras que foram encontradas com adulteração. Sendo que, para fazer um comparativo confiável dos três métodos, teria que se usar o mesmo *pool* de amostras para ambos os métodos. Pois como são amostras de plantas que foram adulteradas, não se tem a garantia de uma homogeneidade da mesma. Só que isso não foi possível, em cada método foi utilizado um *pool* de amostras diferente.

Por isso que quando comparamos o método VIM, que apresentou 15 amostras adulteradas, sendo que todas as amostras foram analisadas pelo método de AdCSV e seis foram analisadas pelo método de IPC, apenas uma amostra foi encontrado um adulterante pelo método de AdCSV, o adulterante encontrado pelo método não é o mesmo, mas são da mesma classe dos ansiolíticos. E sabe-se, como são amostras de formulações naturais as quais foram adulteradas com substâncias sintéticas, poderia sim ser encontrado outro fármaco, já que os dois fármacos são da mesma classe, sendo que o efeito é o mesmo. O fato de nenhum outro fármaco ter sido encontrado por outro método pode ser justificado pelo *pool*, e pode ser justificado pelo método, já que no método VIM, o eletrodo é aplicado diretamente na amostra sólida, podendo assim ter um aumento na sensibilidade.

Já as amostras que foram analisadas pelo método de AdCSV, foram também analisadas pelo método cromatográfico. Apenas duas amostras a 87 e a 88, foram confirmadas pelos dois métodos, as outras amostras que não foram confirmadas,

pode ser que seja pelo *pool*, e pode ser porque o método de AdCSV é bem mais sensível que o método cromatográfico, não detectando assim os adulterantes.

Tabela 24 – Comparação da análise das amostras adulteradas pelos três métodos desenvolvidos.

Amostra analisadas	Adulterante encontrado em cada método		
	VIM	AdCSV	IPC
7	Furosemida (✓)	(✓)	(✓)
12	Furosemida (✓)	(✓)	
15	Lorazepam (✓)	(✓)	
19	Femproporex (✓)	(✓)	
20	Lorazepam (✓)	(✓)	(✓)
21	Lorazepam (✓)	(✓)	(✓)
22	Furosemide (✓)	(✓)	
25	Lorazepam (✓)	(✓)	(✓)
26	Lorazepam (✓)	Clonazepam (✓)	(✓)
27	Lorazepam (✓)	(✓)	(✓)
34	Furosemide (✓)	(✓)	
36	Furosemide (✓)	(✓)	
37	Femproporex (✓)	(✓)	
39	Furosemida (✓)	(✓)	
67	Hidroclorotiazida (✓)	(✓)	
73		(✓)	Fenolftaleína (✓)
75		Clonazepam (✓)	(✓)
87		Fenolftaleína (✓)	Fenolftaleína (✓)
88		Fenolftaleína (✓)	Fenolftaleína (✓)
89		(✓)	(✓)
101		Clonazepam (✓)	(✓)

(✓): Sinal para identificar em qual método a amostra foi analisada.

