

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

**DETERMINAÇÃO VOLTAMÉTRICA DE 1,4-
BENZODIAZEPÍNICOS E DIETILPROPIONA COMO
ADULTERANTES EM FITOTERÁPICOS PARA
EMAGRECIMENTO**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

DANIELE CORREIA

Santa Maria, RS, Brasil

2008

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

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**DETERMINAÇÃO VOLTAMÉTRICA DE 1,4-BENZODIAZEPÍNICOS E
DIETILPROPIONA COMO ADULTERANTES EM FITOTERÁPICOS
PARA EMAGRECIMENTO**

elaborada por
Daniele Correia

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Química

COMISSÃO EXAMINADORA:

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

Renata Pereira Limberger, Dra. (UFRGS)

Solange Cristina Garcia, Dra. (UFSM)

Santa Maria, 12 de Setembro de 2008.

Dedico este trabalho

*Aos amores da minha vida... à minha família,
ao meu pai **Gilberto**, a minha mãe **Rosani**, meus eternos mestres que guiaram meus
primeiros passos, ensinaram as primeiras palavras, ensinaram os maiores valores
da vida: caráter, respeito e amor....*

obrigada por me concederem a vida, pelo incentivo, dedicação,

e por acreditarem em mim:

*a minha irmã **viviani**,*

*ao meu noivo, **Fábio**,*

pelo carinho, amor, companheirismo,

apoio e paciência;

*e aos maravilhosos e fiéis **amigos***

pela força e pelo apoio.

Obrigada por tudo! Amo vocês!

*"De tudo, ficaram três coisas:
a certeza de que estamos sempre começando.....
a certeza de que precisamos continuar....
a certeza de que seremos interrompidos antes de terminar....*

*Portanto, devemos:
Fazer da interrupção um caminho novo
da queda um passo de dança
do medo, uma escada
do sonho, uma ponte
da procura, um encontro."*

(Fernando Pessoa)

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Leandro Machado de Carvalho pelo apoio, sabedoria, paciência. Por fazer despertar em mim a curiosidade que nos é pertinente nesta profissão, ter senso crítico e principalmente à importância da frase: “vamos nos dar um prazo”. O meu sincero agradecimento pela orientação e por todas as contribuições à minha formação pessoal e profissional.

Ao Prof. Dr. Paulo Cícero do Nascimento e à Prof^a. Dr^a. Denise Bohrer do Nascimento pela amizade e pelo esclarecimento de dúvidas pertinentes no desenvolvimento deste trabalho.

À Prof^a. Dr^a. Solange pelo apoio, esclarecimento de dúvidas e pela colaboração neste trabalho.

Aos colegas e amigos do LACHEM Luciana Del Fabro, Daiane Dias, Claudia Carvalho, Juliane Froncheti, Eduarda, Júlia Garmatz, Michele Sauer, Marieli Marques, Adrian Ramirez, Sabrina Schirmer, Emilene Becker, Ana Paula Lima, Cristiane Spengler, Carine Iggli, Marlei Veiga, Raquel Stefanello, Denise Bertagnolli Simone Noremberg, Cristiane Jost, Maurício Hilgemann, Sandra Ribeiro, Vanessa Mörschbacher, Alexandre Schneider Lara Saccol, Alice Raabe, Guilherme Radis, Cibele Canabarro e Fabiane Stringhini, Adriana Berggrav pelo incentivo, apoio, conselhos e pelos momentos de descontração vividos ao longo deste período em que trabalhamos juntos.

As minhas amigas e colegas Daiane Dias, Luciana D. Del Fabro, Juliane F. de Moura, Mariele S. Marques e Emilene Becker, pessoas fundamentais para o meu crescimento profissional e principalmente pessoal. Companheiras para todos os momentos sendo eles de alegria ou tristeza. Amo vocês.

À Dai minha fiel amiga para todas as horas, parceira nas noites intermináveis de medidas no laboratório “caverna”, nossas jantãs e “geladas”, e esclarecimentos de dúvidas pertinentes neste trabalho. Com você aprendi muita coisa e para sempre vou guardar sua frase: “cada um tem o que merece”. Amiga você faz falta... amo você.

À Luluzinha e a Jujuzinha pelo companheirismo, incentivo nos bons e maus momentos, pelo carinho e pelos esclarecimentos de dúvidas pertinentes no desenvolvimento deste trabalho. Nossa amizade é eterna... amo vocês.

À minha irmã Viviani Correia, pelo amor, carinho, incentivo, dedicação. Amo-te.

Mãe, a mulher mais forte que existe, batalhadora, guerreira, amorosa, exemplo de vida. Amo-te.

Ao meu amor Fábio Mallmann Zimmer, pelo amor, companheirismo, incentivo, dedicação, ensinamentos profissionais e principalmente humanos. Você é o melhor presente que a vida me deu... te amarei eternamente.

Aos meus avós que conviveram comigo durante esta etapa de minha vida, mas que sempre me apoiaram e acreditaram em mim.

À 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 mestrado.

À Metrohm AG (Herisau, Suíça) pelo financiamento deste projeto através da doação de equipamentos e acessórios.

“A Deus por ter me dado forças e ter me acompanhado!”

**DETERMINAÇÃO VOLTAMÉTRICA DE 1,4-
BENZODIAZEPÍNICOS E DIETILPROPIONA COMO
ADULTERANTES EM FITOTERÁPICOS PARA
EMAGRECIMENTO**

por

DANIELE CORREIA

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado 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 **Mestre em Química.**

Orientador: Prof. Dr. Leandro Machado de Carvalho

Santa Maria, RS, Brasil

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Química
Universidade Federal de Santa Maria

DETERMINAÇÃO VOLTAMÉTRICA DE 1,4-BENZODIAZEPÍNICOS E DIETILPROPIONA COMO ADULTERANTES EM FITOTERÁPICOS PARA EMAGRECIMENTO

AUTORA: DANIELE CORREIA

ORIENTADOR: LEANDRO MACHADO DE CARVALHO

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 12 de setembro de 2008.

A adulteração de formulações fitoterápicas tem sido uma prática recorrente em todo o mundo, tendo em vista o fato de que ainda não existe uma legislação específica de controle da manipulação e comercialização dos chamados “medicamentos naturais”. Neste sentido, a existência de metodologias analíticas que possibilitem a identificação e a quantificação de possíveis fármacos como adulterantes nestas formulações é de extrema importância na análise toxicológica. Como a possibilidade de adulteração é relativamente ampla em termos de classes de compostos, os métodos analíticos requerem principalmente boa seletividade e sensibilidade na identificação de classes e/ou compostos individuais.

Neste trabalho, um método voltamétrico foi desenvolvido e validado para a determinação seletiva de fármacos da classe dos 1,4-benzodiazepínicos (ansiolíticos) e da dietilpropiona (anorexígeno). Para avaliar uma possível interferência na determinação destes fármacos causada por outros fármacos eletroativos (possíveis adulterantes em formulações fitoterápicas) no eletrodo de mercúrio, misturas sintéticas com diferentes concentrações dos 1,4-benzodiazepínicos, dietilpropiona e os interferentes fluoxetina, femproporex, sibutramina e metformina foram analisadas. Os parâmetros da análise voltamétrica pH, potencial e tempo de deposição foram otimizados, visando uma medida voltamétrica com alto grau de seletividade e sensibilidade. O método validado para a determinação de 1,4-benzodiazepínicos e dietilpropiona foi empregado na análise de formulações fitoterápicas utilizadas no tratamento da obesidade, as quais são comercializadas como medicamentos naturais por farmácias de manipulação brasileiras. Quatro diferentes formulações fitoterápicas analisadas acusaram a

presença de 1,4-benzodiazepínicos como adulterantes em concentrações entre 0,056 e 0,270 mg/g. Ensaios de recuperação para os 1,4-benzodiazepínicos e dietilpropiona foram realizados nas formulações, obtendo-se recuperações acima de 90% para todas as espécies de adulterantes analisadas. O método desenvolvido e validado apresentou alta sensibilidade, seletividade, precisão analítica, baixo custo e análises rápidas, comprovando a aplicabilidade do mesmo como uma alternativa para o controle e fiscalização da adulteração em formulações fitoterápicas.

Palavras-chave: benzodiazepínicos; dietilpropiona; formulações fitoterápicas; voltametria; validação analítica.

ABSTRACT

Master Dissertation in Chemistry
Postgraduate in Chemistry
Federal University of Santa Maria

VOLTAMMETRIC DETERMINATION OF BENZODIAZEPINES AND DIETHYLPROPION AS ADULTERANTS IN PHYTOTHERAPIC FORMULATIONS

AUTHOR: DANIELE CORREIA

ADVISOR: LEANDRO MACHADO DE CARVALHO

Date and Local of Defense: Santa Maria, September 12th, 2008.

The adulteration of phytotherapeutic formulations has been a common practice in many countries, since there is not an specific legislation for the control of the manufacturing and commercialization of the so called “natural medicaments”. In this context, the existence of analytical methodologies, which allow the identification and quantification of possible pharmaceuticals as adulterants in these formulations is very important in the toxicological analysis. Since the possibility of adulteration is very broad in terms of compound classes, the analytical methods have to be very selective and sensitive for the identification of compound classes and/or individual compounds.

In this work, a voltammetric method was developed and validated for the selective determination of pharmaceuticals from the class of 1,4-benzodiazepines (anxiolytics) and diethylpropion (anorexics). In order to investigate the possible interference of other electroactive drugs (possible adulterants in phytotherapeutic formulations) at the mercury electrode, synthetic mixtures containing different concentrations of 1,4-benzodiazepines, diethylpropion and interferents fluoxetine, sibutramine and metformin were analyzed. The parameters of the voltammetric analysis, such as pH, potential and time of deposition, were optimized aiming a voltammetric measurement with high selectivity and sensitivity. The validated method was applied for the determination of the adulterants in phytotherapeutic formulations used in the treatment of obesity, which have been commercialized as natural medicaments by Brazilian pharmacies. Four different phytotherapeutic formulations were found to be contaminated by 1,4-benzodiazepines in concentration ranging from 0,056 to 0,270 mg/g. Recovery experiments for 1,4-benzodiazepines and

diethylpropion were carried out in the formulations, which gave recovery values higher than 90% for all the analyzed adulterants. The developed and validated method presented high sensitivity, selectivity, analytical precision and short analysis time. Therefore, the method is very usefull as an analytical tool for the control and fiscalization of the adulteration of phytotherapeutic formulations.

Keywords: benzodiazepines; diethylpropion; phytotherapeutic formulations; voltammetry; analytical validation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura química dos 1,4-benzodiazepínicos.....	21
Figura 2: Estruturas químicas da anfetamina e dietilpropiona.....	24
Figura 3: Resumo do procedimento experimental utilizado para a determinação seqüencial dos grupos A, B, C e D nas amostras fitoterápicas analisadas.....	46
Figura 4: Influência do pH no comportamento voltamétrico dos benzodiazepínicos estudados.....	50
Figura 5: Sinais voltamétricos da mistura de benzodiazepínicos.....	51
Figura 6: Sinais voltamétricos do grupo A.....	52
Figura 7: Sinais voltamétricos do grupo B.....	53
Figura 8: Sinais voltamétricos do grupo C.....	53
Figura 9: Estudo do potencial de deposição para os benzodiazepínicos.....	55
Figura 10: Estudo do tempo de deposição para os benzodiazepínicos.....	56
Figura 11: Voltamograma AC do clonazepam. (A) $\varphi = 90^\circ$ e (B) $\varphi = 0^\circ$. $T_d = 15$ s, $f = 60$ Hz.....	58
Figura 12: Voltamograma AC do flurazepam. (A) $\varphi = 90^\circ$ e (B) $\varphi = 0^\circ$. $T_d = 15$ s, $f = 60$ Hz.....	59
Figura 13: Voltamograma AC do diazepam. (A) $\varphi = 90^\circ$ e (B) $\varphi = 0^\circ$. $T_d = 15$ s, $f = 60$ Hz.....	60
Figura 14: Curvas analíticas obtidas para os benzodiazepínicos: (A) Grupo A; (B) Grupo B; (C) Grupo C.....	64
Figura 15: Sinais voltamétricos do clonazepam por AdCSV.....	65
Figura 16: Sinais voltamétricos do flurazepam por AdCSV.....	65
Figura 17: Sinais voltamétricos do diazepam por AdCSV.....	66
Figura 18: Esquema representativo do protocolo experimental para a especificação de benzodiazepínicos em grupos (A, B e C) como adulterantes.....	67
Figura 19: Sinais voltamétricos da mistura de adulterantes (grupos A, B, C e D)....	74
Figura 20: Determinação seqüencial dos fármacos dos grupos A, B, C e D na amostra 8 por AdCSV.....	78
Figura 21: Sinais voltamétricos do clonazepam na amostra 10.....	79
Figura 22: Sinais voltamétricos do diazepam na amostra 6 diazepam.....	79

Figura 23: Resumo do procedimento experimental utilizado para a determinação seqüencial dos grupos A, B, C e D nas amostras fitoterápicas analisadas.....82

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – 1,4-Benzodiazepínicos: nomes comerciais	22
Tabela 2 – Anorexígenos: nomes comerciais	25
Tabela 3 – Reagentes utilizados no desenvolvimento do trabalho	38
Tabela 4 – Parâmetros das curvas analíticas obtidas para os benzodiazepínicos analisados (faixa de concentração: 3 a 15 x 10 ⁻⁵ mol L ⁻¹)	63
Tabela 5 – Resultado dos ensaios de recuperação para os grupos A, B e C por AdCSV	68
Tabela 6 – Valores de LD e LQ para os grupos A, B e C	70
Tabela 7 – Determinação dos benzodiazepínicos do grupo A, B e C em misturas sintéticas na presença dos interferentes	72
Tabela 8 – Determinação dos grupos B total e C total em misturas sintéticas dos grupos B e C na presença dos interferentes	73
Tabela 9 – Determinação de dietilpropiona em misturas sintéticas dos benzodiazepínicos (grupos A, B e C) e na presença dos interferentes	75
Tabela 10 – Composição das amostras fitoterápicas para emagrecimento estudadas neste trabalho.....	77
Tabela 11 – Resultado das amostras analisadas por AdCSV (n = 3).....	80
Tabela 12 – Composição das amostras fortificadas utilizadas nos ensaios de recuperação	85
Tabela 13 – Resultado dos ensaios de recuperação para os grupos A, B e C nas amostras fortificadas na presença dos interferentes empregando AdCSV (n = 3)....	86
Tabela 14 – Resultado dos ensaios de recuperação para o grupo D nas amostras fortificadas na presença dos grupos A, B e C e dos interferentes empregando AdCSV (n = 3).....	86

LISTA DE SIGLAS E ABREVIações

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AdCSV	Voltametria Adsorptiva de Redissolução Catódica
AdSV	Voltametria Adsorptiva de Redissolução
ASV	Voltametria de Redissolução Anódica
CSV	Voltametria de Redissolução Catódica
NPV	Voltametria de pulso normal
DPV	Voltametria de pulso diferencial
RPV	Voltametria de pulso reverso
SWV	Voltametria de onda quadrada
AC	Voltametria de corrente alternada
CV	Voltametria cíclica
E_d	Potencial de deposição no eletrodo
HMDE	Eletrodo de Mercúrio de gota pendente
UV	Ultravioleta
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
SCE	Eletrodo de Calomelano Saturado
T_d	Tempo de deposição no eletrodo
AAS	Espectrometria de Absorção Atômica
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
CE	Eletroforese capilar

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	20
2.1 1,4-Benzodiazepínicos	20
2.1.1 Propriedades farmacológicas e usos terapêuticos	22
2.1.2 Dependência química.....	23
2.2 Dietilpropiona	23
2.2.1 Dependência química.....	25
2.3 A presença de adulterantes em formulações fitoterápicas e suas determinações analíticas	25
2.4 Determinação de compostos orgânicos por voltametria.....	29
2.5 Voltametria adsortiva de redissolução catódica (AdCSV)	31
2.6 Análise seqüencial de 1,4 benzodiazepínicos e dietilpropiona por AdCSV.....	32
2.7 Voltametria de corrente alternada	33
2.8 Validação Analítica.....	34
3 MATERIAIS E MÉTODOS	36
3.1 Instrumentação.....	36
3.2 Reagentes e soluções	36
3.3 Procedimentos analíticos	39
3.3.1 Determinações voltamétricas de redissolução	39
3.3.1.1 Determinação do grupo A.....	39
3.3.1.2 Determinação do grupo B.....	40
3.3.1.3 Determinação do grupo C	40
3.3.1.4 Determinação do grupo D	40
3.4 Estudos realizados para a otimização da medida voltamétrica	41
3.4.2 Comportamento voltamétrico de misturas de benzodiazepínicos	41
3.4.3 Estudo do potencial de deposição.....	41
3.4.4 Estudo do tempo de deposição	42
3.5 Determinações voltamétricas em misturas sintéticas.....	42
3.6 Estudo dos interferentes.....	42

3.7 Determinações voltamétricas de corrente alternada	43
3.8 Validação Analítica do método padronizado	43
3.8.1 Linearidade.....	43
3.8.2 Precisão e Exatidão	44
3.8.4 Limite de detecção (LD) e limite de detecção (LQ)	44
3.8.5 Recuperação	44
3.8.6 Especificidade	45
3.9 Amostras reais de formulações fitoterápicas.....	45
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
4.1 Comportamento voltamétrico dos benzodiazepínicos no HMDE.....	48
4.1.1 Influência do pH e do eletrólito suporte	48
4.2 Comportamento voltamétrico de misturas de benzodiazepínicos	51
4.3 Estudo do potencial e tempo de deposição no HMDE de misturas de benzodiazepínicos.....	54
4.4 Estudo do mecanismo de reação de benzodiazepínicos no HMDE por voltametria de corrente alternada (AC).....	56
4.5 Análise quantitativa dos benzodiazepínicos	62
4.6 Especificação e determinação dos grupos A, B e C em misturas sintéticas empregando AdCSV	67
4.7 Validação analítica do método padronizado.....	69
4.7.1 Linearidade.....	69
4.7.2 Precisão	69
4.7.2 Exatidão	70
4.7.3 Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ).....	70
4.8 Estudo dos interferentes na determinação e especificação dos grupos A, B, C e D por AdCSV.....	71
4.9 Aplicações analíticas.....	75
4.9.1 Análise seqüencial dos grupos A, B, C e D em formulações fitoterápicas para emagrecimento por AdCSV.....	76
4.9.2 Determinação e especificação dos grupos A, B, C e D em amostras fitoterápicas para emagrecimento empregando AdCSV.....	83
5 CONCLUSÕES	88
6 REFERÊNCIAS.....	92
ANEXOS	96

1 INTRODUÇÃO

A obesidade é reconhecida como uma doença mundial, que afeta milhões de pessoas, o que constitui um problema de saúde pública. Neste contexto, percebe-se que a automedicação com produtos “naturais” emagrecedores tem aumentado consideravelmente nos últimos anos. Sendo que existe um grande número de produtos fitoterápicos para emagrecimento disponíveis no mercado e comercializados livremente. Entretanto, há trabalhos científicos que relatam à existência de substâncias tais como anorexígenos, benzodiazepínicos e antidepressivos adicionados em formulações fitoterápicas, os quais não estão declarados em suas formulações (ALMEIDA *et al.*, 2000; de AZEREDO *et al.*, 2004).

A presença de drogas sintéticas como adulterantes em formulações fitoterápicas é caracterizada como uma prática ilegal, relatada com freqüência no Brasil e em outros países (PARODI *et al.*, 1993; KU *et al.*, 2003; CHEN *et al.*, 2000; SOMBRA *et al.*, 2005; LAU *et al.*, 2003). Dentre as classes de adulterantes mais freqüentemente relatadas em formulações fitoterápicas estão os anorexígenos (dietilpropiona, femproporex e a sibutramina), os benzodiazepínicos (clonazepam, flurazepam, alprazolam, midazolam, medazepam, clordiazepóxido e diazepam), os antidepressivos (fluoxetina) e os hipoglicêmicos (metformina) (ALMEIDA *et al.*, 2000; de AZEREDO *et al.*, 2004; PARODI *et al.*, 1993; KU *et al.*, 2003; CHEN *et al.*, 2000; SOMBRA *et al.*, 2005; LAU *et al.*, 2003).

A fraude do emprego de substâncias controladas não declaradas no rótulo, fato que já constitui uma violação grave da Lei de Vigilância Sanitária, e o desconhecimento por parte do usuário destas “fórmulas mágicas” é um sério risco à saúde. Assim o usuário, acreditando estar consumindo um produto natural, pode aumentar a dose por conta própria, ingerir bebida alcoólica, podendo conduzir, entre outras conseqüências, ao exacerbamento dos efeitos no Sistema Nervoso Central (ALMEIDA e RIBEIRO, 1998). Portanto, o uso de metodologia analítica adequada capaz de identificar de maneira seletiva e quantificar possíveis fármacos presentes como adulterantes em formulações fitoterápicas para emagrecimento é de fundamental importância tanto do ponto de vista clínico como toxicológico. Assim, a existência de métodos analíticos adequados ao controle de qualidade de

formulações fitoterápicas para emagrecimento é indispensável e deve ser estudada de forma sistemática.

A determinação de fármacos utilizando métodos voltamétricos é extremamente sensível e está bem fundamentada na literatura (BROOKS, 1983; dos SANTOS *et al.*, 2002 ; de CARVALHO *et al.*, 2007). A voltametria adsortiva de redissolução catódica (AdCSV) empregando o HMDE (eletrodo de mercúrio de gota pendente) como eletrodo de trabalho é um método que ocupa posição importante entre os métodos eletroanalíticos na investigação de fármacos, sendo as suas principais vantagens a possibilidade de se realizar determinações analíticas simultâneas e os baixos limites de detecção alcançados (da ordem de 10^{-9} a 10^{-11} mol L⁻¹) (HENZE, 2001).

Levando em consideração o exposto acima, este trabalho trata do desenvolvimento e validação de um método analítico baseado na voltametria adsortiva de redissolução catódica empregando o HMDE como eletrodo de trabalho, para investigar possíveis adulterações em fitoterápicos emagrecedores. O método está baseado na deposição adsortiva dos 1,4-benzodiazepínicos (clonazepam, flurazepam, alprazolam, midazolam, medazepam, clordiazepóxido e diazepam) e da dietilpropiona (anfepramona) na superfície do eletrodo de mercúrio e na redução dos mesmos durante a varredura dos potenciais. A determinação voltamétrica dos 1,4-benzodiazepínicos e da dietilpropiona em amostras fitoterápicas para emagrecimento foi realizada sequencialmente através da solução resultante da dissolução da cápsula do medicamento fitoterápico em metanol. A metodologia desenvolvida foi empregada na determinação de adulterantes em formulações fitoterápicas comercializadas como emagrecedores naturais.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 1,4-Benzodiazepínicos

Os benzodiazepínicos são fármacos ansiolíticos (sedativos) capazes de atuar no sistema nervoso central (SNC) reduzindo a ansiedade e exercendo efeito calmante. Um agente sedativo é aquele capaz de reduzir a atividade motora, moderar a excitação e acalmar o indivíduo (KATZUNG, 2006). Os benzodiazepínicos são fármacos que possuem propriedades ansiolíticas, anticonvulsivantes, relaxante muscular e anestésica (KATZUNG, 2006; HARVEY e CHAMPE, 1998; VALLE *et al.*, 1991).

