

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

Diana Tomazi Muratt

**ESTUDO DA PRESENÇA DE FÁRMACOS COMO ADULTERANTES EM  
SUPLEMENTOS ALIMENTARES EMPREGANDO DETECÇÃO  
AMPEROMÉTRICA E VOLTAMÉTRICA**

Santa Maria – RS  
2018



**Diana Tomazi Muratt**

**ESTUDO DA PRESENÇA DE FÁRMACOS COMO ADULTERANTES EM  
SUPLEMENTOS ALIMENTARES EMPREGANDO DETECÇÃO  
AMPEROMÉTRICA E VOLTAMÉTRICA**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós Graduação em Química da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), como requisito parcial para a obtenção do título de **Doutor em Química**.

Orientador: Prof. Dr. Leandro Machado de Carvalho

Santa Maria – RS

Muratt, Diana

ESTUDO DA PRESENÇA DE FÁRMACOS COMO ADULTERANTES EM  
SUPLEMENTOS ALIMENTARES EMPREGANDO DETECÇÃO AMPEROMÉTRICA  
E VOLTAMÉTRICA / Diana Muratt.- 2018.

203 p.; 30 cm

Orientador: Leandro Machado de Carvalho

Coorientador: Paulo Cícero do Nascimento

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa  
Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de  
Pós-Graduação em Química, RS, 2018

1. Suplementos alimentares 2. Cromatografia 3.  
Detecção pulso-amperométrica 4. Detecção voltamétrica I.  
Machado de Carvalho, Leandro II. Cícero do Nascimento,  
Paulo III. Título.

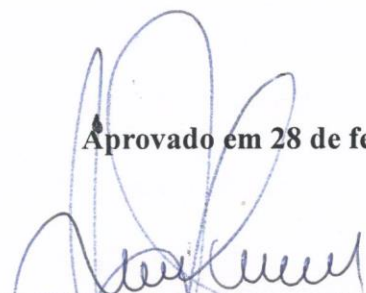
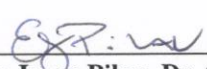
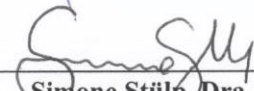
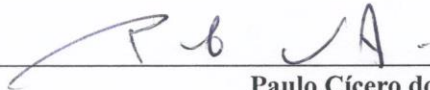
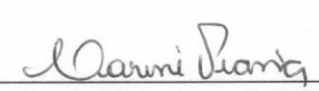


→ Diana Tomazi Muratt

**ESTUDO DA PRESENÇA DE FÁRMACOS COMO ADULTERANTES EM  
SUPLEMENTOS ALIMENTARES EMPREGANDO DETECÇÃO  
AMPEROMÉTRICA E VOLTAMÉTRICA**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós Graduação em Química da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), como requisito parcial para a obtenção do título de **Doutor em Química**.

**Aprovado em 28 de fevereiro de 2018:**

---

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

---

**Eduardo Jorge Pilau, Dr. (UEM)**

---

**Simone Stülp, Dra. (UNIVATES)**

---

**Paulo Cícero do Nascimento, Dr. (UFSM)**

---

**Carine Viana, Dra. (UFSM)**



*Dedico este trabalho aos meus pais, Delmar e Odete,  
por terem paciência e dedicação mesmo quando eu não merecia.  
Vocês são meus exemplos sempre. Amo vocês!*



## AGRADECIMENTOS

*Este trabalho de doutorado não teria se concretizado sem a ajuda de muitas pessoas. Chegando até aqui, percebo que sem a presença de muitos amigos que passaram pela minha vida ao longo desse tempo, tudo seria menos colorido, menos divertido e o plano JK/Tese Diana 4 anos em 4 meses não teria se concretizado. O primeiro amigo, formalmente conhecido como orientador foi a pessoa que me deu a oportunidade, mesmo sem me conhecer, de iniciar uma pós-graduação. Ao professor Leandro Carvalho agradeço pela convivência, pela experiência passada e até pelos puxões de orelha. Ao professor Paulo Nascimento, pela amizade, pelo conhecimento enciclopédico passado e pela serenidade ao tratar dos problemas quando tudo parecia perdido. A professora Denise Bohrer por ser exemplo de integridade e autenticidade para mim dentro do Lachem. Aos professores avaliadores deste trabalho, Eduardo Pilau, Simone Stülp e Carine Viana, desde já agradeço a disponibilidade e contribuições.*

*Nos 6 anos da minha passagem pelo Lachem, tive oportunidade de reconhecer amigos que levarei para a vida toda. A mãe Sandra sempre presente com um conselho experiente e um pudim maravilhoso. Ao Luíz Ferraz sempre disponível para qualquer assunto aleatório teórico-prático-fotográfico. Aos queridos amigos/irmãos Carolina Dolwitsch, Patrícia Mattiazzi, Luis Claussem, Rejane Cargnin, Gabriela Leal e Patrícia Schmidt, minha gratidão por aguentarem minhas lamentações, reclamações e choradeiras desesperadoras. Também sou grata por compartilharem momentos tão especiais comigo, os lanches gourmetizados quase todos os dias, as receitas trocadas, os “dias do vizinho” e a parceria do almoço das 11. As Bibis do coração, Valéria Dal Prá, Mariana Bortoluzi, Marlise Ferreira, Márcia Barrichelo, Fernanda Pires, Carol e Pati, espero que tenhamos ainda muitos chás e amigos secretos em que compartilhamos muito amor, amizade e respeito. Aos demais amigos do laboratório, todos vocês tem um cantinho especial no meu coração <3.*

*Ao Tomás Aires, a pessoa em que encontrei refúgio e segurança, não encontrei uma metade, mas sim um todo, sou grata pela tua paciência, força e pés no chão e por ter me acolhido na tua família. Te amo!*

*Meus pais Delmar Walmir Muratt e Odete Tomazi Muratt, exemplos de caráter, de empatia, de amor e respeito, de humildade. Obrigada é pouco comparado a tudo que vocês me deram e ensinaram e continuam ensinando até hoje. Agradeço por terem me presenteado com duas irmãs lindas, a Marina e a Lenise que sempre me apoiaram nos momentos bons e ruins. Sem a ajuda de vocês, com certeza eu não chegaria até onde cheguei. Obrigada e amo todos vocês!*

*Por fim, agradeço a Deus pela pessoa que me tornei com o passar desses anos, com certeza ainda tenho muito a evoluir e aprender em um caminho que agora esta só começando.*

*Agradeço ainda a CAPES pela concessão da bolsa auxílio durante a execução desse trabalho e ao CNPq e ANVISA, pelo fomento em apoio ao projeto de pesquisa.*



*Eu sei que não vou morrer  
Porque de mim vai ficar  
O mundo que eu construí  
O meu Rio Grande, o meu lar  
Campeando as próprias origens  
Qualquer guri vai achar  
Campeando as próprias origens  
Qualquer guri, vai achar.*

Antônio Augusto Fagundes / Bagre Fagundes





## RESUMO

### ESTUDO DA PRESENÇA DE FÁRMACOS COMO ADULTERANTES EM SUPLEMENTOS ALIMENTARES EMPREGANDO DETECÇÃO AMPEROMÉTRICA E VOLTAMÉTRICA

AUTOR: Diana Tomazi Muratt

ORIENTADOR: Leandro Machado de Carvalho

O uso de suplementos alimentares cresce ao redor do mundo a cada dia. No intuito de melhorar o desempenho físico, prevenir doenças, manter e melhorar a saúde, obter e/ou manter o peso corporal desejado e ainda preencher lacunas nutricionais na dieta, muitos indivíduos consomem estes produtos, mesmo sem a comprovada eficácia ou segurança. Em consequência ao crescimento deste mercado, aumentam os casos de adulteração por substâncias sintéticas. Isto implica na necessidade de desenvolverem-se metodologias rápidas, sensíveis, seletivas e que alcancem um número considerável de fármacos de interesse analítico. Neste trabalho estão descritos dois métodos de análise de multi classes de fármacos. O método de separação cromatográfico com detecção pulso-ampérométrica abrange 15 fármacos: anorexígenos (anfeparamona e femproporex), estimulantes (cafeína, ioimbina, sildenafil e tadalafil), diuréticos (furosemida), antidepressivos (fluoxetina e sertralina), ansiolíticos (lorazepam, clonazepam, midazolam e diazepam) e laxantes (bisacodil). As características relacionadas à coluna de separação (bifenil) favoreceram o estudo de um grande número de compostos. As condições otimizadas foram: acetato de amônio  $10 \text{ mmol L}^{-1}$ , metanol 64 %, pH 4,0,  $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ ,  $40^\circ\text{C}$ , potencial de detecção +0,8 V. O segundo método, utilizando técnica voltamétrica de pulso no eletrodo de mercúrio em meio orgânico, abrange um total de 10 compostos farmacêuticos sendo ansiolíticos (alprazolam, bromazepam, clonazepam, clordiazepóxido, midazolam e diazepam), diuréticos (amilorida), antidepressivos (bupropiona) e anorexígenos (anfeparamona e femproporex). As condições otimizadas foram:  $0,01 \text{ mol L}^{-1} \text{ NaClO}_4$  em ACN, HMDE operando no modo pulso diferencial, velocidade varredura  $30 \text{ mV/s}$ . Dentre os dois métodos, um total de 20 fármacos podem ser estudados em amostras reais. Ambos os métodos foram validados de acordo com os parâmetros recomendados pela AOAC. Seletividade, linearidade, limites de detecção e quantificação, precisão e exatidão foram avaliados. O método cromatográfico (HPLC-PAD) foi aplicado em 81 amostras de suplementos alimentares comercializados no Brasil. 1,23 % das amostras apresentou sinal positivo para femproporex, 1,23 % para anfeparamona, 6,17 % para ioimbina, 53,10 % para cafeína, 1,23 % para furosemida, 1,23 % para tadalafil e 9,87 % para diazepam. Deste total de amostras contendo fármacos declarados ou não, foram encontrados dois ou mais fármacos em aproximadamente 15 % dos suplementos analisados. A concentração encontrada dos fármacos variou de 0,20 a 866,88 mg/dose diária recomendada pelo fabricante. O método voltamétrico foi aplicável somente a amostras com diluições de no mínimo cem vezes, uma vez que há interferência da matriz nas reações redox no eletrodo de mercúrio. O grande diferencial deste trabalho consiste no rastreamento de 20 fármacos como possíveis adulterantes em amostras de suplementos alimentares, devido as características da fase estacionária em cromatografia e ao meio não aquoso em voltametria.

Palavras-chave: suplementos alimentares, cromatografia, detecção pulso-ampérométrica, voltametria em meio orgânico.



## ABSTRACT

### STUDY OF THE PRESENCE OF DRUGS AS ADULTERANTS IN FOOD SUPPLEMENTS EMPLOYING AMPEROMETRIC AND VOLTAMETRIC DETECTION

AUTHOR: Diana Tomazi Muratt  
ADVISOR: Leandro Machado de Carvalho

The use of food supplements grows around the world every day. In order to improve physical performance, prevent disease, maintain and improve health, obtain and / or maintain desired body weight and still fill nutritional gaps in the diet, many individuals consume these products even without proven efficacy or safety. As a result of the growth of this market, cases of adulteration by synthetic substances increase. This implies the need to develop rapid, sensitive, selective methodologies that reach a considerable number of drugs of analytical interest. In this work two methods of analysis of multi-drug classes are described. The method of chromatographic separation with pulse-amperometric detection comprises 15 drugs: anorexigenics (amfepramone and femproporex), stimulants (caffeine, yohimbine, sildenafil and tadalafil), diuretics (furosemide), antidepressants (fluoxetine and sertraline), anxiolytics (lorazepam, clonazepam, midazolam and diazepam) and laxatives (bisacodyl). The characteristics related to the separation column (biphenyl) favored the study of a large number of compounds. The optimized conditions were: ammonium acetate 10 mmol L<sup>-1</sup>, methanol 64%, pH 4.0, 1.0 mL min<sup>-1</sup>, 40°C, detection potential +0.8 V. The second method, using voltammetric pulse technique on the mercury electrode in organic medium, comprises a total of 10 pharmaceutical compounds being anxiolytics (alprazolam, bromazepam, clonazepam, chlordiazepoxide, midazolam and diazepam), diuretics (amiloride), antidepressants (bupropion) and anorectics (amfepramone and femproporex). The optimized conditions were: 0.01 mol L<sup>-1</sup> NaClO<sub>4</sub> in ACN, HMDE operating in differential pulse mode, scanning speed 30 mV/s. Of the two methods, a total of 20 drugs can be studied in real samples. Both methods were validated according to AOAC recommended parameters. Selectivity, linearity, limits of detection and quantification, precision and accuracy were evaluated. The chromatographic method (HPLC-PAD) was applied in 81 samples of food supplements marketed in Brazil. 1.23% of the samples had a positive signal for femproporex, 1.23% for amfepramone, 6.17% for yohimbine, 53.10% for caffeine, 1.23% for furosemide, 1.23% for tadalafil and 9.87 % for diazepam. From this total of samples containing drugs declared or not, two or more drugs were found in approximately 15% of the supplements analyzed. The concentration of the drugs varied from 0.20 to 866.88 mg/daily dose recommended by the manufacturer. The voltammetric method was applied only to samples with dilutions of at least one hundred times, since there is interference of the matrix in the redox reactions in the mercury electrode. The great differential of this work is the screening of 20 drugs as possible adulterants in food supplement samples, due to the characteristics of the stationary phase in chromatography and to the non-aqueous medium in voltammetry.

Keywords: dietary supplements, chromatography, pulsed amperometric detection, non-aqueous voltammetry.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura proposta para a legislação que contemplaria os suplementos alimentares.....	44
Figura 2: Principais fármacos já encontrados como adulterantes classificados de acordo com sua classe farmacológica. ....	49
Figura 3: Esquema ilustrativo de amostragem de corrente em voltametria de pulso diferencial.....	61
Figura 4: Esquema ilustrativo da aplicação de potencial na varredura por voltametria cíclica.....	62
Figura 5: Esquema de uma célula padrão com três eletrodos e esquema com o sistema básico do eletrodo de mercúrio. ....	63
Figura 6: Esquema representativo da célula de detecção eletroquímica em fluxo.....	65
Figura 7: Ciclo de potenciais continuamente aplicados ao eletrodo de ouro. ....	66
Figura 8: Conjunto de equipamentos utilizado para obter os voltamogramas. ....	70
Figura 9: Célula voltamétrica utilizada com três eletrodos. ....	70
Figura 10: Cromatógrafo, interface e detector amperométrico utilizados para obter os cromatogramas. ....	71
Figura 11: Estrutura interna do detector amperométrico em fluxo. ....	71
Figura 12: Fluxo esquemático do método de extração das amostras de suplementos alimentares.....	80
Figura 13: Espectro obtido para a 10 e 1000 mg L <sup>-1</sup> de Amilorida em metanol na faixa de 200 a 1100 nm. ....	82
Figura 14: Representação da estrutura quimicamente ligada das fases estacionárias estudadas (TMS – trimetilclorosilano). ....	84
Figura 15: Cromatograma de separação em fase reversa dos fármacos identificados no gráfico na concentração de 20 mg L <sup>-1</sup> . Condições: fase móvel fosfato de sódio 5 mmol L <sup>-1</sup> ; pH 4,0; metanol 45 % (v/v); coluna C18 (150 mm); potencial de detecção +0,8 V (0,4 s); potenciais de limpeza: +1,0 V (0,4 s) e -0,2 V (1,2 s); fluxo 1,0 mL min <sup>-1</sup> .....	85
Figura 16: Cromatograma de separação em fase reversa dos fármacos identificados no gráfico na concentração de 50 mg L <sup>-1</sup> . Condições: fase móvel acetato de amônio 50 mmol L <sup>-1</sup> ; pH 6,5; metanol 45 % (v/v); acetonitrila 5 % (v/v); SDS 1 mmol L <sup>-1</sup> ;coluna C18 (250 mm); potencial de detecção +0,8 V (0,4 s); potenciais de limpeza: +1,0 V (0,4 s) e -0,2 V (1,2 s); temperatura forno da coluna 45°C; fluxo 1,0 mL min <sup>-1</sup> .....	87
Figura 17: Cromatograma de separação em fase reversa. Femproporex, anfepramona e cafeína a 20 mg L <sup>-1</sup> . Condições: fase móvel acetato de amônio 5 mmol L <sup>-1</sup> ; pH 4,0; metanol 45 % (v/v); coluna Bifenil (150 mm); potencial de detecção +0,8 V (0,4 s); potenciais de limpeza: +1,0 V (0,4 s) e -0,2 V (1,2 s); temperatura forno da coluna 40°C; fluxo 1,0 mL min <sup>-1</sup> .....	89
Figura 18: Cromatograma de separação em fase reversa dos fármacos identificados no gráfico: Flurazepam 5 mg L <sup>-1</sup> , Bromazepam 100 mg L <sup>-1</sup> , Lorazepam 80 mg L <sup>-1</sup> , Clonazepam 20 mg L <sup>-1</sup> , Clordiazepóxido 80 mg L <sup>-1</sup> , Medazepam 40 mg L <sup>-1</sup> ,	

Midazolam 40 mg L<sup>-1</sup>, Alprazolam 60 mg L<sup>-1</sup>, Diazepam 60 mg L<sup>-1</sup>.  
Condições: fase móvel acetato de amônio 10 mmol L<sup>-1</sup>; pH 4,0; metanol 70 %  
(v/v); β-ciclodextrina 0,1 mmol L<sup>-1</sup>; coluna Bifenil (150 mm); potencial de  
detecção +0,8 V (0,4 s); potenciais de limpeza: +1,0 V (0,4 s) e -0,2 V (1,2 s);  
temperatura forno da coluna 40°C; fluxo 1,0 mL min<sup>-1</sup>. .....90

Figura 19: Cromatograma de separação em fase reversa para o Bromazepam 100 mg L<sup>-1</sup>.  
Condições: fase móvel acetato de amônio 10 mmol L<sup>-1</sup>; pH 4,0; metanol 70  
% (v/v); β-ciclodextrina 0,1 mmol L<sup>-1</sup>; coluna Bifenil (150 mm); potencial de  
detecção +0,8 V (0,4 s); potenciais de limpeza: +1,0 V (0,4 s) e -0,2 V (1,2 s);  
temperatura forno da coluna 40°C; fluxo 1,0 mL min<sup>-1</sup>. .....91

Figura 20: Cromatograma de separação em fase reversa para o Clordiazepóxido 80 mg  
L<sup>-1</sup>. Condições: fase móvel acetato de amônio 10 mmol L<sup>-1</sup>; pH 4,0; metanol  
70 % (v/v); β-ciclodextrina 0,1 mmol L<sup>-1</sup>; coluna Bifenil (150 mm); potencial  
de detecção +0,8 V (0,4 s); potenciais de limpeza: +1,0 V (0,4 s) e -0,2 V (1,2  
s); temperatura forno da coluna 40°C; fluxo 1,0 mL min<sup>-1</sup>. .....91

Figura 21: Cromatograma de separação em fase reversa para o Medazepam 40 mg L<sup>-1</sup>.  
Condições: fase móvel acetato de amônio 10 mmol L<sup>-1</sup>; pH 4,0; metanol 70 %  
(v/v); β-ciclodextrina 0,1 mmol L<sup>-1</sup>; coluna Bifenil (150 mm); potencial de  
detecção +0,8 V (0,4 s); potenciais de limpeza: +1,0 V (0,4 s) e -0,2 V (1,2 s);  
temperatura forno da coluna 40°C; fluxo 1,0 mL min<sup>-1</sup>. .....92

Figura 22: Cromatograma de separação em fase reversa para o Alprazolam 60 mg L<sup>-1</sup>.  
Condições: fase móvel acetato de amônio 10 mmol L<sup>-1</sup>; pH 4,0; metanol 70 %  
(v/v); β-ciclodextrina 0,1 mmol L<sup>-1</sup>; coluna Bifenil (150 mm); potencial de  
detecção +0,8 V (0,4 s); potenciais de limpeza: +1,0 V (0,4 s) e -0,2 V (1,2 s);  
temperatura forno da coluna 40°C; fluxo 1,0 mL min<sup>-1</sup>. .....92

Figura 23: Cromatograma de separação em fase reversa de multiclasses de adulterantes:  
(1) Femproporex 3 mg L<sup>-1</sup> (2) Anfepramona 100 mg L<sup>-1</sup> (3) Ioimbina 3 mg L<sup>-1</sup>  
(4) Cafeína 40 mg L<sup>-1</sup> (5) Furosemida 5 mg L<sup>-1</sup> (6) Fluoxetina 30 mg L<sup>-1</sup> (7)  
Flurazepam 5 mg L<sup>-1</sup> (8) Sildenafil 80 mg L<sup>-1</sup> (9) Lorazepam 10 mg L<sup>-1</sup> (10)  
Clonazepam 20 mg L<sup>-1</sup> (11) Midazolam 10 mg L<sup>-1</sup> (12) Sertralina 20 mg L<sup>-1</sup>  
(13) Tadalafil 10 mg L<sup>-1</sup> (14) Bisacodil 20 mg L<sup>-1</sup> (15) Diazepam 60 mg L<sup>-1</sup>.  
Condições: fase móvel acetate de amônio 10 mmol L<sup>-1</sup> (pH 4.0); metanol 64 %  
(v/v); coluna bifenil; potencial de detecção: +0.8 V (0.4s); potenciais de  
limpeza: +1.0 V (0.4s) e -0.2 V (1.2s). Fluxo: 1.0 mL/min; temperatura: 40°C. ....96

Figura 24: Cromatograma de separação em fase reversa de multiclasses de adulterantes:  
(1) Femproporex 3 mg L<sup>-1</sup> (2) Anfepramona 100 mg L<sup>-1</sup> (3) Ioimbina 3 mg L<sup>-1</sup>  
(4) Cafeína 40 mg L<sup>-1</sup> (5) Furosemida 5 mg L<sup>-1</sup> (6) Fluoxetina 30 mg L<sup>-1</sup> (7)  
Flurazepam 5 mg L<sup>-1</sup> (8) Sildenafil 80 mg L<sup>-1</sup> (9) Lorazepam 10 mg L<sup>-1</sup> (10)  
Clonazepam 20 mg L<sup>-1</sup> (11) Midazolam 10 mg L<sup>-1</sup> (12) Sertralina 20 mg L<sup>-1</sup>  
(13) Tadalafil 10 mg L<sup>-1</sup> (14) Bisacodil 20 mg L<sup>-1</sup> (15) Diazepam 60 mg L<sup>-1</sup>.  
Condições: fase móvel acetate de amônio 10 mmol L<sup>-1</sup> (pH 4.0); metanol 64 %  
(v/v); coluna C18; potencial de detecção: +0.8 V (0.4s); potenciais de limpeza:  
+1.0 V (0.4s) e -0.2 V (1.2s). Fluxo: 1.0 mL/min; temperatura: 40°C. ....97

Figura 25: Voltamogramas hidrodinâmicos de corrente direta (DC) dos compostos de interesse Anfepriamo e Femproporex a 20 mg L <sup>-1</sup> no eletrodo de ouro. Eluente: Fosfato de sódio 5 mmol L <sup>-1</sup> , pH 5,0, fluxo 0,5 mL/min, temperatura ambiente. ....	99
Figura 26: Voltamogramas hidrodinâmicos de corrente direta (DC) dos compostos de interesse Ioimbina, Tadalafil e Sildenafil a 20 mg L <sup>-1</sup> no eletrodo de ouro. Eluente: Fosfato de sódio 5 mmol L <sup>-1</sup> , pH 5,0, fluxo 0,5 mL/min, temperatura ambiente. Cafeína a 20 mg L <sup>-1</sup> . Eluente: Acetato de amônio 5 mmol L <sup>-1</sup> , pH 4,0, fluxo 0,5 mL/min, temperatura ambiente. ....	100
Figura 27: Voltamogramas hidrodinâmicos de corrente direta (DC) dos compostos de interesse Lorazepam, Clonazepam, Midazolam e Diazepam a 20 mg L <sup>-1</sup> no eletrodo de ouro. Eluente: Fosfato de sódio 5 mmol L <sup>-1</sup> , pH 5,0, fluxo 0,5 mL/min, temperatura ambiente. ....	102
Figura 28: Voltamogramas hidrodinâmicos de corrente direta (DC) dos compostos de interesse Furosemida, Fluoxetina, Sertralina e Bisacodil a 20 mg L <sup>-1</sup> no eletrodo de ouro. Eluente: Fosfato de sódio 5 mmol L <sup>-1</sup> , pH 5,0, fluxo 0,5 mL/min, temperatura ambiente. ....	103
Figura 29: Voltamogramas hidrodinâmicos de corrente direta (DC) de todos os compostos de interesse. ....	104
Figura 30: Sinais voltamétricos do condicionamento da superfície do eletrodo de ouro por voltametria cíclica (10 ciclos), velocidade de varredura 500 mV/s. Eletrólito de suporte: H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,5 mol L <sup>-1</sup> . ....	105
Figura 31: Sinais voltamétricos obtidos para o eletrólito de suporte. Eletrodo de disco rotatório de ouro, voltametria cíclica (8 ciclos), velocidade de varredura 500 mV/s, eletrólito de suporte: Acetato de amônio 10 mmol L <sup>-1</sup> pH 4,0.....	106
Figura 32: Sinais voltamétricos para o Femproporex, concentração 500 mg L <sup>-1</sup> . Eletrodo de disco rotatório de ouro, voltametria cíclica (8 ciclos), velocidade de varredura 500 mV/s, eletrólito de suporte: Acetato de amônio 10 mmol L <sup>-1</sup> pH 4,0.....	107
Figura 33: Sinais voltamétricos para Anfepriamo, concentração 500 mg L <sup>-1</sup> . Eletrodo de disco rotatório de ouro, voltametria cíclica (8 ciclos), velocidade de varredura 500 mV/s, eletrólito de suporte: Acetato de amônio 10 mmol L <sup>-1</sup> pH 4,0. ....	108
Figura 34: Sinais voltamétricos para Ioimbina, concentração 500 mg L <sup>-1</sup> . Eletrodo de disco rotatório de ouro, voltametria cíclica (8 ciclos), velocidade de varredura 500 mV/s, eletrólito de suporte: Acetato de amônio 10 mmol L <sup>-1</sup> pH 4,0.....	109
Figura 35: Sinais voltamétricos para Tadalafil, concentração 100 mg L <sup>-1</sup> . Eletrodo de disco rotatório de ouro, voltametria cíclica (8 ciclos), velocidade de varredura 500 mV/s, eletrólito de suporte: Acetato de amônio 10 mmol L <sup>-1</sup> pH 4,0.....	109
Figura 36: Sinais voltamétricos para Cafeína, concentração 500 mg L <sup>-1</sup> . Eletrodo de disco rotatório de ouro, voltametria cíclica (8 ciclos), velocidade de varredura 500 mV/s, eletrólito de suporte: Acetato de amônio 10 mmol L <sup>-1</sup> pH 4,0.....	110