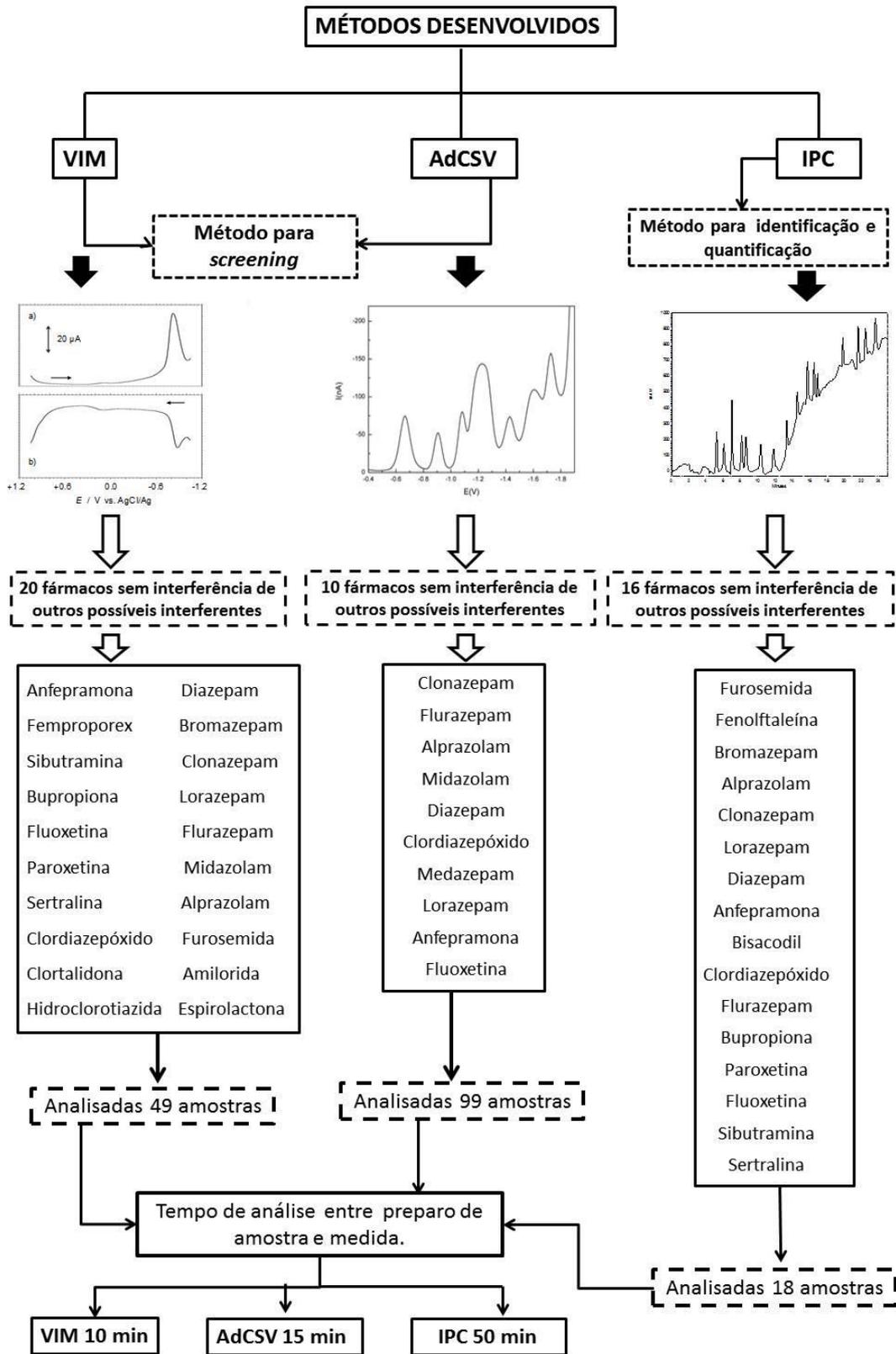


Figura 39 – Esquema comparativo dos três métodos desenvolvidos para análise de adulteração.

7 CONCLUSÕES

Através do método VIM, pode-se realizar um *screening*, rápido das amostras em estado sólido, sem necessidade de preparo ou tratamento das mesma. Este foi aplicado no *screening* de 49 amostras, destas 15 apresentaram adulteração por fármacos da classe dos anorexígenos, ansiolíticos e diuréticos.

O método analítico desenvolvido usando voltametria de micropartículas imobilizadas para a determinação de fármacos é ainda pouco descrita na literatura, sendo que o seu emprego na determinação de adulterantes em formulações fitoterápicas a base de produtos naturais é de caráter inédito.

O método por AdCSV, também se mostrou um método rápido é fácil para *screening* de amostras, sendo que a amostra não necessita de etapas de filtração a única etapa é a dissolução da amostra em metanol. O método foi validado sob os parâmetros de especificidade, linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção e de quantificação.

O método por AdCSV, foi aplicado no *screening* de 99 amostras de formulações farmacêuticas naturais, destas 5 apresentaram adulteração por ansiolíticos e laxantes, foi necessário um método de separação para poder identificar duas amostras, pois o bromazepam apresenta o mesmo potencial de pico que a fenolftaleína, e esta foi identificada no método cromatográfico.

O método por IPC foi desenvolvido com o objetivo de identificação e quantificação das amostras, tendo dois métodos citados acima para *screening*. O método foi validado sob os parâmetros de especificidade, linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção e de quantificação, apresentando resultados dentro dos limites preconizados para a aplicação dos mesmos.

O método cromatográfico foi aplicado no *screening* de 18 amostras e destas 3 estavam adulteradas por laxantes (fenolftaleína). Sendo que, o adulterante encontrado nas amostras foi retirado do mercado em 2002, já que este pode causar sérios riscos à saúde.

Os métodos usando voltametria de redissolução catódica e cromatografia de par iônico já foram descritas na literatura para a determinação de fármacos em formulações fitoterápicas. No entanto, não há nenhum trabalho descrito na literatura utilizando as mesmas classes que foram utilizadas nestes trabalhos, para a determinação destas na condição de adulterantes em formulações farmacêuticas naturais.

Os métodos desenvolvidos apresentam boa sensibilidade para a determinação de adulterantes em formulações farmacêuticas naturais. Pois, caso seja encontrado um adulterante em uma formulação farmacêutica, este não vai estar em uma concentração tão baixa, vai estar próximo à dose terapêutica, porque do contrário não vai realizar o efeito desejado. Sendo assim, os métodos desenvolvidos conseguem detectar limites bem inferiores aos níveis esperados para os adulterantes.