Em 1957 foi sintetizado o primeiro benzodiazepínico, o clordiazepóxido, essa droga foi comercializada em 1961, inaugurando a era dos benzodiazepínicos. Em 1963 foi lançado no mercado um medicamento ainda mais potente, o diazepam. Atualmente a cerca de 35 benzodiazepínicos disponíveis comercialmente (HARVEY e CHAMPE, 1998). A Tabela 1 mostra alguns exemplos destes compostos 1,4-benzodiazepínicos, assim como, seus nomes comerciais.

As estruturas dos 1,4-benzodiazepínicos (ver figura 1) consistem de um anel benzeno fundido a um anel diazepínico heptagonal. A maioria dos 1,4 benzodiazepínicos contém um grupo carboxamida na estrutura em anel heterocíclica de sete membros, sendo necessário um substituinte na posição sete como, por exemplo, um grupo halogênio ou nitro, para a atividade sedativa-hipnótica. A estrutura do alprazolam inclui a adição de um anel triazólico na posição 1, 2 e essa droga é algumas vezes denominada triazolobenzodiazepínico (KATZUNG, 2006).

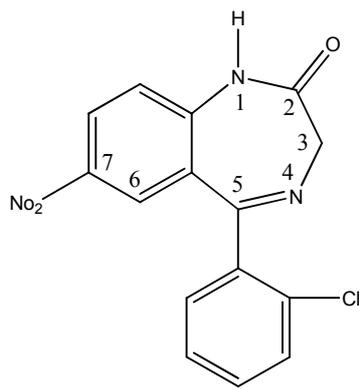
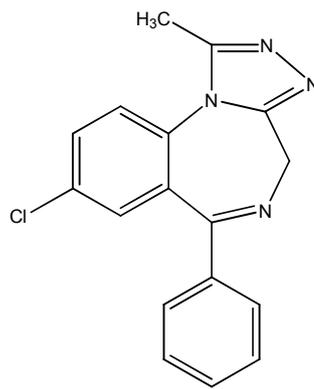
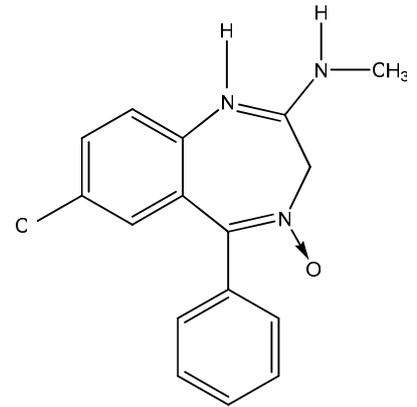
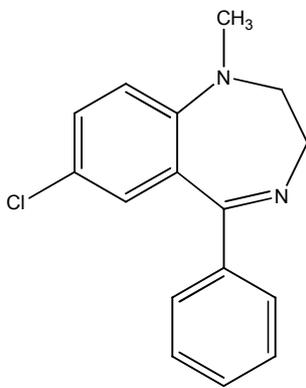
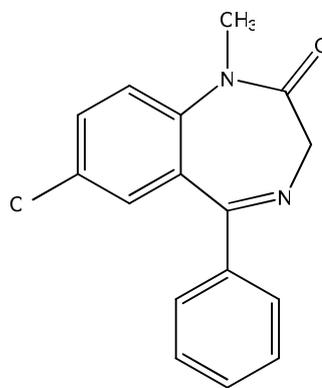
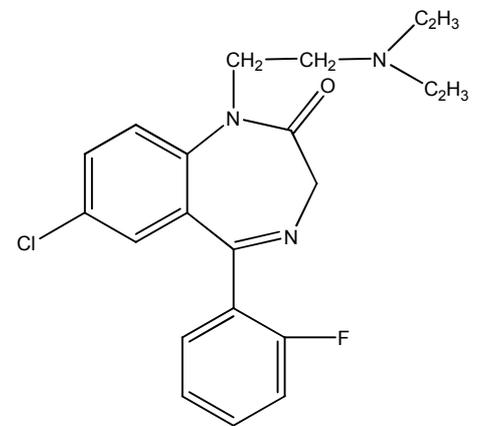
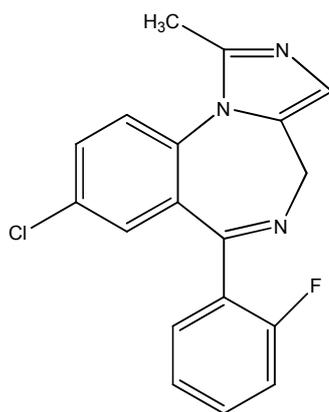
**Clonazepam****Alprazolam****Clordiazepóxido****Medazepam****Diazepam****Flurazepam****Midazolam**

Figura 1: Estrutura química dos 1,4-benzodiazepínicos (KATZUNG, 2006; BROOKS e DE SILVA, 1975).

Tabela 1 – 1,4-Benzodiazepínicos: nomes comerciais

Nome da substância	Nome comercial
Alprazolam	Apraz®, Xanax®
Bomazepam	Lexotan®, Brozepax®
Clonazepam	Klonopin®, Rivotril®
Clordiazepóxido	Librium®, Psicosedin®
Diazepam	Valium®, Calmociteno®
Flurazepam	Dalmadorm®, Dalmane®
Lorazepam	Alzapam®, Lorax®
Midazolam	Versed®, Dormonid®
Nitrazepam	Sonebon®, Nitrapan®

Fonte: KATZUNG, B.G. Farmacologia Básica & Clínica. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan S.A., 2006.

2.1.1 Propriedades farmacológicas e usos terapêuticos

Os benzodiazepínicos entre si apresentam pequenas diferenças quanto às propriedades ansiolíticas e anticonvulsivantes. Entretanto, a duração de ação varia bastante no grupo e, com frequência as considerações farmacocinéticas são itens de importância na escolha do fármaco (HARVEY e CHAMPE, 1998). Dentre os usos terapêuticos dos ansiolíticos podemos citar:

- 1- Efeitos ansiolíticos:** Os benzodiazepínicos exercem efeito sedativo com redução concomitante da ansiedade em doses baixas (KATZUNG, 2006; HARVEY e CHAMPE, 1998). Todavia, na maioria dos casos, as ações ansiolíticas dos benzodiazepínicos são acompanhadas de algum decaimento das funções psicomotoras (KATZUNG, 2006).
- 2- Efeitos hipnóticos:** Em doses mais altas, certos benzodiazepínicos produzem hipnose (sono artificialmente induzido) (KATZUNG, 2006; HARVEY e CHAMPE, 1998).

- 3- Anticonvulsivantes:** Alguns benzodiazepínicos têm atividade anticonvulsivante e são usados no tratamento da epilepsia e de outros distúrbios convulsivos (HARVEY e CHAMPE, 1998).
- 4- Relaxamento muscular:** A ação relaxante muscular é devida a depressão sobre os reflexos espinhais envolvidos no controle muscular (VALLE *et al.*, 1991).
- 5- Anestesia:** Alguns fármacos ansiolíticos quando administrados em doses altas deprimem o sistema nervoso central até certo ponto conhecido como anestesia geral. Entretanto, a propriedade de determinado fármaco como coadjuvante na anestesia depende principalmente das características físico-químicas que determinam a rapidez de seu início e duração dos efeitos (KATZUNG, 2006).

2.1.2 Dependência química

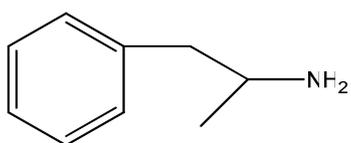
Os casos de dependência química aos benzodiazepínicos são dependentes da dosagem administrada e do uso prolongado. A interrupção abrupta da administração do fármaco provoca síndrome de abstinência, com confusão, ansiedade, agitação, inquietação, insônia e tensão (HARVEY e CHAMPE, 1998).

2.2 Dietilpropiona

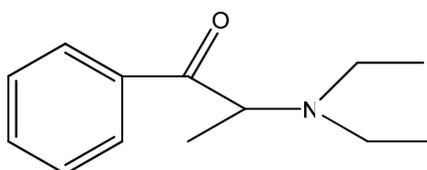
Os fármacos mais empregados como redutores do apetite pertencem ao grupo das anfetaminas (ver figura 2), que além de potentes estimulantes do Sistema Nervoso Central (SNC), exercem atividades cardiovasculares, manifestando também dependência química (KOROLKOVAS e BURCKHALTER, 1982). A primeira descrição da utilização de drogas para promover a diminuição da ingestão alimentar é de 1937, quando a anfetamina foi administrada experimentalmente em seres humanos. Entretanto, esta droga possui efeitos adversos como estimulante do SNC e alterações cardiovasculares que limitam o seu uso terapêutico. Na tentativa de

resolver estes problemas, foram realizadas várias alterações estruturais nas moléculas da anfetamina com a finalidade de produzir novas drogas anoréxicas (de LÚCIA, 1992).

Em 1958 foi introduzida no mercado a dietilpropiona, também conhecida como dietilpropiona (ver figura 2), essa é uma droga largamente utilizada pela medicina nos tratamentos de obesidade como supressora do apetite (anorexígeno). A dietilpropiona foi sintetizada com o intuito de eliminar os efeitos indesejáveis causados pelas anfetaminas, porém este fármaco anorexígeno atua através do SNC, acarretando na diminuição do apetite ou aumentando a sensação de saciedade, assim como, promove outros efeitos colaterais tais como: irritabilidade, taquicardia, inquietação, insônia e até alucinações e delírios (de ALMEIDA e RIBEIRO, 1998).



Anfetamina



Dietilpropiona

Figura 2: Estruturas químicas da anfetamina e dietilpropiona (ALMEIDA e RIBEIRO, 1998).

Atualmente estão disponíveis comercialmente no Brasil outros agentes anorexígenos derivados da anfetamina. A Tabela 2 ilustra alguns exemplos comerciais desses derivados anfetamínicos.

Tabela 2 – Anorexígenos: nomes comerciais

Nome da substância	Nome comercial
Diethylpropiona ou anfepramona	Dualid®, Inibex®
Femproporex	Desobesi®
Mazindol	Absten®

Fonte: IMESC, Instituto de Medicina Social e de Criminologia de São Paulo, Disponível em: <http://www.imesc.sp.gov.br/infodrogas/anfetami.htm>

2.2.1 Dependência química

Os casos de dependência química aos anorexígenos são dependentes da dosagem administrada e do uso prolongado. A interrupção abrupta da administração do fármaco provoca síndrome de abstinência, com grande mal-estar, ansiedade, inquietação, irritabilidade, taquicardia, inquietação e até alucinações e delírios (de ALMEIDA e RIBEIRO, 1998).

2.3 A presença de adulterantes em formulações fitoterápicas e suas determinações analíticas

A fitoterapia é uma forma de complementar a medicina alternativa, e está se tornando cada vez mais popular em países desenvolvidos e subdesenvolvidos (EISENBERG *et al.*, 1998). Embora as ervas medicinais sejam freqüentemente consideradas naturais, é necessário ter cautela ao utilizar a fitoterapia, uma vez que, um produto natural não significa que esteja isento de efeitos colaterais. Os efeitos colaterais causados pelo uso de formulações fitoterápicas podem ser devido à adulteração, substituição, contaminação, rotulagem e/ou anúncio inadequado (PINN, 2001).

O problema da adulteração de medicamentos, na atualidade, não se limita apenas aos casos de formulações sintéticas. A presença de drogas sintéticas

adicionadas ilegalmente a formulações fitoterápicas utilizadas no tratamento da obesidade pode ser caracterizada, também, como um problema sério de adulteração e de saúde pública. Este problema é agravado pelo uso excessivo de drogas inibidoras de apetite (anorexígenos), sendo o Brasil responsável pelo maior consumo destes em nível mundial. A adulteração de formulações fitoterápicas com drogas sintéticas tais como o diazepam, clordiazepóxido e cafeína são um dos os maiores problemas com ervas medicinais chinesas (ERNEST, 2002). Os casos de complicações clínicas e os efeitos colaterais resultantes da adulteração de ervas medicinais com drogas sintéticas têm sido relatados com frequência (ERNEST, 2002; KU, 2003; LIANG, 2006).

Atualmente, o Brasil se destaca no cenário mundial em relação ao consumo de anorexígenos estimulantes do SNC constituindo, junto com Argentina e Estados Unidos, um dos três países com maior taxa de utilização destes medicamentos no mundo (UNODC, 2008). Além disso, aproximadamente 60% da produção mundial do medicamento femproporex é consumida por laboratórios farmacêuticos e farmácias de manipulação situados no Brasil. Além da adição ilegal de anorexígenos como a dietilpropiona, o femproporex e a sibutramina, estas formulações fitoterápicas apresentam com frequência compostos benzodiazepínicos, antidepressivos e hipoglicêmicos como adulterantes (ALMEIDA *et al.*, 2000). Os casos de adulteração de formulações fitoterápicas por drogas sintéticas adicionadas ilegalmente podem se estender, ainda, a formulações administradas como tranqüilizantes, anti-inflamatórios, hipoglicêmicos, etc.

A presença de drogas sintéticas como adulterantes em formulações fitoterápicas é caracterizada como uma prática ilegal, relatada com frequência também em outros países (PARODI *et al.*, 1993; KU *et al.*, 2003; CHEN *et al.* 2000; Sombra *et al.*, 2005; LAU *et al.*, 2003). Dentre os casos mais recentes, pode-se citar a adulteração de pílulas de emagrecimento brasileiras comercializadas nos Estados Unidos com as drogas femproporex, clordiazepóxido e fluoxetina, segundo informação divulgada pelo FDA órgão do governo americano que controla alimentos e medicamentos. Dentre as classes de adulterantes mais freqüentes já relatados em formulações fitoterápicas estão os anorexígenos (dietilpropiona, femproporex, mazindol e sibutramina), os benzodiazepínicos (diazepam, clordiazepóxido, clonazepam e midazolam), os antidepressivos (fluoxetina), os hipoglicêmicos (metformina, fenformina, clorpropamida, acetohexamida, glibenclamida e

tolbutamida) e a cafeína como estimulante (ALMEIDA *et al.*, 2000; PARODI *et al.*, 1993; KU *et al.*, 2003; CHEN *et al.* 2000; SOMBRA *et al.*, 2005; LAU *et al.*, 2003).

O universo das possibilidades de adulteração de formulações fitoterápicas com drogas sintéticas é relativamente amplo, tendo em vista as combinações possíveis entre compostos anorexígenos, benzodiazepínicos, antidepressivos e hipoglicêmicos que podem ser realizadas com fins terapêuticos (inibição do apetite). Sendo assim, os métodos analíticos devem ser capazes de determinar de maneira seletiva e quantitativa a presença de adulterantes, bem como a presença de interferentes, os quais pertencem normalmente à outra classe de medicamento combinada na formulação; um exemplo comum de associação é a combinação: anorexígeno + benzodiazepínico. Porém, qualquer tipo de associação dessa natureza foi recentemente proibida pela Resolução RDC nº 58, de 05 de setembro de 2007 (ANVISA, 2007), que dispõe sobre o aperfeiçoamento do controle e fiscalização de substâncias psicotrópicas anorexígenas e dá outras providências, na qual fica expressamente vedada a associação de substâncias ansiolíticas, antidepressivas, diuréticas e anorexígenas na mesma formulação para emagrecimento.

Dentro deste contexto, os métodos voltamétricos permitem uma determinação sensível e seletiva de alguns compostos orgânicos, baseado no comportamento eletroquímico diferenciado das espécies no eletrodo de trabalho (de CARVALHO *et al.*, 2007). Da mesma forma, os métodos de separação cromatográficos e eletroforéticos são ferramentas utilizadas para a determinação simultânea de possíveis misturas de adulterantes sintéticos nas formulações fitoterápicas.

A determinação de adulterantes em formulações fitoterápicas empregando métodos voltamétricos ainda não foi relatada na literatura. Em um trabalho preliminar publicado em 2007 (de CARVALHO *et al.*, 2007), a determinação do fármaco dietilpropiona, um adulterante bastante provável nestas formulações e já relatado em casos de adulteração na literatura (ALMEIDA *et al.*, 2000), foi estudada por voltametria adsortiva empregando o eletrodo de mercúrio (HMDE). Neste trabalho, a determinação da dietilpropiona se mostrou possível na presença de outros adulterantes como femproporex, mazindol, sibutramina, fluoxetina, cafeína, diazepam e metformina. Além destas drogas já estudadas, a determinação de mazindol e de benzodiazepínicos de maneira isolada em formulações farmacêuticas sintéticas, onde a droga é sempre o componente majoritário, também pode ser

realizada por voltametria adsortiva e está descrita na literatura (dos SANTOS *et al.*, 2002).

Os métodos de separação mais empregados na determinação de possíveis adulterantes de formulações fitoterápicas são a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e a eletroforese capilar (CE). Entre os métodos publicados recentemente, de especial interesse são os métodos eletroforéticos que empregam a eletroforese capilar de zona (CZE) e a eletrocromatografia capilar eletrocinética micelar (MEKC), devido à alta eficiência de separação obtida em misturas complexas.

Dentre os adulterantes já descritos na literatura com determinação eletroforética, encontram-se os hipoglicêmicos acetohexamida, clorpropamida, glibenclamida e tolbutamida por CZE em tampão borato (pH 7,5) como eletrólito de trabalho e detecção UV (KU *et al.*, 2003). O hipoglicêmico coptisina, berberina e palmatina foram também determinadas em formulações fitoterápicas por CZE-UV (CHEN *et al.*, 2000).

A determinação dos benzodiazepínicos alprazolam, bromazepam, clordiazepóxido, diazepam, flunitrazepam, medazepam, oxazepam e nitrazepam por MEKC foi descrita na literatura (HANCU *et al.*, 2007), apesar de não ter sido aplicada ainda na determinação destas drogas como possíveis adulterantes em formulações fitoterápicas. Outras drogas menos comuns têm sido também determinadas como adulterantes em formulações fitoterápicas por HPLC, como a cafeína, a teobromina, a teofilina, a fenilbutazona, o ibuprofeno, o captopril e a amoxicilina (SOMBRA *et al.*, 2005; LAU *et al.*, 2003; LIANG *et al.*, 2006).

A determinação dos adulterantes mais comuns dietilpropiona, femproporex e diazepam por HPLC-UV já foi descrita na literatura (ALMEIDA *et al.*, 2000) para formulações fitoterápicas comercializadas no Brasil. No entanto, a determinação de misturas complexas contendo anorexígenos e benzodiazepínicos como adulterantes, os quais são provavelmente os adulterantes mais empregados e esperados nestas formulações, empregando métodos eletroforéticos (CZE e MEKC), ainda não foi descrita na literatura.

Entretanto, a determinação destas drogas sintéticas como adulterantes em formulações fitoterápicas empregando métodos voltamétricos ainda é de caráter inédito, não foi relatado na literatura e, é tema desta dissertação.

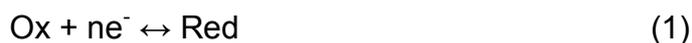
Fazendo um comparativo entre os métodos de separação descritos acima com a voltametria e a polarografia, verifica-se que os dois últimos apresentam algumas vantagens principalmente com relação à possibilidade de realizar determinações em matrizes complexas como as formulações fitoterápicas, análises mais rápidas, e também as baixas concentrações determinadas. Além disso, os métodos voltamétricos são vantajosos com relação ao custo de análise, principalmente no que se refere à aquisição e manutenção do equipamento, além do tempo necessário para a análise ser significativamente menor. Com relação aos métodos de separação mais empregados para a determinação de benzodiazepínicos e dietilpropiona (HPLC e CE), a voltametria e a polarografia apresentam uma vantagem adicional com relação à detecção seletiva de benzodiazepínicos e dietilpropiona, uma vez que estes métodos são baseados no comportamento eletroquímico diferenciado destas espécies. Devido ao fato destes fármacos serem eletroliticamente ativos, eles são reduzidos no eletrodo de trabalho sendo possível a determinação de benzodiazepínicos e dietilpropiona em formulações fitoterápicas, bem como, na presença de outros fármacos eletroliticamente ativos que podem estar presentes como adulterantes nestas formulações, conforme será descrito sistematicamente neste trabalho.

2.4 Determinação de compostos orgânicos por voltametria

A voltametria estuda as relações entre a voltagem, a corrente e o tempo, durante a eletrólise numa célula voltamétrica. Normalmente o procedimento envolve o uso de uma célula que contém o eletrólito suporte e o analito onde serão imersos três eletrodos: 1) um eletrodo de trabalho no qual ocorre à eletrólise que se está investigando; 2) um eletrodo de referência que é usado para medir o potencial do eletrodo de trabalho e 3) um eletrodo auxiliar que, juntamente com o eletrodo de trabalho, permite a passagem de corrente da eletrólise (VOGEL, 1992).

Assim, nessa técnica, as informações sobre o analito são obtidas por meio da medição da magnitude da corrente elétrica que surge no eletrodo de trabalho ao se aplicar um potencial entre um eletrodo de trabalho e um eletrodo auxiliar. O parâmetro ajustado é o potencial (E) e o parâmetro medido é a corrente resultante

(i). O registro da corrente em função do potencial é denominado voltamograma. A magnitude da corrente obtida pela transferência de elétrons durante um processo de oxiredução (ver equação 1) pode ser relacionada com a quantidade de analito presente na interface do eletrodo/solução e conseqüentemente, na célula eletroquímica (HENZE, 2001; WANG, 1985).



sendo Ox a forma oxidada do analito e Red a forma reduzida.

Com relação ao eletrodo de trabalho, existem diversos tipos, variando-se desde o material empregado na sua construção, até sua morfologia e dimensões. O eletrodo mais empregado em voltametria é o eletrodo de mercúrio de gota pendente (HMDE). Esse apresenta como vantagem o fato de que cada nova gota pode ser facilmente formada e este processo de renovação remove problemas que possam ser causados por contaminação de uma análise prévia. O emprego do eletrodo de mercúrio é restrito à região catódica e, dependendo do eletrólito, pode ser empregado entre +0,3 V a -2,3 V vs. eletrodo de calomelano saturado (SCE). Nessa região de potencial ocorrem as reações eletródicas da maioria das espécies orgânicas, o que vem a justificar o seu amplo emprego como eletrodo de trabalho nas últimas décadas em diversas aplicações (SCHOLZ, 2002).

A escolha de técnica voltamétrica a ser utilizada está relacionada com o tipo e a qualidade de informação qualitativa/quantitativa que se quer obter a respeito do analito ou do processo que envolve a interação entre o analito e o eletrodo de trabalho. Existem diversas técnicas voltamétricas: voltametria de pulso normal (NPV), voltametria de pulso diferencial (DPV), voltametria de pulso reverso (RPV), voltametria de onda quadrada (SWV), voltametria de corrente alternada (AC), voltametria cíclica (CV), voltametria de redissolução catódica (CSV), voltametria de redissolução anódica (ASV) e voltametria adsortiva de redissolução (AdSV). A escolha de cada uma delas depende do analito e da concentração do mesmo, entre outros fatores. Entretanto este trabalho restringe-se ao uso das voltametrias de corrente alternada (ver seção 2.6) e a voltametria adsortiva de redissolução catódica (ver seção 2.5).

O desenvolvimento tecnológico gerou um grande desenvolvimento da instrumentação analítica, o que contribuiu intensamente na melhoria da sensibilidade destes métodos. Atualmente os limites de detecção já podem ser comparados aos métodos cromatográficos, quando se utilizam técnicas de pulso e de redissolução. Em eletroanalítica, cada espécie possui um potencial de oxidação e ou redução particular, em uma determinada condição, o que minimiza a interferência de outras espécies.