Figura 37: Sinais voltamétricos para Sildenafil, concentração 500 mg L <sup>-1</sup> . Eletrodo de disco rotatório de ouro, voltametria cíclica (8 ciclos), velocidade de varredura 500 mV/s, eletrólito de suporte: Acetato de amônio 10 mmol L <sup>-1</sup> pH 4,0. ....	111
Figura 38: Sinais voltamétricos para Lorazepam, concentração 100 mg L <sup>-1</sup> . Eletrodo de disco rotatório de ouro, voltametria cíclica (8 ciclos), velocidade de varredura 500 mV/s, eletrólito de suporte: Acetato de amônio 10 mmol L <sup>-1</sup> pH 4,0. ....	112
Figura 39: Sinais voltamétricos para Clonazepam, concentração 100 mg L <sup>-1</sup> . Eletrodo de disco rotatório de ouro, voltametria cíclica (8 ciclos), velocidade de varredura 500 mV/s, eletrólito de suporte: Acetato de amônio 10 mmol L <sup>-1</sup> pH 4,0. ....	112
Figura 40: Sinais voltamétricos para Midazolam, concentração 100 mg L <sup>-1</sup> . Eletrodo de disco rotatório de ouro, voltametria cíclica (8 ciclos), velocidade de varredura 500 mV/s, eletrólito de suporte: Acetato de amônio 10 mmol L <sup>-1</sup> pH 4,0. ....	113
Figura 41: Sinais voltamétricos para Diazepam, concentração 100 mg L <sup>-1</sup> . . Eletrodo de disco rotatório de ouro, voltametria cíclica (8 ciclos), velocidade de varredura 500 mV/s, eletrólito de suporte: Acetato de amônio 10 mmol L <sup>-1</sup> pH 4,0. ....	113
Figura 42: Sinais voltamétricos para Fluoxetina, concentração 100 mg L <sup>-1</sup> . . Eletrodo de disco rotatório de ouro, voltametria cíclica (8 ciclos), velocidade de varredura 500 mV/s, eletrólito de suporte: Acetato de amônio 10 mmol L <sup>-1</sup> pH 4,0. ....	114
Figura 43: Sinais voltamétricos para Sertralina, concentração 100 mg L <sup>-1</sup> . . Eletrodo de disco rotatório de ouro, voltametria cíclica (8 ciclos), velocidade de varredura 500 mV/s, eletrólito de suporte: Acetato de amônio 10 mmol L <sup>-1</sup> pH 4,0. ....	115
Figura 44: Sinais voltamétricos para Furosemida, concentração 100 mg L <sup>-1</sup> . . Eletrodo de disco rotatório de ouro, voltametria cíclica (8 ciclos), velocidade de varredura 500 mV/s, eletrólito de suporte: Acetato de amônio 10 mmol L <sup>-1</sup> pH 4,0. ....	115
Figura 45: Sinais voltamétricos para Bisacodil, concentração 100 mg L <sup>-1</sup> . Eletrodo de disco rotatório de ouro, voltametria cíclica (8 ciclos), velocidade de varredura 500 mV/s, eletrólito de suporte: Acetato de amônio 10 mmol L <sup>-1</sup> pH 4,0. ....	116
Figura 46: Estudo da influência da matriz em amostra de suplemento alimentar do grupo 1 para Femproporex. ....	126
Figura 47: Estudo da influência da matriz em amostra de suplemento alimentar do grupo 2 para Anfepramona. ....	126
Figura 48: Estudo da influência da matriz em amostra de suplemento alimentar do grupo 1 para Ioimbina. ....	127
Figura 49: Estudo da influência da matriz em amostra de suplemento alimentar do grupo 2 para Cafeína. ....	127
Figura 50: Estudo da influência da matriz em amostra de suplemento alimentar do grupo 1 para Furosemida. ....	127
Figura 51: Estudo da influência da matriz em amostra de suplemento alimentar do grupo 2 para Fluoxetina. ....	128
Figura 52: Estudo da influência da matriz em amostra de suplemento alimentar do grupo 1 para Sildenafil. ....	128



Figura 53: Estudo da influência da matriz em amostra de suplemento alimentar do grupo 2 para Lorazepam. ....	128
Figura 54: Estudo da influência da matriz em amostra de suplemento alimentar do grupo 1 para Clonazepam. ....	129
Figura 55: Estudo da influência da matriz em amostra de suplemento alimentar do grupo 2 para Midazolam. ....	129
Figura 56: Estudo da influência da matriz em amostra de suplemento alimentar do grupo 1 para Sertralina. ....	129
Figura 57: Estudo da influência da matriz em amostra de suplemento alimentar do grupo 2 para Tadalafil. ....	130
Figura 58: Estudo da influência da matriz em amostra de suplemento alimentar do grupo 1 para Bisacodil. ....	130
Figura 59: Estudo da influência da matriz em amostra de suplemento alimentar do grupo 1 para Diazepam. ....	130
Figura 60: Voltamograma obtido para NaClO <sub>4</sub> em ACN 0,01 mol L <sup>-1</sup> . Condições: HMDE operando no modo pulso diferencial, velocidade varredura: 30 mV/s, amplitude do pulso: 50 mV (+ / -) tempo de pulso: 30 ms. ....	133
Figura 61: Estrutura molecular básica em comum para os benzodiazepínicos. ....	134
Figura 62: Voltamograma obtido para Alprazolam (6 adições na célula de 10 mg L <sup>-1</sup> / adição). Condições: NaClO <sub>4</sub> em ACN 0,01 mol L <sup>-1</sup> , HMDE operando no modo pulso diferencial, velocidade varredura: 30 mV/s. ....	136
Figura 63: Voltamograma obtido para Bromazepam (6 adições na célula de 10 mg L <sup>-1</sup> / adição). Condições: NaClO <sub>4</sub> em ACN 0,01 mol L <sup>-1</sup> , HMDE operando no modo pulso diferencial, velocidade varredura: 30 mV/s. ....	137
Figura 64: Voltamograma obtido para Clordiazepóxido (6 adições na célula de 10 mg L <sup>-1</sup> / adição). Condições: NaClO <sub>4</sub> em ACN 0,01 mol L <sup>-1</sup> , HMDE operando no modo pulso diferencial, velocidade varredura: 30 mV/s. ....	138
Figura 65: Voltamograma obtido para Clonazepam (6 adições na célula de 10 mg L <sup>-1</sup> / adição). Condições: NaClO <sub>4</sub> em ACN 0,01 mol L <sup>-1</sup> , HMDE operando no modo pulso diferencial, velocidade varredura: 30 mV/s. ....	138
Figura 66: Voltamograma obtido para Lorazepam (6 adições na célula de 10 mg L <sup>-1</sup> / adição). Condições: NaClO <sub>4</sub> em ACN 0,01 mol L <sup>-1</sup> , HMDE operando no modo pulso diferencial, velocidade varredura: 30 mV/s. ....	139
Figura 67: Voltamograma obtido para Diazepam (6 adições na célula de 10 mg L <sup>-1</sup> / adição). Condições: NaClO <sub>4</sub> em ACN 0,01 mol L <sup>-1</sup> , HMDE operando no modo pulso diferencial, velocidade varredura: 30 mV/s. ....	140
Figura 68: Voltamograma obtido para Medazepam (6 adições na célula de 10 mg L <sup>-1</sup> / adição). Condições: NaClO <sub>4</sub> em ACN 0,01 mol L <sup>-1</sup> , HMDE operando no modo pulso diferencial, velocidade varredura: 30 mV/s. ....	140
Figura 69: Voltamograma obtido para Midazolam (6 adições na célula de 10 mg L <sup>-1</sup> / adição). Condições: NaClO <sub>4</sub> em ACN 0,01 mol L <sup>-1</sup> , HMDE operando no modo pulso diferencial, velocidade varredura: 30 mV/s. ....	141

Figura 70: Voltamograma obtido para Amilorida (6 adições na célula de 10 mg L <sup>-1</sup> / adição). Condições: NaClO <sub>4</sub> em ACN 0,01 mol L <sup>-1</sup> , HMDE operando no modo pulso diferencial, velocidade varredura: 30 mV/s. ....	142
Figura 71: Voltamograma obtido para Bupropiona (6 adições na célula de 10 mg L <sup>-1</sup> / adição). Condições: NaClO <sub>4</sub> em ACN 0,01 mol L <sup>-1</sup> , HMDE operando no modo pulso diferencial, velocidade varredura: 30 mV/s. ....	143
Figura 72: Voltamograma obtido para Anfepramona (6 adições na célula de 10 mg L <sup>-1</sup> / adição). Condições: NaClO <sub>4</sub> em ACN 0,01 mol L <sup>-1</sup> , HMDE operando no modo pulso diferencial, velocidade varredura: 30 mV/s. ....	144
Figura 73: Voltamograma obtido para Femproporex (6 adições na célula de 10 mg L <sup>-1</sup> / adição). Condições: NaClO <sub>4</sub> em ACN 0,01 mol L <sup>-1</sup> , HMDE operando no modo pulso diferencial, velocidade varredura: 30 mV/s. ....	144
Figura 74: Fluxograma do agrupamento de sinais proposto para identificação dos fármacos como adulterantes em meio não aquoso.....	147
Figura 75: Sinal eletroquímico observado em eletrodo de mercúrio para faixa linear do Alprazolam em 0,01 mol L <sup>-1</sup> NaClO <sub>4</sub> em ACN. ....	151
Figura 76: Sinal eletroquímico observado para faixa linear do Bromazepam. Condições: NaClO <sub>4</sub> em ACN 0,01 mol L <sup>-1</sup> , HMDE operando no modo pulso diferencial, velocidade varredura: 30 mV/s. ....	151
Figura 77: Sinal eletroquímico observado para faixa linear do Clonazepam. Condições: NaClO <sub>4</sub> em ACN 0,01 mol L <sup>-1</sup> , HMDE operando no modo pulso diferencial, velocidade varredura: 30 mV/s. ....	152
Figura 78: Sinal eletroquímico observado para faixa linear do Clordiazepóxido. Condições: NaClO <sub>4</sub> em ACN 0,01 mol L <sup>-1</sup> , HMDE operando no modo pulso diferencial, velocidade varredura: 30 mV/s. ....	152
Figura 79: Sinal eletroquímico observado para faixa linear do Diazepam. Condições: NaClO <sub>4</sub> em ACN 0,01 mol L <sup>-1</sup> , HMDE operando no modo pulso diferencial, velocidade varredura: 30 mV/s. ....	153
Figura 80: Sinal eletroquímico observado para faixa linear do Lorazepam. Condições: NaClO <sub>4</sub> em ACN 0,01 mol L <sup>-1</sup> , HMDE operando no modo pulso diferencial, velocidade varredura: 30 mV/s. ....	153
Figura 81: Sinal eletroquímico observado para faixa linear do Midazolam. Condições: NaClO <sub>4</sub> em ACN 0,01 mol L <sup>-1</sup> , HMDE operando no modo pulso diferencial, velocidade varredura: 30 mV/s. ....	154
Figura 82: Sinal eletroquímico observado para faixa linear do Amilorida. Condições: NaClO <sub>4</sub> em ACN 0,01 mol L <sup>-1</sup> , HMDE operando no modo pulso diferencial, velocidade varredura: 30 mV/s. ....	154
Figura 83: Sinal eletroquímico observado para faixa linear do Bupropiona. Condições: NaClO <sub>4</sub> em ACN 0,01 mol L <sup>-1</sup> , HMDE operando no modo pulso diferencial, velocidade varredura: 30 mV/s. ....	155
Figura 84: Sinal eletroquímico observado para faixa linear do Anfepramona. Condições: NaClO <sub>4</sub> em ACN 0,01 mol L <sup>-1</sup> , HMDE operando no modo pulso diferencial, velocidade varredura: 30 mV/s. ....	155

Figura 85: Sinal eletroquímico observado para faixa linear do Femproporex. Condições: NaClO <sub>4</sub> em ACN 0,01 mol L <sup>-1</sup> , HMDE operando no modo pulso diferencial, velocidade varredura: 30 mV/s.....	156
Figura 86: Sinal eletroquímico obtido para quantificação de amostra fortificada com Alprazolam. Condições: NaClO <sub>4</sub> em ACN 0,01 mol L <sup>-1</sup> , HMDE operando no modo pulso diferencial, velocidade varredura: 30 mV/s.....	158
Figura 87: Sinal eletroquímico obtido para quantificação de amostra fortificada com Bromazepam. Condições: NaClO <sub>4</sub> em ACN 0,01 mol L <sup>-1</sup> , HMDE operando no modo pulso diferencial, velocidade varredura: 30 mV/s.....	159
Figura 88: Sinal eletroquímico obtido para quantificação de amostra fortificada com Clonazepam. Condições: NaClO <sub>4</sub> em ACN 0,01 mol L <sup>-1</sup> , HMDE operando no modo pulso diferencial, velocidade varredura: 30 mV/s.....	159
Figura 89: Sinal eletroquímico obtido para quantificação de amostra fortificada com Clordiazepóxido. Condições: NaClO <sub>4</sub> em ACN 0,01 mol L <sup>-1</sup> , HMDE operando no modo pulso diferencial, velocidade varredura: 30 mV/s.....	160
Figura 90: Sinal eletroquímico obtido para quantificação de amostra fortificada com Diazepam. Condições: NaClO <sub>4</sub> em ACN 0,01 mol L <sup>-1</sup> , HMDE operando no modo pulso diferencial, velocidade varredura: 30 mV/s.....	160
Figura 91: Sinal eletroquímico obtido para quantificação de amostra fortificada com Midazolam. Condições: NaClO <sub>4</sub> em ACN 0,01 mol L <sup>-1</sup> , HMDE operando no modo pulso diferencial, velocidade varredura: 30 mV/s.....	161
Figura 92: Sinal eletroquímico obtido para quantificação de amostra fortificada com Amilorida. Condições: NaClO <sub>4</sub> em ACN 0,01 mol L <sup>-1</sup> , HMDE operando no modo pulso diferencial, velocidade varredura: 30 mV/s.....	161
Figura 93: Sinal eletroquímico obtido para quantificação de amostra fortificada com Bupropiona. Condições: NaClO <sub>4</sub> em ACN 0,01 mol L <sup>-1</sup> , HMDE operando no modo pulso diferencial, velocidade varredura: 30 mV/s.....	162
Figura 94: Sinal eletroquímico obtido para quantificação de amostra fortificada com Anfepramona. Condições: NaClO <sub>4</sub> em ACN 0,01 mol L <sup>-1</sup> , HMDE operando no modo pulso diferencial, velocidade varredura: 30 mV/s.....	162
Figura 95: Sinal eletroquímico obtido para quantificação de amostra fortificada com Femproporex. Condições: NaClO <sub>4</sub> em ACN 0,01 mol L <sup>-1</sup> , HMDE operando no modo pulso diferencial, velocidade varredura: 30 mV/s.....	163
Figura 96: Perfil cromatográfico de amostra contendo cafeína. Condições: Fase reversa – bifenil, fase móvel acetato de amônio 10 mmol L <sup>-1</sup> (pH 4.0); metanol 64 % (v/v); coluna bifenil; potencial de detecção: +0.8 V (0.4s); potenciais de limpeza: +1.0 V (0.4s) e -0.2 V (1.2s). Fluxo: 1.0 mL/min; temperatura: 40°C.....	173
Figura 97: Perfil cromatográfico de amostra contendo Ioimbina. Condições: Fase reversa – bifenil, fase móvel acetato de amônio 10 mmol L <sup>-1</sup> (pH 4.0); metanol 64 % (v/v); coluna bifenil; potencial de detecção: +0.8 V (0.4s); potenciais de limpeza: +1.0 V (0.4s) e -0.2 V (1.2s). Fluxo: 1.0 mL/min; temperatura: 40°C.....	173
Figura 98: Perfil cromatográfico de amostra contendo Diazepam. Condições: Fase reversa – bifenil, fase móvel acetato de amônio 10 mmol L <sup>-1</sup> (pH 4.0); metanol	

64 % (v/v); coluna bifenil; potencial de detecção: +0.8 V (0.4s); potenciais de limpeza: +1.0 V (0.4s) e -0.2 V (1.2s). Fluxo: 1.0 mL/min; temperatura: 40°C. ....174

- Figura 99: Perfil cromatográfico de amostra contendo Tadalafil. Condições: Fase reversa – bifenil, fase móvel acetato de amônio 10 mmol L<sup>-1</sup> (pH 4.0); metanol 64 % (v/v); coluna bifenil; potencial de detecção: +0.8 V (0.4s); potenciais de limpeza: +1.0 V (0.4s) e -0.2 V (1.2s). Fluxo: 1.0 mL/min; temperatura: 40°C. ....174
- 00: Perfil apresentado para amostras de suplementos alimentares analisados por voltametria em meio não aquoso (diluição 100 x).....175
- 01: Procedimentos analíticos envolvidos na análise de suplementos alimentares por métodos de detecção eletroquímica e separação. ....179

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Resumo das normas principais que tratam de alimentos aos quais se encaixam os suplementos alimentares no Brasil. ....	39
Tabela 2: Definições da RDC nº 18/2010 sobre aditivos aos alimentos para atletas. ....	43
Tabela 3: Representação da estrutura química molecular de cada fármaco com seus respectivos mecanismos de ação e efeitos adversos.....	51
Tabela 4: Métodos analíticos para determinação de fármacos em suplementos alimentares.....	59
Tabela 5: Fármacos testados com seus respectivos nomes comerciais, forma adquirida, classe farmacológica e pKas.....	73
Tabela 6: Fármacos testados para tentativa de inclusão no método de separação cromatográfico em coluna bifenil com detecção amperométrica pulsada (HPLC–PAD). ....	93
Tabela 7: Compostos testados como interferentes para avaliação da seletividade do método de separação cromatográfico. ....	117
Tabela 8: Dados de validação obtidos para os adulterantes estudados por cromatografia com detecção amperométrica: Faixa linear (equação da reta, $R^2$ ), limites de detecção e quantificação.....	119
Tabela 9: Valores obtidos para precisão intra e interdia em três níveis de concentração para os compostos analisados pelo método de separação cromatográfico.....	121
Tabela 10: Dados de exatidão e demais valores obtidos para a determinação dos adulterantes de interesse. ....	124
Tabela 11: Sais e solventes testados como eletrólitos de suporte para análise em meio não aquoso. ....	132
Tabela 12: Exemplos de compostos orgânicos reduzíveis e oxidáveis e seus potenciais da primeira etapa de reação em solventes não aquosos.....	135
Tabela 13: Análise dos sinais apresentados pelos fármacos, sinal principal escolhido para quantificação e interferências mútuas de acordo com o sinal escolhido. ....	148
Tabela 14: Parâmetros voltamétricos de validação individuais para os adulterantes em suplementos alimentares. Condições: $\text{NaClO}_4$ em ACN $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ , HMDE operando no modo pulso diferencial, velocidade varredura: $30 \text{ mV/s}$ .....	149
Tabela 15: Dados de validação obtidos para os adulterantes estudados por voltametria em meio não aquoso: Faixa linear (equação da reta, $R^2$ ), limites de detecção e quantificação. ....	150
Tabela 16: Figuras de mérito obtidas para os adulterantes estudados por voltametria em meio não aquoso. ....	157
Tabela 17: Composição, dose diária recomendada e resultados obtidos para análise de adulterantes em amostras de suplementos alimentares por cromatografia com detecção amperométrica. ....	165



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACN	Acetonitrila
AdSV	Adsorptive Stripping Voltammetry
AE	Auxiliary electrode
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOAC	Official Methods of Analysis - AOAC International
BZD	Benzodiazepínicos
CV	Coeficiente de variância
DC	Direct current
DMF	Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPR	Desvio padrão relativo
DPV	Differential Pulse Voltammetry
DSHEA	Dietary Supplement Health and Education Act
EAA	Esteroides Anabólicos Androgênicos
EPA	Environmental Protection Agency
EU	European Union
EUA	Estados Unidos da América
FDA	U.S. Food & Drug Administration
FM	Fase móvel
GCE	Glassy carbon electrode
HMDE	Hanging Mercury Drop Electrode
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HRMS	High Resolution Mass Spectrometry
ICH	International Conference on Harmonisation
IDR	Ingestão Diária Recomendada
IFAV	Insumo Farmacêutico Ativo Vegetal
IN	Instrução Normativa
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
LD	Limite de detecção
LD	Limite de quantificação
m/v	Massa / Volume
MAPA	Ministério da Agricultura Pecuária e Desenvolvimento
MFE	Mercury Film Electrode
MME	Multi Mode Electrode
MME	Multi mode electrode
NIST	National Institute of Standards and Technology
OGM	Organismos Geneticamente Modificados
PAD	Pulsed Amperometric Detection
PDCAAS	Protein Digestibility Corrected Amino Acid Score
PIQ	Padrão de Identidade e Qualidade
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
RDE	Rotating Disc Electrode
RE	Reference electrode
SCE	Saturated calomelane electrode
SCE	Saturated Calomelane Electrode
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SRMs	Materiais de referência certificados

SV	Stripping Voltammetry
SVS	Secretaria de Vigilância Sanitária
SVS/MS	Secretaria de Vigilância Sanitária/Ministério da Saúde
TMS	Trimetilclorosilano
Tr	Tempo de retenção
UHPLC	Ultra High Performance Liquid Chromatography
UV-Vis	Ultravioleta-visível
v/v	Volume / Volume
VMP	Voltametria de micropartículas
WADA	World Anti-Doping Agency
WE	Working electrode
WHO	World Health Organization



## SUMÁRIO

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>29</b>
<b>2.</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>31</b>
2.1	OBJETIVO GERAL.....	31
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	31
<b>3.</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO.....</b>	<b>33</b>
3.1	SUPLEMENTOS ALIMENTARES: HISTÓRICO E DEFINIÇÕES.....	33
3.2	ENQUADRAMENTO LEGAL DOS SUPLEMENTOS ALIMENTARES.....	35
3.3	O CONSUMO DE SUPLEMENTOS E OS CASOS DE ADULTERAÇÃO .....	45
3.4	FÁRMACOS DE INTERESSE ANALÍTICO .....	50
3.5	MÉTODOS ANALÍTICOS APLICADOS NO ESTUDO DA ADULTERAÇÃO DE SUPLEMENTOS ALIMENTARES .....	58
<b>3.5.1</b>	<b>Voltametria em meio não-aquoso e Voltametria Cíclica.....</b>	<b>61</b>
<b>3.5.2</b>	<b>Cromatografia líquida com detecção pulso-amperométrica.....</b>	<b>64</b>
<b>4.</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>69</b>
4.1	EQUIPAMENTOS.....	69
4.2	REAGENTES E SOLUÇÕES .....	72
4.3	PROCEDIMENTOS ANALÍTICOS .....	74
<b>4.3.1</b>	<b>Métodos de separação cromatográfica .....</b>	<b>74</b>
<b>4.3.2</b>	<b>Método de análise por voltametria em meios aquoso e não aquoso.....</b>	<b>75</b>
<b>4.3.3</b>	<b>Parâmetros de validação .....</b>	<b>76</b>
4.4	AMOSTRAS E PREPARO DE AMOSTRAS.....	79
4.5	ESTUDO DA ESTABILIDADE QUÍMICA DOS PADRÕES DE FÁRMACOS .....	81
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>83</b>
5.1	ANÁLISE CROMATOGRÁFICA DE FÁRMACOS COMO ADULTERANTES .....	83
<b>5.1.1</b>	<b>Cromatografia em C18.....</b>	<b>84</b>
<b>5.1.2</b>	<b>Cromatografia em Bifenil .....</b>	<b>88</b>
<b>5.1.3</b>	<b>Detecção Pulso-Amperométrica em Eletrodo de Ouro (HPLC-PAD).....</b>	<b>98</b>
<b>5.1.4</b>	<b>Voltametria Cíclica em Eletrodo de Ouro (CV).....</b>	<b>105</b>
<b>5.1.5</b>	<b>Validação do Método (HPLC-PAD).....</b>	<b>117</b>
5.1.5.1	<i>Seletividade.....</i>	117
5.1.5.2	<i>Faixa linear, limites de detecção e quantificação .....</i>	119
5.1.5.3	<i>Precisão .....</i>	120
5.1.5.4	<i>Exatidão.....</i>	124
5.1.5.5	<i>Estudo do efeito de matriz .....</i>	125
5.2	ANÁLISE VOLTAMÉTRICA DE FÁRMACOS COMO ADULTERANTES .....	131
<b>5.2.1</b>	<b>Voltametria em meio não aquoso no eletrodo de Mercúrio (DPV-ACN).....</b>	<b>131</b>
<b>5.2.2</b>	<b>Validação do Método (DPV-ACN).....</b>	<b>145</b>
5.2.2.1	<i>Seletividade.....</i>	145
5.2.2.2	<i>Faixa linear, limites de detecção e quantificação .....</i>	149
5.2.2.3	<i>Precisão e Exatidão.....</i>	156
5.3	ANÁLISE DE SUPLEMENTOS ALIMENTARES.....	163

<b>5.3.1</b>	<b>Análise de Amostras por HPLC–PAD .....</b>	<b>163</b>
<b>5.3.2</b>	<b>Análise de Amostras por DPV–ACN .....</b>	<b>175</b>
<b>5.4</b>	<b>ADULTERAÇÃO DE SUPLEMENTOS ALIMENTARES COMERCIALIZADOS NO BRASIL.....</b>	<b>176</b>
<b>6.</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>180</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>182</b>
	<b>APÊNDICE A .....</b>	<b>192</b>
	<b>APÊNDICE B .....</b>	<b>202</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A prática de atividades físicas é sem dúvida um dos mecanismos mais eficientes para manter-se em boas condições de saúde com qualidade de vida regular. É notável o crescimento a cada dia do número de adeptos a este estilo vida. Associados na maioria das vezes a novos hábitos alimentares, exercícios físicos tem levado uma grande parcela da população às difundidas academias. No intuito de melhorar o desempenho físico, prevenir doenças, manter e melhorar a saúde, obter e/ou manter o peso corporal desejado e ainda preencher lacunas nutricionais na dieta, muitos indivíduos aventuram-se no contemporâneo universo dos suplementos alimentares (ALMEIDA, 2014). Influenciada pelo forte apelo publicitário, estima-se que nos Estados Unidos (EUA), por exemplo, metade da população adulta faça uso destes produtos (BROWN, 2016). No Brasil, as taxas de consumo tanto para atletas quanto para o público fisicamente ativo, podem variar de 20 a 94 % sendo observado crescimento nos últimos anos (BRITO; DUTRA, 2015).

Atualmente os brasileiros contam com um mercado de suplementos formado por produtos de diferentes níveis de risco, ora normativamente classificados, por exemplo, como alimentos ora como medicamentos específicos. A inexistência de uma legislação específica para os diferentes suplementos alimentares prejudicam não apenas a comercialização, uma vez que é necessário analisar uma diversidade de normas para regularização do produto no país, mas também o consumidor, já que esta situação deprecia o controle de qualidade promovendo insegurança ao consumidor (BRASIL, 2017).

Por outro lado, o consumidor muitas vezes opta pelo consumo dos suplementos com apelo natural. Acredita-se que estes são livres de substâncias sintéticas e hormônios que possam ser prejudiciais ao seu metabolismo. Entretanto, apesar desta crença, muitos destes produtos já foram relatados na literatura como potenciais riscos à saúde, inclusive por estarem associados a interações com medicamentos prescritos ou mesmo com outro suplemento (PETROCZI; TAYLOR; NAUGHTON, 2011). Além disso, mais um possível problema associado é o risco de adulteração. Em alguns casos a presença de substâncias proibidas ou não declaradas ocorre por contaminação cruzada. Contudo, uma vez que alguns destes produtos são isentos de registro e de livre comercialização e importação, fármacos sintéticos podem ser adicionados intencionalmente para garantir ou melhorar a eficácia do suplemento alimentar (BRITO; CALDAS, 2015).