Com tudo isso, podemos verificar a importância de metodologias analíticas para identificar e quantificar a adulteração em produtos naturais com fármacos sintéticos, já que substâncias que estão proibidas continuam a ser utilizadas de forma ilegal.

Seria importante uma regulamentação unificada pelos órgãos governamentais para o controle de produtos fitoterápicos. Cada país tem a sua legislação, porém a comercialização destes produtos é mundial. Talvez por isso a adulteração de produtos naturais vem sendo uma prática recorrente em diversas partes do mundo. No entanto, uma regulamentação efetiva para os produtos de origem natural, poderia resultar na redução destas infrações, ou punição dos infratores, garantindo assim os direitos dos consumidores de realizar um tratamento de qualidade, seguro e eficaz, sem prejuízo à saúde.

8 REFERÊNCIAS

ABT, A.B. et al. Chinese herbal medicine induced acute renal failure. **Archives of Internal Medicine**, v. 155, p. 211-212, 1995.

AL-GHAMDI, A.H.; AL-GHAMDI, A.F.; AL-OMAR, M.A. Electrochemical studies and square-wave adsorptive stripping voltammetry of spironolactone drug. **Analytical Letters**. v. 41, p. 90-103, 2008.

ALMEIDA, A.E.; RIBEIRO, M.L. High-performance liquid chromatographic determination of amfepramone hydrochloride, mazindol, and diazepam in tablets. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 22, p. 1759-1769, 1999.

ALMEIDA, A.E.; RIBEIRO, M.L.; POLESE, L. Determination of amfepramone hydrochloride, femproporex, and diazepam in so-called "natural" capsules used in the treatment of obesity. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 23, n. 7, p. 1109-1118, 2000.

ANASTOS, N.; BARNETT, N.W.; LEWIS, S.W. Capillary electrophoresis for forensic drug analysis: A review. **Talanta**, v. 67, p. 269-279, 2005.

ANDERSON, L.A. Concern regarding herbal toxicities: case reports and counseling tips. **Ann Pharmacother**, v. 30, p. 79-80, 1996.

ANONYMOUS: Cadmium and lead exposure associated with pharmaceuticals imported from Asia — **Texas; MMWR**, v. 8, p. 612, 1989.

APARICIO, X. et al. Determination of a buspirone metabolite in plasma samples, **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 6, p. 945-958.1988.

ARTHRITIS FOUNDATION, Personal communication; January 1991.

ASSONUMA MM. **Determinação de alantoína e avaliação farmacológica de *Cordia ecalyculata* Vell (chá de bugre)**. Dissertação. Universidade Estadual Paulista. Araraquara: sp, 2009.

AU, A.M. et al. Screening methods for drugs and heavy metals in Chinese patente medicines. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 65, p. 112-119, 2000.

AURICCHIO, M.T.; BATISTIC, M.A.; MARKMAN, B.E.O. Detecção de anorexígenos e benzodiazepínicos em formulações “naturais” empregadas em regimes de emagrecimento. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 51, p. 105-110, 1991.

AZEREDO, F.S. et al. Validação de técnica analítica em cromatografia em camada delgada comparativa para identificação de fármacos anorexígenos sintéticos em produtos fitoterápicos. **Infarma**, v. 17, n. 5/6, p. 86-88, 2005.

BOGUSZ, M.J.; TUFAIL, M.A.; HASSAN, H: How natural are “natural herbal remedies”? A Saudi perspective. **Adverse drug reactions and toxicological reviews**, v. 21, p. 219-229 2002.

BRASIL. Agência Nacional da Vigilância Sanitária. **Resolução 571 de 2002**. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/divulga/informes/2002/090402.htm>. Acesso em, 17 dezembro de 2013.

BRASIL. Agência Nacional da Vigilância Sanitária. **Resolução, RDC N° 48 de 16 de março de 2004**. Disponível em <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=10230&word=> Acesso em, 17 dezembro de 2013.

BRASIL – Ministério da Saúde – Política Nacional de Plantas Medicinais e Medicamento Fitoterápicos. Ministério da Saúde, Brasília 2006. Disponível em http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/politica_nacional_fitoterapicos.pdf. Acesso em, 17 dezembro de 2013.

BRASIL. Agência Nacional da Vigilância Sanitária. **Resolução, RDC N° 52 de 6 de outubro de 2011**. http://portal.anvisa.gov.br/wps/portal/anvisa/anvisa/busca!/ut/p/c5/jZDJboNADlafhQeIxqFhKEcyLMMSIhTCckEQAkUQoCVqRzx9QOo1qPbJ-vXZ8odStHSf_zR1_miGPu9QjFKcWT41dABecoN3BYxDcKaSRVxtv1_yBGfwomRYa aLL9CDay4yPBAXdcLDguwDuH_0y5_9ze2P7Nm2itO6GYvkxUq4tUwa5VITIPM1H6GjBm-6gN6pJCvUeLZw8t7aqpRYlloDkRNghZdO9az4bHcZfe2760mFx6aPXX7KvmYIz5CWpYX9gtOGcBjZ0qY8kde0r83CRfdKQQ9Hqe9vAmm_4dehwv6HxHobxfGsrmeOeNybe4g!!/?