A principal vantagem das técnicas eletroanalíticas é a possibilidade da medida voltamétrica ser feita diretamente na amostra solubilizada sem extrações prévias. Ainda é possível a análise de amostras coloridas ou contendo partículas sólidas (dos SANTOS *et al.*, 2002). Esta vantagem, aliada ao curto tempo na realização das análises e a seletividade combinada com a confiabilidade devido a boa exatidão nas medidas tem feito da voltametria uma boa alternativa para a análise de traços orgânicos em diversas matrizes (EL-HEFNAWEY *et al.*, 2004; de CARVALHO *et al.*, 2007). Associado a isto, tem-se ainda o baixo custo analítico, rapidez de detecção, alto potencial de automatização e a possibilidade de determinação simultânea e seqüencial de diversos compostos orgânicos.

Mediante todas estas vantagens apresentadas, observa-se que a voltametria ocupa uma importante posição entre os métodos eletroquímicos para a investigação de compostos orgânicos. Muitos grupos funcionais podem ser oxidados ou reduzidos no eletrodo de trabalho, o que torna possível a determinação de uma grande variedade de compostos (SKOOG, 2007).

2.5 Voltametria adsortiva de redissolução catódica (AdCSV)

A voltametria adsortiva de redissolução catódica (AdCSV) têm sido empregada em uma grande variedade de compostos orgânicos de interesse químico e farmacêutico devido à forte tendência que essas substâncias possuem de se adsorverem na superfície do eletrodo 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 eletrodo de trabalho. A agitação faz com que o transporte de massa por convecção mantenha a concentração da espécie eletroativa junto à superfície do eletrodo igual a do seio da solução. Essa agitação deve ser feita à velocidade constante e controlada com precisão (WANG, 1985). Após o término da etapa de deposição, procede-se a etapa de redissolução, em que, as espécies que foram reduzidas na superfície do eletrodo são reoxidadas 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).

2.6 Análise seqüencial de 1,4 benzodiazepínicos e dietilpropiona por AdCSV

A determinação de fármacos por voltametria possibilita realizar a análise em seqüência, ou seja, realizar a determinação de vários fármacos utilizando-se a mesma amostra através de métodos voltamétricos diferentes sequencialmente. Todavia, os trabalhos publicados sobre a determinação de 1,4-benzodiazepínicos por voltametria geralmente descrevem a determinação de um único benzodiazepínico em matrizes como fluidos biológicos e formulações farmacêuticas e, utilizam procedimentos para preparação da mostra baseados na extração com solventes, filtração e extração em fase sólida. Como exemplos, podemos citar a determinação de diazepam em formulações farmacêuticas empregando a polarografia de pulso diferencial (DPP) descrito por Garcia *et al.*, (1993) e a determinação de clordiazepóxido em formulações farmacêuticas e fluídos biológicos empregando a voltametria adsortiva de redissolução catódica de onda quadrada (SWAdCSV) descrita por El-Hefnawey *et al.* (2004). Em um estudo mais recente, temos a determinação da dietilpropiona em formulações farmacêuticas, na presença de outros fármacos (antidepressivos, anorexígenos e hipoglicêmicos) eletroquimicamente ativos empregando DPP descrito por de Carvalho *et al.* (2007).

No presente trabalho, propõe-se o desenvolvimento de análises em seqüência utilizando a voltametria adsortiva de redissolução catódica (AdCSV). A proposta de análise seqüencial permite que de forma simples e rápida se efetue a

determinação de vários fármacos sequencialmente, sem a necessidade de se proceder a grandes alterações nos parâmetros voltamétricos. Portanto, através de um único ensaio há uma tentativa de implementar um procedimento analítico para a determinação seqüencial de 1,4-benzodiazepínicos e dietilpropiona empregando-se a AdCSV e o eletrodo de mercúrio de gota pendente (HMDE) em formulações fitoterápicas para emagrecimento.

2.7 Voltametria de corrente alternada

A voltametria de corrente alternada (AC) envolve a aplicação de um potencial contendo uma pequena componente senoidal de frequência e amplitude constante superposto à varredura linear do potencial DC na forma de degraus. Mede-se o potencial DC na forma habitual e os resultados são acoplados às medidas com a AC (BOND, 1980). Devido à corrente residual ser muito grande, o limite de sensibilidade da voltametria AC (10^{-4} mol L⁻¹) não é muito diferente do limite de sensibilidade da DC (10^{-5} mol L⁻¹). A elevada corrente residual é uma consequência da corrente capacitiva, que é muito grande quando comparado com a corrente faradaica (VOGEL, 1992).

A ocorrência de processos de adsorção no eletrodo de mercúrio é identificada através da voltametria AC, e tem permitido o desenvolvimento e aplicação de métodos eletroquímicos mais sensíveis para determinação de baixas concentrações de fármacos em produtos farmacêuticos (de CARVALHO *et al.*, 2007).

Em medidas por voltametria de corrente alternada, os picos característicos de adsorção podem ser produzidos em potenciais onde a adsorção ou desorção ocorre. Estes processos não faradaicos ocorrem em potenciais positivos ou negativos, onde uma espécie adsorvida é deslocada do eletrodo em virtude de uma maior afinidade pelo eletrólito suporte (BOND, 1980). A eletro-sorção dos compostos orgânicos é resultado da adsorção competitiva entre compostos orgânicos e os íons do eletrólito suporte. O grau de adsorção na superfície do eletrodo é determinado por várias interações entre o eletrólito suporte e compostos orgânicos.

Como resultado da adsorção da espécie na superfície do eletrodo (durante a varredura de potenciais), uma diminuição da capacitância da dupla camada (e,

portanto, medido com um ângulo de fase de 90°) é observada. Esta diminuição da corrente capacitiva é dependente da concentração do composto orgânico, ou seja, a diminuição da corrente capacitiva torna-se maior à medida que aumenta a concentração da espécie orgânica até a saturação da superfície do eletrodo (de CARVALHO e SCHWEDT, 2001). A diminuição da corrente capacitiva é geralmente mais próxima ao potencial máximo de adsorção (E_m). Além da diminuição da corrente capacitiva, os voltamogramas AC mostram também correntes de pico em ambos os lados do E_m que definem os limites dos potenciais positivos e negativos da região de adsorção (SANDER *et al.*, 1995).

As correntes capacitiva e faradaica obtidas dependem da otimização de três fatores: frequência, ângulo de fase e amplitude de pulso. Em geral para as medidas de AC se utilizam os ângulos de 90° e 45° , o que distingue a ocorrência dos processos capacitivo e faradaico na superfície do eletrodo, uma vez que, as correntes capacitiva e faradaica estão a 90° e 45° , respectivamente, fora de fase em relação à voltagem AC aplicada (BOND, 1980).

2.8 Validação Analítica

A validação de um método analítico (ANVISA, 2003) é obtida quando os procedimentos experimentais apresentam resultados analíticos confiáveis. Isto é, os resultados devem apresentar linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção, limite de quantificação, e recuperações adequadas à análise. No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) tem determinado os parâmetros a serem seguidos, bem como os limites de tolerância para um processo de validação de uma metodologia analítica. Esses parâmetros são detalhados a seguir.

A linearidade do método indica o intervalo de concentração em que a resposta do instrumento é linear a concentração do analito.

A curva de calibração deve ser construída utilizando-se a matriz proposta para estudo, deve conter no mínimo cinco pontos contendo o padrão de cada fármaco, do limite de quantificação até 120 % da concentração mais alta que se pretende analisar. O desvio padrão relativo (RSD) deve ser menor ou igual a 20 % em relação à concentração em relação à concentração nominal para o limite de

quantificação e menor ou igual a 15 % em relação à concentração nominal para as outras concentrações da curva de calibração. No mínimo 4 das 5 concentrações da curva de calibração devem cumprir esses critérios. O coeficiente de correlação linear (r) deve ser igual ou superior a 0,99.

A precisão de um método analítico está relacionada com concordância entre os resultados obtidos, sendo que, quanto mais próximos estão os resultados de diferentes mediadas maiores são os graus de precisão do método. A precisão pode ser expressa na forma de um desvio padrão relativo ou como um coeficiente de variação, os quais não devem possuir valores superiores a 15%.

A exatidão é expressa como os resultados obtidos se aproximam do valor verdadeiro. Pode ser determinada através da razão entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica dentro da faixa de variação do procedimento, realizando-se pelo menos três replicatas da concentração, o desvio não deve exceder 15 %.

O limite de detecção (LD) de um método é a menor quantidade de analito que pode ser detectada, porém, não necessariamente quantificada como um valor exato. Estabelecido por meio de análise de soluções de concentração conhecidas e decrescentes, até menor nível detectável. Já o limite de quantificação (LQ) é a menor quantidade do analito que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis. Um procedimento comum para calcular o LD tem sido estabelecido através da confecção da curva analítica e três vezes o desvio padrão do branco ($3\sigma_B/b$) após dez medidas da corrente base do eletrólito suporte (SKOOG, 2007). Similarmente os limites de quantificação (LQ) são calculados a partir de $10\sigma_B/b$.

A recuperação avalia a eficiência de um método analítico, considerando um limite de variação estabelecido. Recuperações próximas a 100 % são as desejáveis, porém tem-se admitido valores menores, desde que a recuperação seja precisa e exata.

A especificidade (seletividade) é a capacidade de um método em determinar o analito de maneira inequívoca na presença de outras substâncias susceptíveis de interferirem na determinação. Em geral, uma forma simples de verificar a seletividade de um método voltamétrico é observar a presença de picos na faixa de potenciais de redução dos analitos de interesse fazendo-se a medida voltamétrica de um branco obtido com a mesma matriz a ser analisada.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Instrumentação

- Processador: ▶ 693 VA Processor (Metrohm)
 - ▶ 694 VA Stand (Metrohm)
 - ▶ Eletrodo de referência – Ag / AgCl / KCl 3 mol L⁻¹
 - ▶ Contra eletrodo – Platina
 - ▶ Eletrodo de trabalho – HMDE (eletrodo de mercúrio de gota pendente)

- Balança Analítica Sartorius com quatro casas decimais de precisão;

- Sistema de purificação de água Milli-Q, resistividade 18,2 MΩ.cm⁻¹ (Millipore, Bedford, USA);

3.2 Reagentes e soluções

A água utilizada foi destilada, deionizada e purificada em um sistema Milli-Q (resistividade de 18,2 MΩ cm⁻¹).

As soluções padrão estoque dos 1,4-Benzodiazepínicos (clonazepam, flurazepam, alprazolam, midazolam, diazepam, medazepam e clordiazepóxido), do antidepressivo (fluoxetina), do hipoglicêmico (metformina) e dos anorexígenos (dietilpropiona, sibutramina e femproporex) nas concentrações 10⁻² e 10⁻³ mol L⁻¹ foram preparadas pela dissolução do padrão de cada fármaco em balão volumétrico de 10 mL com metanol. As soluções estoque foram armazenadas sob refrigeração em frascos plásticos de 13 mL, mantendo-se estáveis por pelo menos 3 meses. A partir das soluções estoque, por meio de diluições (também em metanol) prepararam-se as soluções de trabalho nas concentrações desejadas.

As soluções de trabalho 1 g L^{-1} dos 1,4-Benzodiazepínicos foram preparadas pela dissolução de 50 mg de cada padrão em balão volumétrico de 50 mL com metanol.

As soluções de trabalho 10 g L^{-1} de dietilpropiona, fluoxetina e metformina foram preparadas pela dissolução de 500 mg de cada padrão em balão volumétrico de 50 mL com metanol.

A solução tampão acetato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 2 a 12) foi preparada pela mistura de 2,0507 g de acetato de sódio e 1,5 mL de ácido acético glacial em balão volumétrico de 250 mL com água ultrapura.

A solução tampão Britton-Robinson $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 2 a 12) foi preparada pela mistura de 1,5457 g de ácido bórico, 1,7 mL de ácido fosfórico e 1,5 mL de ácido acético glacial em balão volumétrico de 250 mL com água ultrapura.

A solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 2 a 12) foi preparada pela mistura de 3,4050 g de fosfato de potássio monobásico e 3,5490 g de fosfato de sódio dibásico em balão volumétrico de 250 mL com água ultrapura.

A solução tampão borato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 2 a 12) foi preparada pela mistura de 1,0 g de hidróxido de sódio e 9,5350 g de tetraborato de sódio em balão volumétrico de 250 mL com água ultrapura.

A solução tampão Ringer $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 2 a 12) foi preparada pela mistura de 1,0 g hidróxido de sódio e 3,5490 g de fosfato de sódio dibásico em balão volumétrico de 250 mL com água ultrapura.

O pH das soluções tampão descritas acima foi ajustado adicionando-se hidróxido de sódio ou ácido clorídrico 3 mol L^{-1} .

Todos os reagentes empregados no presente trabalho foram produtos de grau analítico, sendo que, suas especificações e respectivos fabricantes estão descritos na Tabela 3.

Tabela 3 – Reagentes utilizados no desenvolvimento do trabalho

Reagentes	Fornecedores
Clonazepam	Sul Farma
Flurazepam	Labovid
Alprazolam	Sul Farma
Midazolam	Pharma Nostra
Diazepam	Sul Farma
Medazepam	Pharma Nostra
Clordiazepóxido	Sul Farma
Dietilpropiona	Labovid
Fluoxetina	Sul Farma
Sibutramina	Labovid
Femproporex	Labovid
Metformina	Sul Farma
Fosfato de sódio dibásico	Vetec ^a
Fosfato de potássio monobásico	Merck ^a
Ácido bórico	Merck ^a
Acetato de sódio	Synth ^a
Tetraborato de sódio	Merck ^a
Hidróxido de sódio	Vetec ^a
Ácido clorídrico 37 % (m/v)	Quimex ^a
Ácido acético glacial 99,8 % (m/v)	Quimex ^a
Ácido fosfórico 85 % (m/v)	Merck ^a
Metanol	Quimex ^a

^aFabricantes

3.3 Procedimentos analíticos

3.3.1 Determinações voltamétricas de redissolução

Todas as determinações voltamétricas foram realizadas em Processador 693 VA Processor (Metrohm) em conjunto com 694 VA Stand (Metrohm). Os sete 1,4-Benzodiazepínicos e o anorexígeno 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.

Para melhor análise e interpretação dos resultados que serão apresentados nas seções posteriores, os 1,4-Benzodiazepínicos foram divididos em três grupos de acordo com o seu comportamento voltamétrico. Neste caso, classificam-se como grupo A o fármaco clonazepam, como grupo B os fármacos flurazepam, midazolam e alprazolam e como grupo C os fármacos medazepam, clordiazepóxido e dizepam. Seguindo esta estrutura, classificou-se a dietilpropiona como fármaco pertencente ao grupo D.

3.3.1.1 Determinação do grupo A

A determinação do grupo A (clonazepam) foi baseada na deposição adsorptiva do fármaco no HMDE (anexo A) em um potencial de -0,4 V e na varredura catódica dos potenciais (50 mV s^{-1}) de -0,3 a -0,8 V. Como eletrólito suporte utilizou-se o tampão Ringer pH 10. As determinações voltamétricas foram realizadas com as soluções em temperatura ambiente. Para a adição do padrão foi utilizada a solução padrão de clonazepam $10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ (720 mg L^{-1}).

3.3.1.2 Determinação do grupo B

A determinação do grupo B (flurazepam, alprazolam e midazolam) foi baseada na deposição adsortiva dos fármacos no HMDE (anexo B) em um potencial de -0,8 V e na varredura catódica dos potenciais (50 mV s⁻¹) de -0,95 a -1,15 V. Como eletrólito suporte foi utilizado o tampão Ringer pH 10. As determinações voltamétricas foram realizadas com as soluções em temperatura ambiente. Para a adição do padrão foi utilizada a solução de flurazepam 10⁻³ mol L⁻¹ (1130 mg L⁻¹).

3.3.1.3 Determinação do grupo C

A determinação do grupo C (diazepam, medazepam e clordiazepóxido) foi baseada na deposição adsortiva dos fármacos no HMDE (anexo C) em um potencial de -0,8 V e na varredura catódica dos potenciais (50 mV s⁻¹) de -1,05 a -1,25 V. Como eletrólito suporte foi utilizado o tampão Ringer pH 10. As determinações voltamétricas foram realizadas com as soluções em temperatura ambiente. Para a adição do padrão foi utilizada a solução de diazepam 10⁻³ mol L⁻¹ (1170 mg L⁻¹).

3.3.1.4 Determinação do grupo D

A determinação do grupo D (dietilpropiona) foi baseada na deposição adsortiva do fármaco no HMDE (anexo D) em um potencial de -0,8 V e na varredura catódica dos potenciais (50 mV s⁻¹) de -1,4 a -1,7 V. Como eletrólito suporte foi utilizado o tampão Ringer pH 10. As determinações voltamétricas foram realizadas com as soluções em temperatura ambiente. Para a adição do padrão foi utilizada a solução de dietilpropiona 10⁻³ mol L⁻¹ (1110 mg L⁻¹).

3.4 Estudos realizados para a otimização da medida voltamétrica

Em todos os estudos realizados procurava-se atingir uma melhor resposta de corrente de pico (I_p) assim como uma melhor definição na forma do pico. Os estudos realizados para a otimização do método são descritos a seguir:

3.4.1 A influência do eletrólito suporte e do pH

Neste estudo observou-se o sinal voltamétrico de cada benzodiazepínico em cinco eletrólitos diferentes (Acetato, Borato, Fosfato, Britton-Robinson, Ringer), variando-se o pH de 2 a 12. 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 -1,8 V e amplitude de pulso de -50 mV.

3.4.2 Comportamento voltamétrico de misturas de benzodiazepínicos

Neste estudo observou-se o comportamento da mistura dos sete benzodiazepínicos estudados, quando os mesmos estivessem presentes na medida voltamétrica. Através deste estudo, a possibilidade de especificação de benzodiazepínicos em grupos foi investigada.

3.4.3 Estudo do potencial de deposição

Neste estudo avaliou-se o efeito do potencial de deposição no sinal voltamétrico dos benzodiazepínicos e da dietilpropiona. O potencial de deposição escolhido para o grupo A foi -0,4 V e para os grupos B, C e D foi -0,8 V.

3.4.4 Estudo do tempo de deposição

Neste estudo observou-se a influência do tempo de deposição na corrente de pico dos grupos A, B, C e D na superfície do eletrodo de mercúrio. Tempos de deposição de a 120 s foram avaliados sendo que o tempo de 15 s foi o escolhido para as determinações dos grupos. O potencial de deposição de -0,4 V para o grupo A e de -0,8 V para os grupos B, C e D foram mantidos constantes para este estudo.

3.5 Determinações voltamétricas em misturas sintéticas

Com o objetivo de avaliar a influência de cada grupo na determinação analítica dos demais foram utilizadas várias formulações sintéticas, inclusive na presença dos interferentes estudados neste trabalho. A influência na determinação de um grupo específico (A, B, C e D) na presença dos demais adulterantes e, também na presença dos interferentes, foi avaliada pelo aumento ou diminuição da eficiência de recuperação de cada grupo em suas condições de determinação otimizadas.

3.6 Estudo dos interferentes

Para verificar a interferência de outros fármacos na determinação de cada grupo utilizou-se a voltametria adsortiva de redissolução catódica (AdCSV). Os interferentes estudados foram: dietilpropiona, fluoxetina, femproporex, sibutramina e metformina.

A influência dos interferentes na determinação de cada grupo (A, B, C e D) foi avaliada com base na diminuição ou aumento da corrente de pico do sinal voltamétrico de cada grupo em suas condições de determinação otimizadas.

3.7 Determinações voltamétricas de corrente alternada

Medidas por voltametria de corrente alternada foram realizadas com o objetivo de verificar a ocorrência da adsorção das espécies orgânicas no HMDE. Os fármacos investigados foram os 1,4 benzodiazepínicos clonazepam, flurazepam, alprazolam, midazolam, diazepam, medazepam e clordiazepóxido. A faixa de potenciais utilizada variou de -0,3 a -0,8 V para o clonazepam e de -0,6 a -1,8 V para os demais benzodiazepínicos. Os ângulos de fase estudados foram de 0° e 90° (os demais parâmetros estão descritos no anexo E). As medidas foram realizadas em tampão Ringer pH 10.

3.8 Validação Analítica do método padronizado

O estudo das características analíticas de um método analítico é realizado utilizando-se estudos capazes de garantir a exatidão, seletividade, precisão e robustez do método dentro de uma faixa específica na qual a espécie de interesse é determinada. Os principais parâmetros avaliados neste trabalho foram: linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), recuperação e especificidade.

3.8.1 Linearidade

Para o método estudado, o parâmetro linearidade foi avaliado através da confecção de curvas analíticas com os padrões para a determinação de cada grupo separadamente. A faixa de concentração estudada para os três padrões benzodiazepínicos (clonazepam, flurazepam e diazepam) e dietilpropiona foi de 1 a $30 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$.

3.8.2 Precisão e Exatidão

A precisão intra-ensaio (replicatas em um mesmo dia) e inter-ensaio (replicatas em dias diferentes) é o parâmetro que avalia a proximidade entre várias medidas efetuadas. Pode ser estimada através do coeficiente de variação (estimativa do desvio padrão relativo). Para todas as determinações efetuadas neste trabalho, os resultados foram obtidos em triplicatas e a estimativa do desvio padrão foi então calculada.

A exatidão expressa como os resultados obtidos se aproximam do valor verdadeiro. Pode ser determinada por (i) comparação dos resultados obtidos pelo novo método com os obtidos por um método de referência; (ii) análise de material de referência certificado ou (iii) testes de recuperação (ZHANG *et al.*, 1996)

Neste trabalho a exatidão do método proposto foi avaliada mediante comparação dos testes de recuperação obtidos através da análise do eletrólito suporte e da amostra fitoterápica fortificada separadamente com os padrões de cada grupos na concentração de $2 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$.

3.8.4 Limite de detecção (LD) e limite de detecção (LQ)

Os limites de detecção e de quantificação do método foram estabelecidos através das seguintes equações: o $LD = 3\sigma_B/b$ e $LQ = 10\sigma_B/b$, onde σ_B é a estimativa do desvio padrão de dez medidas da corrente base do eletrólito suporte e b é o coeficiente angular da curva analítica (SKOOG, 2007). A aplicação de procedimentos estatísticos em uma curva analítica fornece uma expressão para o cálculo de LD e LQ em função da concentração do analito.

3.8.5 Recuperação

Para os ensaios de recuperação, fez-se a análise do eletrólito suporte e das

amostras fitoterápicas, previamente fortificados com os padrões dos benzodiazepínicos e dietilpropiona (colocar as concentrações testadas nos ensaios para benzo e dietilpropiona).

3.8.6 Especificidade

A especificidade foi investigada através da análise do eletrólito suporte fortificado com os grupos A, B, C e D, na presença dos interferentes estudados. Neste estudo observou-se a ausência de picos dos interferentes na faixa de potencial de redução dos grupos A, B, C e D.

3.9 Amostras reais de formulações fitoterápicas

As formulações fitoterápicas utilizadas neste trabalho foram adquiridas em várias farmácias de manipulação na cidade de Santa Maria/RS.

Os métodos propostos na seção 3.3.1 foram aplicados na determinação seqüencial grupos A, B, C e D (ver figura 3) em 13 amostras de formulações fitoterápicas para emagrecimento.

Para as análises das 13 amostras, adotou-se o seguinte procedimento: o conteúdo (pó) de uma cápsula do fitoterápico foi dissolvido com metanol em um balão de 25 mL (extrato metanólico). A seguir, alguns mililitros do extrato metanólico (0,5 a 2 mL) foram adicionados na célula voltamétrica contendo o eletrólito suporte (tampão Ringer pH 10). Essa etapa foi seguida pela análise seqüencial dos grupos A, B, C e D nas condições otimizadas para cada grupo.