Após estas constatações, análises sistemáticas de suplementos alimentares foram realizadas parcerias entre institutos de pesquisa e agências de fomento (universidades federais

e órgão reguladores ANVISA), na tentativa de conhecer mais sobre as características destes produtos. As pesquisas revelaram a presença de uma ampla variedade de compostos que não estavam listadas no rótulo e dentre estes, substâncias proibidas pela Agência Mundial Antidoping (WADA, do inglês, *World Anti-Doping Agency*) (MARTELLO; FELLI; CHIAROTTI, 2007; PETROCZI; TAYLOR; NAUGHTON, 2011). A investigação da qualidade de suplementos alimentares através da análise dos mesmos possibilita a detecção de possíveis fraudes envolvendo a adição ilegal de fármacos sintéticos, viabilizando então, a retirada do mercado de produtos que oferecem riscos para os consumidores (MOREIRA, 2016).

Devido ao aumento dos casos de suplementos com composição divergente da declarada e do avanço na variedade mercadológica destes produtos, justifica-se a constante demanda no desenvolvimento de métodos analíticos para estudo em diferentes matrizes. São diversas as técnicas de análise utilizadas. Métodos de separação cromatográficos e eletroforéticos sem dúvida são os mais difundidos na área (BRITO; CALDAS, 2017; CARVALHO, et al. 2010 (a); HYE, et al. 2017; PARK, et al. 2016). Por outro lado, métodos com detecção eletroquímica e voltamétricos, tem se destacado na análise de compostos orgânicos em matrizes complexas (DOMÉNECH-CARBÓ, et al. 2013; DOMÉNECH-CARBÓ, et al. 2014).

Dentro do contexto apresentado, é proposto neste trabalho de tese uma abordagem analítica através da otimização e validação de metodologias para *screening* de fármacos como adulterantes em suplementos alimentares. Cromatografia com detecção pulso-amperométrica e voltametria de pulso diferencial em meio não aquoso, constituem as técnicas escolhidas para o estudo de ansiolíticos, estimulantes, anorexígenos, diuréticos, laxantes e antidepressivos nas amostras dos suplementos adquiridas de todo o Brasil.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Tendo em vista o crescente consumo de suplementos alimentares em todo o mundo e a falta de segurança destes produtos, o objetivo principal deste trabalho é desenvolver, otimizar e validar métodos de *screening*, para estudo multiclasse de fármacos não declarados em suplementos alimentares.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolver um método de separação cromatográfica com detecção pulso-amperométrica para determinação de ansiolíticos, estimulantes, anorexígenos, diuréticos, laxantes e antidepressivos;
- Desenvolver um método utilizando voltametria em meio não aquoso no eletrodo de mercúrio para determinação de ansiolíticos, estimulantes, anorexígenos, diuréticos, laxantes e antidepressivos;
- Investigar as figuras de mérito na validação para ambos os métodos desenvolvidos;
- Determinar em amostras reais de suplementos alimentares, quais os fármacos presentes como adulterantes na amostragem realizada;
- Utilizar os dois métodos como comparativo para análise confirmatória da adulteração.



### 3. REFERENCIAL TEÓRICO

#### 3.1 SUPLEMENTOS ALIMENTARES: HISTÓRICO E DEFINIÇÕES.

O uso de suplementação à dieta normal diária pode parecer bastante recente. Entretanto, é surpreendente encontrar registros desta prática desde 500 a 400 a.C. onde atletas e guerreiros faziam uso de fígado de cervo ou coração de leão esperando que o consumo destes órgãos aumentasse sua bravura, velocidade ou força (APPLEGATE; GRIVETTI, 1997). É difícil determinar quando a dieta dos gregos e romanos, exímios atletas passou a ser baseada em carne. Na antiguidade, atletas consumiam basicamente comida vegetariana, contendo vegetais, legumes, frutas, cereais e vinho diluído em água. Acredita-se que em meados do século V, Eurymenes de Samos, orientado por seu treinador, o filósofo Pythagoras de Cróton, tenha consumido carne, sendo uns dos pioneiros no uso de alimentos para fins de suplementação. Em registros mais concretos, Milo de Cróton, renomado e vitorioso lutador grego, consumiu em torno de 9 kg de carne, 9 kg de pão e 8,5 L de vinho no dia da Olimpíada (GRANDJEAN, 1997).

Desde então, a alimentação rica em carne animal foi adquirida como hábito. A partir daí, o Homem empenhou-se em aperfeiçoar o desempenho esportivo por meio de alterações na dieta. A maioria das evidências para impor-se uma relação científica entre dieta, suplementos e melhor desempenho, no entanto, decorre do início do século XX. Com o advento da pesquisa sobre a compreensão do trabalho muscular, o uso de combustível durante o exercício e os papéis específicos das proteínas, gorduras e carboidratos, pode-se “provar” as lendas e crenças de milhares de anos (APPLEGATE; GRIVETTI, 1997).

Desde as primeiras edições de jogos olímpicos até o presente, o uso dos suplementos difundiu-se para toda a população mundial em praticamente qualquer faixa etária. Esta evolução trouxe consigo uma série de definições que caracterizam os suplementos como uma classe de produtos diferenciados. O objetivo desta classificação é identificar o produto para que sejam reconhecidos como um tipo de alimento.

Caracterizados pela primeira vez segundo a lei pública 103-417 de 1994 dos EUA, suplementos dietéticos são oficialmente definidos como alimentos (DSHEA – *Dietary Supplement Health and Education Act*). Esta lei fornece o quadro regulamentar para os produtos utilizados como suplementos os definindo como: “Um produto (diferente do tabaco) destinado a complementar a dieta que contém um ou mais dos seguintes ingredientes dietéticos”.

- (a) vitaminas;
- (b) minerais;
- (c) ervas ou outros botânicos;
- (d) aminoácidos;
- (e) suplemento alimentar usado pelo homem para suplementar a dieta pelo aumento da ingestão dietética diária total; ou
- (f) Concentrado, metabólito, constituinte, extrato ou combinação de qualquer ingrediente em (a), (b), (c), (d), ou (e). O produto não deve ser utilizado como refeição ou como dieta. Suas formas podem incluir cápsulas, pó a granel, géis, tabletes, líquidos ou outra forma que possa ser ingerida, excluindo-se os aditivos alimentares (BROWN, 2016).

Na União Européia, “suplementos dietéticos, alimentares ou nutrientes, podem ser definidos como fontes concentradas de nutrientes ou outras substâncias com efeito nutricional ou fisiológico, comercializadas sob a forma de dose, com o objetivo de complementar a dieta normal” (BRITO; DUTRA, 2015).

Segundo a *Codex Alimentarius*, suplemento alimentar é: “Produto para ingestão oral, apresentado em formas farmacêuticas, e destinado a suplementar a alimentação de indivíduos saudáveis com nutrientes, substâncias bioativas, enzimas ou probióticos, isolados ou combinados” (FDA, 2008).

No Brasil, a categoria suplementos alimentares “não existe” e, portanto, não há uma definição específica na legislação. Existem classes em que os produtos se encaixam de acordo com suas características, como alimentos para atletas, suplementos vitamínicos e ou minerais, novos alimentos e substâncias bioativas com alegações de propriedade funcional. A ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária é a responsável pela regulamentação, comercialização e fiscalização destes produtos.

Diferente dos alimentos funcionais, que incluem alimentos que tenham sido enriquecidos ou fortificados com nutrientes originais para melhorar ou corrigir os níveis de nutrientes adequados, os suplementos alimentares não são destinados à alimentação ou como substitutos de refeições. Entretanto, com base na sua composição, podem auxiliar em efeitos nutricionais, metabólicos e fisiológicos. Os suplementos são considerados desta forma, uma ampla categoria de nutrientes e de substâncias bioativas que contribuem para o total da ingestão diária dietética (MOREIRA, 2016). Mesmo que grande parte dos suplementos não seja enquadrado como um medicamento, embora suas formas de apresentação possam ser similares, eles não são utilizados no tratamento ou cura de doenças. Porém, ao serem associados com um estilo de vida mais saudável, pela prática de atividades e pela adequação



da dieta alimentícia, os suplementos alimentares podem auxiliar na redução do risco de problemas de saúde (ALMEIDA, 2014).

### 3.2 ENQUADRAMENTO LEGAL DOS SUPLEMENTOS ALIMENTARES

Conforme mencionado anteriormente, a legislação sanitária brasileira não prevê a categoria “suplementos alimentares”. Esta situação promove um cenário regulatório confuso e inseguro, onde as definições se sobrepõem, confundindo não apenas o consumidor, mas também o fabricante e até mesmo próprio órgão fiscalizador.

As normas bases para alimentos e que englobam os suplementos alimentares estão certamente desatualizadas. O Decreto-Lei Federal nº 986 de 21 de outubro de 1969 instituiu as normas básicas para alimentos, desde o seu registro, órgãos de controle junto ao Ministério da Saúde, rotulagem, aditivos e entre outros (BRASIL, 1969). Três leis federais bastante relevantes, Leis nº 5.991, de 1973 (Controle Sanitário do Comércio de Drogas, Medicamentos, Insumos Farmacêuticos e Correlatos); Lei nº 6.360, de 1976 (Vigilância Sanitária a que ficam sujeitos os Medicamentos, as Drogas, os Insumos Farmacêuticos e Correlatos, Cosméticos, Saneantes e Outros Produtos) e a Lei 6.437, de 1977 (Configura Infrações à Legislação Sanitária Federal, Estabelece as Sanções Respectivas) também dizem respeito aos produtos usados como suplementos alimentares (BRASIL, 1973; BRASIL, 1976; BRASIL, 1977). Uma vez que os hábitos da população brasileira sofreram alterações nestas últimas décadas, percebe-se que a regulação legislativa não acompanha mais este quadro de forma adequada.

Mais de 20 anos depois, o ano de 1998 foi importante para os produtos alimentícios no sentido de sua regulamentação. Diversas portarias foram instituídas pela Secretaria de Vigilância Sanitária – Ministério da Saúde (SVS/MS) na tentativa de adequação ao cenário apresentado. A Portaria nº 29 (SVS/MS), de 13 de janeiro de 1998, definiu as características mínimas de qualidade a que deveriam ser apresentados os “alimentos para fins especiais”. Por exemplo, alimentos para dietas e para ingestão com restrição de nutrientes, alimentos para grupos populacionais específicos (como gestantes), alimentos para controle de peso, por praticantes de atividades físicas e entre outros (BRASIL, 1998a). Visando a necessidade de constante aperfeiçoamento das ações de controle sanitário na área de alimentos e visando promover proteção à saúde da população, a SVS/MS publicou em adição a Portaria nº 30 (SVS/MS), de 13 de janeiro de 1998, fixando a identidade de produtos classificados como “alimentos para controle de peso”, bem como suas características mínimas de qualidade

(BRASIL, 1998b). Na mesma data, foi divulgada a Portaria nº 31 (SVS/MS), que por sua vez, tratou dos alimentos adicionados de nutrientes essenciais (BRASIL, 1998c). Com o objetivo de fixar e definir as características mínimas essenciais para a qualidade destes alimentos, esta portaria abrangeu todos os produtos adicionados de nutrientes essenciais contidos naturalmente ou não no alimento, bem como definir os critérios para adição destes nutrientes ao produto. Ainda em 1998, a Secretaria de Vigilância Sanitária percebeu a necessidade de normalizar o uso de suplementos vitamínicos e minerais no país, controlar efetivamente sua produção e comercialização, aperfeiçoar as ações de controle sanitário na área para garantir a saúde da população e definir a identidade e características mínimas de qualidade a que devem obedecer estes suplementos, através da publicação da Portaria 32 (13 de janeiro de 1998, SVS/MS). Estes suplementos foram definidos como “alimentos que servem para contemplar com estes nutrientes isolados ou associados entre si, a dieta diária de uma pessoa saudável, em casos onde sua ingestão a partir da alimentação, seja insuficiente ou quando a dieta requerer suplementação” (BRASIL, 1998d). Finalmente, a Portaria nº 33 (13 de janeiro de 1998, SVS/MS), definiu os limites de Ingestão Diária Recomendada (IDR) para diferentes grupos populacionais, de vitaminas, minerais e proteínas. Visando atender as necessidades nutricionais da maior parte dos indivíduos considerados saudáveis, esta portaria apresentou os valores para adultos, lactentes, crianças, gestantes e lactantes (BRASIL, 1998e). Esta portaria foi revogada pela RDC – ANVISA nº269, de 22 de setembro de 2005, atualizando os valores de IDR (BRASIL, 2005).

Em 1999, a resolução da diretoria colegiada da ANVISA nº 16, de 30 de abril de 1999 aprovou o regulamento técnico dos procedimentos para controle de Novos Alimentos e Novos Ingredientes. Estes produtos são aqueles que não possuem histórico de consumo no País, ou alimentos com substâncias já consumidas, e que, entretanto venham a ser adicionadas ou utilizadas em níveis muito superiores aos atualmente observados nos alimentos utilizados na dieta regular e que podem ser enquadrados como suplementos alimentares (BRASIL, 1999a). Ainda em 1999, a resolução nº 18 (ANVISA), também de 30 de abril, estabeleceu as diretrizes básicas para análise e comprovação de propriedades funcionais e/ou de saúde alegadas nos rótulos destes alimentos. Produtos com alegação de propriedade funcional são aqueles relativos ao papel metabólico ou fisiológico que o nutriente ou não nutriente tem no crescimento, desenvolvimento, manutenção e outras funções normais do organismo humano. Produtos com alegação de propriedade funcional por sua vez, são aqueles que afirmam, sugerem ou implicam a existência de relação entre o alimento ou ingrediente com doença ou condição relacionada à saúde (BRASIL, 1999b).

Em 2002, a RDC – ANVISA nº 02 (07 de janeiro de 2002) foi publicada para tratar das Substâncias Bioativas e Probióticos Isolados com alegação de propriedades funcional e/ou de saúde. Foram adotadas diretrizes para a avaliação de segurança, registro e comercialização, como forma de padronização dos procedimentos referentes a estes alimentos. Nesta categoria estão excluídos chás, compostos líquidos para consumo, alimentos para praticantes de atividades físicas, produtos com indicação terapêutica ou medicamentosa, produtos com ação farmacológica preventiva ou curativa definida (mesmo de origem natural), produtos que contenham substâncias consideradas “*dopping*” pelo comitê olímpico internacional, produtos fitoterápicos e suas associações, alimentos e ingredientes alimentares que contenham, consistam ou que sejam produzidos a partir de OGM (Organismos Geneticamente Modificados), suplemento vitamínico ou mineral, alimentos para nutrição enteral, novos alimentos e ingredientes (BRASIL, 2002).

Em 2007, foi publicada a RDC – ANVISA nº 67 de 9 de outubro, estabelecendo as boas práticas para manipulação de em farmácias. Esta RDC abrange aqueles produtos que sejam originados de insumos/matérias primas inclusive de origem vegetal, substâncias sujeitas a controle especial e também de medicamentos homeopáticos. Suplementos alimentares manipulados em farmácias autorizadas encaixam-se nesta norma.

Em 2010, foi estabelecida a RDC – ANVISA nº 18, de 27 de abril de 2010, que trata dos alimentos para atletas. Esta talvez seja a normativa mais abrangente em se tratando dos suplementos mais utilizados em academias. Este regulamento tem o objetivo de estabelecer a classificação, a designação, os requisitos de composição e de rotulagem dos alimentos especialmente formulados para auxiliar os atletas a atender suas necessidades nutricionais específicas e desempenho do exercício. Os produtos alimentícios especificados por esta RDC são os suplementos hidroeletrólíticos, suplementos energéticos, suplementos protéicos, suplementos para substituição parcial de refeições, suplementos de creatina e suplementos de cafeína. Foram estabelecidas as classificações, designação, requisitos de composição de rotulagem, desta forma, revogando os itens referentes à categoria previstos na Portaria nº 29 (1998, SVS/MS) (BRASIL, 2010).

Alguns suplementos alimentares não se encaixam como alimentos, mas sim, como medicamentos. Dentro desse contexto, podem ser classificados de acordo com a RDC – ANVISA nº 24 (14 de junho de 2011) como medicamentos específicos ou com a RDC – ANVISA nº 26 (13 de maio de 2014) como medicamentos fitoterápicos ou produtos tradicionais fitoterápicos. A resolução para os medicamentos específicos possui o objetivo de definir a categoria e estabelecer os requisitos mínimos para seu registro. São considerados

medicamentos específicos os produtos farmacêuticos, tecnicamente obtidos ou elaborados, com finalidade profilática, curativa ou paliativa não enquadrados nas categorias de medicamento novo, genérico, similar, biológico, fitoterápico ou notificado e cuja(s) substância(s) ativa(s), independente da natureza ou origem, não é passível de ensaio de bioequivalência, frente a um produto comparador (BRASIL, 2011). Os medicamentos fitoterápicos são aqueles obtidos com emprego exclusivo de matérias-primas ativas vegetais cuja segurança e eficácia sejam baseadas em evidências clínicas e que sejam caracterizados pela constância de sua qualidade. Os produtos tradicionais fitoterápicos, por sua vez, são os obtidos com emprego exclusivo de matérias-primas ativas vegetais cuja segurança e efetividade sejam baseadas em dados de uso seguro e efetivo publicados na literatura técnico-científica e que sejam concebidos para serem utilizados sem a vigilância de um médico para fins de diagnóstico, de prescrição ou de monitorização (BRASIL, 2014). A RDC – ANVISA nº 26/2014, trata das definições envolvidas nestas categorias de suplementos e estabelece os requisitos mínimos para o seu registro.

Na tentativa de resumir as principais resoluções e portarias existentes e que englobam no Brasil os alimentos descritos como suplementos, foram reunidas em ordem cronológica na Tabela 1, informações relevantes sobre cada uma destas normativas.

Tabela 1: Resumo das normas principais que tratam de alimentos aos quais se encaixam os suplementos alimentares no Brasil.

Norma	Âmbito	Definições	Exemplos
Portaria nº32/1998a	Suplementos Vitamínicos e ou Minerais	Alimentos que contemplem com estes nutrientes a dieta diária de uma pessoa saudável, onde a alimentação normal seja insuficiente ou quando a dieta requerer suplementação. Devem conter um mínimo de 25%, e no máximo até 100% da Ingestão Diária Recomendada (IDR) de vitaminas e ou minerais, na porção diária indicada pelo fabricante, não podendo substituir os alimentos, nem serem considerados como dieta exclusiva.	<ul style="list-style-type: none"> <li>– Vitaminas isoladas ou associadas entre si</li> <li>– Minerais isolados ou associados entre si</li> <li>– Associações de vitaminas com minerais</li> <li>– Produtos de fontes naturais de vitaminas e ou minerais, legalmente regulamentados por Padrão de Identidade e Qualidade (PIQ) de conformidade com a legislação pertinente.</li> </ul> Ex: polivitamínicos co IDR entre 25 e 100%.
RDC nº16/1999 <sup>1</sup>	Novos Alimentos ou Novos Ingredientes	São os alimentos ou substâncias sem histórico de consumo no País, ou alimentos com substâncias já consumidas que venham a ser adicionadas ou utilizadas em níveis muito superiores aos atualmente observados nos alimentos utilizados na dieta regular.	<ul style="list-style-type: none"> <li>– Açai em pó</li> <li>– Maca peruana</li> <li>– Goji berry</li> <li>– Chia</li> </ul>
RDC nº18/1999 <sup>2</sup>	Alimentos com Alegação de Propriedade Funcional e ou de Saúde	<p>Alegação de propriedade funcional: é aquela relativa ao papel metabólico ou fisiológico que o nutriente ou não nutriente tem no crescimento, desenvolvimento, manutenção e outras funções normais do organismo humano.</p> <p>Alegação de propriedade de saúde: é aquela que afirma, sugere ou implica a existência de relação entre o alimento ou ingrediente com doença ou condição relacionada à saúde.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>– Ácidos graxos EPA (ácido eicosapentaenoico) e DHA (ácido docosahexaenoico)</li> <li>– Carotenóides (licopeno, luteína)</li> <li>– Fibras alimentares (beta glucana em derivados de aveia, dextrina resistente, psyllium, quitosana)</li> <li>– Proteína de soja</li> </ul>
RDC nº02/2002	Substâncias Bioativas e Probióticos Isolados com Alegação de Propriedades Funcional e ou de Saúde	<p>São consideradas substâncias Bioativas e Probióticos Isolados com alegação de propriedades funcional e ou de saúde:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>– Matéria-prima: toda substância de origem vegetal ou animal, em estado bruto, que para ser utilizada como alimento precisa ser submetido a tratamento e/ou transformação de natureza física, química ou biológica.</li> <li>– Nutriente: é a substância química encontrada em alimento, que proporcione energia, e ou é necessária para o crescimento, desenvolvimento e manutenção da saúde e da vida, e ou cuja carência resulte em mudanças químicas ou fisiológicas características.</li> <li>– Probiótico: microrganismos vivos capazes de melhorar o equilíbrio microbiano intestinal produzindo efeitos benéficos à saúde do indivíduo.</li> <li>– Substância Bioativa: além dos nutrientes, os não nutrientes que possuem ação</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>– Prebióticos</li> <li>– Polifenóis</li> <li>– Probióticos</li> </ul>

		metabólica ou fisiológica específica. – Isolado(a): entende-se como a substância extraída da sua fonte original.	
RDC nº18/2010 <sup>3</sup>	Alimentos para Atletas	Aplica-se aos alimentos especialmente formulados para auxiliar os atletas a atender suas necessidades nutricionais específicas e auxiliar no desempenho do exercício. São considerados: – Suplemento hidroeletrólítico para atletas: produto destinado a auxiliar a hidratação; – Suplemento energético para atletas: produto destinado a complementar as necessidades energéticas; – Suplemento protéico para atletas: produto destinado a complementar as necessidades protéicas; – Suplemento para substituição parcial de refeições de atletas: produto destinado a complementar as refeições de atletas em situações nas quais o acesso a alimentos que compõem a alimentação habitual seja restrito; – Suplemento de creatina para atletas: produto destinado a complementar os estoques endógenos de creatina; – Suplemento de cafeína para atletas: produto destinado a aumentar a resistência aeróbia em exercícios físicos de longa duração;	– Suplemento hidroeletrólítico para atletas – Suplemento energético para atletas – Suplemento protéico para atletas – Suplemento para substituição parcial de refeições de atletas – Suplemento de creatina para atletas – Suplemento de cafeína para atletas.
RDC nº24/2011 <sup>4</sup>	Medicamentos Específicos	São considerados medicamentos específicos os produtos farmacêuticos, tecnicamente obtidos ou elaborados, com finalidade profilática, curativa ou paliativa não enquadrados nas categorias de medicamento novo, genérico, similar, biológico, fitoterápico ou notificado e cuja(s) substância(s) ativa(s), independente da natureza ou origem, não é passível de ensaio de bioequivalência, frente a um produto comparador.	– Medicamentos à base de vitaminas e/ou minerais e/ou aminoácidos e/ou proteínas isolados ou associados entre si, para uso oral, com pelo menos um dos componentes acima dos limites nutricionais estabelecidos pela IDR – Medicamentos à base de derivados vegetais associados a vitaminas e/ou minerais e/ou aminoácidos e/ou proteínas e/ou fitofármaco. Ex: Vitamina C, vitamina E.
RDC nº26/2014 <sup>5</sup>	Medicamentos Fitoterápicos e Produtos Tradicionais Fitoterápicos	São considerados medicamentos fitoterápicos os obtidos com emprego exclusivo de matérias-primas ativas vegetais cuja segurança e eficácia sejam baseadas em evidências clínicas e que sejam caracterizados pela constância de sua qualidade. São considerados produtos tradicionais fitoterápicos os obtidos com emprego exclusivo de matérias-primas ativas vegetais cuja segurança e efetividade sejam baseadas em dados de uso seguro e efetivo publicados na literatura técnico-científica e que sejam concebidos para serem utilizados sem a vigilância de um médico para fins de diagnóstico, de prescrição ou de monitorização.	Erva mate ( <i>Ilex paraguariensis</i> ) Maracujá ( <i>Passiflora incarnata L.</i> )

<sup>1,2</sup> Mais informações sobre novos ingredientes e sobre alimentos com alegação de propriedade funcional e ou saúde, podem ser encontradas em: <http://portal.anvisa.gov.br/alimentos/quadro-1> e <http://portal.anvisa.gov.br/alimentos/alegacoes>, respectivamente. Acesso em: 29 dez 2017.

<sup>3</sup> RDC nº24/2011 que revogou a RDC nº132/2003.

<sup>4</sup> Mais informações sobre alimentos para atletas encontram-se em <http://portal.anvisa.gov.br/legislacao#/visualizar/28544> Acesso em 29 dez 2017.

<sup>5</sup> Mais informações sobre medicamentos fitoterápicos e produtos naturais fitoterápicos encontram-se em [http://bvsmis.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2014/rdc0026\\_13\\_05\\_2014.pdf](http://bvsmis.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2014/rdc0026_13_05_2014.pdf) Acesso em: 02 jan 2018.

Fonte: BRASIL, ANVISA. Todas as normas referentes a alimentos tratados aqui podem ser encontradas em <http://portal.anvisa.gov.br/legislacao-por-categoria-de-produto> Acesso em: 29 dez 2017.

A grande maioria dos suplementos alimentares utilizados é passível de ser encaixada em uma destas normas para alimentos e medicamentos. De uma forma geral, suplementos que contenham cafeína, proteínas ou creatina são descritos como alimentos para atletas. Atletas por sua vez são os “praticantes de exercício físico com especialização e desempenho máximos com o objetivo de participação em esporte com esforço muscular intenso” (BRASIL, 2010). A resolução da ANVISA nº18 (2010) abrange os suplementos que além dos atletas profissionais, também são utilizados pelo público fisicamente ativo. Estes produtos podem ou não conter determinadas substâncias adicionadas à sua composição como pode ser visto na tabela a seguir (Tabela 2).

Os demais suplementos, caracterizados por composição distinta dos referidos alimentos para atletas, devem encaixar-se em uma das demais normas (Tabela 1). Adicionalmente, é importante destacar que os suplementos vitamínicos e minerais são considerados alimentos apenas quando apresentarem valores de concentração entre 25 e 100% do IDR pela ANVISA. Acima destes valores, o produto é considerado um medicamento específico (DAL MOLIN, 2016).

É facilmente perceptível o conflito gerado pela diversidade de normas, as quais repetidamente se sobrepõem em se tratando dos suplementos/alimentos. Neste sentido, um marco regulatório para unificação dos regulamentos para a ampla categoria dos suplementos alimentares, faz-se necessário. Para tanto, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária tem se organizado na formulação de materiais que melhor identifiquem e normatizem estes produtos. O documento de base sobre a regulamentação dos suplementos alimentares publicado em julho de 2017 (BRASIL, 2017), traz uma nova proposta que pretende reunir numa única categoria de suplementos, aqueles produtos que hoje são entendidos como alimentos e medicamentos. Esta abordagem facilitaria o preenchimento de lacunas regulatórias e uniformizaria critérios sanitários para alimentos.