1dmy&urile=wcm%3apath%3a//Anvisa%20Portal/Anvisa/Conteudo%20Destaque%20-%20Inicio/Anvisa%20propoe%20banir%20inibidores%20de%20apetite. Acesso em, 17 dezembro de 2013.

BY, A. et al. Black Pearl: Identification and chromatographic determination of some undeclared medicinal ingredients. **Journal of Chromatography A** v. 469, p. 406-411, 1989.

CAIRNS T, SIEGMUND EG, RADER BR, Identification of prescription drugs in adulterated Chinese herbal medicines. **Pharm Research**, v. 4, p. 126-129, 1987.

CARVALHO, A.C.B. et al. Situação do registro de medicamentos fitoterápicos no Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 2, p. 314-319, 2008.

CARVALHO, L.M. de. Et al. Voltammetric behavior of amfepramone (diethylpropion) at the hanging mercury drop electrode and its analytical determination in pharmaceutical formulations. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 18, p. 789-796, 2007.

CARVALHO, LM. Et al. Voltametria de micropartículas imobilizadas: fundamentos e aplicações Analíticas. **Química Nova**, v. 33, p. 1765-1772, 2010 (a).

CARVALHO, LM. Et al. A new method for the simultaneous determination of 1,4-benzodiazepines and amfepramone as adulterants in phytotherapeutic formulations by voltammetry. **Forensic Science International**, v. 202, p. 75–81, 2010 (b).

CARVALHO, L. M. de. Et al. Presence of synthetic pharmaceuticals as adulterants in slimming phytotherapeutic formulations and their analytical determination. **Forensic Science International**, v. 204, p. 6-12, 2011 (a).

CARVALHO, L. M. de; et al. The Illegal Use of Synthetic Pharmaceuticals in Herbal Formulations: An Overview of Adulteration Practices and Analytical Investigations. **Forensic Science Review**, v. 23, n. 2, p. 73-90, 2011(b).

DE CARVALHO, L.M. et al. Pulsed amperometric detection (PAD) of diuretic drugs in herbal formulations using a gold electrode following ion-pair chromatographic separation. **Journal of Solid State Electrochemistry**, v.17, p.1601-1608, 2013.

CELLENO, L. et al. A Dietary Supplement Containing Standardized *Phaseolus vulgaris* Extract Influences Body Composition of Overweight Men and Women. **International Journal of Medical Sciences**, vol. 4, p. 45-52, 2007.

CIANCHINO, V. et al. Analysis of potential adulteration in herbal medicines and dietary supplements for the weight control by capillary electrophoresis. **Food Chemistry**, v. 108, p. 1075-1081, 2008.

CHAVES, M.A.; AKATUKA, A.S.; TRUJILLO, L.M. Dietilpropiona, femproporex, diazepam e fenofltaína: Determinação em formulações para emagrecimento. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 54, n. 1, p. 36-43, 1994.

CHEN Y-F, et al. Identification of the adulteration in Chinese herbal preparations with chemical drugs and their toxicities. **Annals of Emergency Medicine-1944 Toxicology World Congress Abstracts**; p. 717; December 1995.

CHEN, S.P.L. et al. Psychosis associated with usage of herbal slimming products adulterated with sibutramine, A case series. **Clinical Toxicology**, v. 48, p. 832, 2010.

COHEN, P.A. Imported fenproporex-based diet pills from Brazil: A report of two cases. **Journal of General Internal Medicine**, v. 24, p. 430-433, 2009.

COHEN, P.A. ERNEST, E. Safety of Herbal Supplements. A Guide for Cardiologists; **Cardiovascular Therapeutics**, v. 28, p. 246-253, 2010.

COHEN, P.A; GODAY, A; SWANN, J.P. The Return of Rainbow Diet Pills. **American Journal of Public Health**. p. e1-e11, 2012.

COLLINS, C. H. & GUIMARAES, L. F. L., **Introdução a Métodos Cromatográficos**. 3a ed. São Paulo: Ed. UNICAMP, p 179 – 243, 1988.

COOPER R, MORRÉ J, MORRÉ DM. Medicinal benefits of green tea: part I. review of noncancer health benefits. **The Journal of Alternative and Complementary Medicine**, v. 11, p. 521-528, 2005.

CORREIA, D. **Determinação voltamétrica de 1,4-benzodiazepínicos e dietilpropiona como adulterantes em fitoterápicos para emagrecimento.** Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Santa Maria, Brasil, 2008.