Com base nos resultados obtidos nas análises das 13 amostras fitoterápicas, ensaios de recuperação foram realizados para avaliar a eficiência do método nas amostras reais. Para este estudo foram elaboradas fortificações nas amostras 6, 10 (adulteradas) e 12 (não adulterada), com a intenção de simular uma amostra real adulterada contendo um benzodiazepínico, dietilpropiona, fluoxetina e metformina.

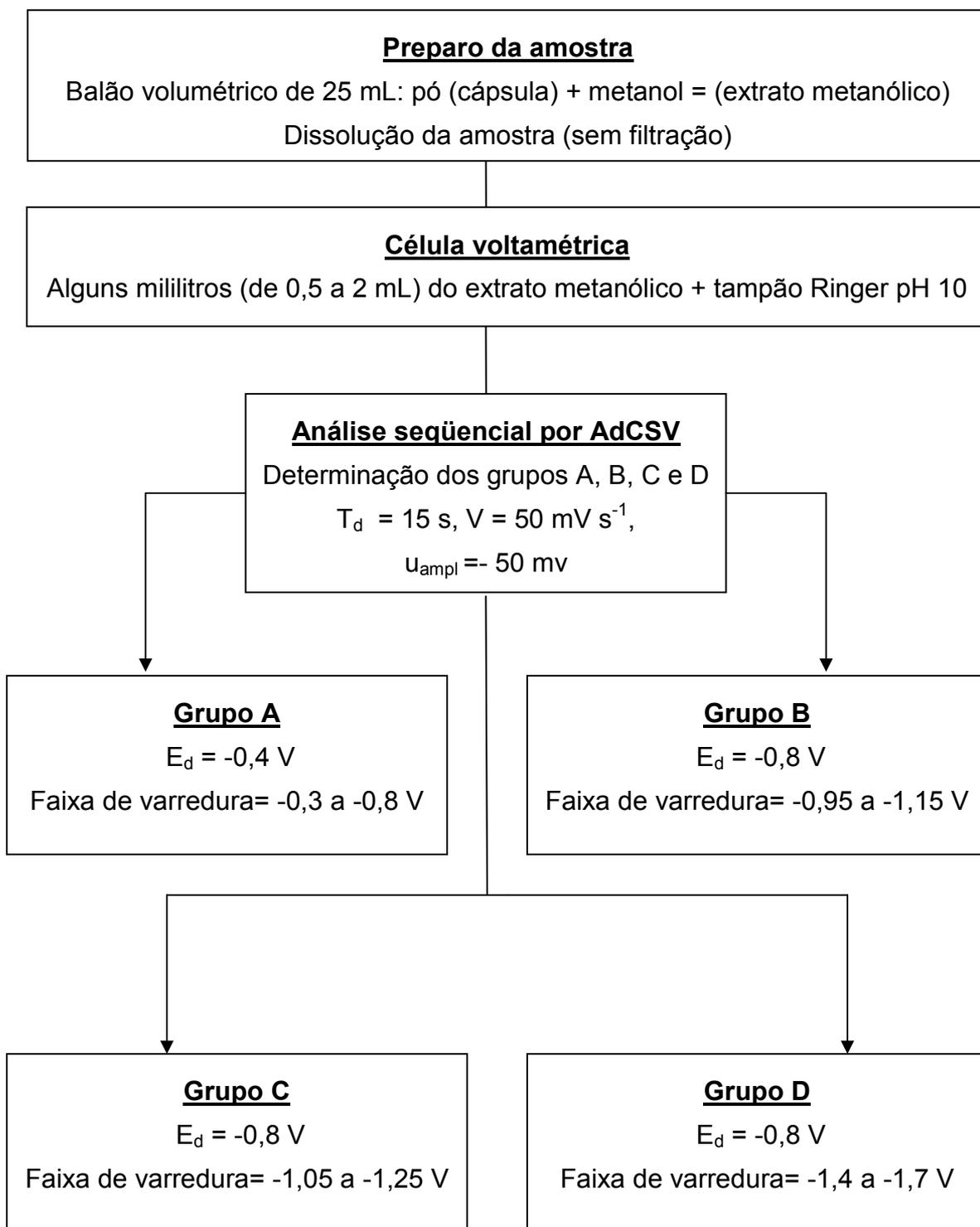


Figura 3: Resumo do procedimento experimental utilizado para a determinação seqüencial dos grupos A, B, C e D nas amostras fitoterápicas analisadas.

3.10 Controle de contaminação externa

Para garantir superfícies livres de contaminação, fez-se o uso de material plástico para armazenar as soluções utilizadas neste estudo. Os recipientes plásticos foram deixados em contato com uma solução 10% de HNO₃ em etanol 96° INPM (v/v) por, no mínimo, 48 horas, sendo posteriormente lavados com água ultrapura.

Os recipientes de vidro foram deixados em contato com uma solução de 1% HNO₃ em água (v/v) por, no mínimo, 24 horas, sendo posteriormente lavadas com água ultrapura em abundância.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Comportamento voltamétrico dos benzodiazepínicos no HMDE

Devido ao fato de a determinação voltamétrica das misturas dos 7 benzodiazepínicos estudados dar origem a no mínimo 3 sinais voltamétricos dependentes do pH, o comportamento de cada fármaco foi inicialmente estudado em diferentes valores de pH e eletrólitos suporte de diferentes composições.

4.1.1 Influência do pH e do eletrólito suporte

Neste estudo observou-se o sinal voltamétrico de cada benzodiazepínico em cinco eletrólitos diferentes (Acetato, Borato, Fosfato, Britton-Robinson e Ringer), variando-se o pH de 2 a 12. O procedimento consistiu em adicionar à célula voltamétrica 10 mL do eletrólito mais $3 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ do benzodiazepínico 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 -1,8 V e amplitude de pulso de -50 mV. Os resultados são apresentados na figura 1, que mostra o comportamento do sinal voltamétrico para cada benzodiazepínico em função do pH do eletrólito.

Na figura 4 pode ser verificado um deslocamento do sinal voltamétrico de cada benzodiazepínico no sentido catódico durante a varredura de potenciais com o aumento do pH. Este comportamento manteve-se independente da composição dos eletrólitos suportes em estudo. O deslocamento do sinal 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).

Para valores de pH < 10 pode-se atribuir os sinais voltamétricos a redução dos grupos $\text{N} \rightarrow \text{O}$, $\text{C}=\text{O}$, $\text{C}=\text{N}$, $\text{C}-\text{N}$ e NO_2 e para valores de pH ≥ 10 , a redução dos grupos $\text{N} \rightarrow \text{O}$ e $\text{C}=\text{N}$ (EL-HEFNAWAY *et al.*, 2004) nos benzodiazepínicos.

A figura 4 também mostra a possibilidade de determinação de todos os benzodiazepínicos em pH 10 em potenciais de pico entre -1,0 e -1,2 V e uma possível especiação do clonazepam em pH 10 em um potencial de pico de -0,5 V. De acordo com os resultados obtidos e considerando o fato de que a composição do eletrólito suporte não influenciou no sinal voltamétrico dos benzodiazepínicos, optou-se em utilizar o tampão Ringer pH 10 como eletrólito suporte para os experimentos seguintes. Além disso, o tampão Ringer (pH 10) apresentou uma linha base com baixo ruído e um sinal de corrente menor que 5 nA.

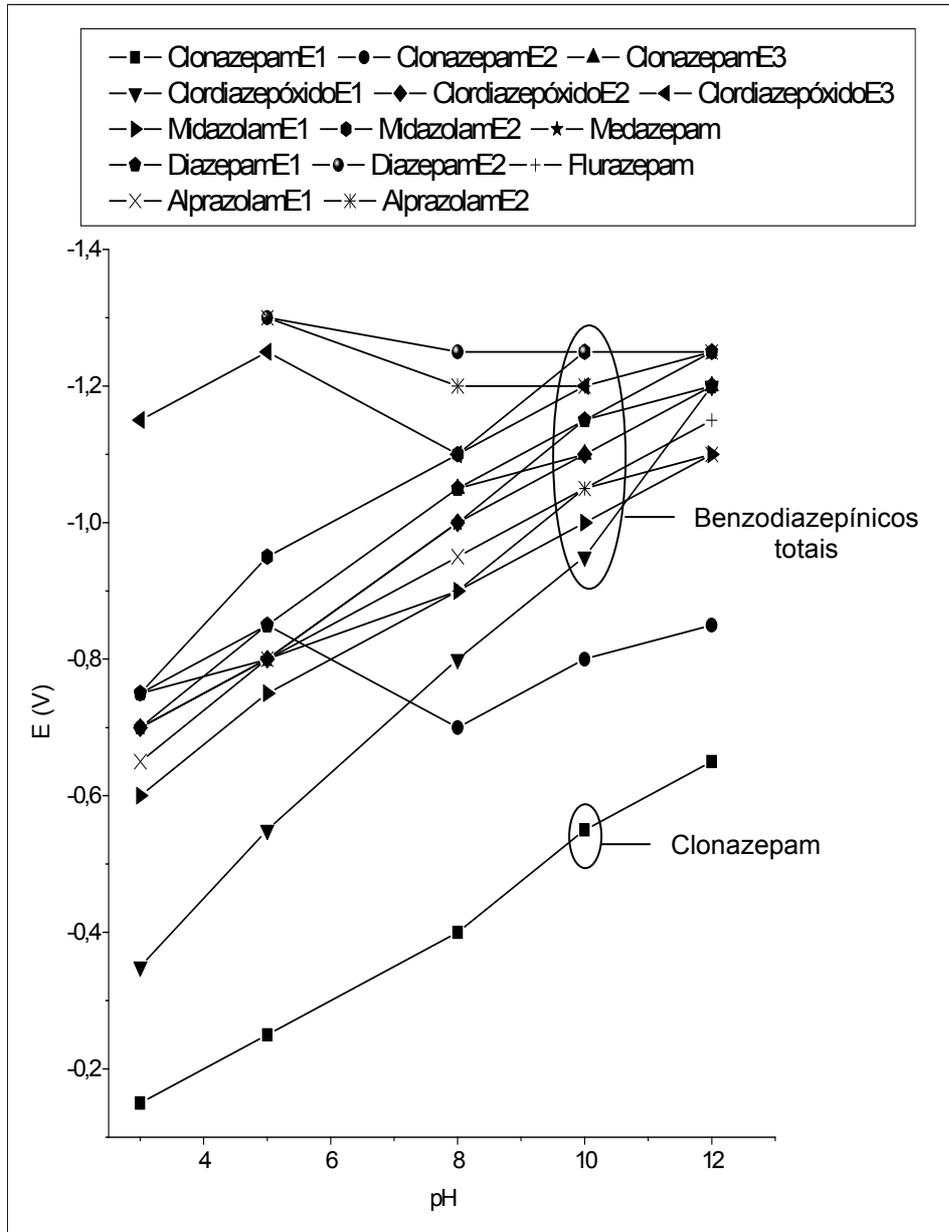


Figura 4: Influência do pH no comportamento voltamétrico dos benzodiazepínicos estudados. Os números 1, 2 e 3 representam os benzodiazepínicos que possuem mais de um sinal voltamétrico (E1, E2 e E3).

4.2 Comportamento voltamétrico de misturas de benzodiazepínicos

Devido à proximidade dos sinais voltamétricos observados na região entre $-1,0$ e $-1,3$ V para os 6 benzodiazepínicos estudados, a análise de misturas foi estudada em uma etapa subsequente.

Primeiramente, analisou-se o comportamento do sinal voltamétrico quando todos os benzodiazepínicos em estudo estão presentes na medida voltamétrica. O procedimento consistiu em adicionar à célula voltamétrica 10 mL do eletrólito suporte mais 6×10^{-5} mol L⁻¹ de clonazepam e 1×10^{-5} mol L⁻¹ de flurazepam, alprazolam, midazolam, diazepam, medazepam e clordiazepóxido. As medidas foram feitas por voltametria de pulso diferencial, adotando-se a varredura catódica dos potenciais (50 mV s⁻¹) de $-0,4$ a $-1,6$ V e amplitude de pulso de -50 mV. Os resultados são apresentados na figura 5.

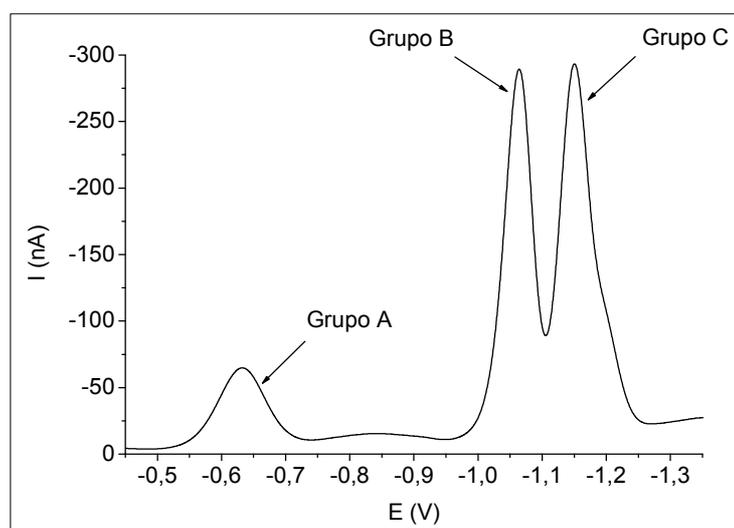


Figura 5: Sinais voltamétricos da mistura de benzodiazepínicos. Solução de medida: 10 mL de tampão Ringer pH 10 + 6×10^{-5} mol L⁻¹ de clonazepam + 1×10^{-5} mol L⁻¹ dos demais benzodiazepínicos. Grupo A: clonazepam; Grupo B: flurazepam, midazolam e alprazolam; Grupo C: diazepam, medazepam e clordiazepóxido.

A figura 5 mostra três sinais voltamétricos, que serão chamados de grupos A, B e C. O grupo A apresenta sinal voltamétrico em $-0,60$ V, o grupo B em -

1,05 V e o grupo C em -1,15 V. Com base no surgimento destes três sinais voltamétricos originados da mistura dos benzodiazepínicos, investigou-se quais seriam os benzodiazepínicos pertencentes a cada grupo (A, B e C). Para isto, adotou-se o seguinte procedimento: adicionou-se 10 mL do eletrólito suporte mais $1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de cada benzodiazepínico à célula voltamétrica; na etapa posterior adotou-se a varredura catódica dos potenciais de -0,3 a -0,8 V, para identificar o grupo A, e de -0,8 a -1,5 V, para identificar os grupos B e C; após fez-se a medida com adição do padrão de cada um dos sete benzodiazepínicos nas respectivas faixas de potencial.

Através deste estudo, pode-se verificar que o grupo A representa o clonazepam, o grupo B representa o flurazepam, alprazolam e midazolam e o grupo C representa o diazepam, medazepam e clordiazepóxido. Os resultados são apresentados nas figuras 6, 7 e 8 que mostram os voltamogramas obtidos para os grupos A, B e C, respectivamente.

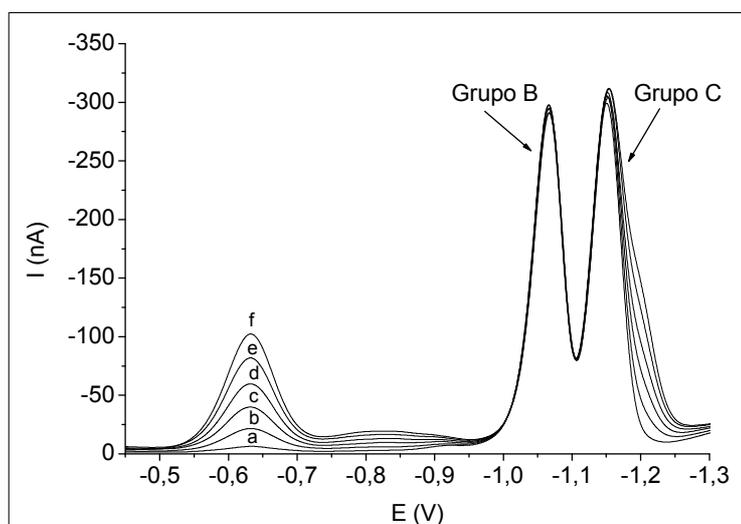


Figura 6: Sinais voltamétricos do grupo A: (a) = $1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de clonazepam, (b) = (a) + $3 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de clonazepam, (c) = (a) + $6 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de clonazepam, (d) = (a) + $9 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de clonazepam, (e) = (a) + $12 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de clonazepam, (F) = (a) + $15 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de clonazepam, $T_d = 15 \text{ s}$, $E_d = -0,4 \text{ V}$, $V = 50 \text{ mV s}^{-1}$. Solução de medida: 10 mL de tampão Ringer pH 10 + $1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de cada benzodiazepínico.

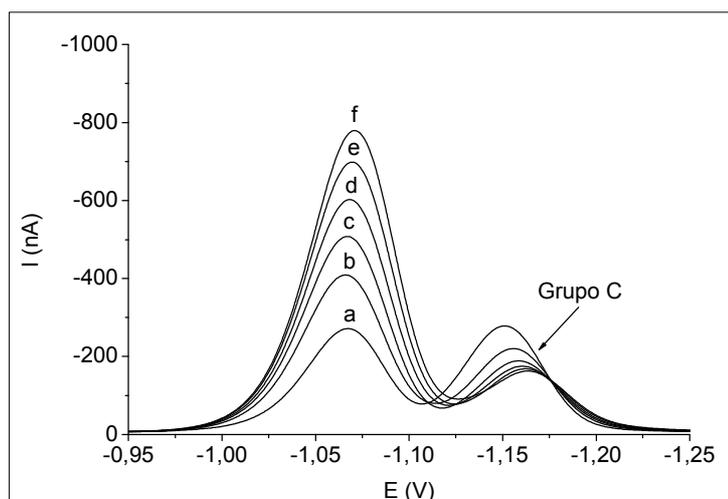


Figura 7: Sinais voltamétricos do grupo B: (a) = 1×10^{-5} mol L⁻¹ de flurazepam, alprazolam e midazolam, (b) = (a) + 3×10^{-5} mol L⁻¹ de flurazepam, (c) = (a) + 6×10^{-5} mol L⁻¹ de flurazepam, (d) = (a) + 9×10^{-5} mol L⁻¹ de flurazepam, (e) = (a) + 12×10^{-5} mol L⁻¹ de flurazepam, (F) = (a) + 15×10^{-5} mol L⁻¹ de flurazepam, $T_d = 15$ s, $E_d = -0,8$ V, $V = 50$ mV s⁻¹. Solução de medida: 10 mL de tampão Ringer pH 10 + 1×10^{-5} mol L⁻¹ de cada benzodiazepínico.

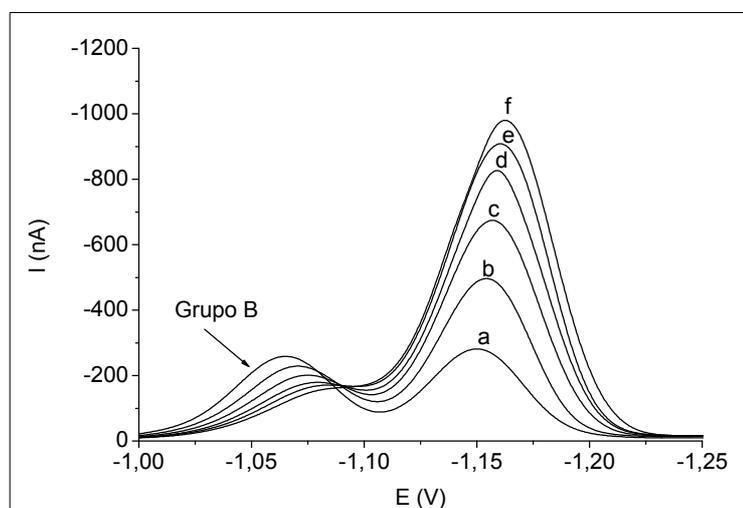


Figura 8: Sinais voltamétricos do grupo C: (a) = 1×10^{-5} mol L⁻¹ de diazepam, medazepam e clordiazepóxido, (b) = (a) + 3×10^{-5} mol L⁻¹ de diazepam, (c) = (a) + 6×10^{-5} mol L⁻¹ de diazepam, (d) = (a) + 9×10^{-5} mol L⁻¹ de diazepam, (e) = (a) + 12×10^{-5} mol L⁻¹ de diazepam, (F) = (a) + 15×10^{-5} mol L⁻¹ de diazepam, $T_d = 15$ s, $E_d = -0,8$ V, $V = 50$ mV s⁻¹. Solução de medida: 10 mL de tampão Ringer pH 10 + 1×10^{-5} mol L⁻¹ de cada benzodiazepínico.

Os voltamogramas mostrados nas figuras 6, 7 e 8 mostram a possibilidade de determinação de 7 benzodiazepínicos como adulterantes e a especificação entre 3 grupos, com base nos potenciais de pico de -0,6, -1,05 e -1,15 V.

4.3 Estudo do potencial e tempo de deposição no HMDE de misturas de benzodiazepínicos

Uma vez definido quais os benzodiazepínicos pertencentes aos grupos A, B e C e estabelecida a possibilidade de especificação entre 3 grupos de adulterantes, tornou-se necessário estudar dois parâmetros fundamentais na determinação voltamétrica: o potencial e o tempo de deposição, que influenciam diretamente na seletividade e sensibilidade das medidas voltamétricas por AdCSV.

O potencial e o tempo de deposição a ser empregado depende principalmente do tipo de eletrodo, do eletrólito suporte e da substância a ser determinada (SKOOG, 2007). Assim, em um método voltamétrico baseado na deposição adsorptiva deve-se empregar um potencial de deposição igual ou próximo ao potencial de adsorção (dos SANTOS *et al.*, 2002). O efeito do potencial de deposição no sinal voltamétrico dos benzodiazepínicos estudados, devido à redução dos benzodiazepínicos adsorvidos, é mostrado na figura 9. O potencial de deposição escolhido para o grupo A foi -0,4 V (figura 9A), para os grupos B e C foi -0,8 V (figuras 9B e 9C).

A figura 10 mostra o efeito do tempo de deposição na corrente de pico, sendo o tempo de deposição de 15 s o escolhido para as análises.