Uma vez que os suplementos estão em constante inovação científica, a intenção é que a regulamentação seja periodicamente atualizada e revisada, visto que a demanda para estes produtos exige frequentes modificações em sua composição, anexos ou listas vinculadas. Este tipo de abordagem facilitaria para que os requisitos de composição e rotulagem dos suplementos fossem atualizados constantemente com base em evidências científicas. Adicionalmente, este novo enfoque, possibilitaria a inclusão de novos constituintes ou alegações, bem como alterações nos limites estabelecidos.



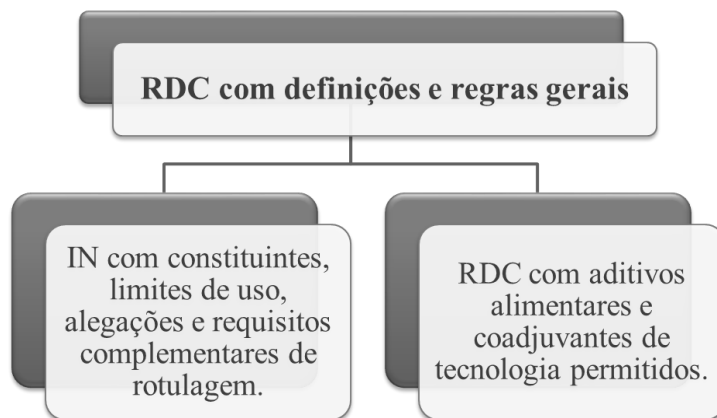
Tabela 2: Definições da RDC nº 18/2010 sobre aditivos aos alimentos para atletas.

<b>Produto alimentício</b>	<b>Definição de uso</b>	<b>Adição permitida</b>	<b>Adição proibida</b>
Suplemento hidroeletrólítico	Produto destinado a auxiliar a hidratação	Carboidratos (até 8% m/v) Vitaminas e minerais Potássio (até 700 mg/L)	Nutrientes Não nutrientes Fibras alimentares
Suplemento energético	Produto destinado a complementar as necessidades energéticas	Vitaminas e minerais Proteínas e lipídios	Fibras alimentares Não nutrientes
Suplemento protéico	Produto destinado a complementar as necessidades protéicas	Vitaminas e minerais	Fibras alimentares Não nutrientes
Suplemento para substituição parcial de refeições	Produto destinado a complementar as refeições de atletas em situações nas quais o acesso a alimentos que compõem a alimentação habitual seja restrito	Vitaminas e minerais Fibras alimentares	–
Suplemento de creatina	Produto destinado a complementar os estoques endógenos de creatina	Carboidratos	Fibras alimentares
Suplemento de cafeína	Produto destinado a aumentar a resistência aeróbia em exercícios físicos de longa duração	–	Nutrientes Não nutrientes

Fonte: BRASIL, 2010.

A estrutura proposta ficaria da seguinte forma (onde IN, Instrução Normativa):

Figura 1: Estrutura proposta para a legislação que contemplaria os suplementos alimentares.



Fonte: Adaptado de BRASIL, 2017.

Estas alterações por sua vez, revogariam 11 atos normativos da Secretaria de Vigilância Sanitária – Ministério da Saúde (SVS/MS) que estão listados abaixo:

- Portaria SVS/MS nº 32, de 13/01/1998, que trata dos suplementos vitamínicos ou minerais.

---

- Portaria SVS/MS nº 40, de 13/01/1998, que dispõe sobre os medicamentos à base de vitaminas ou minerais.

---

- Portaria SVS/MS nº 222, de 24 /03/1998, que trata dos alimentos para praticantes de atividade física.

---

- Portaria SVS/MS nº 223, de 24/03/1998, referente aos complementos alimentares para gestantes ou nutrízes.

---

- RDC nº 2, de 7/01/2002, que dispõe sobre as substâncias bioativas e probióticos.

---

- RDC nº 18, de 27/03/2010, relativo aos alimentos para atletas.

---

- RDC nº 24, de 15 /02/2005, dispõe sobre aditivos e coadjuvantes para suplementos vitamínicos ou minerais.

---

- RDC nº 69, de 22 /10/2007, que aprova o uso de aditivos para suplementos contendo substâncias bioativas.

---

- RDC nº 7, de 20 /02/2008, que dispõe sobre aditivos para suplementos vitamínicos ou minerais.

---

- RDC nº 57, de 4/11/2011, que aprova o uso de aditivo para suplementos vitamínicos ou minerais.

---

- RDC nº 55, de 07/10/2014, que aprova o uso de aditivo para suplementos vitamínicos ou minerais.

---

Além disso, seria necessário alterar os atos normativos referentes ao registro de alimentos, alimentos para fins especiais, novos alimentos e medicamentos específicos, para adequação à nova estrutura proposta. Os atos mencionados são os seguintes:

- RDC nº 27, de 6/08/2010, que dispõe sobre as categorias de alimentos e embalagens isentos e com obrigatoriedade.

---

- Portaria SVS/MS nº 29, de 13/01/1998, que trata dos alimentos para fins especiais.

---

- RDC nº 16, de 30/04/1999, referente aos novos alimentos e novos ingredientes.

---

- Portaria SVS/MS nº 223, de 24 /03/1998, referente aos complementos alimentares para gestantes ou nutrízes.

---

Entre os itens que estão abordados nesta proposta, podem-se encontrar os requisitos de composição dos suplementos, uma lista dos constituintes autorizados (com base em evidências científicas), especificações de referência (como farmacopeias reconhecidas oficialmente, *Codex Alimentarius*), limites mínimos e máximos dos constituintes, critérios de sobredosagem e estabilidade, lista de aditivos e coadjuvantes além das restrições de uso e advertências, bem como os requisitos obrigatórios e as restrições na rotulagem. É possível perceber que essa nova abordagem regulatória dos suplementos alimentares modernizaria e simplificaria os procedimentos para regularização destes produtos. Mais informações sobre esta proposta podem ser encontradas no arquivo disponibilizado online pela ANVISA em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/219201/3322895/Documento+de+base+sobre+regulame+nta%C3%A7%C3%A3o+de+suplementos+alimentares> Acesso em: 04/01/2018.

### 3.3 O CONSUMO DE SUPLEMENTOS E OS CASOS DE ADULTERAÇÃO

Nas últimas décadas o mercado de suplementos alimentares foi impulsionado fortemente ao redor do mundo. Talvez pelo advento da comunicação, muitas pessoas passaram a se preocupar em mudar o estilo de vida, passando do sedentarismo ao dinamismo associado à prática de atividades físicas. Os principais objetivos no uso de suplementos, cujo nome já os descreve, são preencher brechas de nutrientes alimentares, promover a saúde e o bem estar geral, bem como melhorar o bem estar da mente e do corpo com o uso de suplementos para perda de peso, ganho de massa muscular, saúde digestiva e gastrointestinal,

foco mental e concentração e ainda estimulantes sexuais (BROWN, 2016). Segundo Attlee e colaboradores (2017), as razões para o uso de suplementos vão desde o desejo de diminuir a susceptibilidade ao desenvolvimento de doenças até a melhora na saúde pessoal por suprimir as necessidades nutricionais necessárias.

A cultura dos suplementos foi iniciada pelo uso de plantas com fins terapêuticos. Numerosas drogas que surgiram inicialmente na década de 1800, não existiriam se as pessoas não reconhecessem a eficácia de determinadas plantas contendo substâncias ativas. Grande parte dos fármacos contemporâneos é derivada de plantas, com os mais diversos princípios de ação terapêutica. Desta forma, o interesse por suplementos originados de plantas é tão intenso que este mercado desenvolve-se a cada dia. Uma vez que muitas pessoas acreditam que determinadas substâncias sintéticas, como hormônios e estimulantes possam oferecer riscos a saúde, estes suplementos “naturais” tornam-se bastante atrativos (PETROCZI; TAYLOR; NAUGHTON, 2011). Pesquisas realizadas por Harrison (2004) e colaboradores, revelaram que a idade média dos usuários de suplementos de origem vegetal na Inglaterra, foi de 49,8 anos onde 45,2% (6.986 / 15.465) eram homens. A porcentagem de consumo de pelo menos um suplemento de ervas foi de 12,8% (1.987 / 15.465). Os usuários de suplementos provenientes de plantas eram mais propensos a ser mais jovens, do sexo feminino, cor branca e já possuir sua casa própria. O uso destes produtos não foi fortemente associado a variáveis de saúde e estilo de vida examinadas. Algumas associações foram encontradas com atividade física, problemas psiquiátricos e uso de medicamentos prescritos.

Para os frequentadores de academias, o uso de suplementos é diferenciado. Grande parte destes “atletas” acredita que a alimentação normal não é suficiente para atingir tais objetivos ou, entretanto, os buscam com rapidez em demasia. A indústria de suplementos alimentares consciente disso, converge com grande influência publicitária para estes espaços (ATTLEE, et al. 2017). Nestes espaços em que os praticantes de alguma atividade funcional buscam construir através da disciplina, seus corpos e mentes, em sua forma mais equilibrada, muitos produtos são disponibilizados facilmente para comercialização. Pesquisas realizadas na comunidade universitária dos Emirados Árabes Unidos mostrou que quase metade dos frequentadores de academias, na faixa etária de 18 a 24 anos, fazia uso de pelo menos um tipo de suplemento alimentar. Neste ambiente, indivíduos do sexo masculino foram mais propensos a utilizar produtos para suplementação (47,7% vs. 28,1%). Para os praticantes de musculação, em relação aos que buscavam perda de peso, 88,6% faziam uso de suplementos, enquanto entre os outros, apenas 11,4% relatou o uso de produtos. Ademais, destacou-se o

consumo de suplementos do tipo *whey protein* (48,6 %) e *protein powder* (45,7%), seguidos de multivitamínicos (ATTLEE, et al. 2017).

No Brasil, um dos países de maior mercado de academias de ginástica na América latina e em academias no mundo, conta com um público mais de 2 milhões de frequentadores. O aumento na utilização dos suplementos por este público abre cada vez mais o caminho para a utilização indevida, podendo acarretar riscos para o consumidor, como desequilíbrio na dieta, antagonismo e até toxidez em alguns casos. Os suplementos mais atrativos, chamados de ergogênicos, chamam atenção pela promessa de efeitos esteticamente imediatos e ainda pelo estímulo promovido por alguns profissionais de educação física, no intuito de melhorar os resultados do seu aluno. O termo ergogênico utilizado pela medicina do esporte abrange todo e qualquer mecanismo que seja capaz de melhorar a performance de um indivíduo como: o efeito fisiológico obtido através do treinamento físico; o nutricional através dos alimentos e os suplementos nutricionais e farmacológicos com destaque os anabolizantes (FERREIRA et al. 2008).

De uma forma geral, a associação de uma legislação não satisfatória em se tratando de suplementos alimentares, junto à facilidade com que são produzidos e comercializados devido ao grande marketing envolvido os torna mais suscetíveis a casos de adulteração. Ademais, a dificuldade de fiscalização pode proporcionar casos de contaminação, pela falta de controle de qualidade e boas práticas de fabricação. Os efeitos indesejados mais observados decorrentes do uso de suplementos à base de plantas medicinais incluem reações alérgicas, hepatotoxicidade, nefrotoxicidade, cardiotoxicidade, citotoxicidade e genotoxicidade (MOREIRA, 2016). Surgem assim, diversos trabalhos buscando alertar sobre a presença de compostos orgânicos e inorgânicos nocivos a saúde nestes produtos. Inúmeros trabalhos na literatura científica já relataram a presença de algumas classes de fármacos não declarados no rótulo do produto.

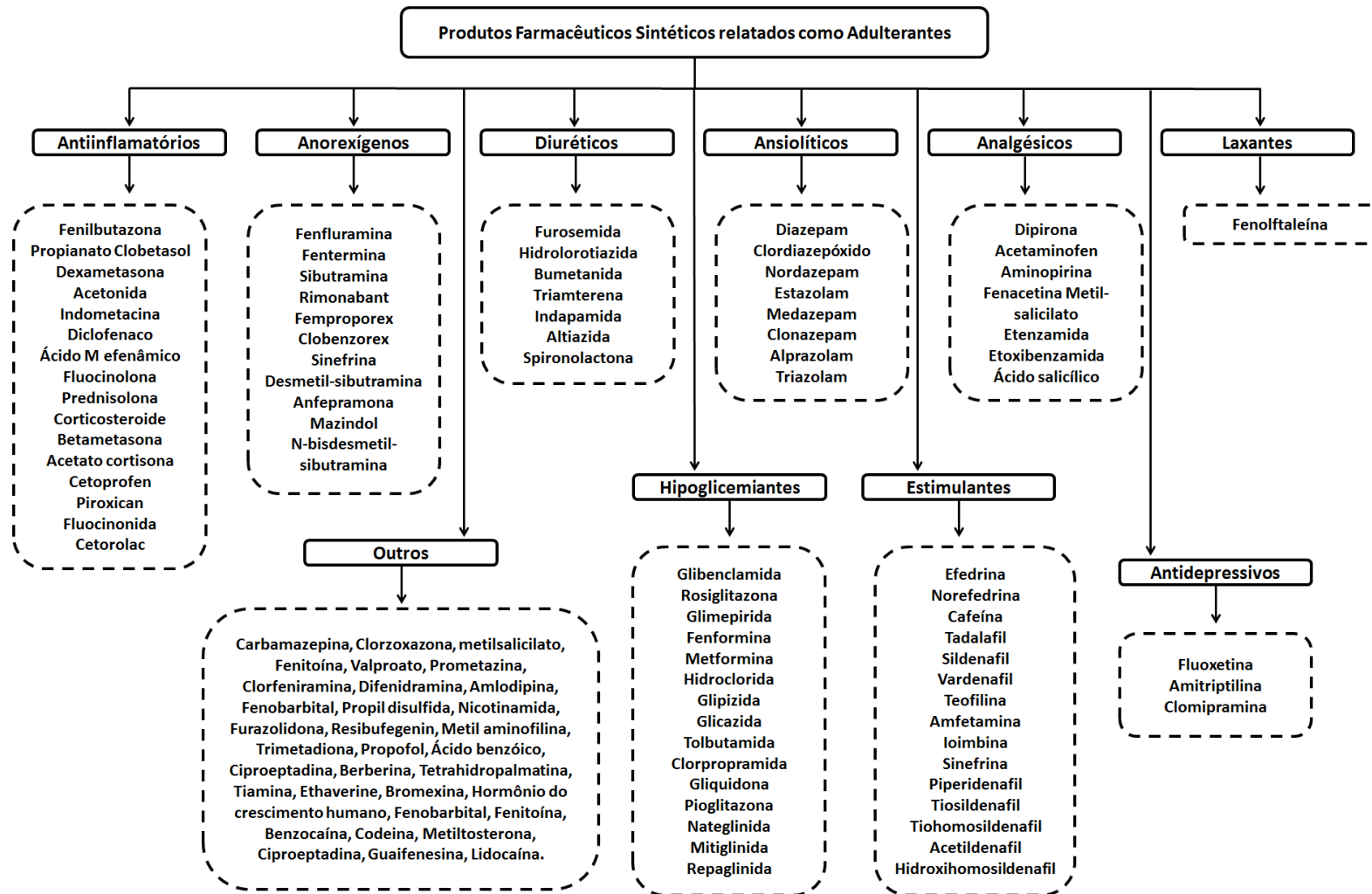
Jiang e coautores desenvolveram método para a determinação de 14 compostos, incluindo barbitúricos e benzodiazepínicos, utilizando UHPLC (do inglês, *Ultra High Performance Liquid Chromatography*). O método foi aplicado em suplementos alimentares de origem chinesa. Foram encontrados em três compostos sedativo-hipnóticos (alprazolam, diazepam e clonazepam) com dosagens na faixa de 8 a 24 mg g<sup>-1</sup>, adicionados de forma ilegal em cápsulas e comprimidos (JIANG et al. 2015). Ainda nesta linha, foi realizado o estudo de 28 narcóticos em amostras de 47 suplementos alimentares coreanos, nas formas de pós, cápsulas, comprimidos, líquidos, doces e biscoitos (CHOI et al. 2015).

Dentre as classes de compostos farmacêuticos já estudados em suplementos alimentares, há relatos na literatura científica de alguns trabalhos demonstrando a presença de estimulantes sexuais e para aumento da libido. Toomey e colaboradores em 2012, por exemplo, perceberam a presença de análogos ao taladafil em amostras de suplementos alimentares. Este composto foi detectado em amostras de produtos dietéticos e também em formulações herbáceas (TOOMEY; LITZAU; FLURER, 2012).

A adulteração de suplementos é continuamente dita como fraudulenta, uma vez que consiste em torná-lo impuro, divergente da composição indicada no rótulo do mesmo. Na maioria das vezes, produtos de menor valor substituem o composto principal. Por outro lado, a adição de fármacos sintéticos promove o suplemento por intensificar o efeito indicado. Ademais, a adulteração não se restringe a adição de uma substância isolada. Suplementos com a presença não declarada de mais de um fármaco sintético já foram relatados. Algumas vezes essa associação tem por objetivo potencializar sinergicamente os efeitos atribuídos ao produto. Contudo, em alguns casos, tais associações parecem não fazer sentido devido a natureza dos fármacos encontrados (CARVALHO et al. 2011)

Com base nos casos descritos encontrado na literatura é possível observar um leque de possibilidades para adulteração de suplementos alimentares e produtos naturais. A associação de fármacos prescritos com os possivelmente adicionados a estes produtos pode causar um série de efeitos ao consumidor. Com base nisso, é possível ver no esquema a seguir (Figura 2), adaptado de Carvalho e coautores (2011) uma lista com alguns dos principais fármacos já encontrados como adulterantes, de acordo com sua classe farmacológica.

Figura 2: Principais fármacos já encontrados como adulterantes classificados de acordo com sua classe farmacológica.



Fonte: CARVALHO, et al. 2011.

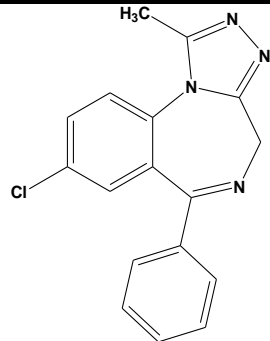
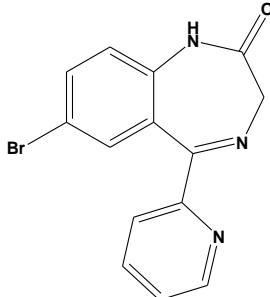
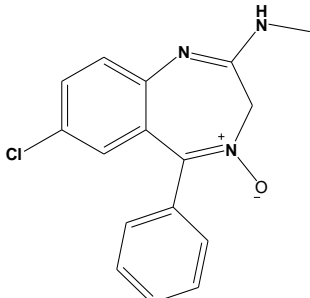
### 3.4 FÁRMACOS DE INTERESSE ANALÍTICO

A incidência de casos de adulteração é evidenciada a cada momento pelo crescimento de trabalhos com diferentes abordagens nesta área da ciência. Este problema prevalente em todo o mundo, já levou muitas pessoas a óbito (NEVES, 2016). Segundo Rocha, e colaboradores (2016), a adulteração de suplementos herbais e dietéticos com apelo emagrecedor, esta associada com fármacos prevalentemente da classe dos anorexígenos, especialmente a sibutramina, além de estimulantes, diuréticos, laxantes, ansiolíticos e antidepressivos. Em suplementos para melhora do desempenho atlético, os esteroides anabólicos androgênicos (EAA), popularmente conhecidos como anabolizantes, foram o grupo de adulterantes mais frequente, além dos estimulantes e anoréticos. Para suplementos comercializados com apelo no desempenho sexual, a incidência de adulteração foi atribuída a presença de fármacos como tadalafil e sildenafil, conhecidos medicamentos para tratamento de disfunções erécteis. Para análogos destes fármacos, como sulfosildenafil, dimetilsildenafil aminotadalafil estudos suficientes ainda não existem para comprovação de sua eficácia ou toxicidade (ROCHA, et al. 2016).

Tendo esse contexto em mente, algumas classes de fármacos se tornam mais interessantes do ponto de vista de aplicação analítico metodológico. Estão reunidas a seguir, as principais características referentes aos fármacos abrangidos por este trabalho.



Tabela 3: Representação da estrutura química molecular de cada fármaco com seus respectivos mecanismos de ação e efeitos adversos.

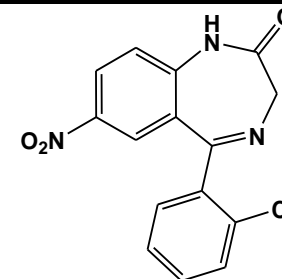
Fármaco	Mecanismo de Ação	Efeitos Adversos	Estrutura Química
Alprazolam (ansiolítico)	Os BZD, aumentam o fluxo do cloreto mediado por GABA através dos canais do receptor GABA, causando a hiperpolarização da membrana. Os efeitos neuroinibitórios resultam nas propriedades sedativas, hipnóticas, ansiolíticas e relaxantes musculares observadas.	Coordenação prejudicada, sonolência e tempo de reação retardado. Os sintomas de overdose incluem confusão, coma. LD50 (ratos) = 1020 mg/kg	
Bromazepam (ansiolítico)	Os BZD, aumentam o fluxo do cloreto mediado por GABA através dos canais do receptor GABA, causando a hiperpolarização da membrana. Os efeitos neuroinibitórios resultam nas propriedades sedativas, hipnóticas, ansiolíticas e relaxantes musculares observadas.	Fadiga, sonolência, redução da força muscular, embotamento emocional, redução da atenção, confusão mental, cefaleia, tontura, ataxia ou diplopia.	
Clordiazepóxido (ansiolítico)	Os BZD, aumentam o fluxo do cloreto mediado por GABA através dos canais do receptor GABA, causando a hiperpolarização da membrana. Os efeitos neuroinibitórios resultam nas propriedades sedativas, hipnóticas, ansiolíticas e relaxantes musculares observadas.	Sinais de overdose incluem depressão respiratória, fraqueza muscular, sonolência (atividade deprimida em geral). LD50 (ratos) = 537 mg/kg	

Clonazepam  
(ansiolítico)

Os BZD, aumentam o fluxo do cloreto mediado por GABA através dos canais do receptor GABA, causando a hiperpolarização da membrana. Os efeitos neuroinibitórios resultam nas propriedades sedativas, hipnóticas, ansiolíticas e relaxantes musculares observadas.

Sonolência, confusão, coma e reflexos diminuídos. O evento adverso mais comumente relatado quando o clonazepam é usado para transtornos convulsivos é a depressão do SNC.

LD50 (ratos) = > 15000 mg/kg

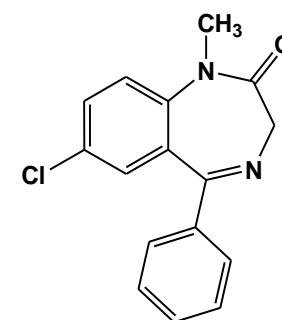


Diazepam  
(ansiolítico)

Os BZD, aumentam o fluxo do cloreto mediado por GABA através dos canais do receptor GABA, causando a hiperpolarização da membrana. Os efeitos neuroinibitórios resultam nas propriedades sedativas, hipnóticas, ansiolíticas e relaxantes musculares observadas.

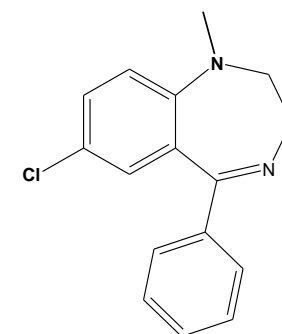
Os sintomas de overdose incluem sonolência, confusão, coma e reflexos diminuídos.

Alterações na respiração e fluxo sanguíneo.



Medazepam  
(ansiolítico)

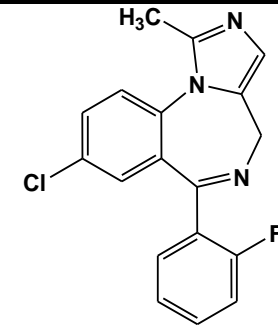
Os BZD, aumentam o fluxo do cloreto mediado por GABA através dos canais do receptor GABA, causando a hiperpolarização da membrana. Os efeitos neuroinibitórios resultam nas propriedades sedativas, hipnóticas, ansiolíticas e relaxantes musculares observadas.



Midazolam  
(ansiolítico)

Os BZD, aumentam o fluxo do cloreto mediado por GABA através dos canais do receptor GABA, causando a hiperpolarização da membrana. Os efeitos neuroinibitórios resultam nas propriedades sedativas, hipnóticas, ansiolíticas e relaxantes musculares observadas.

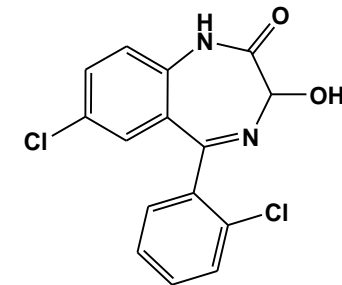
Os sinais de overdose incluem sedação, sonolência, confusão, comprometimento da coordenação, reflexos diminuídos, coma e efeitos deletérios sobre os sinais vitais. LD50 (ratos) = 825 mg/kg



Lorazepam  
(ansiolítico)

Os BZD, aumentam o fluxo do cloreto mediado por GABA através dos canais do receptor GABA, causando a hiperpolarização da membrana. Os efeitos neuroinibitórios resultam nas propriedades sedativas, hipnóticas, ansiolíticas e relaxantes musculares observadas.

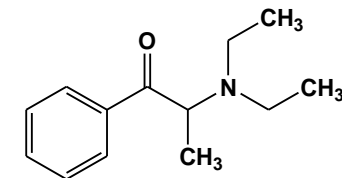
O evento adverso clínico mais importante causado pelo lorazepam é a depressão respiratória. LD50 (ratos) = 1850 mg/kg



Anfepramona  
(anorexígeno)

Age na liberação da dopamina nos terminais pré sinápticos.

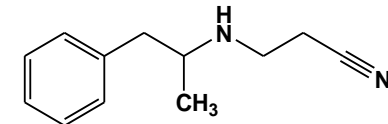
Sobredosagem aguda pode causar hipertensão pulmonar, agitação, tremor, respiração rápida, confusão, alucinações e estados de pânico.



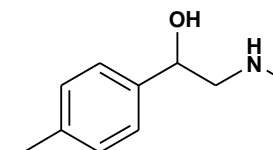
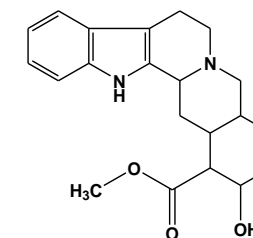
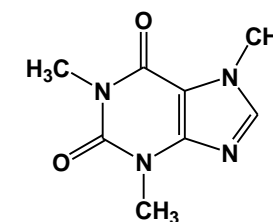
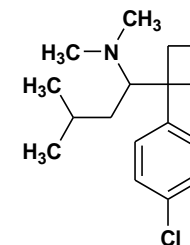
Femproporex  
(anorexígeno)

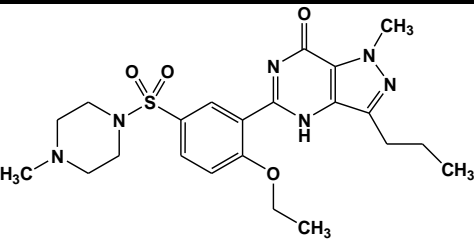
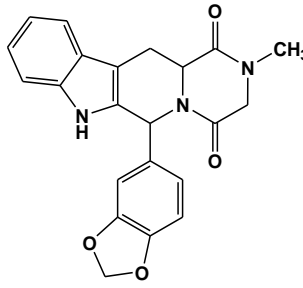
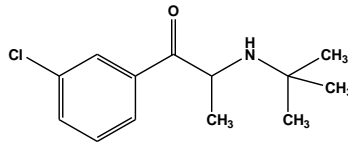
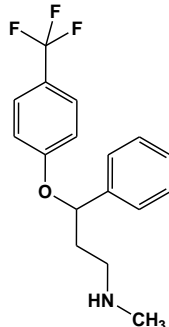
Recaptação da norepinefrina (NE), serotonina (5-hidroxitriptamina, 5-HT) e, em menor grau, recaptação da dopamina na sinapse neuronal. Ao inibir a recaptação desses neurotransmissores, promove sensação de saciedade e diminuição do apetite, reduzindo assim a ingestão de alimentos.