CUNHA, C.L.et al. Revisão e avaliação crítica da incidência de fármacos anorexígenos sintéticos em “produtos naturais” para o emagrecimento em Goiânia-GO. **Revista Brasileira de Toxicologia**, v. 15, p. 69-73, 2002.

DEF Dicionário de Especialidades Farmacêuticas. **Jornal Brasileiro de Medicina**. 2007/2008.

DOMÉNECH-CARBÓ, A; DOMÉNECH-CARBÓ, MT; SAURI-PERIS, MC; Electrochemical identification of flavonoid dyes in solid work of art samples by abrasive voltammetry at paraffinimpregnated graphite electrodes. **Talanta**, v.66, p. 769-782, 2005.

DOMÉNECH-CARBÓ, A; COSTA, VA; DOMÉNECH-CARBÓ, MT, Electrochemical Methods in Archaeometry, Conservation and Restoration. **Springer Berlin**, 2010 (a).

DOMÉNECH-CARBÓ, A; Voltammetric methods applied to identification, speciation, and quantification of analytes from works of art: an overview. **Journal of Solid State Electrochemistry**, 14, 363-379, 2010 (b).

DOMÉNECH-CARBÓ, A; DOMÉNECH-CARBÓ, MT, CALISTI, M.; Sequential identification of organic dyes using the voltammetry of microparticles approach. **Talanta**, v. 81, p. 404-414, 2010 (c).

DOMÉNECH-CARBÓ, A; DOMÉNECH-CARBÓ, MT; AGREDOS-PASCUAL, MLV; **Angewandte Chemie (International Edition)** 50, 5740, 2011.

DOMENECH-CARBO, A. et al. Screening of pharmacologic adulterant classes in herbal formulations using voltammetry of microparticles. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 74, p. 194– 204, 2013.

DOMENECH-CARBO, A. et al. Standard additions-dilution method for absolute quantification in voltammetry of microparticles. Application for determining psychoactive 1,4-benzodiazepine and antidepressants drugs as adulterants in phytotherapeutic formulations. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 80, p. 159– 163, 2013.

DOS SANTOS, M. M. C.; FAMILLO, V.; GONÇALVES, M. L. S. Square-wave voltammetric techniques for determination of psychoactive 1,4-benzodiazepine drugs. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 374, p. 1074-1081, 2002.

EL-ENANY, N.; BELA, F.; RIZK, M. Voltammetric analysis of trazodone HCl in pharmaceuticals and biological fluids. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 30, p. 219-226, 2002.

EL-HEFNAWY, G.B. et al. Electrochemical behavior and determination of amiloride drug in bulk form and pharmaceutical formulation at mercury electrodes. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 34, p. 899-907, 2004.

FENG, L. et al. A new method for testing synthetic drugs adulterated in herbal medicines based on infrared spectroscopy. **Analytica Chimica Acta**, v. 589, p. 200-207, 2007.

Fetrow, C.W.; Avila, J.R. Manual de medicina alternativa. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, 2000. 743p.

FIEDLER, D. A.; SCHOLZ, F. Em *Electroanalytical Methods: Guide to Experiments and Applications*; Scholz, F., ed.; **Springer: Berlin**, 2005, cap. II.8.

FRANCISCHI, R.P. et al. Obesidade: Atualização Sobre Sua Etiologia, Morbidade e Tratamento. **Revista de Nutrição**, v. 13 p. 17-28, 2000.

FRASER, D.B. et al. Determination of undeclared prescription drugs in black pearl products. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 5, p. 329-336, 1997.

GERTNER, E. et al. Complications resulting from the use of Chinese herbal medications containing undeclared prescription drugs. **Arthritis & Rheumatology**, v. 38, p. 614-617, 1995.

GRYGAR, T. et al. Collect. Czech. Electrochemical analysis of solids: a review. **Collection of Czechoslovak Chemical Communications**, 67, p.163-208, 2002.

GHONEIM, M.M. et al. Electrochemical determination of muscle relaxant drug tetrazepam in bulk form, pharmaceutical formulation, and human serum. **Chemical Papers**, v. 62, p. 127-134, 2008.

GOUGEON, R. et al. Increase in the Thermic Effect of Food in Women by Adrenergic Amines Extracted from Citrus Aurantium. **Obesity Research**, vol. 13, p. 1187-1194, 2005.

GUNNAR, T.; ARINIEMI, K.; LILLSUNDE, P. Determination of 14 benzodiazepines and hydroxy metabolites, zaleplon and zolpidem as tert-butyldimethylsilyl derivatives compared with other common silylating reagents in whole blood by gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 818, p. 175-189, 2005.

HANCU, G.; GÁSPÁR, A.; GYÉRESI, A. Separation of 1,4-benzodiazepines by micellar electrokinetic capillary chromatography. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v. 69, p. 251-259, 2007.