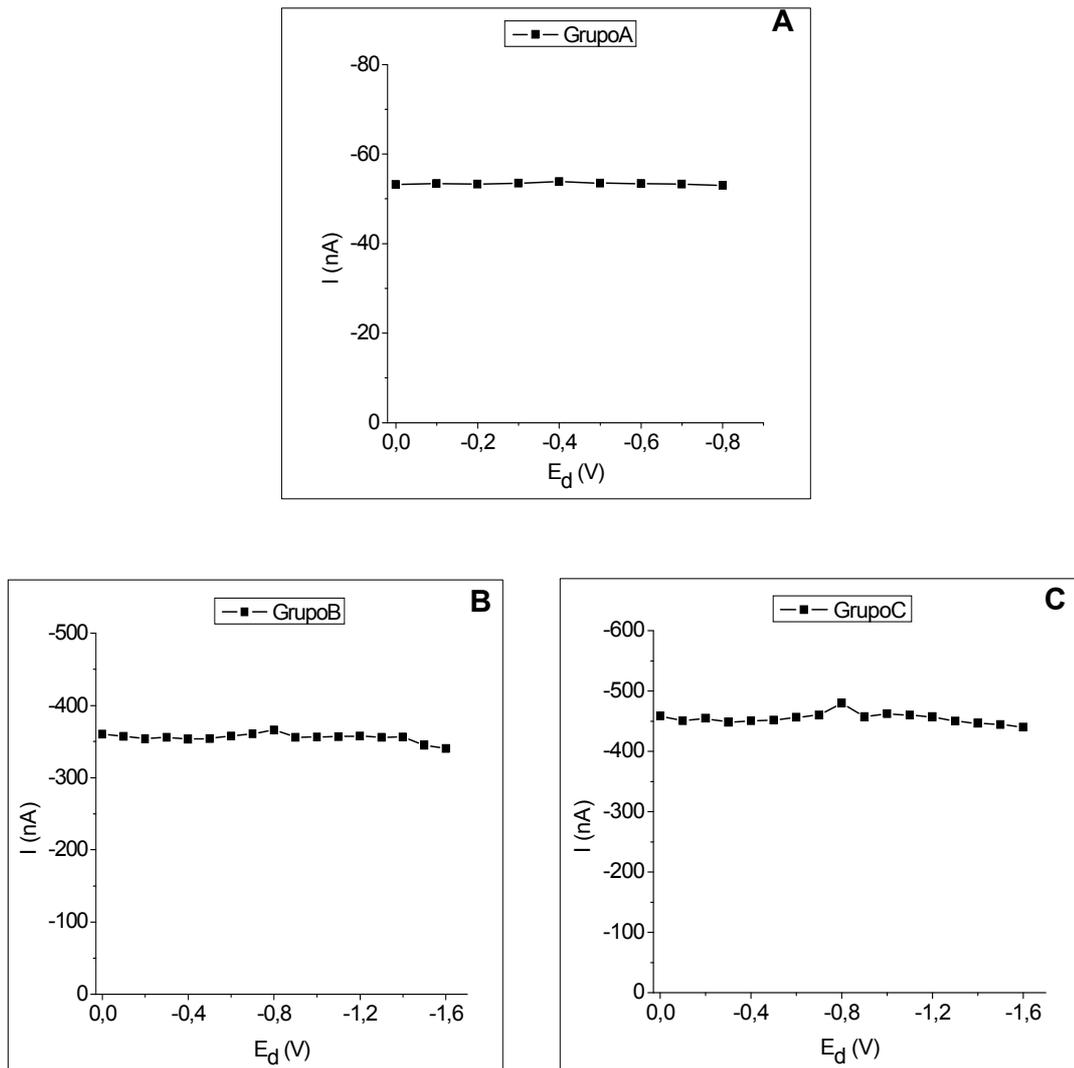


Figura 9: Estudo do potencial de deposição para os benzodiazepínicos; $V = 50 \text{ mV s}^{-1}$, $T_d = 15 \text{ s}$. Solução de medida: (A) 10 mL tampão Ringer pH 10 + $1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de clonazepam; (B) 10 mL tampão Ringer pH 10 + $1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de flurazepam, alprazolam e midazolam; (C) 10 mL tampão Ringer pH 10 + $1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de diazepam, medazepam e clordiazepóxido.

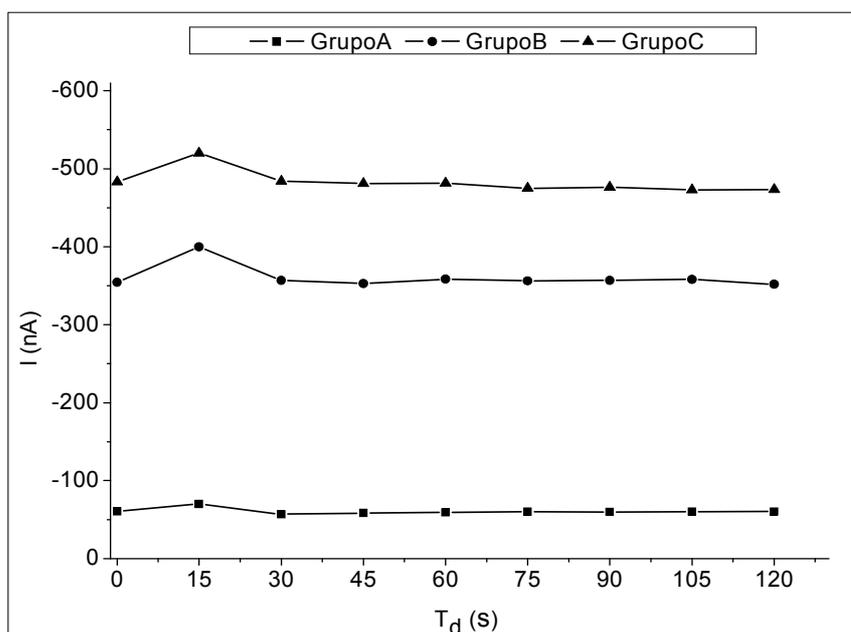


Figura 10: Estudo do tempo de deposição para os benzodiazepínicos. Grupo A: mesmo procedimento descrito na figura 6A e $E_d = -0,4$ V; Grupo B: mesmo procedimento descrito na figura 6B e $E_d = -0,8$ V; Grupo C: mesmo procedimento descrito na figura 6C e $E_d = -0,8$ V.

A figura 10 mostra que o T_d não influencia de maneira significativa a corrente de pico para os 7 benzodiazepínicos estudados. Este efeito observado deve-se provavelmente ao fato de a adsorção dos benzodiazepínicos 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). Esse comportamento foi observado pela voltametria de corrente alternada. Sendo assim, o tempo de deposição de 15s foi escolhido para todos os benzodiazepínicos estudados.

4.4 Estudo do mecanismo de reação de benzodiazepínicos no HMDE por voltametria de corrente alternada (AC)

Na voltametria de corrente alternada é possível obter informações a respeito da presença de fenômenos de adsorção na superfície do eletrodo (BOND, 1980).

Portanto, essa técnica foi empregada para verificar se as transferências de elétrons ocorrem com as moléculas de benzodiazepínicos no estado adsorvido e se os produtos destas reações adsorvem ou não na superfície do eletrodo de mercúrio.

As medidas de AC foram realizadas nas faixas de potenciais onde ocorre a redução de cada grupo (grupo A de -0,3 a -0,8 V, grupos B e C de -0,6 a -1,8 V). Para discriminar a corrente faradaica da capacitiva, as medidas foram realizadas com ângulos $\varphi = 0^\circ$ e $\varphi = 90^\circ$ fora de fase (os demais parâmetros estão descritos no anexo E). As medidas foram realizadas em tampão Ringer pH 10. Os voltamogramas AC estão ilustrados nas figuras 11, 12 e 13.

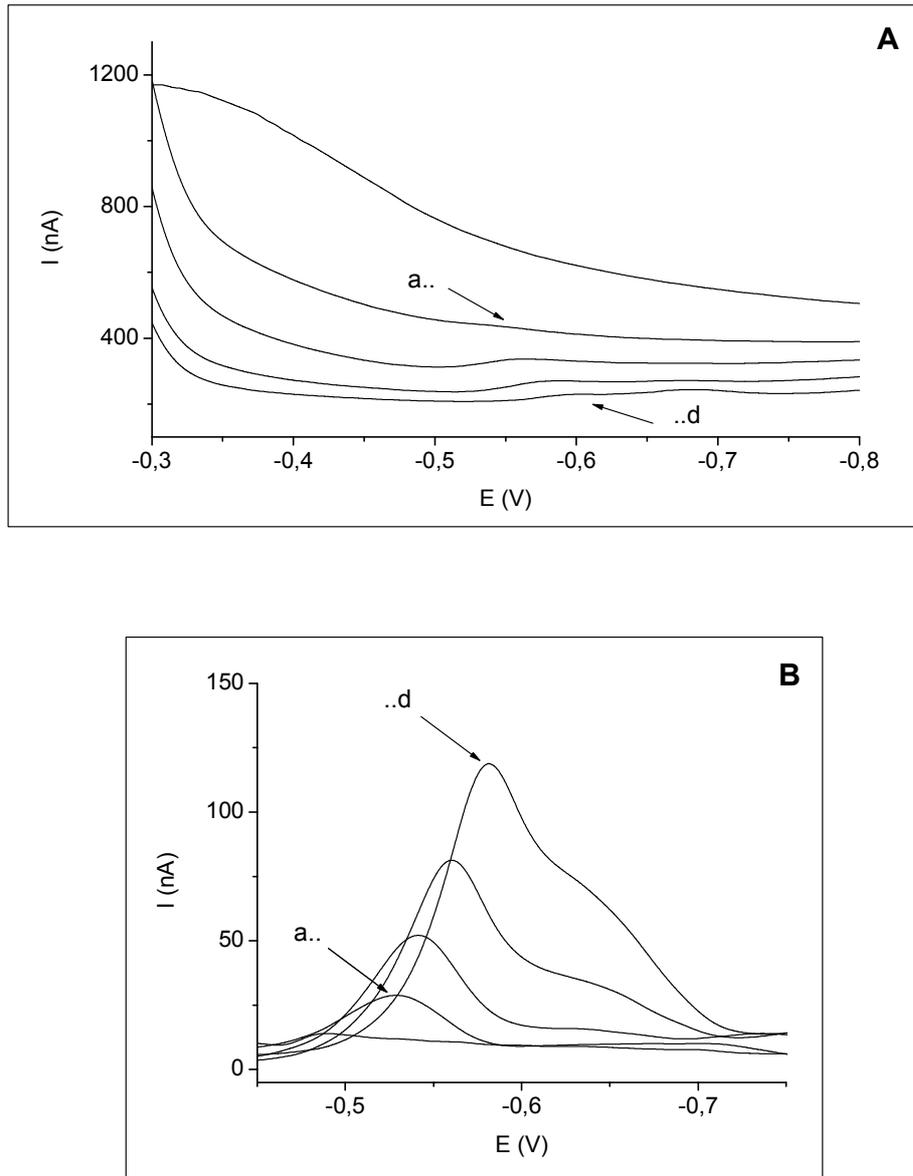


Figura 11: Voltamograma AC do clonazepam. (A) $\phi = 90^\circ$ e (B) $\phi = 0^\circ$. $T_d = 15$ s, $f = 60$ Hz, usando tampão Ringer pH 10: (a) 3×10^{-5} mol L $^{-1}$ de clonazepam, (b) 6×10^{-5} mol L $^{-1}$ de clonazepam, (c) 12×10^{-5} mol L $^{-1}$ e clonazepam, (d) 20×10^{-5} mol L $^{-1}$ de clonazepam.

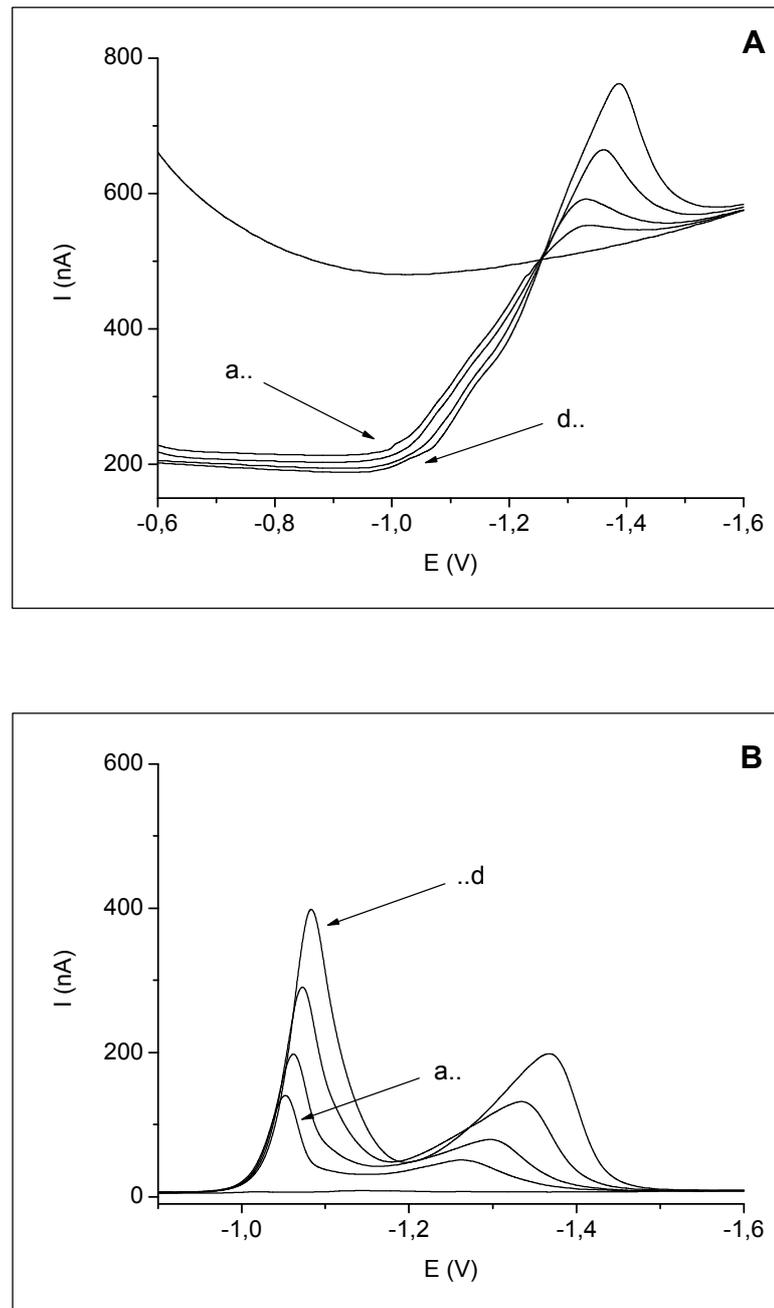


Figura 12: Voltamograma AC do flurazepam. (A) $\varphi = 90^\circ$ e (B) $\varphi = 0^\circ$. $T_d = 15$ s, $f = 60$ Hz, usando tampão Ringer pH 10: (a) 3×10^{-5} mol L $^{-1}$ de flurazepam, (b) 6×10^{-5} mol L $^{-1}$ de flurazepam, (c) 12×10^{-5} mol L $^{-1}$ de flurazepam, (d) 20×10^{-5} mol L $^{-1}$ de flurazepam.

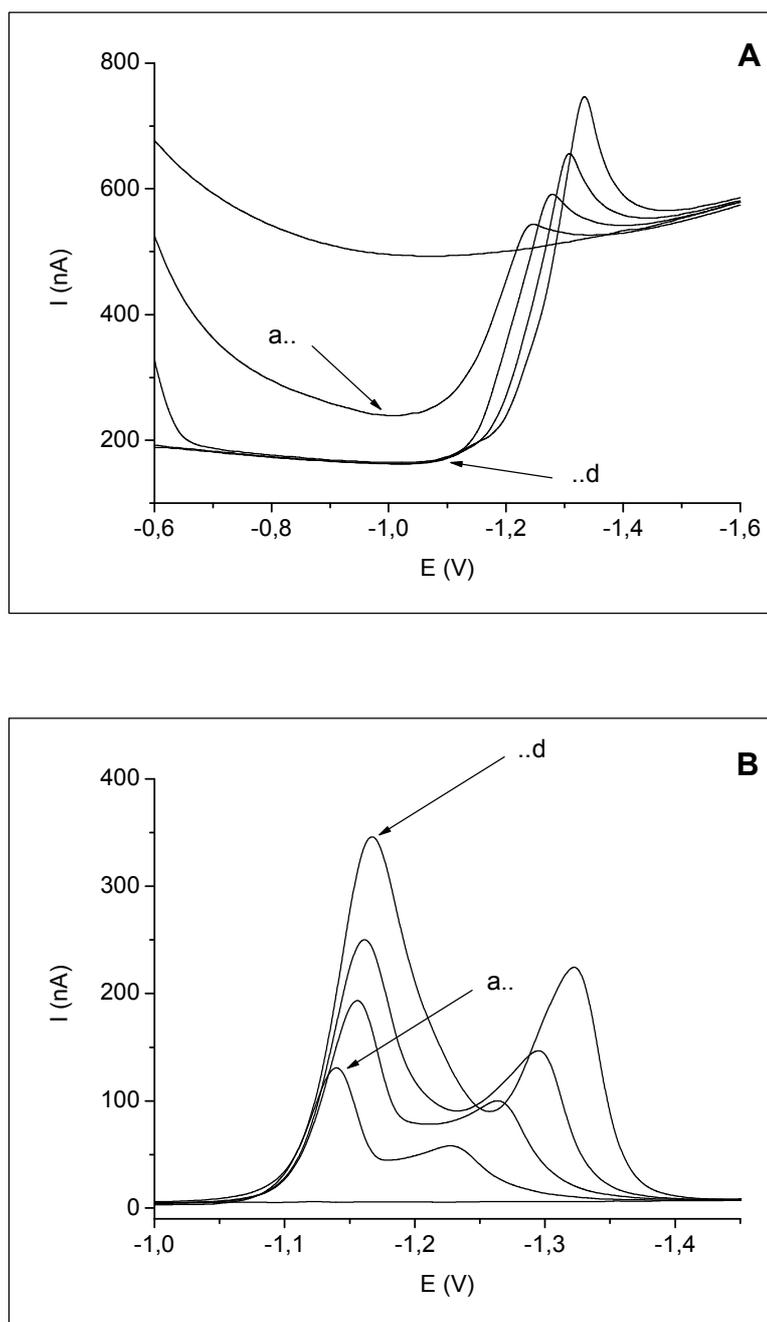


Figura 13: Voltamograma AC do diazepam. (A) $\varphi = 90^\circ$ e (B) $\varphi = 0^\circ$. $T_d = 15$ s, $f = 60$ Hz, usando tampão Ringer pH 10: (a) 3×10^{-5} mol L $^{-1}$ de diazepam, (b) 6×10^{-5} mol L $^{-1}$ de diazepam, (c) 12×10^{-5} mol L $^{-1}$ de diazepam, (d) 20×10^{-5} mol L $^{-1}$ de diazepam.

Os voltamogramas das figuras 11A, 12A e 13A mostram a adsorção dos benzodiazepínicos na superfície do eletrodo de mercúrio. Este efeito é observado pela diminuição da corrente do eletrólito suporte (na região de potenciais na qual as

espécies orgânicas são adsorvidas na superfície do eletrodo) com o aumento da concentração das espécies investigadas.

O voltamograma AC da figura 11A mostra a adsorção do clonazepam (grupo A) na superfície do eletrodo de mercúrio. Este efeito foi observado no potencial de adsorção da espécie na superfície do eletrodo, que ocorre entre -0,3 e -0,8 V.

A figura 12A mostra a adsorção do flurazepam (representando o grupo B) na superfície do eletrodo, que ocorre entre -0,6 e -1,05 V. Os demais integrantes do grupo B (alprazolam e midazolam) também apresentaram o mesmo comportamento na faixa de potenciais utilizada.

O voltamograma AC da figura 13A mostra a adsorção do diazepam (representando o grupo C) na superfície do eletrodo, que ocorre entre -0,6 e -1,15 V. Os demais integrantes do grupo C (medazepam e clordiazepóxido) apresentaram o mesmo comportamento na faixa de potenciais utilizada.

Comparando as figuras 12 e 13, pode-se observar que o potencial de desorção para as espécies orgânicas dos grupos B e C é o mesmo, em torno de -1,3 V.

De acordo com os resultados experimentais obtidos, pode-se concluir que, na etapa de deposição ocorre a adsorção dos benzodiazepínicos no HMDE potenciais entre -0,3 e -0,8 V para o grupo A e entre -0,6 e -1,15 V para o grupo B e C, seguido da redissolução pela redução dos benzodiazepínicos durante a varredura de potenciais. O mecanismo de reação proposto para os grupos A, B e C na superfície do eletrodo é baseado nas referências de Oelschlager (1983) e dos Santos *et al.* (2002) e está representado a seguir:

— **Grupo A:**



— Grupos B e C:



O grupo eletroativo do grupo A (clonazepam) é o grupo NO_2 , o qual é reduzido envolvendo um processo de transferência de quatro elétrons e quatro prótons em um potencial de $-0,50 \text{ V}$. Já para os grupos B e C, o grupo eletroativo é o C=N , o qual é reduzido envolvendo um processo de transferência de dois elétrons e dois prótons em uma faixa de potenciais de $-1,05 \text{ a } -1,15 \text{ V}$. Esses resultados estão qualitativamente de acordo com os obtidos por dos Santos *et al.* (2002) num estudo da complexação do cobre pelos 1,4-Benzodiazepínicos (clonazepam, diazepam, medazepam e flurazepam) por voltametria cíclica e de pulso diferencial, em que os sinais voltamétricos da redução dos grupos NO_2 e C=N são idênticos aos obtidos no presente trabalho.

4.5 Análise quantitativa dos benzodiazepínicos

Com base nos parâmetros instrumentais otimizados para os grupos A, B e C, descritos anteriormente, analisou-se o comportamento voltamétrico e a sensibilidade da medida voltamétrica de cada benzodiazepínico integrante destes grupos. Neste estudo, obtiveram-se curvas analíticas que apresentaram bons coeficientes de correlação linear para a faixa de $3 \text{ a } 15 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. Além disso, como a especiação entre os benzodiazepínicos é possível apenas em grupos (A, B e C), investigou-se também a possibilidade da determinação total dos benzodiazepínicos nos grupos utilizando como padrão um dos benzodiazepínicos pertencentes a cada grupo. Neste caso, foi possível escolher o flurazepam como padrão para a determinação dos benzodiazepínicos totais do grupo B (grupo B total) e o diazepam

como padrão para a determinação dos benzodiazepínicos totais do grupo C (grupo C total). Estes mostraram maior sensibilidade e melhores coeficientes de correlação quando comparados com os demais benzodiazepínicos pertencentes aos grupos B e C, respectivamente. Os resultados podem ser observados na Tabela 4, que apresenta a regressão linear e o coeficiente de correlação para os diferentes benzodiazepínicos analisados. A figura 14 ilustra as curvas analíticas utilizadas nas análises quantitativas para os diferentes benzodiazepínicos estudados.