Vertigem, tremor, irritabilidade, reflexos hiperativos, fraqueza, tensão, insônia, confusão, ansiedade e dor de cabeça. Calafrios, palidez ou rubor das faces, palpitação, arritmia cardíaca, dor anginal, hipertensão ou hipotensão e colapso circulatório. Alteração da libido, dependência psíquica e tolerância.



Sibutramina (anorexígeno)	Recaptação da norepinefrina (NE), serotonina (5-hidroxitriptamina, 5-HT) e, em menor grau, recaptação da dopamina na sinapse neuronal. Ao inibir a recaptação desses neurotransmissores, a sibutramina promove sensação de saciedade e diminuição do apetite, reduzindo assim a ingestão de alimentos.	Boca seca, anorexia, insônia, constipação e dor de cabeça.
Cafeína (estimulante)	A cafeína estimula centros medulares, vasomotores e respiratórios, promovendo bradicardia, vasoconstrição e aumento da frequência respiratória. A cafeína atua como antagonistas em receptores de adenosina dentro da membrana plasmática de praticamente todas as células.	Overdose de cafeína pode resultar em dor gastrointestinal, vômito, diurese, ansiedade, agitação, nervosismo, insônia, excitação, agitação, tensão muscular, confusão, convulsão. Sintomas cardíacos, incluindo taquicardia e arritmia.
Ioimbina (estimulante)	Agente de bloqueio alfa 2-adrenérgico pré-sináptico. O mecanismo exato para a sua utilização na impotência não foi completamente elucidado.	Aumento da pressão arterial, aumento dos batimentos cardíacos, irritabilidade, vertigens, náuseas, vômitos, dores de cabeça, transpiração excessiva, urticária, vermelhidão na pele ou tremores.
Sinefrina (estimulante)	Ativação de receptores $\beta_3$ -adrenérgico. Age sobre o sistema nervoso central e cardiovascular através da estimulação adrenérgica central.	Dor no peito, ansiedade, aumento da pressão arterial, aumento da frequência cardíaca.

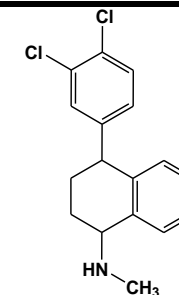


Sildenafil (estimulante)	Inibidor da fosfodiesterase tipo 5 (PDE5), aumentando o fluxo de sangue no corpo cavernoso do pênis.	Urticária na pele, dor de cabeça, tonturas, vômitos, sensibilidade aumentada à luz, palpitações, aumento dos batimentos cardíacos, ereção prolongada, vermelhidão nos olhos ou no rosto.	
Tadalafil (estimulante)	Inibidor da fosfodiesterase tipo 5 (PDE5), aumentando o fluxo de sangue no corpo cavernoso do pênis.	Reações de hipersensibilidade, incluindo erupção cutânea, eventos cardiovasculares graves, incluindo infarto do miocárdio, morte súbita cardíaca, acidente vascular cerebral, dor no peito, palpitações e taquicardia, priapismo, ereção prolongada, enxaqueca.	
Bupropiona (antidepressivo)	Inibe seletivamente a recaptação neuronal de dopamina, norepinefrina e serotonina.	Os sintomas de sobredosagem incluem convulsões, alucinações, perda de consciência, taquicardia e parada cardíaca.	
Fluoxetina (antidepressivo)	Inibe seletivamente a recaptação da serotonina na membrana pré-sináptica. Isso resulta em uma maior concentração sináptica de serotonina no SNC, o que leva a numerosas alterações funcionais associadas à neurotransmissão serotoninérgica melhorada.	Náusea, vômito, convulsões, disfunção cardiovascular (variando desde arritmias assintomáticas até parada cardíaca), disfunção pulmonar e sinais de alteração do sistema nervoso central (variando de excitação ao coma).	

Sertralina  
(antidepressivo)

Inibe seletivamente a recaptação da serotonina na membrana pré-sináptica. Isso resulta em uma maior concentração sináptica de serotonina no SNC, o que leva a numerosas alterações funcionais associadas à neurotransmissão serotoninérgica melhorada.

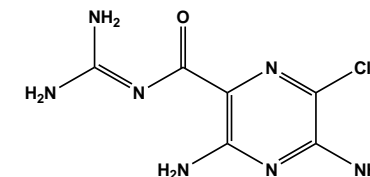
Irregularidades menstruais, ginecomastia, hirsutismo, diminuição da libido.



Amilorida  
(diurético)

Atua no rim, aumentando o volume e diminuindo a concentração da urina. Sua principal função é a conservação do potássio.

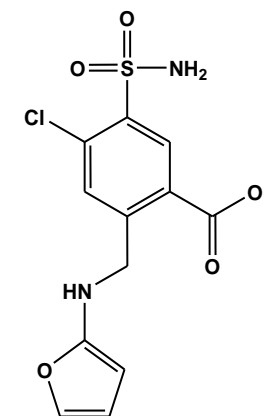
Alteração do ritmo cardíaco, aumento da pressão intraocular, aumento do potássio no sangue.



Furosemida  
(diurético)

Bloqueia o sistema cotransportador de Na<sup>+</sup>+K<sup>+</sup>+2Cl<sup>-</sup>. A ação diurética resulta da inibição da reabsorção de cloreto de sódio neste segmento da alça de Henle.

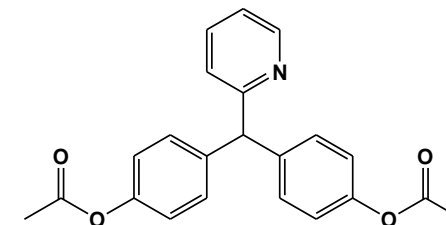
Hipotensão severa (progredindo para choque), trombose, estado de delírio, paralisia flácida, náuseas, surdez, apatia e confusão.



Bisacodil  
(laxante)

Como laxante de contato, o bisacodil estimula o peristaltismo do cólon após hidrólise na mucosa do intestino grosso, promove acúmulo de água, e consequentemente de eletrólitos no lúmen colônico.

Diarreia crônica, dor abdominal, hipopotassemia, hiperaldosteronismo secundário e cálculo renal.



## Fontes:

<https://www.drugbank.ca/> Acesso em 26 jan 2018

[http://www.anvisa.gov.br/datavisa/fila\\_bula/frmVisualizarBula.asp?pNuTransacao=12483482016&pIdAnexo=3098546](http://www.anvisa.gov.br/datavisa/fila_bula/frmVisualizarBula.asp?pNuTransacao=12483482016&pIdAnexo=3098546) Acesso em 26 jan 2018

[http://www.anvisa.gov.br/datavisa/fila\\_bula/frmVisualizarBula.asp?pNuTransacao=4865492015&pIdAnexo=2659143](http://www.anvisa.gov.br/datavisa/fila_bula/frmVisualizarBula.asp?pNuTransacao=4865492015&pIdAnexo=2659143) Acesso em 26 jan 2018

[http://www.anvisa.gov.br/datavisa/fila\\_bula/frmVisualizarBula.asp?pNuTransacao=18022752016&pIdAnexo=3512998](http://www.anvisa.gov.br/datavisa/fila_bula/frmVisualizarBula.asp?pNuTransacao=18022752016&pIdAnexo=3512998) Acesso em 26 jan 2018

[http://www.anvisa.gov.br/datavisa/fila\\_bula/frmVisualizarBula.asp?pNuTransacao=5588702013&pIdAnexo=1691862](http://www.anvisa.gov.br/datavisa/fila_bula/frmVisualizarBula.asp?pNuTransacao=5588702013&pIdAnexo=1691862) Acesso em 26 jan 2018

[http://www.anvisa.gov.br/datavisa/fila\\_bula/frmVisualizarBula.asp?pNuTransacao=22940612016&pIdAnexo=3894214](http://www.anvisa.gov.br/datavisa/fila_bula/frmVisualizarBula.asp?pNuTransacao=22940612016&pIdAnexo=3894214) Acesso em 26 jan 2018

[http://www.anvisa.gov.br/datavisa/fila\\_bula/frmVisualizarBula.asp?pNuTransacao=23840382016&pIdAnexo=3950402](http://www.anvisa.gov.br/datavisa/fila_bula/frmVisualizarBula.asp?pNuTransacao=23840382016&pIdAnexo=3950402) Acesso em 26 jan 2018

[http://www.anvisa.gov.br/datavisa/fila\\_bula/frmVisualizarBula.asp?pNuTransacao=2827462013&pIdAnexo=1567840](http://www.anvisa.gov.br/datavisa/fila_bula/frmVisualizarBula.asp?pNuTransacao=2827462013&pIdAnexo=1567840) Acesso em 26 jan 2018

[http://www.anvisa.gov.br/datavisa/fila\\_bula/frmVisualizarBula.asp?pNuTransacao=13821172016&pIdAnexo=3165406](http://www.anvisa.gov.br/datavisa/fila_bula/frmVisualizarBula.asp?pNuTransacao=13821172016&pIdAnexo=3165406) Acesso em 26 jan 2018

[http://www.anvisa.gov.br/hotsite/anorexigenos/pdf/nota\\_tecnica\\_anorexigenos.pdf](http://www.anvisa.gov.br/hotsite/anorexigenos/pdf/nota_tecnica_anorexigenos.pdf) Acesso em 26 jan 2018

### 3.5 MÉTODOS ANALÍTICOS APLICADOS NO ESTUDO DA ADULTERAÇÃO DE SUPLEMENTOS ALIMENTARES

Com o relato científico a respeito do crescimento exponencial no uso dos suplementos alimentares ao redor do mundo, é clara a necessidade no desenvolvimento de metodologias capazes de detectar e quantificar um número elevado de diferentes compostos como adulterantes, preferencialmente, em uma única varredura. A grande maioria dos métodos existentes para este fim emprega a cromatografia como método de separação associado a detectores conhecidos como universais que sejam seletivos e sensíveis às substâncias desejadas como os de raio ultravioleta (UV), os detectores de arranjo de diodo (DAD) e os detectores de condutividade (DC). Métodos de separação por eletroforese também tem se destacado neste ramo de pesquisa (CARVALHO; et al. 2011).

A estratégia no desenvolvimento de metodologias inicialmente deve levar em consideração que determinados tipos de adulterantes são mais susceptíveis de estarem presentes de acordo com o tipo de suplemento. Em seguida, uma análise sistemática deverá ser realizada a respeito dos possíveis interferentes, onde após escolhida a classe de interesse, qualquer outro composto que porventura seja adicionado ao suplemento será considerado um interferente. Este tipo de avaliação assegura a seletividade e aplicabilidade do método para amostras reais (CARVALHO et al. 2011).

A Tabela 4 mostra um levantamento dos principais métodos analíticos disponíveis na literatura para a determinação de fármacos na condição de adulterantes em amostras de suplementos alimentares emagrecedores.



Tabela 4: Métodos analíticos para determinação de fármacos em suplementos alimentares.

<b>Adulterantes</b>	<b>Produto</b>	<b>Método de Detecção</b>	<b>Referência</b>
Furosemida, fluoxetina, fenfluramina, mazindol, anfepramona, femproporex, benzocaína. Bromazepam, cafeína, clordiazepóxido, diazepam, flurazepam, midazolam, nitrazepam	Fitoterápicos	CCD-UV CCD-Reveladores químicos	AZEREDO et al. 2005.
Anfepramona, diazepam e femproporex	Cápsulas naturais	HPLC-UV	ALMEIDA; RIBEIRO; POLESE, 2000.
266 fármacos (ansiolíticos, diuréticos, antidepressivos, entre outros).	Medicina Tradicional Chinesa	HPLC-DAD GC-MS	LIU et al. 2001
Fenfluramina, fenolfaleína, Desmetil-sibutramina, didesmetilsibutramina, sibutramina e orlistat	Suplemento a base de plantas medicinais	LC-MS	WANG; CHEN; YAO, 2008.
Rimonabant e sibutramina	Formulações a base de plantas medicinais	HPLC-DAD	KANAN et al. 2009
Bumetanida, clopamida, furosemida, hidroclorotiazida e sibutramina	Suplemento alimentar e produto a base de plantas medicinais	HPLC-UV	WANG et al. 2009.
Efedrina, norpseudofedrina, fenfluramina, sibutramina, clopamida, emodin, reína, crisofanol	Suplementos funcionais emagrecedores	HPLC-MS/MS	SHI et al. 2011.
34 fármacos emagrecedores	Preparações emagrecedoras	HPLC-DAD	REBIERE et al. 2012
Clobenzorex, anfepramona, fenfluramina, metanfetamina, fenilpropanolamina e fentermina	Medicina Tradicional Chinesa	HPCE-UV	KU et al. 1999
Efedrina, norefedrina, cefeína e furosemida.	Suplemento alimentar e Produtos à base de plantas	CE-DAD	CIANCHINO et al. 2008
Anfepramona, bupropiona, femproporex, fluoxetina, flurazepam, paroxetina, sertralina e sibutramina	Fitoterápicos	CZE-C4D	CARVALHO et al. 2010 (a)

---

Sibutramina	Ervas medicinais	Espectroscopia IV	FENG et al. 2007
Anfepramona e benzodiazepínicos	Fitoterápicos	Voltametria de Redissolução	CARVALHO et al. 2010 (b)

---

C4D – Detecção por condutividade sem contato

CCD – Cromatografia em camada delgada

CE – Eletroforese capilar

CZE – Eletroforese capilar de zona

DAD – Detecção por arraste de diodo

GC – Cromatografia gasosa

HPCE – Eletroforese capilar de alta performance

HPLC – Cromatografia líquida de alta eficiência

IV – Infravermelho

LC – Cromatografia líquida

MS – Massas

MS/MS – Massas tandem

UV- Ultravioleta

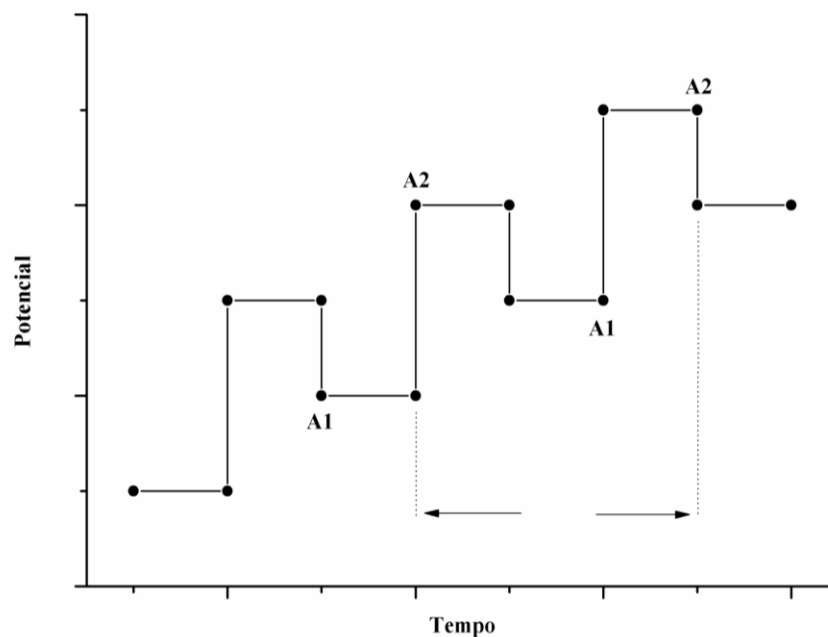
Fonte: MOREIRA, 2016.

### 3.5.1 Voltametria em meio não-aquoso e Voltametria Cíclica

Dentre os métodos eletroanalíticos, a voltametria é bastante utilizada na determinação de espécies elementares inorgânicas e compostos orgânicos com boa seletividade e rapidez em análise de traços. Consiste em uma técnica de análise eletroquímica desenvolvida por Heyrovsky e Kuceras em 1922, que utilizaram um eletrodo gotejante de mercúrio como eletrodo de trabalho e como eletrodo de referência um eletrodo de calomelano saturado. Assim, a primeira técnica voltamétrica desenvolvida foi a polarografia. Resumidamente, a voltametria é um conjunto de técnicas onde, durante um processo eletroquímico, se observa uma relação entre corrente ( $i$ ) que é medida e potencial ( $E$ ) que é aplicado (HARRIS, 2012).

Neste trabalho os voltamogramas foram obtidos pelo método de pulso e pelo método de ciclos. Na amostragem pulsada, uma rampa de potenciais é aplicada no eletrodo. Duas amostragens de sinal são feitas, a primeira no início e a segunda no final do pulso. A diferença entre elas ( $I = A2 - A1$ , Figura 3) é então registrada, evitando a interferência da corrente capacitiva em relação à corrente faradaica de interesse e, portanto, aumentando a sensibilidade da técnica (ALEIXO, 2003).

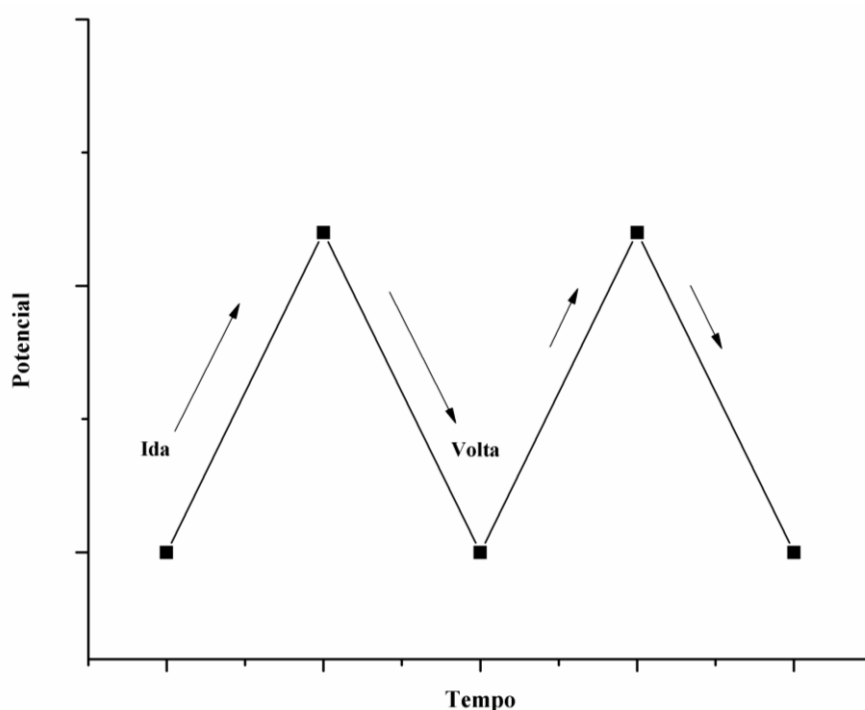
Figura 3: Esquema ilustrativo de amostragem de corrente em voltametria de pulso diferencial.



Fonte: Autora.

A análise por voltametria cíclica é um pouco diferente. Nesta técnica realiza-se a varredura de potencial direta e inversa de forma linear em vários ciclos sucessivos observando-se os picos catódicos e anódicos da espécie eletroativa. Por exemplo, um metal na forma de um íon complexo produzirão picos catódicos e anódicos que crescerão a cada varredura se houver adsorção. O aumento do pico ocorrerá até evidentemente saturar-se a superfície do eletrodo. O crescimento dos picos ocorrerá aproximadamente no mesmo potencial se o sistema for reversível.

Figura 4: Esquema ilustrativo da aplicação de potencial na varredura por voltametria cíclica.



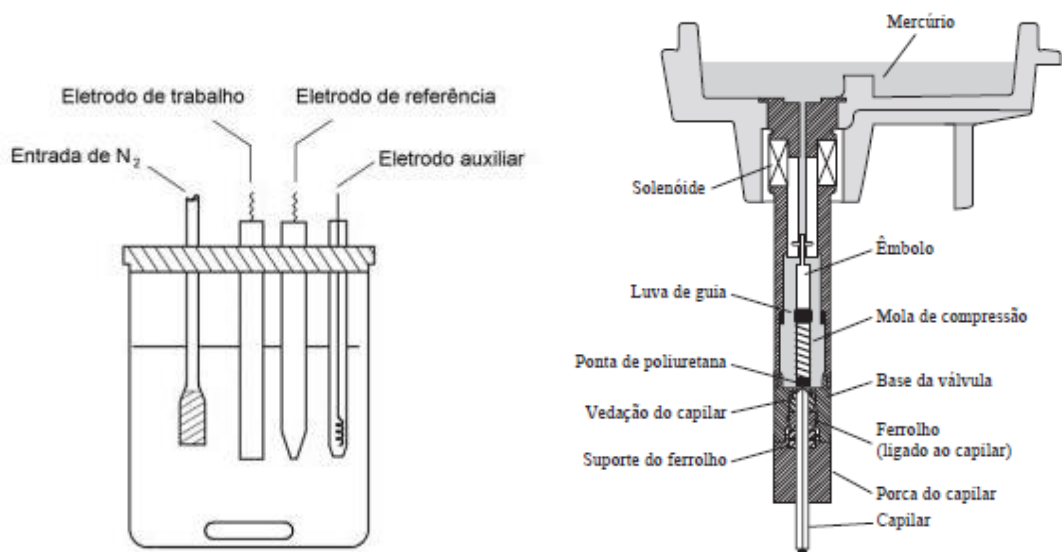
Fonte: Autora.

De forma geral, os métodos voltamétricos apresentam como vantagens principais, a redução no tempo de análise e do volume de amostra utilizado, sendo ainda uma técnica não destrutiva. A determinação é feita geralmente em uma célula padrão com três eletrodos, onde os potenciais de pré-concentração quando usados e de varredura são aplicados entre o eletrodo de trabalho, de pequena área e, portanto polarizável, e o eletrodo auxiliar, não havendo perturbação do eletrodo de referência, podendo este ser um eletrodo de calomelano (Hg) ou Ag/AgCl. O eletrodo de trabalho (WE, *working electrode*), eletrodo auxiliar (AE,

*auxiliary electrode*) e eletrodo de referência (RE, *reference electrode*) podem ser vistos no esquema da Figura 5.

A voltametria conquistou seu espaço na análise não apenas de elementos inorgânicos, mas também para compostos orgânicos. Muitos destes são eletroquimicamente ativos, possibilitando a sua determinação por esta técnica com uma boa sensibilidade. Adicionalmente, o desenvolvimento de métodos em meio não aquoso tem se mostrado vantajoso, uma vez que muitas análises dependem da solubilidade do analito em fase orgânica. Análises por voltametria empregando solventes não aquosos em química pura e aplicada, tem contribuído com ótimos avanços em tecnologia e ciências químicas. A busca por janelas mais amplas de potenciais para análise em diferentes eletrodos promove a exploração de novas possibilidades dentro dessa temática. É preciso, entretanto, ter cuidado neste tipo de estudo, visto que o comportamento eletroquímico do solvente (principalmente porque este não é hábil a realizar ligações de hidrogênio) é bastante diferente quando comparado ao meio aquoso e entre diferentes solventes (IZUTSU, 2002). A gama de potencial mais acessível em solventes orgânicos permite uma fácil detecção dos processos de eletrorredução / oxidação em meios não aquosos que dificilmente podem ser alcançados em soluções aquosas (CARAM, et al. 2015).

Figura 5: Esquema de uma célula padrão com três eletrodos e esquema com o sistema básico do eletrodo de mercúrio.



Fonte: <http://www.ebah.com.br/content/ABAAAgO-sAA/t-ncicas-an-lise-instrumental>. Acesso em: 09 jan 2018.

Embora sejam notáveis as vantagens deste meio, trabalhos na literatura utilizando meio não aquosos são bastante escassos. Para análise de fármacos, até o momento, não foram encontrados relatos a respeito dos compostos propostos neste trabalho. Entretanto, pode-se citar Caram e colaboradores (2015 e 2017), por exemplo, que estudaram os mecanismos de eletro redução e oxidação de corantes fazendo uso de diversos meios não aquosos utilizando eletrodo de carbono vítreo como eletrodo de trabalho (*vs* Ag/Ag<sup>+</sup>). Os experimentos realizados com 3,7-bis(dimethylamino) phenothiazin-5-ium chloride,  $1^+Cl^-$  (azul de metileno) e derivados da antraquinona revelou uma série complexa de mecanismos de reação envolvendo os processos de redução/oxidação (transferência elétrons e prótons) bem como formação de radicais (CARAM, et al. 2015; CARAM et al 2017).

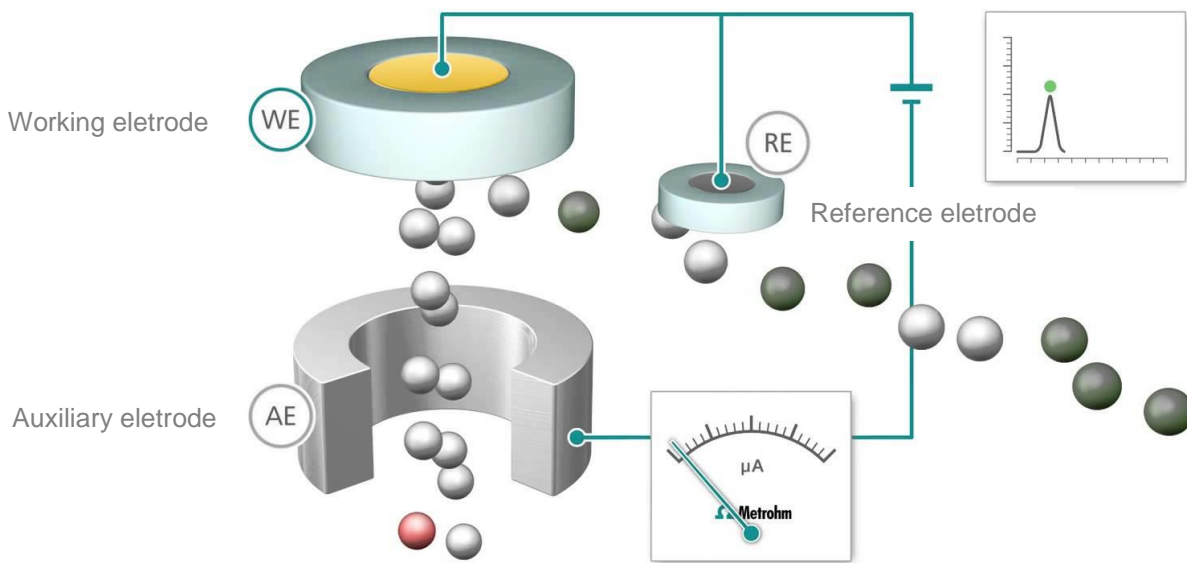
### **3.5.2 Cromatografia líquida com detecção pulso-amperométrica**

Dentre as técnicas analíticas consolidadas na análise química, a cromatografia é uma das mais empregadas devido a sua aplicabilidade e versatilidade. Diferentes formas de separação e diferentes detectores fazem desta uma das técnicas mais buscadas para solução de problemas de pesquisa e também para análise na indústria. O objetivo da cromatografia e também uma grande vantagem frente às outras técnicas, é que esta é capaz de separar individualmente cada substância, identificá-la, quantificá-la e também isolá-la como uma forma pura.