HAMMAM, E. Behavior and quantification studies of amiloride drug using cyclic and square-wave adsorptive stripping voltammetry at a mercury electrode. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 34, p. 1109-1116, 2004.

HAMMAM, E. Determination of Triamcinolone Acetonide in Pharmaceutical Formulation and Human Serum by Adsorptive Cathodic Stripping Voltammetry. **Chem. Anal.-Warsaw**. v. 52, p. 43-53, 2007.

JAIN, R.; RATHER, J.A.; DWIVEDI, A. Voltammetric behaviour of nitroxazepine in solubilized system and biological fluids. **Materials Science and Engineering: A**, v. 31, p. 230-237, 2011.

JAGER, A.V.; TAVARES, M.F.M. Determinação simultânea de cátions por eletroforese capilar: fundamentos e aplicações. **Química Nova**, v. 24, n. 3, p. 363-373, 2001.

JUNG, J.; HERMANNIS-CLAUSEN, M.; WEINMANN, W. Anorectic sibutramine detected in a Chinese herbal drug for weight loss. **Forensic Science International**, v. 161, p. 221-222, 2006.

JUNIOR, V.F.V.; PINTO, A.C.; MACIEL, M.A.M. Plantas medicinais: cura segura?. **Química Nova**, v.28, n. 3, p. 519-529, 2005.

KANAN, S.et al. Detection and quantification of synthetic drugs in herbal slimming formula. **European Journal of Scientific Research**, v. 34, p. 348-357, 2009.

KASTNER, P., KLIMEŠ, J. Príspevek ke studii rp-hplc retencnich charakteristik benzodiazepinu v podminkach iontove parove chromatografie. **Ceska a Slovenska Farmacie**, v. 46, p. 84-87,1997.

KOH H-L, WOO S-O: Chinese proprietary medicine in Singapore — Regulatory control of toxic heavy metals and undeclared drugs. **Drugs Safety**, v. 23, p. 351-362, 2000.

KOMORSKY-LOVRIC, S; GALIC, I; PENOVSKI, R; **Electroanalysis**, 11, 120, 1999.

KOMORSKY-LOVRIĆ, Š; NIGOVIĆ, B; **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis** 36, 41, 2004.

KOMORSKY-LOVRIĆ, Š.; NIGOVIĆ, B; **Journal of Electroanalytical Chemistry**, 593, 125, 2006.

KU Y-R, TSAI M-J, LIN J-H, WEN K-C, Micellar electrokinetic capillary chromatography of clobenzorex HCl and diazepam adulterated in anorexiant traditional Chinese medicine. **Chinese Pharmaceutical Journal** , v. 48, p. 157-165, 1996.

KU, Y.-R. et al. Analysis and confirmation of synthetic anorexics in adulterated traditional Chinese medicines by high-performance capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v. 848, p. 537-543, 1999.

KORNHUBER, J. Identification of New Functional Inhibitors of Acid Sphingomyelinase Using a Structure-Property-Activity Relation Model. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 51, p. 219–237, 2008.

KURIYAN, R. et al.Effect of Caralluma Fimbriata extract on appetite, food intake and anthropometry in adult Indian men and women. **Appetite**, v. 48, p. 338-344, 2007.

LAI, K-C. et al. Isolation and identification of a sibutramine analogue in a healthy food for weight loss. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 15, p. 20-24, 2007.

LIANG, Q. et al. Rapid and reliable determination of illegal adulterant in herbal medicines and dietary supplements by LC/MS/MS. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. V. 40, n. 2, p. 305-311, 2006.

LIMA, A. P. S. **Desenvolvimento de métodos eletroforéticos cromatográficos para a determinação de benzodiazepínicos como adulterantes em formulações fitoterápicas para emagrecimento**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Santa Maria, Brasil, 2009.

LÔBO, C. R. Cáscara Sagrada (*Rhamnus purshiana*): Uma Revisão de Literatura Sacred Bark (*Rhamnus purshiana*): A Literature Review. **Revista de Divulgação Científica Sena Aires**. V. 2, P. 171-178, 2012.

LOW, M-Y. et al. Safety and quality assessment of 175 illegal sexual enhancement products seized in red-light districts in Singapore. **Drugs Safety**, v. 32, p. 1141-1146, 2009.

LURIE, I.S. Capillary electrophoresis of illicit drug seizures. **Forensic Science International**, v. 92, p. 125-136, 1998.

MANCINI, M. C.; HALPERN, A. Pharmacological treatment of obesity. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 50, n. 2, p. 377-389, 2006.

MANNA, L., VALVO, L., ALIMONTI, S. A liquid chromatographic ion-pairing method for simultaneous determination of benazepril hydrochloride, fosinopril sodium, ramipril and hydrochlorothiazide in pharmaceutical formulations. **Chromatographia** v. 53, pp. P. S271-S275, 2001.