Tabela 4 – Parâmetros das curvas analíticas obtidas para os benzodiazepínicos analisados (faixa de concentração: 3 a 15 x 10⁻⁵ mol L⁻¹)

Grupo	Benzodiazepínicos	Potencial de pico (V)	Regressão Linear
			Coefficiente de correlação (r) Intervalo avaliado (3 a 15 x 10 ⁻⁵ mol L ⁻¹) x = nA y = mol L ⁻¹
A	Clonazepam	-0,5	y = 11,09 x - 18,40 r = 0,9964
	Flurazepam	-1,05	y = 36,23 x - 252,09 r = 0,9940
B	Alprazolam	-1,05	y = 45,86 x - 200,56 r = 0,9910
	Midazolam	-1,05	y = 48,24 x - 158,35 r = 0,9909
C	Diazepam	-1,15	y = 43,66 x - 365,24 r = 0,9940
	Medazepam	-1,15	y = 34,08 x - 412,48 r = 0,9903
	Clordiazepóxido	-1,15	y = 53,11 x - 265,30 r = 0,9902

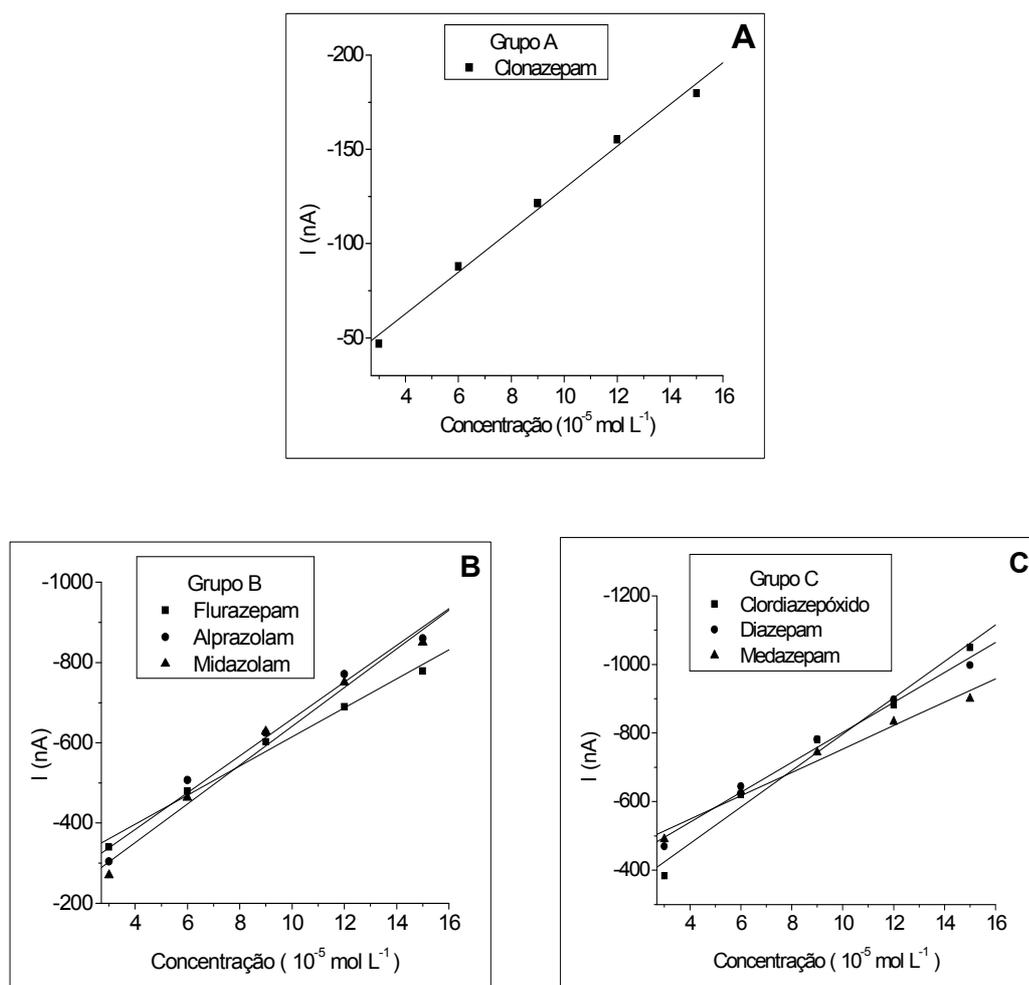


Figura 14: Curvas analíticas obtidas para os benzodiazepínicos: (A) Grupo A; (B) Grupo B; (C) Grupo C. Intervalo de concentração avaliada: 3 a $15 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. Solução de medida: 10 mL de eletrólito suporte.

Com base no comportamento voltamétrico dos grupos A, B e C apresentados foram obtidas novas curvas analíticas para verificar a linearidade dos métodos propostos para a determinação quantitativa dos grupos A, B (em função do flurazepam) e C (em função do diazepam), em baixas concentrações. As curvas analíticas apresentaram bons coeficientes de correlação na faixa de concentração de 1 a $30 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$: $r = 0,9982$, $r = 0,9978$ e $r = 0,9979$ para o clonazepam, flurazepam e diazepam, respectivamente. As figuras 15, 16 e 17 mostram os voltamogramas para o clonazepam, flurazepam e diazepam com adições crescentes dos respectivos padrões à célula voltamétrica contendo o eletrólito suporte.

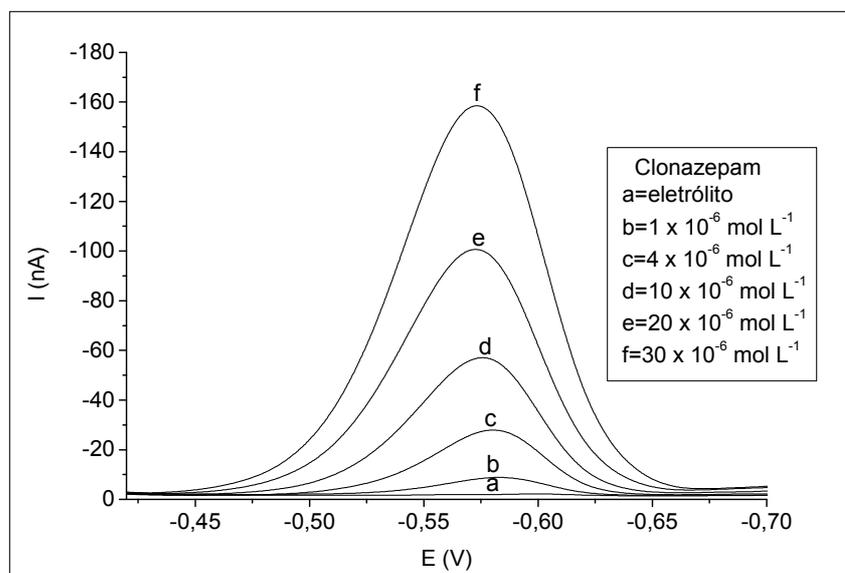


Figura 15: Sinais voltamétricos do clonazepam por AdCSV: adições de clonazepam $1 - 30 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, $T_d = 15 \text{ s}$, $E_d = -0,4 \text{ V}$, $V = 50 \text{ mV s}^{-1}$. Solução de medida: 10 mL de eletrólito suporte.

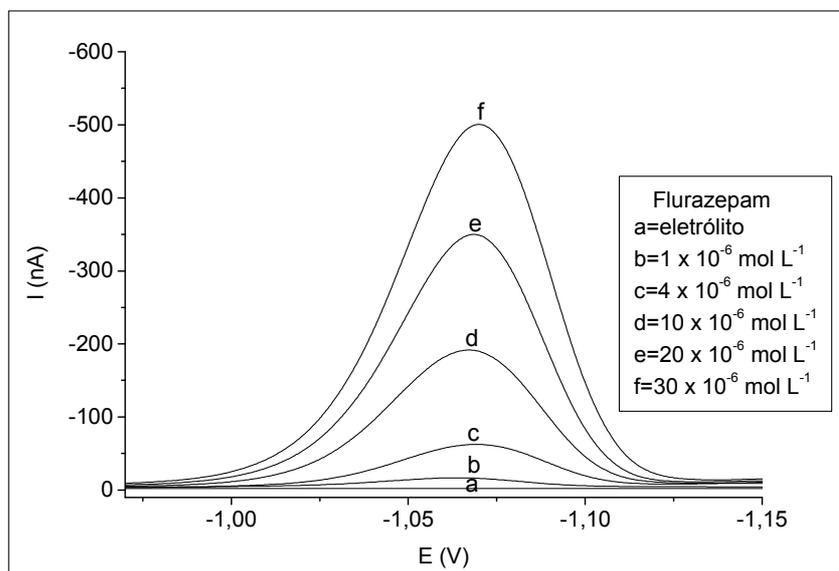


Figura 16: Sinais voltamétricos do flurazepam por AdCSV: adições de flurazepam $1 - 30 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, $T_d = 15 \text{ s}$, $E_d = -0,8 \text{ V}$, $V = 50 \text{ mV s}^{-1}$. Solução de medida: 10 mL de eletrólito suporte.

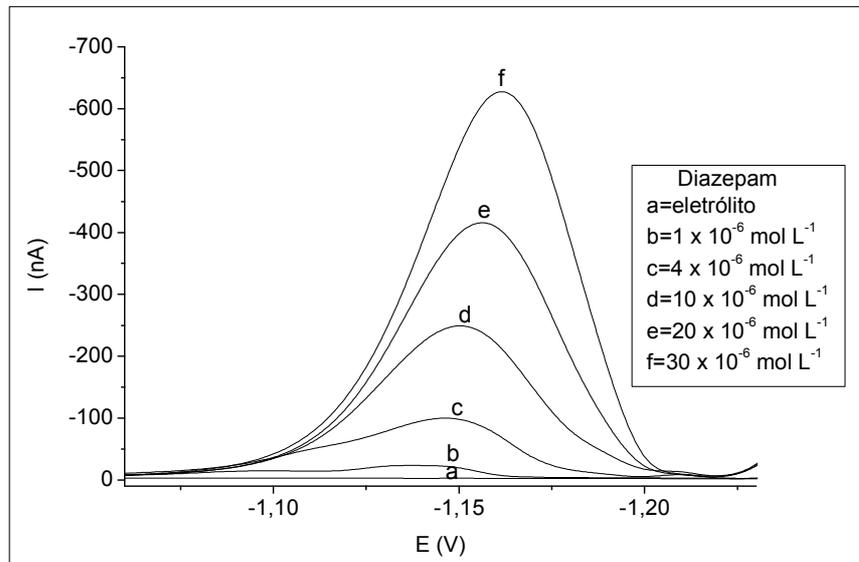


Figura 17: Sinais voltamétricos do diazepam por AdCSV: adições de diazepam $1 - 30 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, $T_d = 15 \text{ s}$, $E_d = -0,8 \text{ V}$, $V = 50 \text{ mV s}^{-1}$. Solução de medida: 10 mL de eletrólito suporte.

Para um melhor esclarecimento das informações analíticas obtidas até o momento, a figura 18 resume o protocolo experimental para a determinação de cada grupo de adulterante.

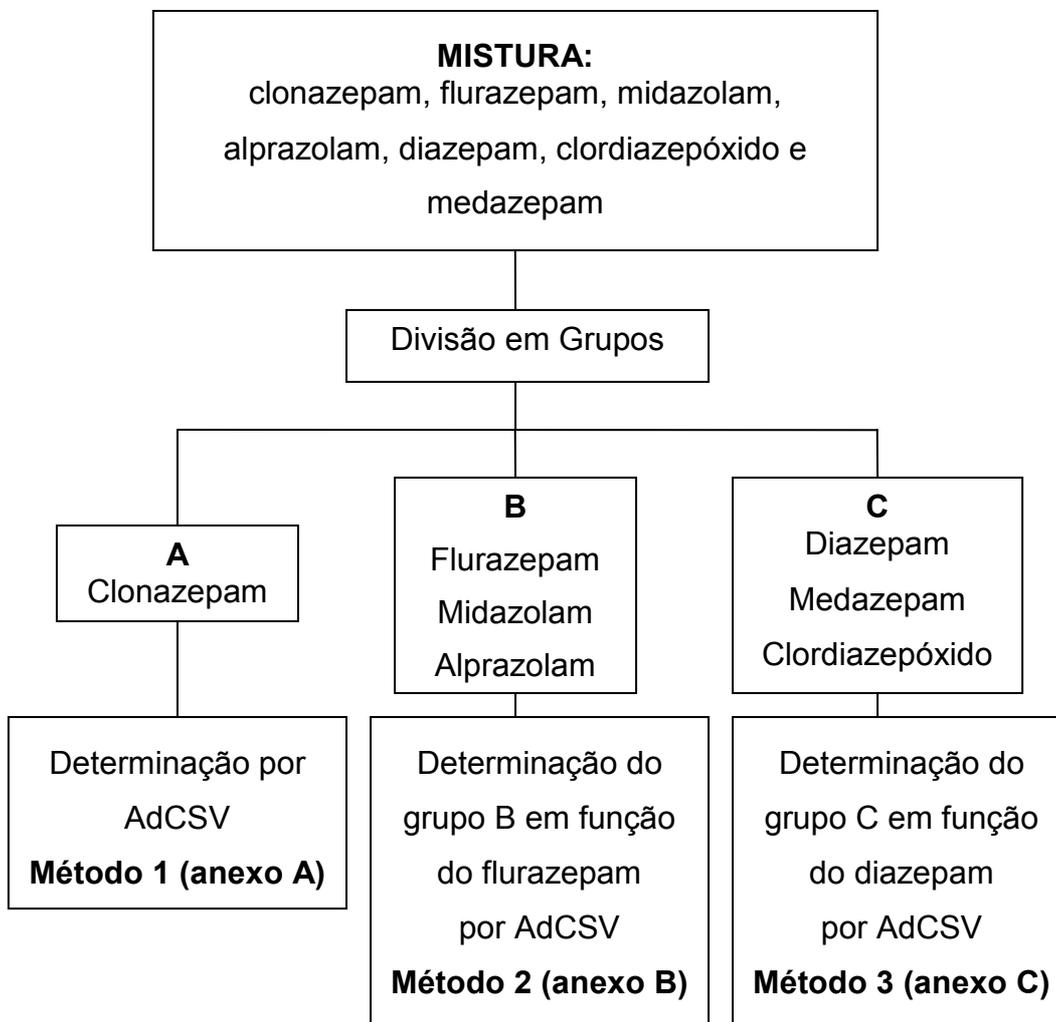


Figura 18: Esquema representativo do protocolo experimental para a especiação de benzodiazepínicos em grupos (A, B e C) como adulterantes.

4.6 Especiação e determinação dos grupos A, B e C em misturas sintéticas empregando AdCSV

Uma vez definidos os grupos de adulterantes benzodiazepínicos (A, B e C) e os padrões (clonazepam, flurazepam e diazepam) que serão utilizados para a determinação quantitativa de cada grupo, ensaios de recuperação foram realizados

para avaliar a reprodutibilidade dos métodos propostos. Nesta etapa, misturas sintéticas contendo os benzodiazepínicos de cada grupo específico foram formuladas separadamente, ou seja, uma mistura para a determinação do grupo A, outra para a determinação do grupo B (em função do flurazepam) e outra para a determinação do grupo C (em função do diazepam).

Para os ensaios de recuperação dos grupos A, B e C soluções de medida contendo o eletrólito suporte (tampão Ringer pH 10) foram fortificadas separadamente com: $2 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de clonazepam (determinação do grupo A); $2 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de flurazepam, alprazolam e midazolam (determinação do grupo B total) e $2 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de diazepam, medazepam e clordiazepóxido (determinação do grupo C total). Os resultados são mostrados na Tabela 5.

Tabela 5 – Resultado dos ensaios de recuperação para os grupos A, B e C por AdCSV

Grupo	Benzodiazepínico adicionado na célula de medida ($10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$)			Determinado por AdCSV ($10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) Recuperação (%)	
	Clonazepam				
A	2			2,04	102,0
Flurazepam Alprazolam Midazolam					
B	2	2	2	5,21	86,8
Diazepam Medazepam Clordiazepóxido					
C	2	2	2	6,17	102,8

4.7 Validação analítica do método padronizado

Neste trabalho, os parâmetros avaliados para a validação do método seqüencial para a determinação de benzodiazepínicos e dietilpropiona foram: linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ) e especificidade.

4.7.1 Linearidade

Para o método estudado foi estabelecida uma faixa linear de trabalho entre 1 a $30 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ com os respectivos padrões para a determinação de cada grupo. O coeficiente de correlação da curva analítica obtido para o grupo A foi de 0,9982, para o grupo B de 0,9978, para o grupo C de 0,9979 e para o grupo D de 0,9996 para esta faixa de trabalho.

4.7.2 Precisão

Neste trabalho a precisão intra-ensaio (replicatas em um mesmo dia) foi avaliada, empregando solução padrão de clonazepam, flurazepam, diazepam e dietilpropiona, na concentração de $3 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$. A estimativa do desvio padrão para os grupos A, B, C e D (n=5), foi menor que 3%. A precisão inter-ensaio foi avaliada em cinco dias diferentes para o mesmo nível de concentração avaliado para a precisão intra-ensaio e a estimativa de desvio padrão foi < 6 %. Os resultados obtidos para a precisão intra-ensaio e inter-ensaio foram satisfatórios, segundo a ANVISA que preconiza coeficiente de variação inferior a 15 %.

4.7.2 Exatidão

A exatidão do método proposto foi avaliada analisando-se separadamente as soluções padrão para a determinação de cada grupo, contendo a concentração de $2,0 \pm 0,2 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ a qual foi adicionado em uma amostra fitoterápica. A concentração recuperada de clonazepam foi de $1,97 \pm 0,5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, para o flurazepam foi de $1,98 \pm 0,4 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, para o diazepam foi de $1,98 \pm 0,4 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ e para a dietilpropiona foi de $1,99 \pm 0,5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$. A exatidão apresentou coeficiente de variação menor que 2 % para os padrões dos grupos A, B, C e D. Estes resultados são satisfatórios e comprovam a exatidão do método voltamétrico proposto, segundo as normas da ANVISA, as quais preconizam coeficientes de variação inferiores a 15 %.

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

Os limites de detecção e quantificação do método foram estabelecidos através das seguintes equações: $LD = 3\sigma_B/b$ e $LQ = 10\sigma_B/b$, onde σ_B é a estimativa do desvio padrão de dez medidas da corrente base do eletrólito suporte e b é o coeficiente angular da curva analítica (SKOOG, 2007). Para os cálculos do LD e LQ para os grupos A, B, C e D, curvas analíticas foram feitas nas concentrações de 1 a $10 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ com os respectivos padrões de cada grupo separadamente. Os resultados podem ser observados na Tabela 6.

Tabela 6 – Valores de LD e LQ para os grupos A, B e C

Grupo	LD ($10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$)	LQ ($10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$)
A	20,0	68,0
B	2,7	9,0
C	2,2	7,2
D	15,0	50,0

4.8 Estudo dos interferentes na determinação e especiação dos grupos A, B, C e D por AdCSV

A possível interferência do antidepressivo, dos anorexígenos e do hipoglicêmico foi investigada pela adição de quantidades crescentes do padrão específico para a determinação de cada grupo à célula voltamétrica, na presença de uma concentração fixa dos grupos (A ou B ou C) e dos interferentes estudados ($2 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de cada interferente). Os resultados são apresentados na Tabela 7.

De acordo com a Tabela 7, observa-se que o antidepressivo, os anorexígenos e o hipoglicêmico testados não interferem de forma significativa no sinal voltamétrico dos benzodiazepínicos dos grupos A, B e C; isto é, não causam um aumento do sinal voltamétrico para os mesmos. Conclui-se então, que a determinação voltamétrica dos benzodiazepínicos dos grupos A, B e C pode ser realizada na presença dos interferentes estudados sem nenhuma interferência.

Tabela 7 – Determinação dos benzodiazepínicos do grupo A, B e C em misturas sintéticas na presença dos interferentes^a

Grupo	Benzodiazepínico adicionado na célula de medida (10^{-6} mol L ⁻¹)			Determinado por AdCSV (10^{-6} mol L ⁻¹) Recuperação (%)	
	Clonazepam				
A	1			0,94	94,0
	2			2,06	103,0
	3			2,99	99,7
B	Flurazepam	Alprazolam	Midazolam		
	1	1	1	2,21	73,7
	2	2	2	5,40	90,0
	3	3	3	9,24	102,0
C	Diazepam	Medazepam	Clordiazepóxido		
	1	1	1	2,93	97,7
	2	2	2	5,42	90,3
	3	3	3	8,84	98,2

^a Fluoxetina, sibutramina, femproporex, metformina e dietilpropiona

Com a intenção de prever se os grupos B e C podem interferir na determinação um do outro, realizaram-se ensaios de recuperação com misturas sintéticas dos grupos B e C apenas, bem como na presença dos interferentes. Para os ensaios de recuperação de misturas sintéticas dos grupos B e C na ausência dos interferentes, soluções de medida contendo o eletrólito suporte (tampão Ringer pH 10) foram fortificadas com 2×10^{-6} mol L⁻¹ de cada benzodiazepínico integrantes dos grupos B e C e a medida voltamétrica realizada com adições crescentes de flurazepam ou diazepam. As recuperações obtidas para os grupos B (concentração total) e C (concentração total) foram acima de 80%. Para os ensaios de recuperação na presença dos interferentes, a determinação do grupo B foi realizada através da

fortificação de soluções de medida (eletrólito suporte) com concentrações fixas dos benzodiazepínicos do grupo B (1 ou 2 ou 3 x 10⁻⁶ mol L⁻¹), 2 x 10⁻⁶ mol L⁻¹ de cada benzodiazepínico do grupo C e dos interferentes. A determinação do grupo C foi realizada através da fortificação de soluções de medida (eletrólito suporte) com concentrações fixas dos benzodiazepínicos do grupo C (1 ou 2 ou 3 x 10⁻⁶ mol L⁻¹), 2 x 10⁻⁶ mol L⁻¹ de cada benzodiazepínico do grupo B e dos interferentes. Os resultados são apresentados na Tabela 8.

Pode-se observar na Tabela 8 que tanto o grupo B quanto o C podem ser determinados um na presença do outro sem nenhuma interferência significativa de ambos.

Tabela 8 – Determinação dos grupos B total e C total em misturas sintéticas dos grupos B e C na presença dos interferentes^a

Grupo	Benzodiazepínico adicionado na célula de medida (10 ⁻⁶ mol L ⁻¹)			Determinado por AdCSV (10 ⁻⁶ mol L ⁻¹) Recuperação (%)	
	Flurazepam	Alprazolam	Midazolam		
B	1	1	1	2,56	85,3
	2	2	2	4,64	77,3
	3	3	3	7,41	82,3
C	Diazepam	Medazepam	Clordiazepóxido		
	1	1	1	2,93	97,7
	2	2	2	5,42	90,3
	3	3	3	8,84	98,2

^a Fluoxetina, Sibutramina, femproporex, metformina e dietilpropiona

Os resultados obtidos no estudo dos interferentes sugerem uma possível especiação da dietilpropiona na presença dos benzodiazepínicos num potencial de

redução de -1,6 V, visto que ela foi a única espécie que apresentou sinal voltamétrico nesta região de potencial. Esse sinal voltamétrico está qualitativamente de acordo com os resultados obtidos por de Carvalho *et al.* (2007) num estudo do comportamento voltamétrico da dietilpropiona no HMDE por voltametria cíclica e de corrente alternada.

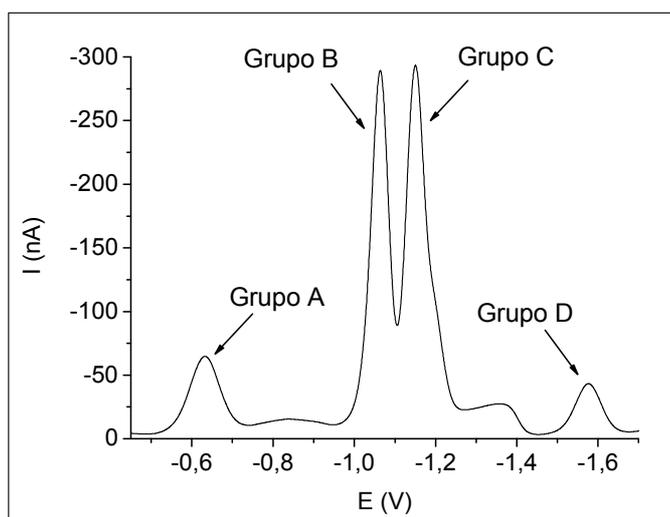


Figura 19: Sinais voltamétricos da mistura de adulterantes (grupos A, B, C e D). Solução de medida: 10 mL de tampão Ringer pH 10, 6×10^{-5} mol L⁻¹ de clonazepam, 1×10^{-5} mol L⁻¹ dos demais benzodiazepínicos e 3×10^{-5} mol L⁻¹ de dietilpropiona.

A figura 19 ilustra o sinal voltamétrico da dietilpropiona, que será chamada de grupo D, na presença dos grupos A, B e C.

Com base neste resultado foi feita a curva analítica para o grupo D (nas mesmas condições otimizadas para os grupos B e C, exceto a faixa de varredura catódica que foi de -1,4 a -1,7 V), que apresentou bom coeficiente de correlação linear $r = 0,9996$ para a faixa de concentração de 1 a 30×10^{-6} mol L⁻¹.