Dentre o universo dos detectores, tem se destacado os eletroquímicos, devido a sua alta sensibilidade e seletividade. Embora não sejam tão comumente utilizados, são comparáveis a outros detectores podendo ser empregados como alternativa em análises farmacêuticas (MARTINS; et al. 2009). Na detecção amperométrica pulsada, convencionalmente um potencial de trabalho é aplicado por um curto período de tempo, seguido de potenciais de limpeza (KWON; PARK, 2012).

A detecção amperométrica utiliza uma corrente que flui constantemente no eletrodo, para a conversão química de analitos eletroativos que se submetem a uma reação de oxidação ou redução, de acordo com o potencial aplicado e dependendo do pH da solução de acordo com o esquema a seguir.

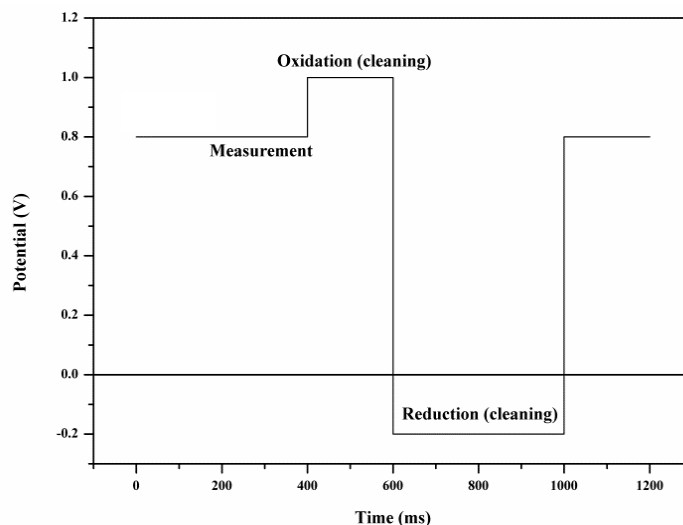
Figura 6: Esquema representativo da célula de detecção eletroquímica em fluxo.



Fonte: [https://www.metrohm.com/pt-br/products-verview/ion\\_chromatography/ic%20detection/](https://www.metrohm.com/pt-br/products-verview/ion_chromatography/ic%20detection/)

A determinação em geral, ocorre em um ciclo de três etapas de potenciais (E1, E2 e E3). A detecção amperométrica pulsada utiliza um potencial de detecção (E1) otimizado de acordo com a natureza dos compostos de interesse. Durante o ciclo, um potencial mais positivo (E2) em relação a E1 é aplicado como uma etapa de oxidação na superfície do eletrodo, para oxidação de compostos que porventura tenham ficado aderidos à superfície do eletrodo. Na última etapa (E3), é utilizado um potencial de redução que é mais negativo que E1 e E2 empregado para remoção dos óxidos da superfície do eletrodo. Este ciclo é constantemente aplicado na célula de fluxo de detecção. E2 e E3 são etapas de limpeza eletroquímicas que promovem a estabilidade do sinal impedindo que substâncias sejam adsorvidas ou contaminem o eletrodo de trabalho (Figura 7) (CARVALHO; et al. 2013).

Figura 7: Ciclo de potenciais continuamente aplicados ao eletrodo de ouro.



Fonte: Adaptado de Carvalho, et al. 2013.

Algumas classes de fármacos já foram determinadas por HPLC – PAD, com ótima sensibilidade e seletividade. A furosemida e a piretanida, por exemplo, são potentes diuréticos consumidos em todo o mundo. Estas substâncias podem acrescer em até 30 vezes o fator de excreção normal e são geralmente utilizados no tratamento de disfunções renais, cirrose do fígado ou hipertensão. Ambos os fármacos foram determinados em medicamentos e urina por HPLC com detecção amperométrica (BARROSO; et al. 1996). Outro exemplo interessante da utilização deste detector é a determinação cromatográfica de astragalina e astragalosida em raízes da planta *A. membranaceus*. Esta raiz é consumida como suplemento alimentar para obtenção de energia e faz parte da medicina tradicional chinesa (KWON; PARK, 2012). A detecção amperométrica também foi bastante eficiente na detecção de 12 compostos fenólicos com propriedades antioxidantes. Após a separação cromatográfica e utilizando o eletrodo de ouro como detector amperométrico, quercetina, rutina, miricetina, quercitrina, resveratrol, catequina, 4-hidroxi-cumarina, ácido gálico, ácido cafeico, ácido ferúlico, ácido clorogênico e ácido *p*-cumárico foram determinados em diferentes extratos de plantas medicinais da região amazônica (SILVEIRA; et al. 2015).

Em recente trabalho publicado no meio científico, Müller e coautores (2018), desenvolveram um novo método para determinação de fármacos utilizando eletrodo de ouro para detecção amperométrica de diuréticos (hidroclorotiazida, furosemida, clortalidona) e



estimulantes (cafeína e sinefrina). O método foi aplicado para a detecção destes compostos como adulterantes em amostras de suplementos alimentares.



## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

Para realização dos testes de otimização dos métodos, os seguintes fármacos foram preparados na concentração de  $1000 \text{ mg L}^{-1}$  em metanol (100 %) como solução estoque.

Ansiolíticos: alprazolam, bromazepam, clordiazepóxido, clonazepam, diazepam, flurazepam, medazepam, midazolam, lorazepam. Anorexígenos: anfepramona, femproporex, sibutramina. Estimulantes: cafeína, ioimbina, sildenafil, tadalafil. Antidepressivos: bupropiona, fluoxetina, sertralina. Diuréticos: amilorida, furosemida. Laxantes: bisacodil.

As amostras de suplementos alimentares adquiridas apresentavam-se na forma de pó a granel, cápsula, comprimidos, cápsulas oleosas ou preparações oleosas. De uma forma geral, os suplementos adquiridos apresentavam apelos comerciais para sua capacidade de promover mudanças e melhoras no desempenho físico e na perda de peso.

Os suplementos alimentares mais populares encontrados foram os proteicos à base de proteína do soro do leite hidrolisada (*whey protein*) e os suplementos indicados para substituição parcial de refeições. A Tabela 17 (página 165) contém a descrição de todas as amostras de suplementos alimentares, a indicação de dose diária e o resultado das análises realizadas por cromatografia.

### 4.1 EQUIPAMENTOS

Como primeira análise, foi feita a avaliação da estabilidade química dos compostos de interesse através de leituras obtidas com espectrômetro UV-Vis (ultravioleta-visível). As especificações do espectrômetro são as seguintes: Sistema Espectroscópico UV-Visível HEWLETT PACKARD, HP®, 8453, foram utilizadas cubetas de 1 cm de quartzo para todas as medidas.

A obtenção de todos os voltamogramas foi realizada em uma célula padrão com três eletrodos. O potenciostato e os eletrodos foram adquiridos da Metrohm (Switzerland), e possuem as seguintes especificações:

- Potenciostato 693 VA Processor;
- Stand 694 VA Stand;
- Eletrodo de Mercúrio (MME), operando no modo HDME (Pulso diferencial);
- Eletrodo de Ouro (RDE), disco de ouro 5 mm (diâmetro);
- Eletrodo de referência – Ag/AgCl com  $\text{KCl } 3 \text{ mol L}^{-1}$ ; e Ag/AgCl modificado contendo LiCl saturado em etanol e Ag/AgCl saturado com  $\text{KCl } 3 \text{ mol L}^{-1}$ .

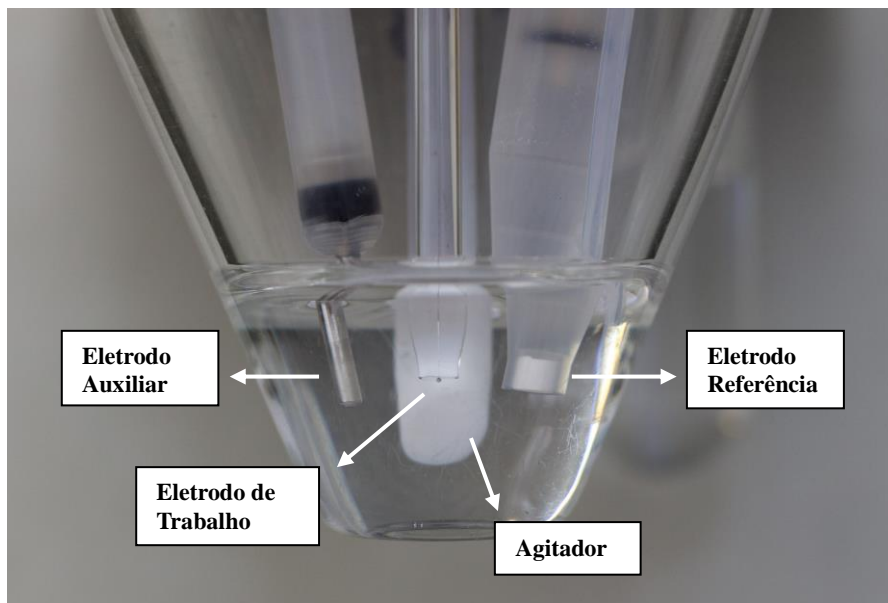
- Contra eletrodo – Platina.

Figura 8: Conjunto de equipamentos utilizado para obter os voltamogramas.



Fonte: Autora.

Figura 9: Célula voltamétrica utilizada com três eletrodos.

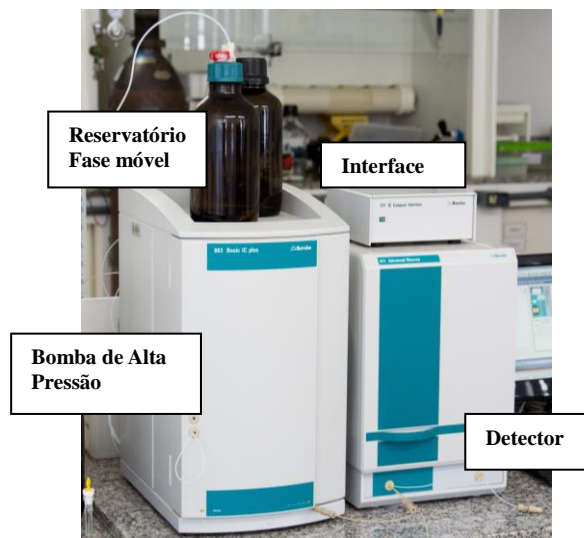


Fonte: Autora.

A parte desenvolvida por separação cromatográfica do trabalho foi realizada utilizando um equipamento também da Metrohm, com as seguintes especificações:

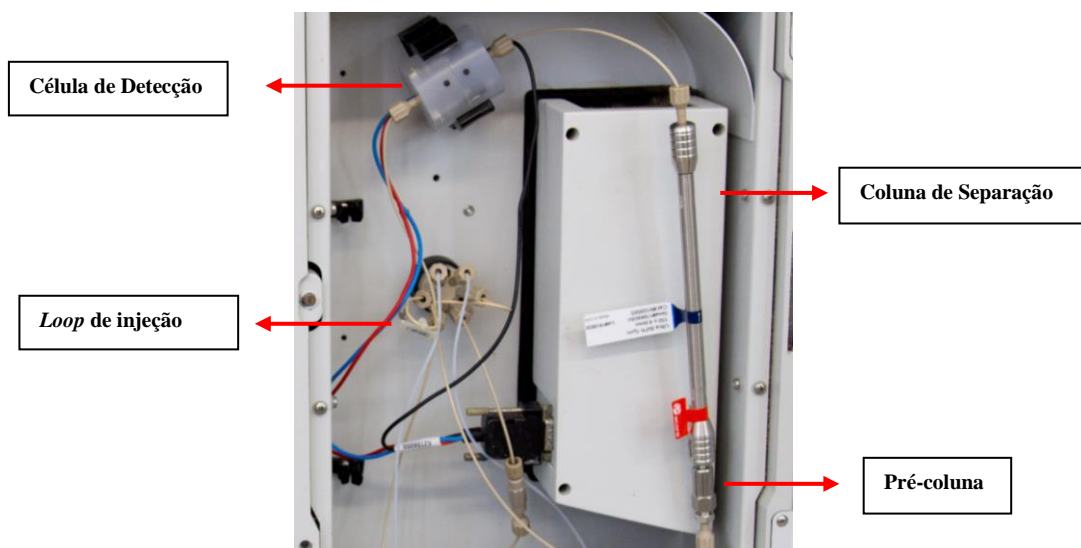
- Bomba isocrática 882 Compact IC plus com *loop* de injeção de 20  $\mu$ L
- Interface 771 IC Compact interface
- Detector 871 Advanced Bioscan
- Célula com eletrodo de trabalho em ouro – Variocell for Bioscan, espaçador 50  $\mu$ m, altura 0.05 mm, disco de ouro 3 mm, eletrodo de referência em estado sólido e eletrodo auxiliar em aço.

Figura 10: Cromatógrafo, interface e detector amperométrico utilizados para obter os cromatogramas.



Fonte: Autora.

Figura 11: Estrutura interna do detector amperométrico em fluxo.



Fonte: Autora.

## 4.2 REAGENTES E SOLUÇÕES

A água utilizada para os experimentos passou por processos de destilação, deionização e purificação através de um sistema MilliQ, resistividade  $18,2 \mu\Omega \text{ cm}^{-1}$  (Millipore, Bedford, MA, USA).

O nitrogênio utilizado nas medidas por voltametria foi de elevado grau de pureza (99,9999%). O mercúrio, como requisito essencial para a qualidade das análises, também foi adquirido com elevada pureza sendo 99,999 %.

A massa necessária dos reagentes sólidos foi obtida em balanças analíticas Sartorius (Goettingen, Alemanha), com 0,1 mg de precisão. A determinação do pH foi executada com pHmetro da Metrohm (827) com um eletrodo de vidro combinado. As soluções de calibração utilizadas, foram os padrões de pH 4,0 e 7,0 da Digimed (Brasil).

As soluções de trabalho dos fármacos de interesse foram preparadas a partir dos padrões farmacêuticos sólidos, dissolvidos a  $1 \text{ g L}^{-1}$  em metanol grau HPLC. Todos os padrões de fármacos foram obtidos com certificado de análise do controle de qualidade a partir de distribuidoras de insumos farmacêuticos e farmácias de manipulação. Todos os reagentes sólidos, inclusive os padrões dos fármacos são de grau analítico e foram preparados periodicamente de acordo com sua estabilidade.

Para ajustes de pH necessários foram adicionados os respectivos complementos básicos ou ácidos ao sal utilizado, como por exemplo, ácido acético ou amônio para ajuste de pH do eluente contendo acetato de amônio. Para o eluente contendo fosfato de sódio, ácido fosfórico ou hidróxido de sódio foram utilizados.

As colunas de separação testadas foram:

- Zorbax Eclipse plus C18 adquirida da Agilent (CA, EUA), diâmetro de partícula  $5 \mu\text{M}$ , dimensões 4,6 x 150 mm.
- C18 adquirida da Phenomenex (CA, EUA), diâmetro de partícula  $5 \mu\text{M}$ , dimensões 4,6 x 250 mm.
- UltraByphenil (bifenil), adquirida da Restek (PA, EUA), diâmetro de partícula  $5 \mu\text{M}$ , dimensões 4,6 x 150 mm.

Todas as colunas testadas foram acopladas previamente a pré-coluna de C18, adquirida da Thermo Scientific (MA, EUA), com diâmetro de partícula de 3  $\mu\text{M}$ .

Todos os eluentes testados foram filtrados em membrana regenerada de celulose com porosidade de 0,45  $\mu\text{M}$  (Sartorius – Göttingen, Alemanha) e sonicados em banho de ultrassom por no mínimo 1 hora antes do uso. A Tabela 5 traz informações adicionais sobre os fármacos testados por ambos os métodos.

Tabela 5: Fármacos testados com seus respectivos nomes comerciais, forma adquirida, classe farmacológica e pKas.

<b>Fármaco</b>	<b>Forma Adquirida</b>	<b>Pureza (%)</b>	<b>Medicamento</b>	<b>pKa<sup>1</sup></b>
Alprazolam	Alprazolam	100,18	Frontal <sup>®</sup>	5.08
Bromazepam	Bromazepam	99,82	Lexotan <sup>®</sup>	2.78
Clordiazepóxido	Clordiazepóxido HCl	99,57	Psicosedin	6.43
Clonazepam	Clonazepam	99,93	Rivotril <sup>®</sup>	1.86
Diazepam	Diazepam	98,99	Valium <sup>®</sup>	3.40
Flurazepam	Flurazepam	100,18	Dalmadorm <sup>®</sup>	8.71
Medazepam	Medazepam	98,79	Serenium <sup>®</sup>	–
Midazolam	Maleato de midazolam	100,06	Dormium <sup>®</sup>	6.20
Lorazepam	Lorazepam	99,98	Lorax <sup>®</sup>	10.61
Anfepramona	Anfepramoan HCl	98,20	Inibex-S	7.44
Femproporex	Femproporex HCl	100,42	Desobesi-M <sup>®</sup>	7.88
Sibutramina	Sibutramina HCl.1H <sub>2</sub> O	99,30	Reductil <sup>®</sup>	9.77
Cafeína	Cafeína	99,98	Neosaldina <sup>®</sup>	10.4
Ioimbina	Ioimbina HCl	98,00	Yomax <sup>®</sup>	7.65
Sildenafil	Citrato de sildenafil	101,00	Viagra <sup>®</sup>	7.27
Tadalafil	Tadalafil	99,90	Cialis <sup>®</sup>	15.17
Bupropiona	Bupropiona HCl	100,02	Zyban <sup>®</sup>	8.22
Fluoxetina	Fluoxetina HCl	100,50	Prozac <sup>®</sup>	9.80
Sertralina	Sertralina HCl	99,26	Zoloft <sup>®</sup>	9.85
Amilorida	Amilorida	100,46	Amilorid <sup>®</sup>	3.29
Furosemida	Furosemida	99,22	Lasix <sup>®</sup>	4.25
Bisacodil	Bisacodil	101,00	Lacto-Purga <sup>®</sup>	4.08

<sup>1</sup> <https://www.drugbank.ca/>

Fonte: Autora.

## 4.3 PROCEDIMENTOS ANALÍTICOS

### 4.3.1 Métodos de separação cromatográfica

O primeiro passo para otimização de método em cromatografia com detecção amperométrica é a escolha do potencial de detecção. Para isso, foram preparadas soluções individuais dos analitos de interesse ( $10 \text{ mg L}^{-1}$ ) para realizar a varredura hidrodinâmica no detector de ouro. Cada analito foi injetado individualmente nos potenciais de  $-0,2 \text{ V}$ ;  $0,0 \text{ V}$ ;  $+0,2 \text{ V}$ ;  $+0,4 \text{ V}$ ;  $+0,6 \text{ V}$  e  $+0,8 \text{ V}$  (injeções ponto a ponto). A voltametria hidrodinâmica foi executada no modo de corrente direta (DC) onde a aquisição de sinal era mantida por 30 segundos. Os fármacos (solução estoque a  $1000 \text{ mg L}^{-1}$ ) foram diluídos em eluente fosfato de sódio  $5 \text{ mmol L}^{-1}$  com pH ajustado para 5,0 com ácido fosfórico concentrado. Esta composição de eluente foi testada uma vez que o fosfato de sódio seria utilizado como primeira opção para otimização da separação cromatográfica.

O eletrodo de disco de ouro trabalha em faixas de potenciais mais positivos (ao redor de  $+1,5 \text{ V}$  a  $-0,8 \text{ V}$ ) Em pHs mais ácidos, o eletrodo tem a faixa relativamente reduzida (em torno de  $+1,1 \text{ V}$  a  $-0,2 \text{ V}$ ) uma vez que em faixas mais negativas de potenciais, ocorre a redução dos íons  $\text{H}^+$ , podendo mascarar a detecção dos compostos.

Os eluentes testados durante toda a otimização, foram preparados diariamente pela dissolução do sal em questão em água, após era adicionado o solvente orgânico com posterior ajuste de pH e finalmente aferição do menisco. Estas soluções eram filtradas a vácuo em membrana regenerada com porosidade de  $0,45 \mu\text{m}$  e então mantidas em banho de ultrassom por no mínimo uma hora.

Para todas as análises e colunas de separação testadas, o sistema foi submetido à passagem do eluente a ser otimizado durante 30 minutos antes do uso no potencial de detecção otimizado. Foram testados diversos parâmetros de separação, como variação na composição do eluente (diferentes solventes orgânicos, tampões), pH, fluxo, temperatura e aditivos à F.M. (fase móvel). Ao final de cada dia, o sistema era submetido ao processo de limpeza para remoção de sais e impurezas. A lavagem foi realizada utilizando soluções de Metanol:Água ( $5 \text{ \% v/v} - 1 \text{ hora}$ ) e Metanol:Água ( $85 \text{ \% v/v} - 45 \text{ minutos}$ ). Os testes realizados para otimização da separação cromatográfica serão melhor abordados nos itens 5.1.1 e 5.1.2.



### 4.3.2 Método de análise por voltametria em meios aquoso e não aquoso

A otimização do método voltamétrico em *meio orgânico* iniciou pela varredura de toda a janela de potenciais promovida pelo eletrólito ( $0,01 \text{ mol L}^{-1} \text{ NaClO}_4$  em acetonitrila) (GOULARTE, 2014) para cada um dos fármacos individualmente. A otimização do eletrólito de suporte será melhor abordada no item 5.2.1 que trata dos parâmetros de otimização do método. Inicialmente foi feita a varredura do eletrólito apenas, seguido de no mínimo 6 adições dos padrões de fármacos. Partindo-se da solução estoque de  $1000 \text{ mg L}^{-1}$  cada adição na célula voltamétrica foi de  $10 \text{ mg L}^{-1}$ , sendo então, 10, 20, 30, 40, 50 e  $60 \text{ mg L}^{-1}$  por análise.

A varredura realizada foi iniciada no sentido dos potenciais mais negativos para os mais positivos (varredura anódica) e na mesma análise, dos potenciais mais positivos para os mais negativos (varredura catódica). Os potenciais analisados foram de  $-1,8 \text{ V}$  a  $+1,0 \text{ V}$  e  $+1,0 \text{ V}$  a  $-1,8 \text{ V}$  com o eletrodo HMDE operando no modo pulso diferencial (DP). Todas as varreduras empregaram a velocidade de  $30 \text{ mV s}^{-1}$ . Para a otimização inicial do método de *screening*, as análises constituíram-se inicialmente sem a presença da amostra. Parâmetros de pré-concentração (tempos de 30, 60 e 90 segundos) e velocidade de varredura (20, 30, 40 e  $50 \text{ mV/s}$ ) foram avaliados.

O eletrólito foi preparado pela dissolução do sal  $\text{NaClO}_{4(s)}$  em acetonitrila de acordo com a demanda e armazenado na geladeira ( $5 - 10 \text{ }^\circ\text{C}$ ). O procedimento diário para medidas em voltametria é bastante prático, uma vez que não é necessário filtrar, sonicar ou condicionar o equipamento. Após a ambientalização da temperatura do eletrólito, dos padrões e amostras, a varredura já pode ser iniciada. Como procedimento rotineiro foi adotado a prática de gotejamento do mercúrio antes de qualquer análise para remoção de quaisquer contaminantes e renovar o mercúrio presente no capilar. Uma vez que a tensão superficial e densidade da acetonitrila são menores que a da água, muitas vezes era necessário fazer um ajuste mais apurado da pressão no eletrodo antes do uso, para que o mesmo fosse capaz de prender a gota. Cada análise era precedida de 60 segundos de desaeração, já que em solventes orgânicos a presença de oxigênio dissolvido ( $\text{O}_{2(g)}$ ) é minimizada. Entre cada análise, os eletrodos eram lavados com etanol 95 % (v/v) e posteriormente com água purificada. As células voltamétricas de vidro foram mantidas em banho de descontaminação de Extran<sup>®</sup> para remoção de contaminantes e lavadas a cada uso com etanol (95 %) e água purificada. Por fim, os eletrodos foram mantidos em  $\text{HNO}_3$  1 % (v/v) para evitar a proliferação de fungos, principalmente na junção cerâmica do eletrodo de referência.

Para as análises confirmatórias do comportamento eletroquímico dos fármacos estudados pelo método de separação, foram realizados ensaios por voltametria cíclica (CV) em *meio aquoso*. A rotina diária para estas análises consistiu no condicionamento do eletrodo de disco rotatório de ouro na presença de  $0,5 \text{ mol L}^{-1}$  de ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) aplicando-se 10 ciclos de potencial (0,0 V a +1,8 V). Uma vez que o eletrodo não havia sido utilizado anteriormente, dispensava-se o processo de polimento físico, segundo recomendação do fabricante, o que foi confirmado pelos voltamogramas estáveis obtidos. Após este procedimento as determinações eram realizadas em seguida à desaeração do sistema com  $\text{N}_{2(g)}$  ultrapuro por 5 minutos. Entre cada análise, os eletrodos eram lavados com etanol 95 % (v/v) e posteriormente com água purificada. Ao final do dia, o eletrodo de trabalho era desacoplado do sistema, lavado com etanol, água purificada e novamente com etanol, seco com papel macio e armazenado em local seco e livre de poeira.

#### 4.3.3 Parâmetros de validação

O processo conhecido como validação é a garantia de que o método ou metodologia gera dados confiáveis e interpretáveis sobre a amostra. Envolve um procedimento o qual prova que o método fornece os resultados esperados e com credibilidade, precisão e exatidão adequadas (LANÇAS, 2004). A validação dos métodos foi realizada de acordo com os parâmetros do guia para métodos em laboratório direcionados a suplementos dietéticos do “*Official Methods of Analysis of AOAC International*” (AOAC, 2013).

Segundo o INMETRO (INMETRO, 2016), as definições para os principais parâmetros necessários para validação são as seguintes:

1. Seletividade: consiste na habilidade do método em estudo de identificar e dosar o analito na presença de interferentes presentes na matriz da amostra, que podem acentuar ou inibir a detecção ou quantificação do analito de interesse. Experimentos para avaliação da seletividade descritos na literatura sobre validação de métodos analíticos envolvem ensaios com padrões ou materiais de referência, amostras com e sem o analito, além da avaliação da capacidade de identificação do analito de interesse na presença de interferentes. Quando não há disponibilidade de interferentes, sugere-se a avaliação da habilidade de medição do analito por diferentes métodos, técnicas ou por meio de variações nas condições instrumentais. Se a seletividade não for assegurada, a linearidade, a tendência e a precisão estarão seriamente comprometidas.

A seletividade foi realizada injetando-se possíveis fármacos que pudessem estar presentes nas amostras de suplementos e que poderiam ser identificados como interferentes. Os fármacos testados estão listados no item 5.1.5.