MANERA M, La Food and Drug Administration (FDA) alerta a los consumidores de la presencia de ingredientes farmacológicos en los complementos alimenticios para la pérdida de peso en Estados Unidos. **Actividad Dietética**, v. 13, p. 43-44 2009.

MCAVOY, Y.; COLE, M.D.; GUENIAT, O. Analysis of amphetamines by supercritical fluid chromatography, high-performance liquid chromatography, gas chromatography and capillary zone electrophoresis a preliminary comparison. **Forensic Science International**, v. 102, p. 13-22, 1999.

MIKAMI, E. et al. Simultaneous analysis of seven benzodiazepines in dietary supplements as adulterants using high performance liquid chromatography and its application to an identification system for diazepam. **Journal Health Science**, v. 51, p. 278-283, 2005.

MILLER GM, STRIPP R, A study of western pharmaceuticals contained within samples of Chinese herbal/patent medicines collected from New York City's Chinatown. **Legal Medicine**, v. 9, p. 258-264, 2007.

MORENO, R.A.; MORENO, D.H.; SOARES, M.B.M. Psicofarmacologia de antidepressivos. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v.21, p. 24-40, 1999.

MORITZ, M.I.G. et al. Identification of undeclared synthetic drugs in herbal products commercialized in Brazil: The "Indiano Talun" case. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 27, p. 274-222, 2008.

NAPPO, S.A.; CARLINI, E.A. Revisão: medicamentos anorexígenos. **Infarma**, p. 6-9, 1993.

NELSON, L.; SHIH, R.; HOFFMAN, R. Aplastic anemia induced by an adulterated herbal medication. **Journal of Clinical Toxicology** , v. 33, p. 467-470, 1995.

NEWTON, D.W.; KLUZA, R.B. pK Values of Medicinal Compounds in Pharmacy Practice. *Drug Intelligence and Clinical Pharmacy*, v. 12, p. 546-554, 1978.

NIGOVIC, B; KOMORSKY-LOVRIC, Š; **Croatica Chemica Acta**, 81, 3, 2008.

NOUWS, H.P.A. et al. Electroanalytical study of the antidepressant sertraline. **J. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 39, p. 290-293, 2005.

NOUWS, H.P.A. et al. Electroanalytical determination of paroxetine in Pharmaceuticals. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 42, p. 341-346, 2006.

NOUWS, H. et al. J.A. Square-Wave Adsorptive-Stripping Voltammetric Detection in the Quality Control of Fluoxetine. **Analytical Letters**, v. 40, p. 1131-1146, 2007.

OFFERHAUS L, DUKE MNG, SMITS HM: "Herbal" medicines and rheumatoid arthritis. **British Medical Journal**, v. 2, p. 668, 1979.

OGA, S.; CAMARGO, M.M. DE A. BATISTUZZO, J.A DE O.; **Fundamentos de Toxicologia**, 3ª Ed. 2008.

OKUDA, T., YAMASHITA, K.,MOTOHASHI, M. High-performance liquid chromatography using on-line solid-phase extraction: Determination of furosemide in human serum. **Journal of Chromatography B: Biomedical Applications**, v. 682 p. 343-348, 1996.

OLIVEIRA, F.; AKISUE, G. **Fundamentos de Farmacobotânica**. Ed. Ateneu 2ª ed. São Paulo, 2000.

OSTERYOUNG, J.; SCHREINER, M. M. Recents Advances in Pulse Voltammetry. **CRC Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v.19, p.S1-S27, 1988.

PARODI, B.et al. Herbal mixtures with claimed slimming activity: Determination by TLC and HPLC of illegally added drugs. **Pharmazie**, v. 48, p. 678-681, 1993.

PEIXOTO, H.G.E.et al. Antidepressivos e alterações no peso corporal. **Revista de nutrição**, v.21, p. 341-348, 2008.

PIRNAY, S. et al. Sensitive method for the detection of 22 benzodiazepines by gas chromatography-ion trap tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 954, p. 235-245, 2002.

PREUSS, H.G. et al. Efficacy of a novel, natural extract of (-)-hydroxycitric acid (HCA-SX) and a combination of HCA-SX, niacin-bound chromium and *Gymnema sylvestre* extract in weight management in human volunteers: a pilot study. **Nutrition Research**, vol. 24, p.45-58, 2004.

RIBANI, M. et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, N. 5, p. 771-780, 2004.

RIVM Report 370030002/2009, Trends in drug substances detected in illegal weight-loss medicines and dietary supplements. A 2002–2007 survey and health risk Analysis.

SAITO, M. et al. High dose of *Garcinia cambogia* is effective in suppressing fat accumulation in developing male Zucker obese rats, but highly toxic to the testis. **Food and Chemical Toxicology**, vol 43, p. 411-419, 2005.