Também foram efetuados ensaios de recuperação para o grupo D com a intenção de avaliar a reprodutibilidade do método. Os ensaios de recuperação foram realizados na ausência e na presença dos grupos A, B e C, bem como, com os demais interferentes estudados. Para os ensaios de recuperação do grupo D, somente na presença dos grupos A, B e C, soluções de medida contendo o eletrólito suporte (tampão Ringer pH 10) foram fortificadas com 2×10^{-6} mol L⁻¹ de cada benzodiazepínico integrante dos grupos A, B e C e 2×10^{-6} mol L⁻¹ de dietilpropiona.

A medida voltamétrica foi realizada com adições crescentes de dietilpropiona. A recuperação obtida para o grupo D foi $1,72 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ (86%). Para os ensaios de recuperação na presença dos interferentes e dos grupos A, B e C, a determinação do grupo D foi realizada através da fortificação de soluções de medida (eletrólito suporte) com: concentrações fixas de dietilpropiona (2 ou 3 ou $5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$), $2 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de cada benzodiazepínico dos demais grupos e interferentes. Os resultados são apresentados na Tabela 9.

Tabela 9 - Determinação de dietilpropiona em misturas sintéticas dos benzodiazepínicos (grupos A, B e C) e na presença dos interferentes^a

Grupo	Dietilpropiona adicionada na célula de medida ($10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$)	Determinado por AdCSV	
		($10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$)	Recuperação (%)
D	2	1,40	70,0
	3	2,53	84,3
	5	4,46	89,2

^a Fluoxetina, Sibutramina, femproporex e metformina

De acordo com a Tabela 9, a determinação voltamétrica do grupo D pode ser realizada na presença dos grupos A, B e C e dos demais interferentes com recuperações que variaram entre 70 e 89,2%. Apesar da interferência observada nesta condição, a mistura sintética testada é improvável, uma vez que uma mistura de 12 adulterantes em uma única formulação seria impraticável tanto do ponto de vista econômico como clínico.

4.9 Aplicações analíticas

A aplicação dos métodos envolvendo a determinação e a especificação dos grupos A, B, C e D por AdCSV foi realizada em treze amostras de formulações

fitoterápicas para emagrecimento. Este estudo teve como objetivo investigar uma possível adulteração destas formulações fitoterápicas com os benzodiazepínicos e interferentes estudados neste trabalho. Para tal, treze amostras de formulações fitoterápicas foram analisadas nas mesmas condições experimentais otimizadas para cada grupo, conforme descrito anteriormente.

Para avaliar a eficiência dos métodos propostos nas amostras reais, realizaram-se ensaios de recuperação em algumas amostras fortificadas com os grupos A, B, C e D na presença de fluoxetina e metformina.

4.9.1 Análise seqüencial dos grupos A, B, C e D em formulações fitoterápicas para emagrecimento por AdCSV

Com o objetivo de tornar a determinação dos fármacos dos grupos A, B, C e D mais simples e rápida, optou-se pela determinação seqüencial dos grupos utilizando a mesma amostra. Neste caso, alternaram-se os parâmetros do método (faixa de varredura e potencial de deposição) para a determinação de cada grupo. A determinação seqüencial dos grupos A, B, C e D nas amostras fitoterápicas foi realizada de acordo com os parâmetros instrumentais (potencial e tempo de deposição) descritos na seção 4.3.

Para a análise das treze amostras, cujas composições estão descritas na Tabela 10, adotou-se o seguinte procedimento: primeiramente, o conteúdo (pó) de uma cápsula do fitoterápico foi dissolvido com metanol em um balão volumétrico de 25 mL (extrato metanólico). A seguir, alguns mililitros (0,5 a 2 mL) desse extrato metanólico foram adicionados à célula voltamétrica contendo o eletrólito suporte (tampão de Ringer pH 10). Essa etapa foi seguida pela análise seqüencial dos grupos A, B, C e D com adições crescentes dos respectivos padrões de cada grupo (método da adição do padrão $n = 3$). A figura 20 ilustra a determinação seqüencial dos grupos A, B, C e D na análise da amostra 8 (ver Tabela 11), que não possui adulteração por nenhum dos grupos estudados.

Tabela 10 - Composição das amostras fitoterápicas para emagrecimento estudadas neste trabalho

Amostra	Composição	Quantidade de pó/caps. (mg)
1	- Carboidratos, proteínas, gorduras, fibra alimentar, sódio; - <u>Quitosana</u>	350
2	- Carboidratos, proteínas, gorduras, fibra alimentar, sódio; - <u>Quitosana</u>	350
3	- Carboidratos, proteínas, gorduras, fibra alimentar, sódio, vitamina C; - <u>Quitosana</u>	500
4	- Fibra alimentar; - <u>Quitosana</u>	50
5	- <u>Garcinia camboja</u>	300
6	- <u>Quitosana</u>	325
7	- <u>Porangaba</u>	250
8	- <u>Caralluma fibrata</u>	500
9	- <u>Hoodia gordonii</u>	500
10	- <u>Chlorella</u>	250
11	- Carboidratos, proteínas, gorduras, fibra alimentar, sódio; - Chá verde	450
12	- Spirulina, Maracujá, Centella Asiática, Cáscara Sagrada, Goma Guar, - <u>Guarcinia</u>	570
13	- Alcachofra	500

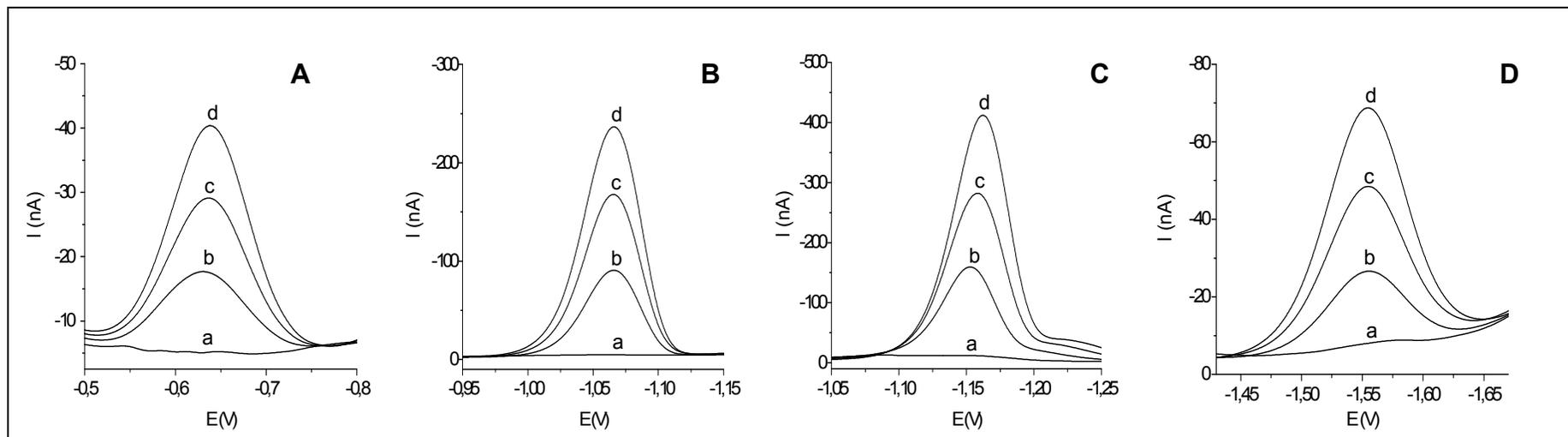


Figura 20: Determinação seqüencial dos fármacos dos grupos A, B, C e D na amostra 8 por AdCSV. A) sinais voltamétricos do clonazepam: (a) amostra, (b) amostra + 4,3 μg de clonazepam, (c) amostra + 8,6 μg de clonazepam, (d) amostra + 12,9 μg de clonazepam; $T_d = 15$ s, $E_d = -0,4$ V, $V = 50$ mV s^{-1} . B) sinais voltamétricos do flurazepam: (a) amostra, (b) amostra + 6,8 μg de flurazepam, (c) amostra + 13,6 μg de flurazepam, (d) amostra + 20,3 μg de flurazepam; $T_d = 15$ s, $E_d = -0,8$ V, $V = 50$ mV s^{-1} . C) sinais voltamétricos do diazepam: (a) amostra, (b) amostra + 7,0 μg de diazepam, (c) amostra + 14,0 μg de diazepam, (d) amostra + 21,1 μg de diazepam; $T_d = 15$ s, $E_d = -0,8$ V, $V = 50$ mV s^{-1} . D) sinais voltamétricos da dietilpropiona: (a) amostra, (b) amostra + 6,7 μg de dietilpropiona, (c) amostra + 13,4 μg de dietilpropiona, (d) amostra + 20,2 μg de dietilpropiona; $T_d = 15$ s, $E_d = -0,8$ V, $V = 50$ mV s^{-1} . Solução de medida 1 mL da amostra 8 (extrato metanólico) + 9 mL tampão Ringer pH 10.

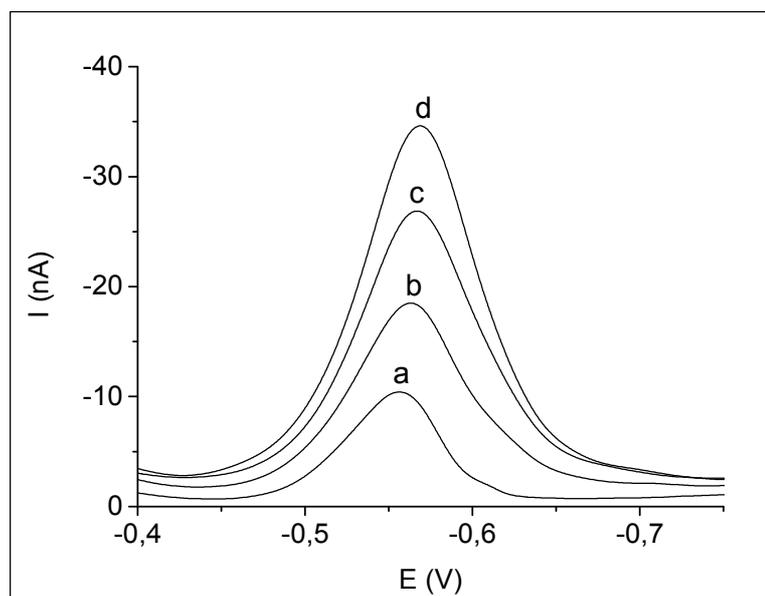


Figura 21: Sinais voltamétricos do clonazepam na amostra 10: (a) amostra, (b) amostra + 4,3 μg de clonazepam, (c) amostra + 8,6 μg de clonazepam, (d) amostra + 12,9 μg de clonazepam; $T_d = 15$ s, $E_d = -0,4$ V, $V = 50$ mV s^{-1} . Solução de medida 500 μL da amostra 10 (extrato metanólico) + 9,5 mL tampão Ringer pH 10.

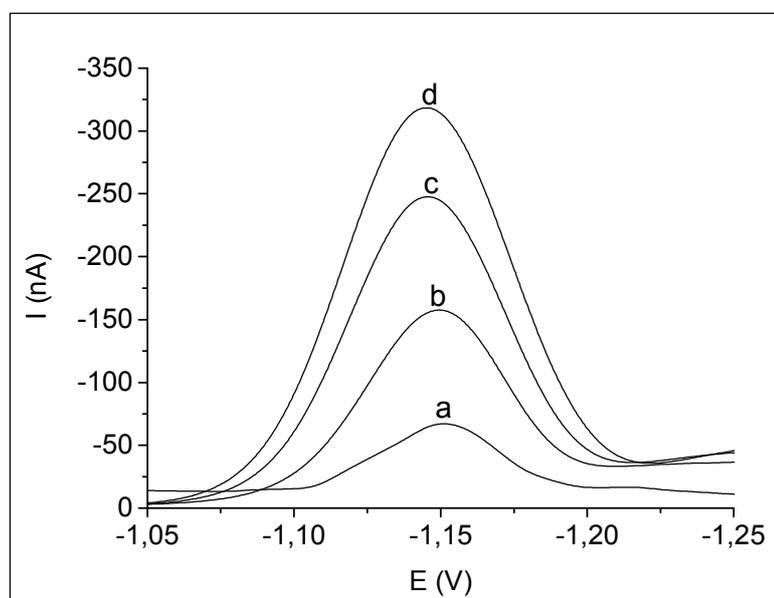


Figura 22: Sinais voltamétricos do diazepam na amostra 6: (a) amostra, (b) amostra + 7,0 μg de diazepam, (c) amostra + 14,0 μg de diazepam, (d) amostra + 21,1 μg de diazepam; $T_d = 15$ s, $E_d = -0,8$ V, $V = 50$ mV s^{-1} . Solução de medida 1 ml da amostra 6 (extrato metanólico) + 9,0 mL tampão Ringer pH 10.

A figura 21 ilustra a análise da amostra 10, que apresentou adulteração pelo clonazepam (grupo A) como pode ser visto pelo surgimento do sinal voltamétrico do clonazepam na amostra. A figura 22 ilustra a análise da amostra 6, que apresentou adulteração por um dos benzodiazepínicos do grupo C como pode ser observado pelo surgimento do sinal voltamétrico na faixa de potenciais onde ocorre a redução dos benzodiazepínicos do grupo C. A Tabela 11 ilustra os resultados obtidos com três replicatas para cada grupo nas amostras analisadas.

Tabela 11 – Resultado das amostras analisadas por AdCSV (n = 3)

Amostra	Determinado (mg/g)	Adulteração (SIM/NÃO)	Adulterado por benzodiazepínico do grupo (A, B ou C)
1	n.d. ^a	NÃO	
2	n.d.	NÃO	
3	n.d.	NÃO	
4	0,240 ± 0,030	SIM	C
5	n.d.	NÃO	
6	0,117 ± 0,021	SIM	C
7	0,072 ± 0,006	SIM	A
8	n.d.	NÃO	
9	n.d.	NÃO	
10	0,084 ± 0,028	SIM	A
11	n.d.	NÃO	
12	n.d.	NÃO	
13	n.d.	NÃO	

^a n.d. – não detectado

Os resultados obtidos na análise das amostras fitoterápicas sugerem que quatro dos treze fitoterápicos apresentaram adulteração pelas substâncias estudadas neste trabalho. Além disso, o método proposto para a determinação seqüencial dos grupos A, B, C e D mostrou-se útil e aplicável em amostras reais.

É importante ressaltar que o método voltamétrico proposto neste trabalho para a determinação seqüencial de benzodiazepínicos pode apresentar vantagens em relação aos custos e rapidez na análise quando comparado a outros métodos, como a Cromatografia Líquida com detecção por espectrometria de massas e a eletroforese capilar com detecção UV, métodos normalmente empregados neste tipo de análise. Outra vantagem é a diminuição da quantidade de amostra necessária para as análises seqüenciais. No caso de amostras caras ou de difícil obtenção, em uma pequena alíquota de amostra várias espécies podem ser facilmente determinadas em seqüência.

Outro ponto importante é a ausência de interferência mútua da matriz da amostra e das espécies com relação aos seus potenciais de pico (E_p), onde cada fármaco tem o seu E_p bem definido e um fármaco não interfere na determinação da outra, possibilitando um “screening” da amostra com relação à adulteração por benzodiazepínicos e dietilpropiona.

Para um melhor esclarecimento do procedimento seqüencial utilizado, a figura 23 resume o protocolo experimental seguido para a determinação seqüencial dos grupos A, B, C e D, nas amostras fitoterápicas para emagrecimento.

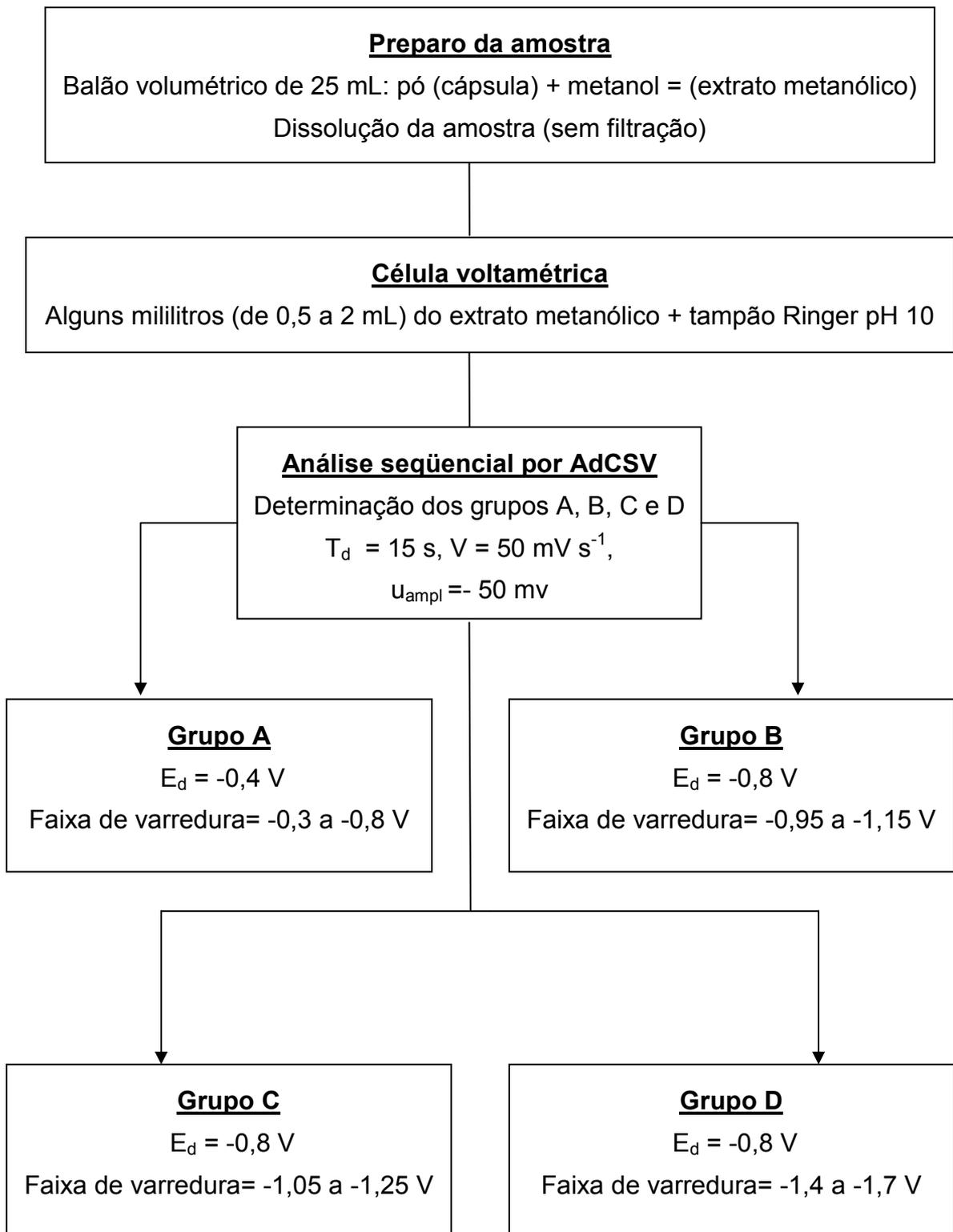


Figura 23: Resumo do procedimento experimental utilizado para a determinação seqüencial dos grupos A, B, C e D nas amostras fitoterápicas analisadas.

4.9.2 Determinação e especificação dos grupos A, B, C e D em amostras fitoterápicas para emagrecimento empregando AdCSV

Com base nos resultados obtidos na seção 4.9.1, ensaios de recuperação foram feitas para avaliar a eficiência do método nas amostras reais. Para este estudo foram elaboradas fortificações nas amostras 6, 10 (adulteradas) e 12 (não adulterada), com a intenção de simular uma amostra real adulterada contendo um benzodiazepínico, dietilpropiona, fluoxetina e metformina. A composição das amostras fortificadas utilizadas nos ensaios de recuperação pode ser observada na Tabela 12.

Para os ensaios de recuperação dos grupos A, B, C e D nas amostras 6, 10 e 12, utilizou-se as soluções padrões 1 g L^{-1} de cada benzodiazepínico integrante dos grupos A, B e C, onde $500 \mu\text{L}$ dessas soluções (0,5 mg) foram adicionadas separadamente em 25 mL de extrato metanólico. As fortificações desses extratos metanólicos foram feitas na presença dos interferentes utilizando soluções padrões 10 g L^{-1} de dietilpropiona, fluoxetina e metformina, onde $50 \mu\text{L}$ dessas soluções (0,5 mg) foram adicionadas em 25 mL de extrato metanólico contendo o benzodiazepínico específico, conforme os procedimentos descritos a seguir:

- **Amostra 6:** Os conteúdos de três cápsulas do fitoterápico foram colocados separadamente em balões volumétricos de 25 mL. Em cada balão foi adicionado 0,5 mg de apenas um único benzodiazepínico pertencente ao grupo C (pois foi detectado adulteração por um dos benzodiazepínicos integrantes do grupo C), de tal forma que, cada balão contém um benzodiazepínico diferente. Nestes balões contendo a mistura do fitoterápico com um específico benzodiazepínico foram adicionados 0,5 mg de dietilpropiona, fluoxetina e metformina. A dissolução dessa mistura foi realizada em metanol. Após, alguns mililitros (0,5 a 2 mL) de cada um desses extratos metanólicos foram adicionados separadamente à célula voltamétrica contendo o eletrólito suporte (tampão de Ringer pH 10). Essa etapa foi seguida pela análise seqüencial dos grupos C e D com adições crescentes dos respectivos padrões de cada grupo (método da adição do padrão $n = 3$).

- **Amostra 10:** primeiramente, o conteúdo (pó) de uma cápsula do fitoterápico foi colocado em um balão volumétrico de 25 mL, seguido da adição de 0,5 mg de clonazepam (pois foi detectado adulteração do mesmo na amostra), dietilpropiona,

fluoxetina e metformina. A dissolução dessa mistura foi realizada em metanol. A seguir, alguns mililitros (0,5 a 2 mL) desse extrato metanólico foram adicionados à célula voltamétrica contendo o eletrólito suporte (tampão de Ringer pH 10). Essa etapa foi seguida pela análise seqüencial dos grupos A e D com adições crescentes dos respectivos padrões de cada grupo (método da adição do padrão $n = 3$).

- **Amostra 12:** Os conteúdos de sete cápsulas do fitoterápico foram colocados separadamente em balões volumétricos de 25 mL. Em cada balão foi adicionado 0,5 mg de apenas um único benzodiazepínico estudado, de tal forma que, cada balão contém um benzodiazepínico diferente. Nestes balões contendo a mistura do fitoterápico com um específico benzodiazepínico foram adicionados 0,5 mg de dietilpropiona, fluoxetina e metformina. A dissolução dessa mistura foi realizada em metanol. Após, alguns mililitros (0,5 a 2 mL) de cada um desses extratos metanólicos foram adicionados separadamente à célula voltamétrica contendo o eletrólito suporte (tampão de Ringer pH 10). Essa etapa foi seguida pela análise seqüencial dos grupos A, B, C e D com adições crescentes dos respectivos padrões de cada grupo (método da adição do padrão $n = 3$).

Os ensaios de recuperação nas amostras são ilustrados na Tabela 13 para os grupos A, B e C, e na Tabela 14 para o grupo D. As análises foram realizadas em triplicata.