2. Linearidade: A maioria dos equipamentos de medição existentes estabelece a sua faixa dinâmica linear. É necessário, entretanto, verificar até que ponto a faixa de concentração do analito coincide com a faixa dinâmica linear e assegurar que nenhum outro fenômeno tenha impacto indesejável na resposta. A quantificação requer que se conheça a dependência entre a resposta medida e a concentração do analito. A linearidade é obtida por padronização interna ou externa e formulada como expressão matemática usada para o cálculo da concentração do analito a ser determinado na amostra real. Em geral, serão necessários vários níveis de concentração, no mínimo cinco, para construir a curva analítica. O número de replicatas em cada nível de concentração deve ser o mais próximo possível daquele empregado na rotina do laboratório. Através do método dos mínimos quadrados (regressão linear) é possível fazer a verificação deste item.

A linearidade foi estudada pela regressão da curva analítica de cada fármaco em separado. Com base na resposta do equipamento em função da concentração obtida de seis pontos (cromatografia) e sete pontos (voltametria) e a partir de três curvas analíticas, foram avaliados os coeficientes de correlação (r).

3. Limite de detecção (LD): representa a menor concentração da substância em exame que pode ser detectada pelo método em questão, mas não necessariamente quantificada. Pode ser expresso como:  $LD = 3 \times S / a$  onde S, é o desvio padrão absoluto do branco, e “a” é o coeficiente angular (inclinação) da curva analítica.

O limite de detecção foi calculado de acordo com a fórmula citada acima. Foram feitas 10 leituras do branco.

4. Limite de quantificação (LQ): representa a menor concentração da substância em exame que pode ser medida pelo método em questão. Pode ser expresso como:

$$LQ = 10 \times S / a$$

onde S, é o desvio padrão absoluto do branco, e “a” é o coeficiente angular (inclinação) da curva analítica.

O limite de quantificação foi calculado de acordo com a fórmula citada acima. Foram feitas 10 leituras do branco.

5. Precisão: pode ser avaliada através de formas diferentes. Pode ser relacionado a repetitividade, com mesmo observador, mesmo procedimento de medição, mesmo instrumento sob mesmas condições e mesmo local. Pode usualmente ser expressa pelo desvio padrão e coeficiente de variação. O coeficiente de variância (CV, usualmente expresso em %), também conhecido como desvio padrão relativo (DPR), é calculado da seguinte forma:

$$C.V. = DPR \frac{DP}{CMD} \times 100$$

onde, DP é o desvio padrão, CMD é a concentração média determinada e DPR é o desvio padrão relativo.

A precisão foi avaliada em três níveis de concentração (pontos baixo, médio e alto da curva analítica) em três dias diferentes (intra e inter dia). O desvio padrão da triplicada em seus respectivos níveis de concentração referentes ao dia foi considerada a precisão *intra dia*. O desvio padrão de todas as medidas na mesma concentração foi considerada a precisão *intra dia*. Os valores foram expressos em função do CV%. A precisão foi avaliada e três níveis de concentração apenas para cromatografia.

6. Exatidão: a exatidão é avaliada numericamente através da tendência. Sempre que possível, os materiais de referência certificados (SRMs) devem ser utilizados no processo de validação de um método. Um SRM possui um valor de concentração, ou outra grandeza, para cada parâmetro, e uma incerteza associada. A tendência, quando aplicada a uma série de resultados de ensaio, implica numa combinação de componentes de erros aleatórios e sistemáticos. Na falta de SRM, é realizada a fortificação da amostra com concentrações conhecidas do analito, de preferência antes dos processos de extração, para realização da determinação.

Na ausência de amostras certificadas de suplementos alimentares, a exatidão foi realizada a partir de ensaios de fortificação. Foram escolhidas amostras aleatoriamente e antes da extração, concentrações conhecidas dos fármacos foram adicionadas. Após o cálculo por extrapolação da curva analítica, a média de três replicatas para cada amostra foi usada para calcular a recuperação do composto, sendo recuperação (%) = Valor calculado x 100 / Valor obtido, onde variações até 15 % foram aceitas.

#### 4.4 AMOSTRAS E PREPARO DE AMOSTRAS

A amostragem de suplementos alimentares foi realizada por integrantes do grupo de pesquisa do LACHEM entre os anos de 2014 e 2017. A amostragem foi feita em todo o país, através da Internet utilizando ferramenta de busca *Google* com os seguintes termos: suplemento alimentar para emagrecer, termogênicos, suplemento alimentar para perda de peso, suplemento para substituição de refeições. Ademais, foram adquiridas amostras por compra diretamente em lojas de suplementos e farmácias da cidade de Santa Maria. Foram priorizados suplementos que demonstrassem maior apelo comercial para perda de peso e produtos que fossem fabricados no Brasil. As amostras recebidas pelo correio foram cadastradas em uma base de dados e armazenadas a temperatura ambiente para então serem analisadas.

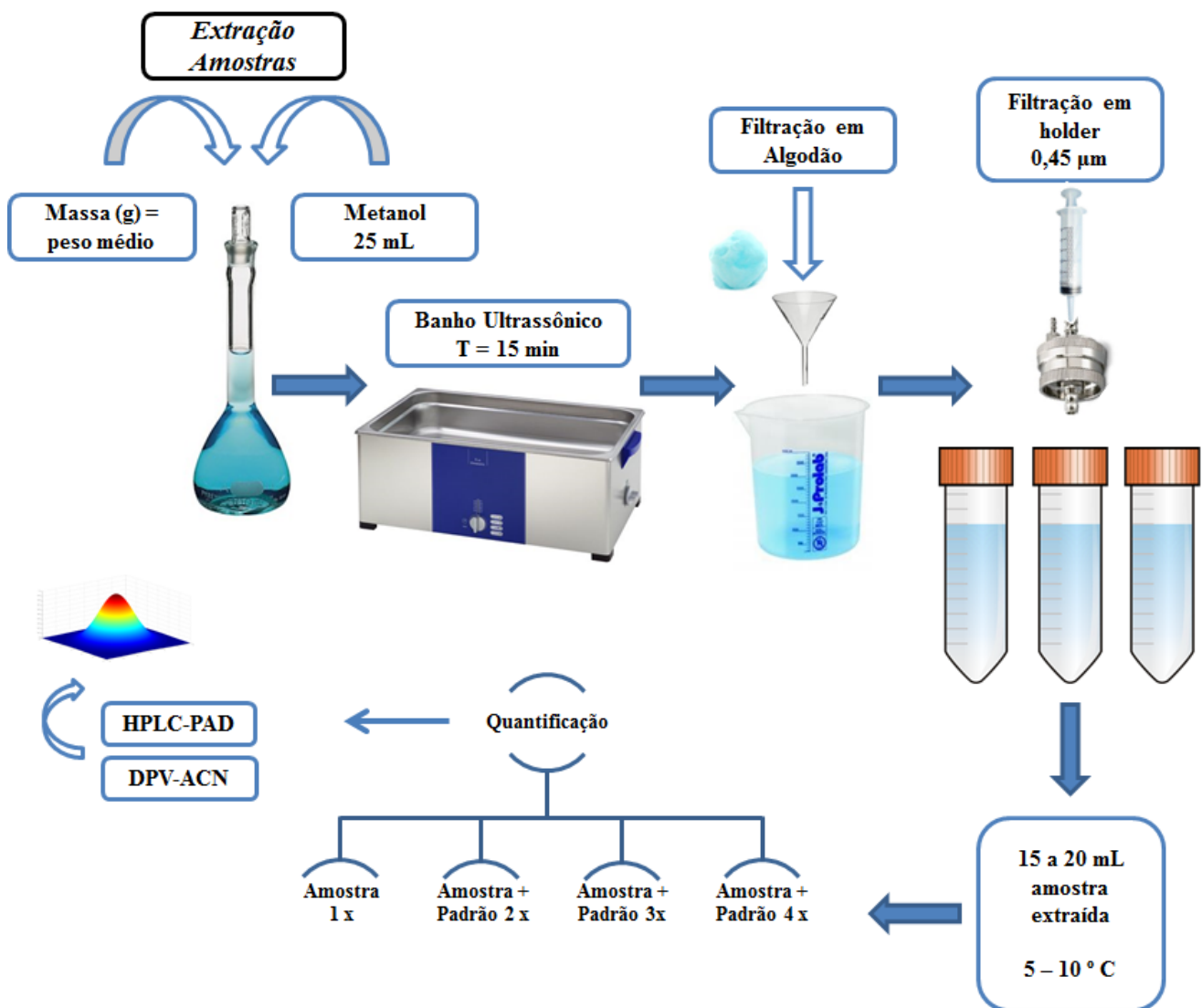
As amostras apresentavam-se na forma de pó a granel, comprimidos, cápsulas em pó e cápsulas oleosas. Para as amostras sólidas, foi preparado um *pool* (n = 10) de amostras. O peso médio das amostras foi calculado pela média da pesagem da massa de 10 unidades de cada amostra. Amostras na forma de comprimidos foram trituradas com gral e pistilo. Para os produtos em pó a granel, alíquotas de massa de 5 g foram tomadas.

A extração das amostras foi feita pesando-se o valor obtido do peso médio e 0,5 g para amostras a granel, em balança analítica. Esta massa foi transferida para um balão volumétrico e completado o volume de 25 mL e homogeneizado. Então, a amostra foi posta em banho de ultrassom durante 15 minutos. Após este tempo, o conteúdo do balão foi filtrado em algodão para remoção dos sólidos mais grosseiros e na sequência, filtrado em membrana com porosidade de 0,45  $\mu\text{m}$  com auxílio do *holder*. Uma vez que o método de separação foi desenvolvido em metanol, solvente em que todos os compostos são facilmente solubilizados, este foi o reagente escolhido para realizar a extração. Por fim, antes da injeção no equipamento, todas as amostras estudadas foram diluídas no mínimo 10 vezes para realização do *screening*. Amostras que apresentassem adulterantes eram diluídas conforme a necessidade para ajuste perante a curva analítica.

Para a quantificação dos analitos foram preparados quatro balões volumétricos de cinco mL, acrescidos de quantidades crescentes do composto a ser quantificado, sendo um dos

balões contendo apenas a amostra. Pelo método de adição padrão, onde a área obtida para o balão contendo a amostra é considerado como  $y=0$  da curva analítica, o valor obtido considerando:  $y = ax + b$ , onde  $y = 0$ ,  $a$ = inclinação da curva analítica,  $x$ = área obtida,  $b$ = interseção da curva. Um esquema da extração e quantificação das amostras pode ser encontrado a seguir (Figura 12).

Figura 12: Fluxo esquemático do método de extração das amostras de suplementos alimentares.



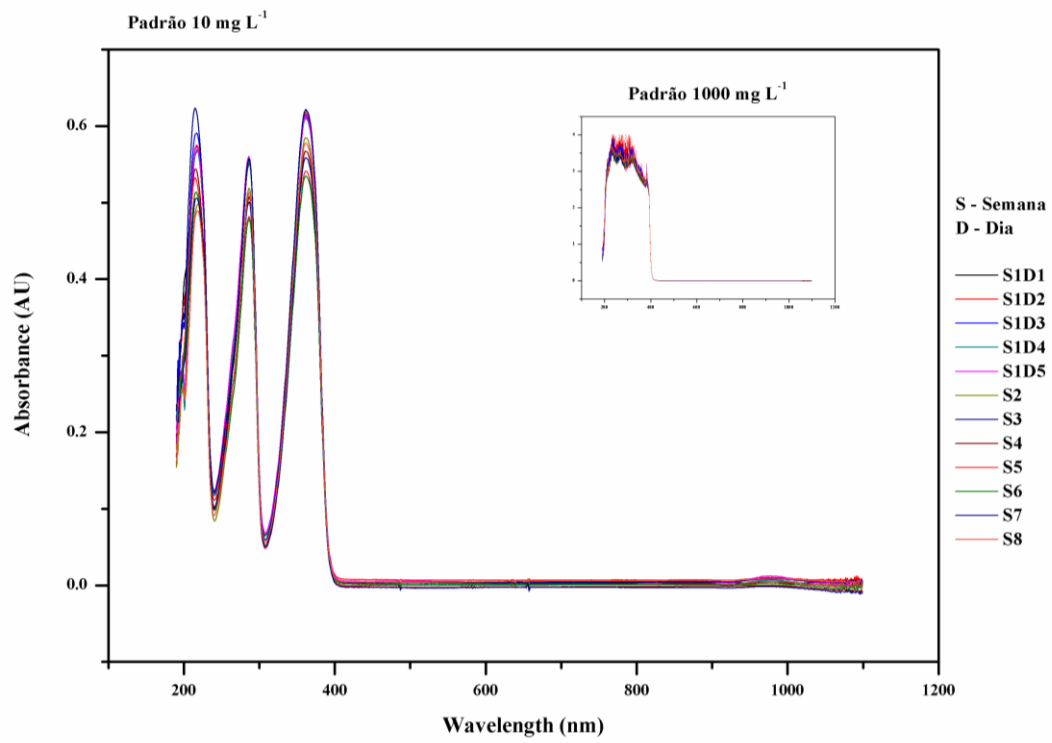
Fonte: Autora.

#### 4.5 ESTUDO DA ESTABILIDADE QUÍMICA DOS PADRÕES DE FÁRMACOS

Paralelamente ao início dos primeiros estudos para desenvolvimento do método de separação cromatográfico bem como do método por voltametria em meio não aquoso, foram realizados ensaios para avaliar a estabilidade dos fármacos estudados como adulterantes. Os testes foram realizados a partir de leituras no espectrofotômetro durante um período de tempo determinado e condições padronizadas.

Uma varredura inicial mostrou que todos os compostos apresentavam absorção no espectro em regiões específicas da faixa total analisada (200 a 1100 nm). A partir deste dado, todos os adulterantes foram preparados no mesmo dia na concentração de  $1000 \text{ mg L}^{-1}$  (solução estoque). O objetivo era sempre avaliar a estabilidade desta solução, uma vez que todos os fármacos eram diluídos diariamente (solução de trabalho) para a otimização do método a partir da solução concentrada de  $1000 \text{ mg L}^{-1}$ . Foram analisadas duas soluções para cada fármaco, a solução mais concentrada e uma solução diluída a  $10 \text{ mg L}^{-1}$ . O solvente utilizado como “branco” para todas as análises bem como para preparo das soluções diluídas dos padrões foi metanol. A aquisição dos perfis espectrais para cada composto teve duração de oito semanas, sendo que na semana de início do ensaio os padrões foram analisados diariamente. A partir da segunda semana, os padrões foram analisados uma vez a cada semana.

Nenhum dos fármacos apresentou alteração significativa no perfil de absorção no espectro na faixa de 200 a 1100 nm, durante as oito semanas de estudo. Os espectros para todos os compostos estudados tanto por voltametria quanto por cromatografia podem ser encontrados no apêndice A e todos os espectros são formatados da seguinte forma:

Figura 13: Espectro obtido para a 10 e 1000 mg L<sup>-1</sup> de Amilorida em metanol na faixa de 200 a 1100 nm.

Fonte: Autora.



## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

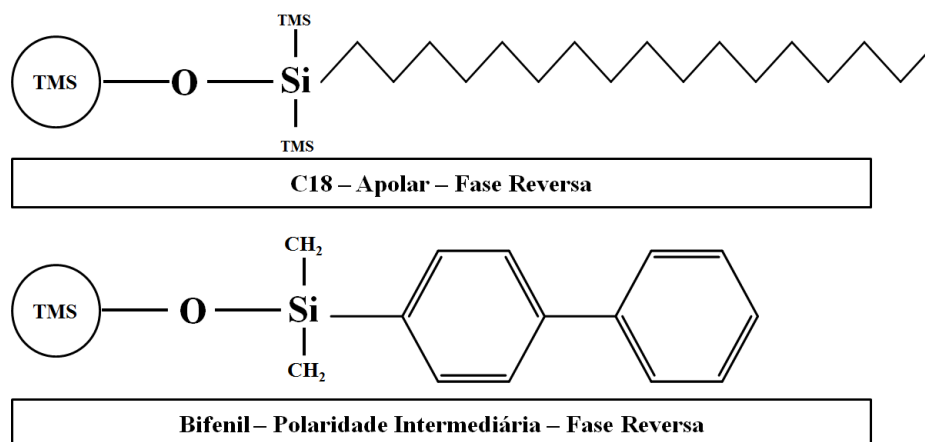
### 5.1 ANÁLISE CROMATOGRÁFICA DE FÁRMACOS COMO ADULTERANTES

Este trabalho de doutorado teve duas etapas importantes no desenvolvimento de métodos de separação por cromatografia. Como primeira tentativa, foi utilizada coluna com fase estacionária C18 (octadecil) principalmente pela disponibilidade da mesma no laboratório. Uma vez que o número de fármacos de interesse era elevado e estes pertenciam a várias classes distintas, os ansiolíticos (alprazolam, bromazepam, clordiazepóxido, clonazepam, diazepam, flurazepam medazepam, midazolam e lorazepam) foram escolhidos como a primeira classe a ser estudada, seguidos dos estimulantes (cafeína e sinefrina) e anorexígenos (sibutramina, anfepramona e femproporex). Demais classes seriam analisadas posteriormente à otimização do método com os compostos citados. Entretanto, após várias tentativas, percebeu-se que cafeína, sinefrina, anfepramona, femproporex e sibutramina eluíam rapidamente da coluna e, portanto, não podiam ser separados em conjunto com os ansiolíticos. Uma vez que quase todos são compostos com estruturas moleculares pequenas e possuem adicionalmente uma considerável polaridade devido aos grupamentos presentes nas suas moléculas, não há interação suficiente entre o analito e a fase estacionária para haver separação efetiva.

Sendo assim, o trabalho de otimização continuou apenas com os ansiolíticos citados anteriormente. Os fármacos “excluídos” (estimulantes e anorexígenos) seriam estudados posteriormente em outras condições, como continuação do trabalho.

A segunda parte importante para a separação cromatográfica foi quando, após muitas tentativas negativas de separação dos ansiolíticos em C18, decidiu-se pela troca de fase estacionária. Devido as características dos fármacos de interesse e com base em uma pesquisa catalográfica, chegou-se a conclusão que uma fase estacionária mais polar, como uma fase bifenólica, seria mais adequada para o estudo dos compostos de interesse. Segundo o fabricante da marca Allcrom<sup>®</sup>, colunas deste tipo podem reter até 2 vezes mais os analitos em relação a fase C18. A seguir é possível perceber as diferenças estruturais entre as colunas testadas e conseqüentemente, a diferença de polaridade.

Figura 14: Representação da estrutura quimicamente ligada das fases estacionárias estudadas (TMS – trimetilclorosilano).



Fonte: Autora.

### 5.1.1 Cromatografia em C18

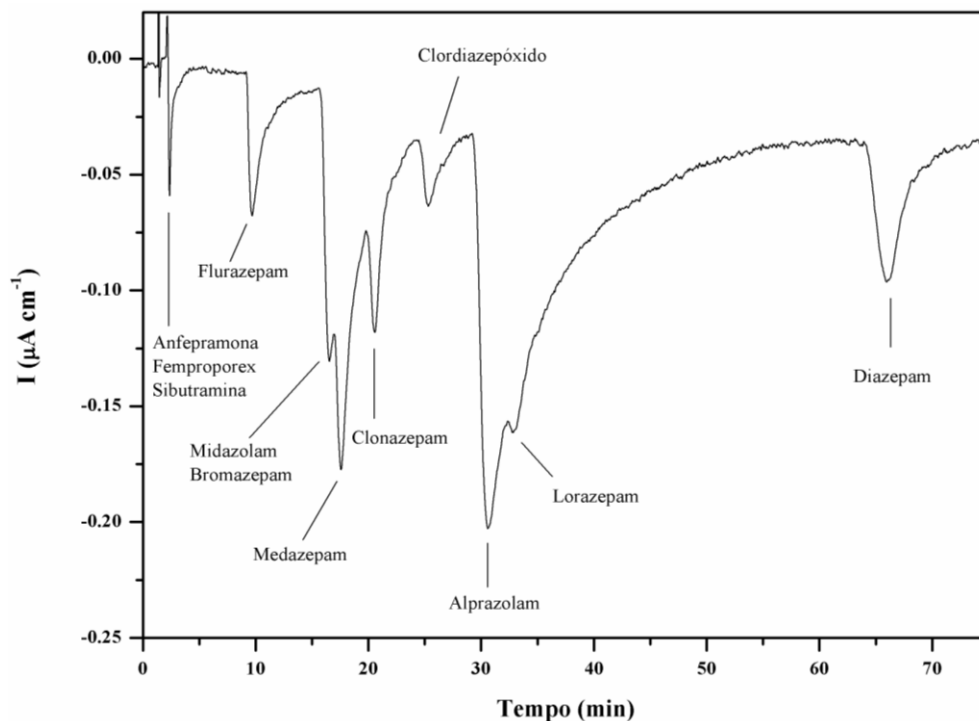
A primeira etapa a ser otimizada para separação cromatográfica de quaisquer substâncias, quando utilizado um detector do tipo amperométrico, apresenta-se no estudo do potencial eletroquímico de detecção. Nem sempre a escolha de um determinado potencial de detecção é o mais adequado para todos os compostos de interesse. Na grande maioria das vezes, o potencial escolhido é aquele em que a maioria das substâncias apresenta sinal satisfatório e também aquele que esteja adequado a faixa de trabalho do eletrodo. Esta temática será discutida no item 5.1.3 uma vez que muitos compostos foram incluídos ou excluídos após a otimização do método.

Desta forma, após a escolha do potencial de detecção, partiu-se então para a otimização das condições de separação. Inicialmente foi empregada coluna C18 (150 x 4,6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ), precedida de pré-coluna com diâmetro de partícula igual a 3  $\mu\text{m}$  (C18). Os primeiros testes foram realizados com fosfato de sódio como sal tamponante e metanol como fase orgânica. A concentração de fosfato de sódio foi estudada na faixa de 1  $\text{mmol L}^{-1}$  até 60  $\text{mmol L}^{-1}$ , iniciando em 1  $\text{mmol L}^{-1}$ , após 5  $\text{mmol L}^{-1}$  e depois de 10 em 10  $\text{mmol L}^{-1}$  até chegar a 60  $\text{mmol L}^{-1}$ . A concentração de metanol foi variada de 5 % a 60 % (v/v), aumentando-se 5 % a cada teste. O pH foi ajustado com ácido fosfórico concentrado e foi avaliado iniciando-se em pH 3,0 até pH 6,5, sendo que os estudos foram realizados acrescentando-se a cada teste 0,5 da escala de pH. Ainda, na tentativa de melhorar a separação

foram testados aditivos à fase móvel. Acetonitrila foi adicionada como modificador orgânico no intuito de diminuir o tempo da varredura. Foram testadas as concentrações de 1, 5 e 10 % (v/v). Além destas variáveis, aditivos de fase móvel foram estudados para aumentar a interação dos analitos com o eluente e também com a coluna, o que proporcionaria em teoria uma melhor separação. Os aditivos  $\beta$ -ciclodextrina, octilsulfato de sódio e dodecilsulfato de sódio (SDS) foram avaliados nas concentrações de 0,5; 1 e 5  $\text{mmol L}^{-1}$ . Embora vários trabalhos tragam estes aditivos como vantajosos para separações em cromatografia e eletroforese, por formarem compostos de transição (*clusters*) e promoverem pareamento iônico (MÜLLER, et al. 2018; CARVALHO, et al. 2013; TAVARES, 1997), para o método proposto nenhum destes compostos trouxe melhoramento para a separação.

Dentre as condições testadas, a mais adequada após a avaliação das variáveis mencionadas foi o seguinte perfil de separação:

Figura 15: Cromatograma de separação em fase reversa dos fármacos identificados no gráfico na concentração de  $20 \text{ mg L}^{-1}$ . Condições: fase móvel fosfato de sódio  $5 \text{ mmol L}^{-1}$ ; pH 4,0; metanol 45 % (v/v); coluna C18 (150 mm); potencial de detecção +0,8 V (0,4 s); potenciais de limpeza: +1,0 V (0,4 s) e -0,2 V (1,2 s); fluxo  $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ .



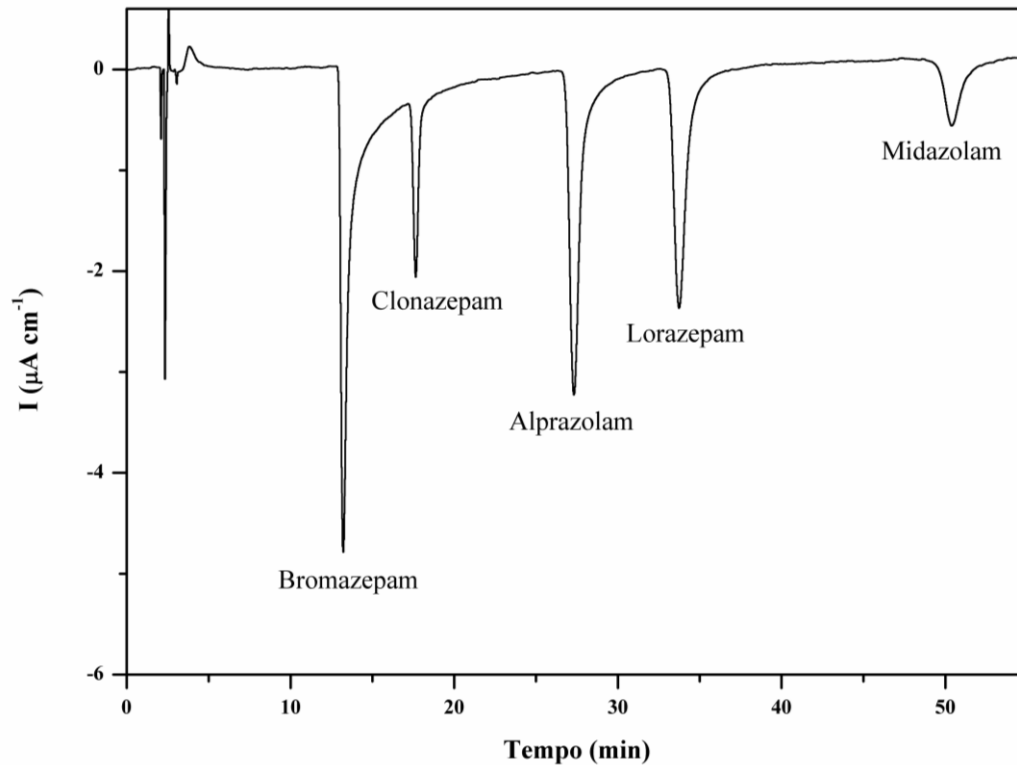
Fonte: Autora.

Observando o cromatograma da Figura 15, é notável a coeluição de várias substâncias correspondentes a no mínimo oito, dos doze analitos injetados. Após muitas tentativas negativas de separação, partiu-se para o estudo de novas possibilidades em se tratando de sais que pudessem ser substitutos do fosfato de sódio. Desta forma, foram pesquisadas alternativas para aumentar as possibilidades analíticas de separação da classe dos ansiolíticos, uma vez que os anorexígenos eluíam muito rápido nestas condições. A esta etapa da otimização, os estimulantes (cafeína e sinefrina) já haviam sido retirados dos testes e por esse motivo não estão presentes no cromatograma da Figura 15.

Foram encontrados alguns trabalhos que destacavam as vantagens de utilizar sais de acetato como componentes da fase móvel, devido principalmente à sua melhor solubilidade em soluções contendo solventes orgânicos (AL-HAWASLI; AL-KHAYAT; AL-MARDINI, 2012; DING; YU; MOU, 2002). A adição de sais como o acetato de amônio em relação ao fosfato de sódio, por exemplo, melhora a interação dos analitos com a fase móvel e a estacionária. A presença de um sal condutor é essencial para detecção amperométrica, uma vez que a reação no eletrodo é dependente da existência de fluxo de elétrons (corrente) entre a fase móvel (analitos) e a superfície do detector (SANTOS, et al. 2011).