SANTOS, R. Intervenção Farmacêutica na Obesidade (Guia Prático). **Associação Nacional de Farmácias**. 1ª Edição, 2007.

SCHOLZ, F.; NITSCHKE, L.; HENRION, G.; A new procedure for fast electrochemical analysis of solid materials. **Naturwissenschaften**, v. 76, p. 71-72, 1989 (a).

SCHOLZ, F. et al. A technique to study the electrochemistry of minerals. **Naturwissenschaften**, v. 76, p. 167-168, 1989 (b).

SCHOLZ, F. et al. Identification of solid materials with a new electrochemical technique — the abrasive stripping analysis. **Analytical Chemistry**, v. 334, p. 56-58, 1989 (c).

SCHOLZ, F. et al. Analytical Chemistry ,1989, 335, 189 (d).

SKOOG, D.A. et al. **Fundamentos de Química Analítica**. São Paulo: Ed. Thomson, 2007.

SILVA, J.A.F. da. Detecção eletroquímica em eletroforese capilar. **Química Nova**, v. 26, n. 1, p. 56-64, 2003.

SILVA, P. **Farmacologia**. 7a ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S. A., 2006.

SIMÕES, C.M.O. et al. (Org) **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Santa Catarina: Editora UFRGS, 2004.

SIMPSON CF: **Practical High Performance Liquid Chromatography**. Edited by Simpson CF. London: Heyden & Son; 1978.

SNYMAN, T. et al. Adulteration of South African Traditional Herbal Remedies. **Therapeutic Drug Monitoring**, v. 27, p. 86-89, 2005.

SOMBRA, L.B. et al. Comparative study between capillary electrophoresis and high performance liquid chromatography in x0201; guaranax0201; based phytopharmaceuticals. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 36, p. 989-994, 2005.

SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; DOLAN, J. W. Introduction to modern liquid chromatography, Terceira edição, **A John Wiley & Sons, Inc., Publication**, 2010.

SUCKOW, R.F., COOPER, T.B. Simultaneous determination of amitriptyline, nortriptyline and their respective isomeric 10-hydroxy metabolites in plasma by liquid chromatography. **Journal of Chromatography**, v. 230, p. 391-400, 1982.

TAGLIARO, F.; TURRINA, S.; SMITH, F.P. Capillary electrophoresis: principles and applications in illicit drug analysis. **Forensic Science International**, v. 77, p. 211-229, 1996.

TAVARES, M.F.M. Mecanismos de Separação em Eletroforese Capilar. **Química Nova**, v. 20, n. 5, p. 493-511, 1997.

TAY, S.A.B.; JOHNSTON, M.A. Quality of imported herbal products; **Medical Journal of Australia**, v. 151, p. 52, 1989.

TONHI, E. et al. Fases estacionarias para cromatografia liquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE-FR) baseadas em superficies de óxidos inorgânicos funcionalizados. **Química Nova**, São Paulo, v. 25, n. 4, p. 616-623, 2002.

TSENE M-C, TSAI M-J, WEN K-C: Quantitative analysis of caffeine, ethoxybenzamide, chlorzoxazone, diazepam and indomethacin illegally adulterated in Chinese medical pills. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 5, p. 78-80, 1997.

TYSZCZUK, K. Determination of Diazepam, Temazepam and Oxazepam at the Lead Film Electrode by Adsorptive Cathodic Stripping Voltammetry. **Electroanal**, v. 22, p. 1975-1984, 2010.

VAYSSE, J. et al. Analysis of adulterated herbal medicines and dietary supplements marketed for weight loss by DOSY H-NMR; **Food Additives and Contaminants**, v. 27, p. 903-916, 2010.

VANDER STRICHT, B.I. et al. Remedies may contain cocktail of active drugs. **British Medical Journal**, v. 308, p. 1162, 1994.

VELA, M.H.; QUINAZ GARCIA, M.B.; MONTENEGRO, M.C.B.S.M. Electrochemical behaviour of sertraline at a hanging mercury drop electrode and its determination in pharmaceutical products. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 369, p. 563-566, 2001.

WANG, J. Stripping analysis: principles, instrumentation and applications. **Weinheim: Wiley - VCH**, 1985.

WANG, J.; CHEN, B.; YAO, S. Analysis of six synthetic adulterants in herbal weight-reducing dietary supplements by LC electrospray ionization-MS. **Food Additives and Contaminants**, v. 25, p. 822-830, 2008.

ZUMAN, P. The elucidation of organic electrode processes. **Academic Press**, p. 21-24, 1969.

YEE S-K, CHU S-S, XU Y-M, CHOO P.L. Regulatory control of Chinese proprietary medicines in Singapore. **Health Policy**, v. 71, p. 133-149, 2005.