Tabela 12 – Composição das amostras fortificadas utilizadas nos ensaios de recuperação

Amostra	Adulterante adicionado (0,5 mg cada)
6(1)	→ Medazepam + dietilpropiona + fluoxetina + metformina
6(2)	→ Clordiazepóxido + dietilpropiona + fluoxetina + metformina
6(3)	→ Diazepam + dietilpropiona + fluoxetina + metformina
10	→ Clonazepam + dietilpropiona + fluoxetina + metformina
12(1)	→ medazepam+ dietilpropiona + fluoxeitna + metformina
12(2)	→ clordiazepóxido + dietilpropiona + fluoxetina + metformina
12(3)	→ Diazepam + dietilpropiona + fluoxetina + metformina
12(4)	→ Flurazepam + dietilpropiona + fluoxetna + metformina
12(5)	→ Midazolam + dietilpropiona + fluoxetina + metformina
12(6)	→ Alprazolam + dietilpropiona + fluoxetina + metformina
12(7)	→ Clonazepam + dietilpropiona + fluoxetina + metformina

Tabela 13 – Resultado dos ensaios de recuperação para os grupos A, B e C nas amostras fortificadas na presença dos interferentes^a empregando AdCSV (n = 3)

Grupo	Amostra	Determinado (mg/caps.)	Recuperação (%)
C	6(1)	0,52	103 ± 1,4
	6(2)	0,49	99 ± 1,5
	6(3)	0,48	95 ± 3,0
A	10	0,52	105 ± 5,0
C	12(1)	0,54	109 ± 2,0
	12(2)	0,56	112 ± 5,0
	12(3)	0,49	98 ± 2,0
B	12(4)	0,51	103 ± 4,0
	12(5)	0,56	112 ± 5,0
	12(6)	0,54	109 ± 3,0
A	12(7)	0,52	103 ± 2,0

^a Fluoxetina, dietilpropiona e metformina

Tabela 14 – Resultado dos ensaios de recuperação para o grupo D nas amostras fortificadas na presença dos grupos A, B e C e dos interferentes^a empregando AdCSV (n = 3)

Grupo	Amostra	Determinado (mg/caps.)	Recuperação (%)
D	6	0,51	103 ± 4,0
	10	0,49	98 ± 2,0
	12	0,52	103 ± 2,0

^a Fluoxetina e metformina

As Tabelas 13 e 14 mostram as recuperações para os grupos A, B, C e D nas amostras fitoterápicas emagrecedoras. Os resultados mostraram-se satisfatórios, pois as recuperações de um modo geral ficaram entre 92,0 e 117,0 %, comprovando dessa forma, a aplicabilidade do método em amostras reais.

5 CONCLUSÕES

Neste trabalho desenvolveu-se um método voltamétrico para a determinação seqüencial de 1,4-benzodiazepínicos e dietilpropiona (dietilpropiona) como adulterantes em formulações fitoterápicas para emagrecimento. As conclusões obtidas através deste trabalho estão enumeradas abaixo.

1) O planejamento experimental através do estudo do pH possibilitou avaliar a influência deste sobre o sinal voltamétrico dos 1,4-benzodiazepínicos e conseqüentemente na obtenção das condições experimentais adequadas para a especificação e determinação de benzodiazepínicos (em grupos).

2) Os ensaios de recuperação para os grupos A, B total e C total na presença dos interferentes (dietilpropiona, fluoxetina, femproporex, sibutramina, metformina) foram satisfatórios: acima de 94% para o grupo A, acima de 73% para o grupo B (benzodiazepínicos totais) e acima de 90,3% para o grupo C (benzodiazepínicos totais). As recuperações obtidas para o grupo D na presença de fluoxetina, sibutramina, femproporex, metformina e dos benzodiazepínicos dos grupos A, B e C foram satisfatórias (acima de 70%).

3) Das 13 amostras fitoterápicas para emagrecimento analisadas neste trabalho, quatro apresentaram adulteração pelos benzodiazepínicos estudados. Dessas, duas amostras apresentaram adulteração na faixa de 0,056 a 0,112 mg/g para o clonazepam e as outras duas apresentaram adulteração na faixa de 0,096 a 0,270 mg/g para um dos benzodiazepínicos do grupo C (diazepam ou clordiazepóxido ou medazepam).

4) Ensaios de recuperação foram realizados a partir da fortificação das amostras fitoterápicas com os benzodiazepínicos estudados, dietilpropiona, fluoxetina e metformina, sendo que, os percentuais de recuperação situaram-se nas faixas de 101,0 a 110,0% para o grupo A, de 99,0 a 117,0% para o grupo B, de 92,0 a 117,0% para o grupo C e de 96,0 a 114,0% para o grupo D. Esses resultados comprovam a aplicabilidade do método para a determinação de ansiolíticos e do anorexígeno (dietilpropiona) como adulterantes em formulações fitoterápicas para emagrecimento.

5) O método padronizado proposto para a determinação seqüencial dos 1,4-benzodiazepínicos e da dietilpropiona apresentou as seguintes vantagens: linearidade, alta sensibilidade, seletividade, precisão analítica, simplicidade, baixo custo, análises rápidas, utilização de volume reduzido de amostra e solvente orgânico. Além disso, o método pode ser uma alternativa para o controle e fiscalização (análise forense) do uso abusivo destes fármacos presentes em formulações fitoterápicas passíveis de adulteração.

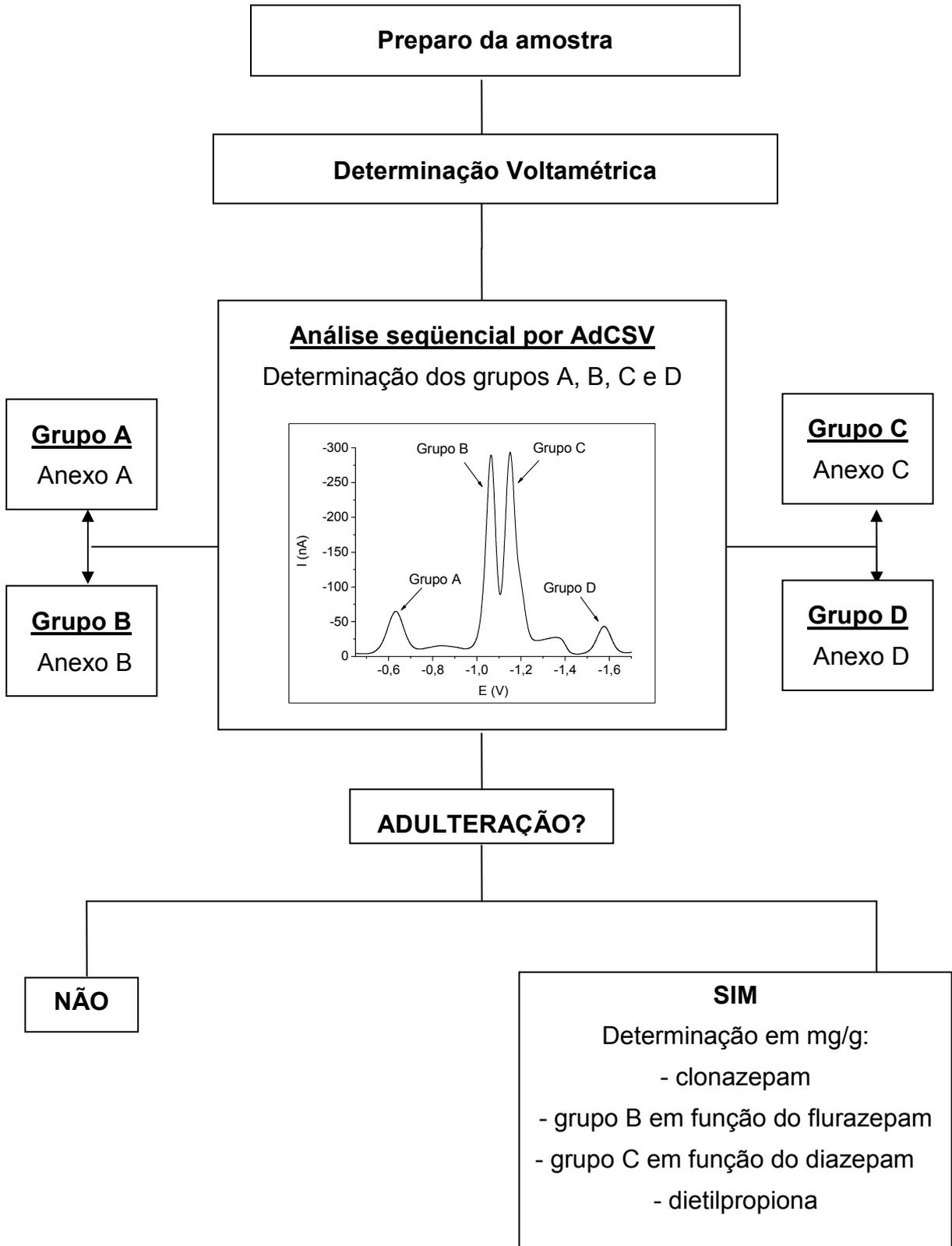
6) Dentre os métodos voltamétricos desenvolvidos para a determinação de 1,4-benzodiazepínicos e dietilpropiona, o método desenvolvido e descrito neste trabalho é o primeiro a descrever a especificação e a determinação seqüencial de benzodiazepínicos e dietilpropiona como adulterantes em formulações fitoterápicas para emagrecimento. Nesse sentido, o trabalho é vantajoso em relação aos existentes e abre uma nova possibilidade dentro do contexto da análise voltamétrica de fármacos, a saber:

a) “*screening*” rápido da amostra quanto à presença de benzodiazepínicos e dietilpropiona como adulterantes;

b) especificação entre os adulterantes benzodiazepínicos de acordo com 3 grupos (A, B e C);

c) quantificação dos 4 grupos de adulterantes nas formulações da seguinte forma: mg/g de clonazepam, mg/g de diazepam, mg/g de flurazepam e mg/g de dietilpropiona.

7) o esquema abaixo mostra de maneira conclusiva os resultados e informações analíticas que podem ser obtidos com a metodologia proposta por AdCSV:



8) Apesar de ainda não haver legislação estabelecida pela ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) para o controle da adulteração de formulações fitoterápicas, a adulteração em si é uma prática recorrente em vários países. As classes de adulterantes escolhidas neste trabalho estão entre as mais freqüentemente encontradas em casos de adulteração.

6 REFERÊNCIAS

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Determina a publicação do “Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos”. Resolução-RE nº 899, de maio de 2003. **Anexo para validação de métodos analíticos**, Brasil, 2003.

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC nº 58**, de setembro de 2007. Disponível em: < <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=28456&word> >. Acesso em: 05 jun. 2008.

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.

BOND, A.M. **Modern Polarographic Methods in Analytical Chemistry**, Marcel Dekker: New York, 1980.

BROOKS, M.A. The electrochemical determination of 1,4-Benzodiazepines biological fluids. **Bioelectrochemistry and Bioenergetics**, v. 10, p. 37-55, 1983.

BROOKS, M.A., de SILVA, J.A.F. Determination of 1,4-benzodiazepines in biological fluids by differential pulse polarography. **Talanta**, v. 22, p. 849-860, 1975.

CHEN, Y.R.; WEN, K.C.; HER, G.R. Analysis of coptisine, berberine and in adulterated Chinese medicine by electrophoresis-electrospray ion trap mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 866, p. 273-280, 2000.

De ALMEIDA, A.E.; RIBEIRO, M.L. Agentes anorexígenos aspectos químico-farmacológicos e perspectivas. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 79, n. 3/4, p. 62-64, 1998.

De AZEREDO, F.S.; GUIMARÃES, R.I.; de Paula, J.R. Validação de técnica analítica em cromatografia em camada delgada comparativa para identificação de fármacos anorexígenos sintéticos em produtos naturais. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 1, p. 17-24, 2004.

De CARVALHO, L. M.; SCHWEDT, G. Electrochemical behavior of dithionite in formaldehyde aqueous solution and its analytical application. **Electroanalysis**, v. 13, n. 7, 2001.

De CARVALHO, L.M. 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, n. 4, p. 789-796, 2007.

De LÚCIA, R. Obesidade e anorexígenos: valem quanto pensam?. **Infarma**, v. 1, n. 2, p. 12-14, 1992.

Dos SANTOS, M.M.C; FAMILA, V.; GONÇALVES, M.L.S. Square-wave voltammetric techniques for determination of psychoactive 1,4-benzodiazepine drugs. **Analytical Biochemistry**, v.374, p.1074-1081, 2002.

Dos SANTOS, M.M.C; FAMILA, V.; GONÇALVES, M.L.S. Copper-psychoactive drug complexes: A voltammetric approach to complexation by 1,4-Benzodiazepines. **Analytical Biochemistry**, v.303, p.111-119, 2002.

EISENBERG, D.M. et al . Trends in Alternative Medicine Use in the United States, 1990-1997: Results of a Follow-Up National Survey. **Journal of the American Medical Association**, v. 28, n. 18, p. 1569 -1575, 1998.

EL-HEFNAWEY, G.B. et al. Voltammetric behavior and quantification of the sedative-hypnotic drug chlordiazepoxide in bulk form, pharmaceutical formulation and human serum at a mercury electrode. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 34, p. 75-86, 2004.

ERNST, E. Adulteration of Chinese Herbal medicines with synthetic drugs: a systematic review. **Journal of Internal Medicine**, v. 252, p. 107-113, 2002.

GARCIA, M.G; GARCIA, A.; GONZALEZ, I. Extraction and electrochemical quantification of the active ingredient (diazepam) in pharmaceutical products. **Talanta**, v. 40, n. 12, p. 1775-1779, 1993.

HARVEY, R.A.; CHAMPE, P. C. **Farmacologia ilustrada**. Porto Alegre: Ed. Artmed, 1998.

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

HENZE, G. **Polarographie und voltammetrie: grundlagen und analytische Praxis**. Berlin: Ed. Springer, 2001.

IMESC, Instituto de Medicina Social e de Criminologia de São Paulo, Disponível em: <<http://www.imesc.sp.gov.br/infodrogas/anfetami.htm>>. Acesso em: 05 jun. 2008.

KATZUNG, B.G. **Farmacologia Básica & Clínica**. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan S.A., 2006.

KOROLKOVAS, A.; BURCKHALTER, J. H. **Química Farmacêutica**. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Dois, 1982.

KU, Y-R. et al. Analysis of anti-diabetic drugs in adulterated traditional Chinese medicines by high-performance capillary electrophoresis. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 33, p. 329-334, 2003.

LAU, A-J. et al. Analysis of adulterants in a traditional herbal medicinal product using liquid chromatography-mass spectrometry-mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 31, p. 401-406, 2003.

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.

OELSCHLAGER, H. Polarographic analysis of psychotropic drugs. **Bioelectrochemistry and Bioenergetics**, v. 10, p. 25-36, 1983.

OSTERYOUNG, J.; SCHREINER, M. M. Recent 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, n. 9, p. 678-681, 1993.

PINN, G. Adverse effects associated with herbal medicine. **Australian Family Physician**, v. 30, p. 1070-1075, 2001.

SANDER, S.; WAGNER, W.; HENZE, G. Direct determination of uranium traces by adsorptive stripping voltammetry. **Analytica Chimica Acta**, v. 305, p. 154-158, 1995.

SCHOLZ, F. **Electroanalytical Methods: Guide to Experimental and Applications**. Germany: Ed. Springer, 2002.

SKOOG, D.A.; WEST, D.M.; HOLLER, F.M.; CROUCH, S.R. **Fundamentos de Química Analítica**. São Paulo: Ed. Thomson, 2007.

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

UNODC, United Nations Office on Drugs and Crime. Disponível em: <<http://www.unodc.org/unodc/en/data-and-analysis/WDR.html>>. Acesso em: 05 jun. 2008.

VALLE, L.B.S. et al. **Fundamentos farmacológicos da terapêutica**. São Paulo: Ed. Atheneu, 1991.

VOGEL, A. **Análise química quantitativa**. Rio de Janeiro: Ed. LTC, 1992.

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

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

ANEXOS

ANEXO A – Método 1: Programa do método para a determinação do grupo A
utilizado na análise sequencial por AdCSV.

===== METROHM 746 VA TRACE ANALYZER (5.746.C101) =====
OPERATION SEQUENCE

```

-----
Instructions      t/s      Main parameters
-----
1  SMPL/M
2  DOS/M
3  PURGE
4  STIR           300.0   Rot.speed    2000 /min
5  (ADD
6  PURGE
7  STIR           10.0    Rot.speed    2000 /min
8  OPURGE
9  (REP
10 SEGMENT        Segm.name  g.A_AdCSV
11 REP)0
12 ADD>M         Soln.name  g.A_Std

13 ADD)3
14 END

```

SEGMENT
g.A_AdCSV

```

-----
Instructions      t/s      Main parameters      Auxiliary parameters
-----
1  STIR           5.0      Rot.speed    2000 /min
2  HMDE           Drop size   9              Meas.cell    normal
3  DPMODE         U.ampl     -50 mV         t.meas       20.0 ms
                  t.step     0.20 s        t.pulse      40.0 ms
4  MEAS           15.0     U.meas       -400 mV
5  OSTIR          5.0
7  SWEEP          8.4      U.start      -300 mV       U.step       10 mV
                  U.end       -800 mV       Sweep rate   50 mV/s
8  OMEAS         U.standby   mV
9  END

```

ANEXO B – Método 2: Parâmetros utilizados para a determinação do grupo B na análise seqüencial por AdCSV.

===== METROHM 746 VA TRACE ANALYZER (5.746.C101) =====
OPERATION SEQUENCE

```

-----
Instructions      t/s      Main parameters
-----
1  SMPL/M
2  DOS/M
3  PURGE
4  STIR           300.0   Rot.speed    2000 /min
5  (ADD
6  PURGE
7  STIR           10.0    Rot.speed    2000 /min
8  OPURGE
9  (REP
10 SEGMENT        Segm.name   g.B_AdCSV
11 REP)0
12 ADD>M         Soln.name   g.B_Std
13 ADD)3
14 END

```

```

SEGMENT
g.B_AdCSV
-----

```

```

Instructions      t/s      Main parameters      Auxiliary parameters
-----
1  STIR           5.0      Rot.speed    2000 /min
2  HMDE           Drop size   9             Meas.cell    normal
3  DPMODE         U.ampl      -50 mV        t.meas       20.0 ms
                   t.step      0.20 s       t.pulse      40.0 ms
4  MEAS           15.0     U.meas       -800 mV
5  OSTIR          5.0
7  SWEEP          4.2      U.start      -950 mV       U.step       10 mV
                   U.end       -1150 mV     Sweep rate   50 mV/s
8  OMEAS
9  END           U.standby   mV

```

ANEXO C – Método 3: Parâmetros utilizados para a determinação do grupo C na análise seqüencial por AdCSV.

===== METROHM 746 VA TRACE ANALYZER (5.746.C101) =====
OPERATION SEQUENCE

```

-----
Instructions      t/s      Main parameters
-----
1  SMPL/M
2  DOS/M
3  PURGE
4  STIR          300.0  Rot.speed    2000 /min
5  (ADD
6  PURGE
7  STIR          10.0   Rot.speed    2000 /min
8  OPURGE
9  (REP
10 SEGMENT      Segm.name   g.C_AdCSV
11 REP)0
12 ADD>M      Soln.name   g.C_Std
13 ADD)3
14 END

```

```

SEGMENT
g.C_AdCSV
-----

```

```

Instructions      t/s      Main parameters      Auxiliary parameters
-----
1  STIR          5.0     Rot.speed    2000 /min
2  HMDE          Drop size   9             Meas.cell    normal
3  DPMODE        U.ampl     -50 mV        t.meas      20.0 ms
                  t.step     0.20 s       t.pulse     40.0 ms
4  MEAS          15.0     U.meas       -800 mV
5  OSTIR         5.0
7  SWEEP         4.2     U.start      -1050 mV     U.step       10 mV
                  U.end       -1250 mV     Sweep rate   50 mV/s
8  OMEAS
9  END          U.standby   mV

```

ANEXO D – Método 4: Parâmetros utilizados para a determinação do grupo D na análise seqüencial por AdCSV.

===== METROHM 746 VA TRACE ANALYZER (5.746.C101) =====
OPERATION SEQUENCE

```

-----
Instructions      t/s      Main parameters
-----
1  SMPL/M
2  DOS/M
3  PURGE
4  STIR           300.0   Rot.speed    2000 /min
5  (ADD
6  PURGE
7  STIR           10.0    Rot.speed    2000 /min
8  OPURGE
9  (REP
10 SEGMENT        Segm.name   g.D_AdCSV
11 REP)0
12 ADD>M         Soln.name   g.D_Std
13 ADD)3
14 END

```

SEGMENT
g.D_AdCSV

```

-----
Instructions      t/s      Main parameters      Auxiliary parameters
-----
1  STIR           5.0      Rot.speed    2000 /min
2  HMDE           Drop size   9             Meas.cell    normal
3  DPMODE         U.ampl     -50 mV        t.meas       20.0 ms
                  t.step     0.20 s       t.pulse      40.0 ms
4  MEAS           15.0     U.meas       -800 mV
5  OSTIR          5.0
7  SWEEP          6.4      U.start      -1400 mV     U.step       10 mV
                  U.end       -1700 mV     Sweep rate   50 mV/s
8  OMEAS
9  END           U.standby   mV

```

ANEXO E – Parâmetros utilizados para as medidas de corrente alternada.

===== METROHM 746 VA TRACE ANALYZER (5.746.C101) =====
 OPERATION SEQUENCE

```

-----
Instructions      t/s      Main parameters
-----
1  SMPL/M
2  PURGE
3  STIR           300.0   Rot.speed    2000 /min
4  (ADD
5  PURGE
6  STIR           10.0    Rot.speed    2000 /min
7  OPURGE
8  (REP
9  SEGMENT        Segm.name  0
10 SEGMENT        Segm.name  90
11 REP)0
12 ADD>M
13 ADD)4
14 END
  
```

SEGMENT
0

```

-----
Instructions      t/s      Main parameters      Auxiliary parameters
-----
1  STIR           5.0     Rot.speed    2000 /min
2  HMDE           Drop size   9             Meas.cell    normal
3  AC1MODE        U.ampl     20 mV         Modul. Freq. 60Hz
                   t.step     0.30 s       Prep. Cycles 0
                   Ph.angle   0°           Prep. Cycles 1
4  OSTIR          10.0
5  SWEEP          90.6     U.start      -600 mV       U.step       6 mV
                   U.end      -1800 mV     Sweep rate   20 mV/s
6  END
  
```

ANEXO F – Continuação dos parâmetros utilizados para as medidas de corrente alternada.

===== METROHM 746 VA TRACE ANALYZER (5.746.C101) =====
OPERATION SEQUENCE

```

-----
Instructions      t/s      Main parameters
-----
1  SMPL/M
2  PURGE
3  STIR           300.0   Rot.speed    2000 /min
4  (ADD
5  PURGE
6  STIR           10.0    Rot.speed    2000 /min
7  OPURGE
8  (REP
9  SEGMENT        Segm.name  0
10 SEGMENT        Segm.name  90
11 REP)0
12 ADD>M
13 ADD)4
14 END

```

SEGMENT
90°

```

-----
Instructions      t/s      Main parameters      Auxiliary parameters
-----
1  STIR           5.0     Rot.speed    2000 /min
2  HMDE
3  AC1MODE        U.ampl     20 mV           Meas.cell normal
                       t.step     0.30 s         Modul. Freq. 60Hz
                       Ph.angle   90°            Prep. Cycles 0
4  OSTIR          10.0
5  SWEEP          90.6    U.start       -600 mV         U.step         6 mV
                       U.end      -1800 mV        Sweep rate     20 mV/s
6  END

```