Sendo assim, foi escolhido então o acetato de amônio como o sal para que fossem continuados os testes na coluna de separação C18. O ajuste de pH foi realizado com ácido acético. Novamente foram testados todos os parâmetros citados anteriormente (concentração do sal, proporção de metanol:água, pH e aditivos). Foi realizada também a otimização da temperatura do forno de coluna, no intuito de melhorar a separação e se possível diminuir o tempo de corrida. Neste sentido, a variação de temperatura foi estudada de 20 a 45°C  $\pm$  1°C. Após estes testes, o perfil de separação para os ansiolíticos havia demonstrado melhora, entretanto, ainda não era satisfatória devido a existência de coeluições. Optou-se finalmente pela utilização de uma coluna, ainda de C18, mas com superior capacidade de separação. A coluna de 150 mm foi substituída por uma coluna de 250 mm, com mesmo diâmetro e tamanho de partícula da anterior (4,6 mm, 5  $\mu$ m). As condições cromatográficas que apresentaram o melhor perfil de separação podem ser encontradas na Figura 16.

Figura 16: Cromatograma de separação em fase reversa dos fármacos identificados no gráfico na concentração de  $50 \text{ mg L}^{-1}$ . Condições: fase móvel acetato de amônio  $50 \text{ mmol L}^{-1}$ ; pH 6,5; metanol 45 % (v/v); acetonitrila 5 % (v/v); SDS  $1 \text{ mmol L}^{-1}$ ; coluna C18 (250 mm); potencial de detecção +0,8 V (0,4 s); potenciais de limpeza: +1,0 V (0,4 s) e -0,2 V (1,2 s); temperatura forno da coluna  $45^\circ\text{C}$ ; fluxo  $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ .



Fonte: Autora.

Dos nove ansiolíticos que foram escolhidos para iniciar o trabalho (alprazolam, bromazepam, clonazepam, clordiazepóxido, diazepam, medazepam, midazolam, flurazepam, lorazepam), apenas cinco puderam ser separados nas condições otimizadas com boa resolução. Os demais compostos não eluíram da coluna até 80 minutos da corrida cromatográfica. É provável que a interação com SDS (pareamento iônico) tenha retido os compostos na coluna de forma excessiva. O próximo passo para este método seria avaliar condições que diminuíssem o tempo de cada varredura, para que fossem incluídos mais fármacos na separação para então, iniciar o processo de validação.

Este método, contudo, não foi validado até o momento. A esta etapa de desenvolvimento do trabalho, ocorreu a introdução da coluna com fase estacionária de características diferenciadas de polaridade (fase bifenil). Os testes para a otimização do método a análise de multiclassas de adulterantes passaram a ser executados, portanto, nesta nova fase estacionária.

### 5.1.2 Cromatografia em Bifenil

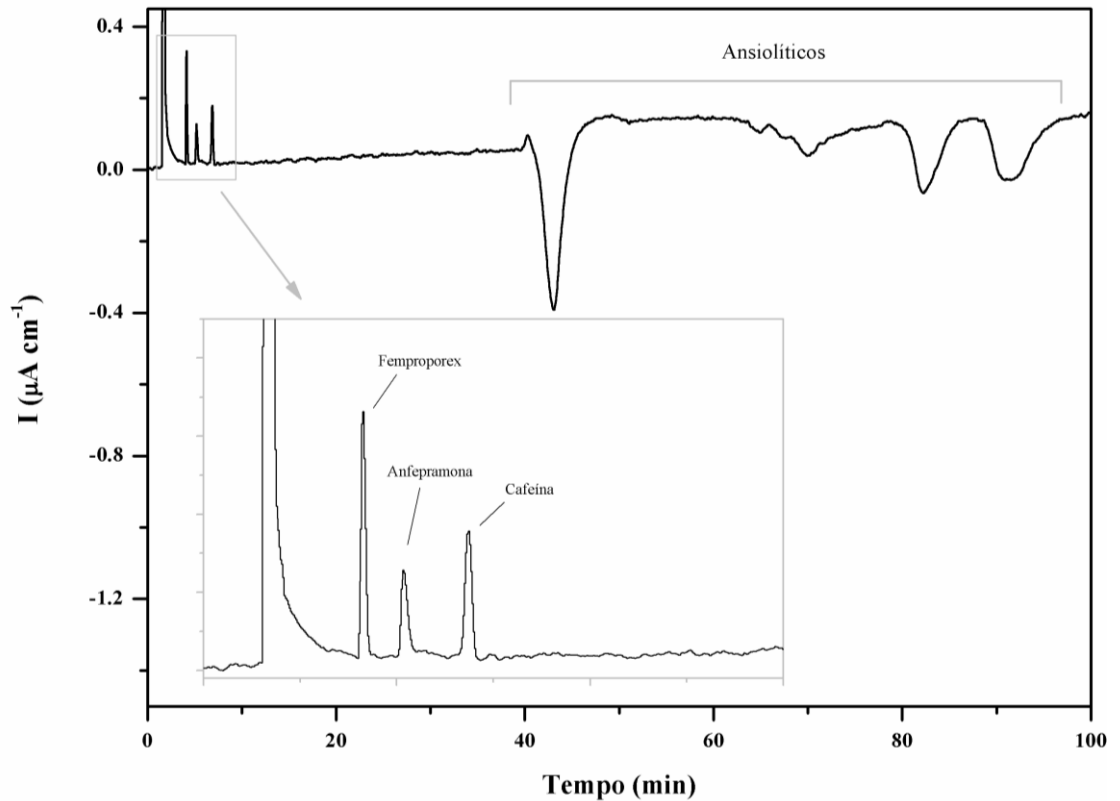
Quando comparada com uma coluna C18, a coluna de fase estacionária bifenil é capaz de promover maior seletividade devido principalmente, à sua capacidade de formação de ligações  $\pi$ - $\pi$  com compostos aromáticos (MALDANER; COLLINS; JARDIM, 2010). Observando-se as estruturas dos fármacos de interesse na Tabela 4, item 3.4, é possível dizer que a maioria destes será capaz de interagir em maior ou menor intensidade, com este tipo de material, já que a maior parte possui pelo menos um anel aromático em sua molécula.

Partindo-se das condições previamente conhecidas e que normalmente se repetiam para a maioria dos testes já realizados como, por exemplo, apesar de serem testados vários pHs, todos os testes mostraram que pHs iguais ou muito próximos a 4,0 eram mais favoráveis para a separação em que não era utilizado aditivo do tipo SDS. Da mesma forma, temperaturas abaixo de 40°C promoviam uma separação mais ruidosa, enquanto temperaturas acima (até 45°C, limite do forno da coluna), não promoviam mudanças significativas. Desta forma, estes dois parâmetros foram fixados para prosseguimento da otimização.

O primeiro teste realizado na coluna bifenil foi bastante positivo, pois se percebeu que compostos como anfepramona, femproporex e cafeína, que antes eluíam muito rápido da coluna C18, agora se mostravam bem resolvidos até oito minutos de análise cromatográfica, ou seja, a interação com a fase estacionária foi efetiva. Estes compostos são de grande interesse analítico visto que muitos trabalhos trazem relatos de casos de adulteração com estes fármacos utilizados para emagrecimento (CARVALHO, et al. 2011; DOMÉNECH-CARBÓ, et al. 2013). Por outro lado, sibutramina e sinefrina, continuaram eluindo tão rápido quanto o volume morto da coluna. Embora estes também sejam fármacos de grande importância para análise em amostras reais de suplementos, foi decidido nesta etapa, pela exclusão destes fármacos da separação cromatográfica.

Na Figura 17 é possível perceber que as condições testadas não foram favoráveis para a separação dos nove ansiolíticos testados desde o início do trabalho. Assim, a otimização seguiu no sentido de melhorar a separação dos benzodiazepínicos, mantendo os anorexígenos e a cafeína na separação, para então, adicionar mais classes de fármacos ao método analítico.

Figura 17: Cromatograma de separação em fase reversa. Femproporex, anfepramona e cafeína a  $20 \text{ mg L}^{-1}$ . Condições: fase móvel acetato de amônio  $5 \text{ mmol L}^{-1}$ ; pH 4,0; metanol 45 % (v/v); coluna Bifenil (150 mm); potencial de detecção  $+0,8 \text{ V}$  (0,4 s); potenciais de limpeza:  $+1,0 \text{ V}$  (0,4 s) e  $-0,2 \text{ V}$  (1,2 s); temperatura forno da coluna  $40^\circ\text{C}$ ; fluxo  $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ .



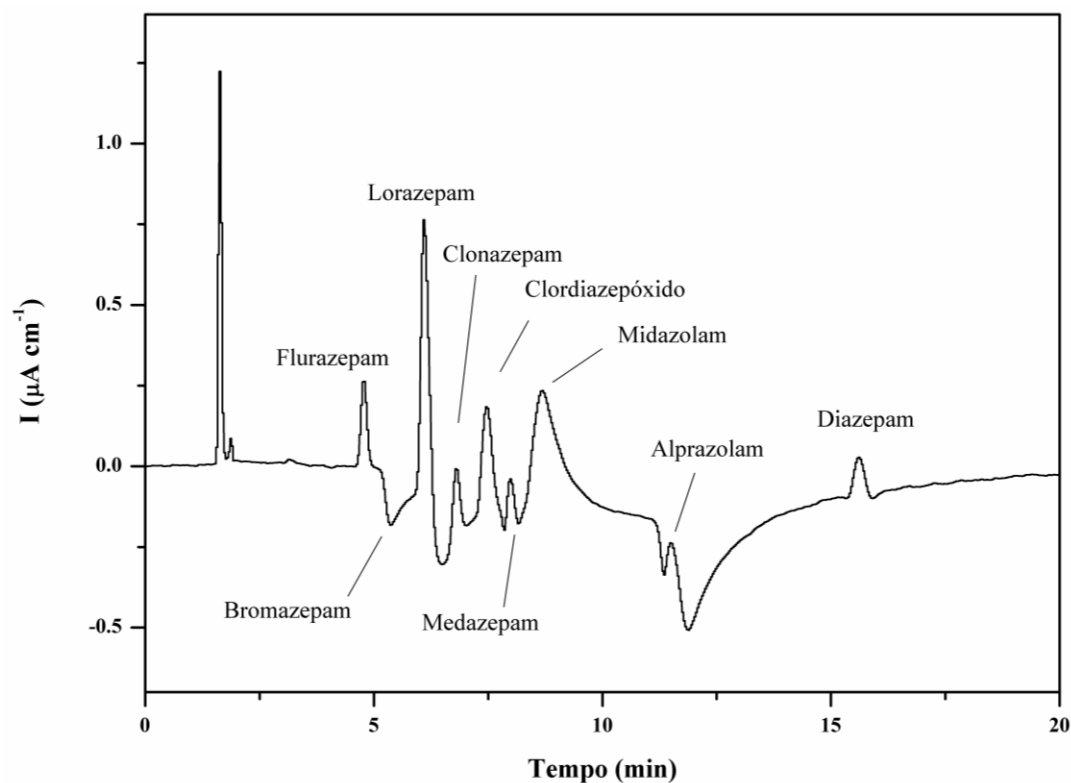
Fonte: Autora.

A continuação dos testes envolveu mais uma vez, variações na concentração do acetato de amônio, modificações na proporção de metanol:água e uso de aditivos (acetonitrila,  $\beta$ -ciclodextrina, octil e dodecilsulfato de sódio). A melhor condição obtida para a separação dos benzodiazepínicos pode ser encontrada na Figura 18 (aumento da proporção de metanol na fase móvel, de 45 para 70 %). Embora a separação ainda não estivesse totalmente adequada, pois é possível observar uma variação indesejável da linha base e ademais, alguns picos não possuem boa resolução, foi possível perceber a melhora na separação já nos primeiros testes realizados. Além disso, o tempo de análise foi reduzido drasticamente em relação às melhores condições obtidas anteriormente.

Para identificação dos analitos e de seu respectivo tempo de retenção, cada um dos compostos sempre era injetado separadamente a cada novo teste de fase móvel. Ao observar o comportamento característico dos fármacos alprazolam, bromazepam, clordiazepóxido e

medazepam (Figuras 19, 20, 21 e 22), foi possível perceber que estes “desestabilizavam” a linha base do cromatograma, tornando o processo de integração do pico para fins de quantificação, uma tarefa bastante complexa. Mesmo com todo o cuidado diário inicial de estabilização e limpeza de todo o sistema cromatográfico, bem como do eletrodo, nenhum dos testes realizados manteve um comportamento padrão para quaisquer dessas substâncias. Mais uma vez, optou-se pela exclusão destes fármacos da separação cromatográfica.

Figura 18: Cromatograma de separação em fase reversa dos fármacos identificados no gráfico: Flurazepam 5 mg L<sup>-1</sup>, Bromazepam 100 mg L<sup>-1</sup>, Lorazepam 80 mg L<sup>-1</sup>, Clonazepam 20 mg L<sup>-1</sup>, Clordiazepóxido 80 mg L<sup>-1</sup>, Medazepam 40 mg L<sup>-1</sup>, Midazolam 40 mg L<sup>-1</sup>, Alprazolam 60 mg L<sup>-1</sup>, Diazepam 60 mg L<sup>-1</sup>. Condições: fase móvel acetato de amônio 10 mmol L<sup>-1</sup>; pH 4,0; metanol 70 % (v/v); β-ciclodextrina 0,1 mmol L<sup>-1</sup>; coluna Bifenil (150 mm); potencial de detecção +0,8 V (0,4 s); potenciais de limpeza: +1,0 V (0,4 s) e -0,2 V (1,2 s); temperatura forno da coluna 40°C; fluxo 1,0 mL min<sup>-1</sup>.

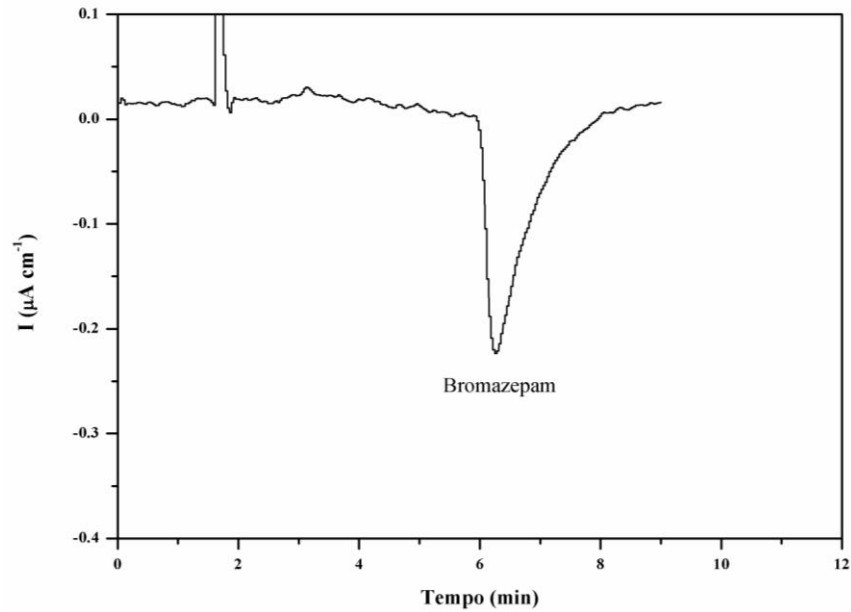


Fonte: Autora.

A seguir podem ser visualizados os cromatogramas individuais correspondentes aos compostos, alprazolam, bromazepam, clordiazepóxido e medazepam, retirados do método em processo de otimização.

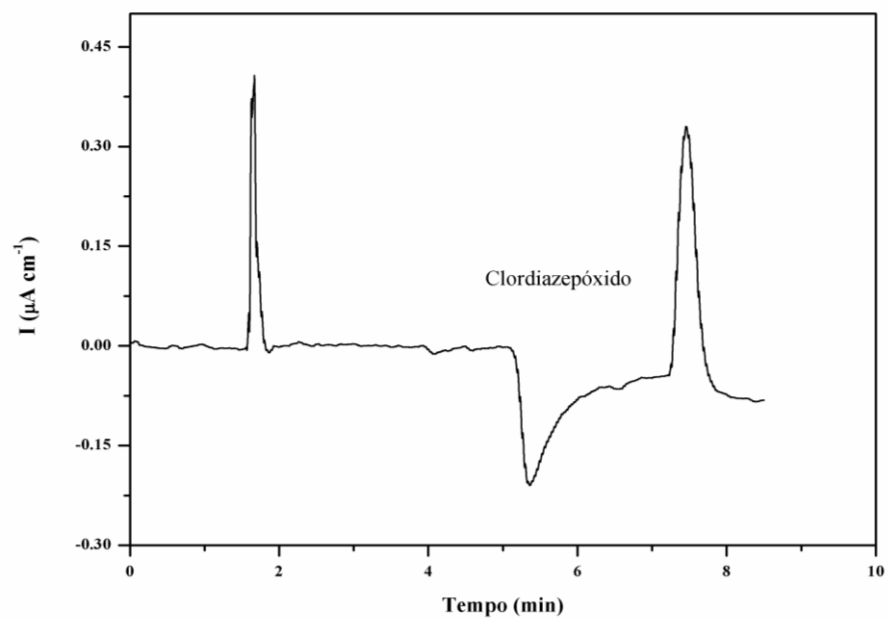


Figura 19: Cromatograma de separação em fase reversa para o Bromazepam 100 mg L<sup>-1</sup>. Condições: fase móvel acetato de amônio 10 mmol L<sup>-1</sup>; pH 4,0; metanol 70 % (v/v); β-ciclodextrina 0,1 mmol L<sup>-1</sup>; coluna Bifenil (150 mm); potencial de detecção +0,8 V (0,4 s); potenciais de limpeza: +1,0 V (0,4 s) e -0,2 V (1,2 s); temperatura forno da coluna 40°C; fluxo 1,0 mL min<sup>-1</sup>.



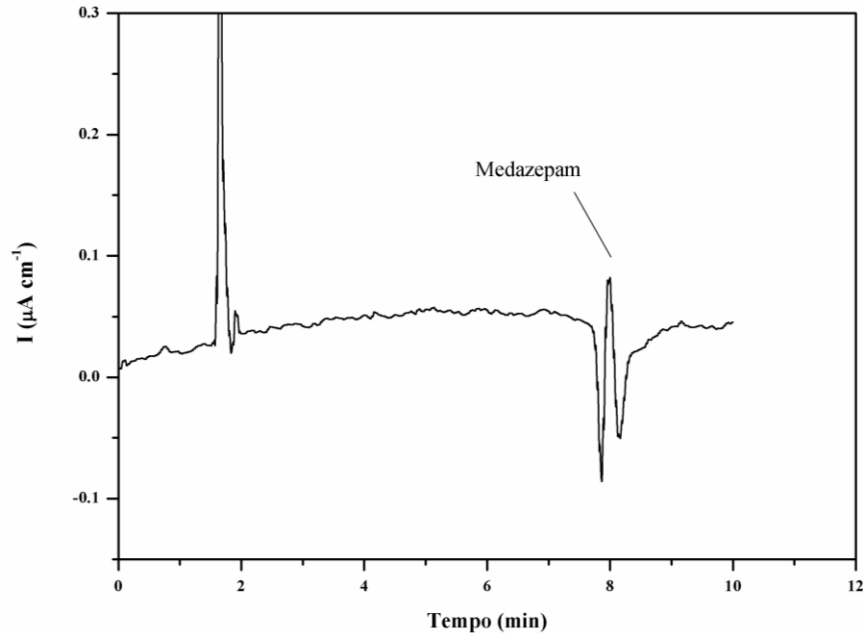
Fonte: Autora.

Figura 20: Cromatograma de separação em fase reversa para o Clordiazepóxido 80 mg L<sup>-1</sup>. Condições: fase móvel acetato de amônio 10 mmol L<sup>-1</sup>; pH 4,0; metanol 70 % (v/v); β-ciclodextrina 0,1 mmol L<sup>-1</sup>; coluna Bifenil (150 mm); potencial de detecção +0,8 V (0,4 s); potenciais de limpeza: +1,0 V (0,4 s) e -0,2 V (1,2 s); temperatura forno da coluna 40°C; fluxo 1,0 mL min<sup>-1</sup>.



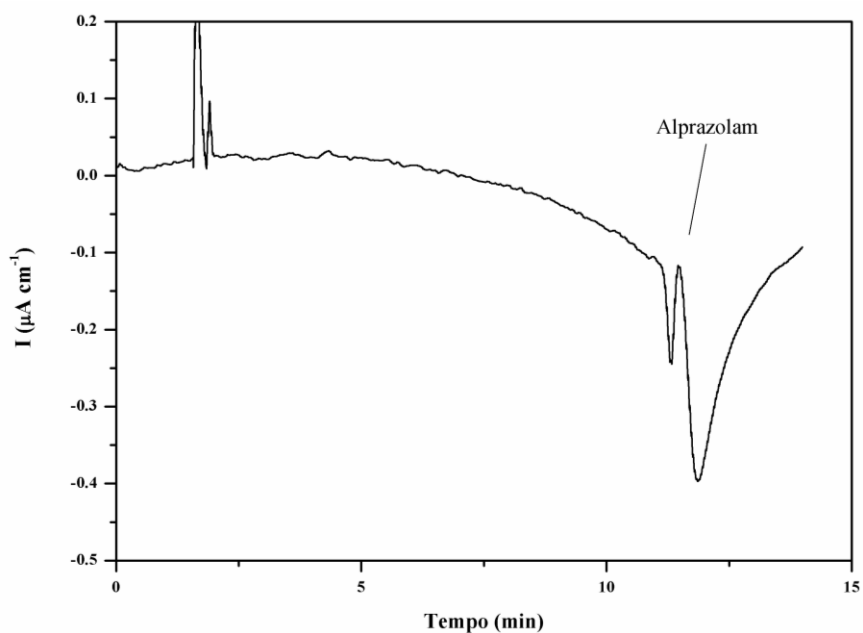
Fonte: Autora.

Figura 21: Cromatograma de separação em fase reversa para o Medazepam  $40 \text{ mg L}^{-1}$ . Condições: fase móvel acetato de amônio  $10 \text{ mmol L}^{-1}$ ; pH 4,0; metanol 70 % (v/v);  $\beta$ -ciclodextrina  $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ ; coluna Bifenil (150 mm); potencial de detecção  $+0,8 \text{ V}$  (0,4 s); potenciais de limpeza:  $+1,0 \text{ V}$  (0,4 s) e  $-0,2 \text{ V}$  (1,2 s); temperatura forno da coluna  $40^\circ\text{C}$ ; fluxo  $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ .



Fonte: Autora.

Figura 22: Cromatograma de separação em fase reversa para o Alprazolam  $60 \text{ mg L}^{-1}$ . Condições: fase móvel acetato de amônio  $10 \text{ mmol L}^{-1}$ ; pH 4,0; metanol 70 % (v/v);  $\beta$ -ciclodextrina  $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ ; coluna Bifenil (150 mm); potencial de detecção  $+0,8 \text{ V}$  (0,4 s); potenciais de limpeza:  $+1,0 \text{ V}$  (0,4 s) e  $-0,2 \text{ V}$  (1,2 s); temperatura forno da coluna  $40^\circ\text{C}$ ; fluxo  $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ .



Fonte: Autora.

Após a retirada destes compostos do método proposto, restaram 5 ansiolíticos (flurazepam, lorazepam, clonazepam, midazolam e diazepam), 2 anorexígenos (anfepramona e femproporex) e 1 estimulante (cafeína) totalizando 8 analitos satisfatoriamente separados. Iniciou-se desta forma, uma nova etapa de otimização do método. Os passos seguintes consistiram em uma série de testes (que mais tarde fariam parte do estudo de seletividade do método) para inclusão de novos fármacos de diferentes classes farmacológicas que possuem interesse analítico, dentro da temática dos suplementos alimentares.

Sendo assim, os seguintes compostos (Tabela 6) foram testados nas condições previamente otimizadas (F.M.: acetato de amônio 10 mmol L<sup>-1</sup>; pH 4,0; metanol 70 % (v/v); coluna Bifenil 150 mm; potencial de detecção +0,8 V (0,4 s); potenciais de limpeza: +1,0 V (0,4 s) e -0,2 V (1,2 s); temperatura forno da coluna 40°C; fluxo 1,0 mL min<sup>-1</sup>), sendo a β-ciclodextrina na concentração de 0,1 mmol L<sup>-1</sup> retirada desta composição.

Tabela 6: Fármacos testados para tentativa de inclusão no método de separação cromatográfico em coluna bifenil com detecção amperométrica pulsada (HPLC-PAD).

<b>Classe Farmacológica</b>	<b>Fármacos Testados<sup>1,2</sup></b>	<b>Sinal</b> (Positivo x Negativo)
Diuréticos	<b>Furosemida</b>	+
	Hidroclorotiazida	-
	Espironolactona	-
	Amilorida	-
	Acetozolamida	+
	Clortalidona	+
Antidepressivos	Venlafaxina	+
	Paroxetina	+
	Nortriptilina	+
	Imipramina	+
	Amitriptilina	+
	Hordequina	-
	Tiramina	-
	Octopamina	-
	Bupropiona	-
	Citalopram	+
	Seleginina	+
<b>Fluoxetina</b>	+	

<b>Classe Farmacológica</b>	<b>Fármacos Testados<sup>1,2</sup></b>	<b>Sinal</b> (Positivo x Negativo)
Antidepressivos	<b>Sertralina</b>	+
	Vardenafil	+
Estimulantes sexuais	<b>Tadalafil</b>	+
	<b>Sildenafil</b>	+
	<b>Ioimbina</b>	+
Hormônios	Testosterona	-
Laxantes	Fenolftaleína	+
	<b>Bisacodil</b>	+
Antidiabéticos	Clorpropramida	+
	Metformina	-
	Glibenclamida	-
	Glipizida	+
Anti-hipertensivo	Valsartan	+
	Propranolol	+
	Atenolol	-
	Captopril	+
	Metoprolol	+
	Losartan	+
	Enalapril	-

<sup>1</sup> Todos os compostos foram testados na concentração de 20 mg L<sup>-1</sup>.

<sup>2</sup> Compostos destacados são aqueles incluídos no método.

Fonte: Autora.

Conforme já era esperado, dentre os compostos testados, foi possível observar comportamentos diferenciados entre as classes de fármacos. Enquanto algumas das substâncias injetadas eluíram rapidamente da coluna, demonstrando pouca ou nenhuma interação com a mesma, outras comportaram-se de forma oposta, indicando uma forte interação com a fase bifênica, pois a eluição de alguns picos ultrapassava 5 minutos. De uma forma generalista, dos 37 fármacos injetados, 25 apresentaram algum tipo de sinal positivo. O critério para que as substâncias que mostraram sinal positivo continuassem no desenvolvimento do método foi a observação das características do sinal e a importância do fármaco em questão nas amostras de suplementos alimentares. Assim, apenas venlafaxina, seleginina, fluoxetina, sertralina, nortriptilina, imipramina, amitriptilina, clorpropramida, glipizida, propranolol, metoprolol, vardenafil, tadalafil, sildenafil, ioimbina, bisacodil e

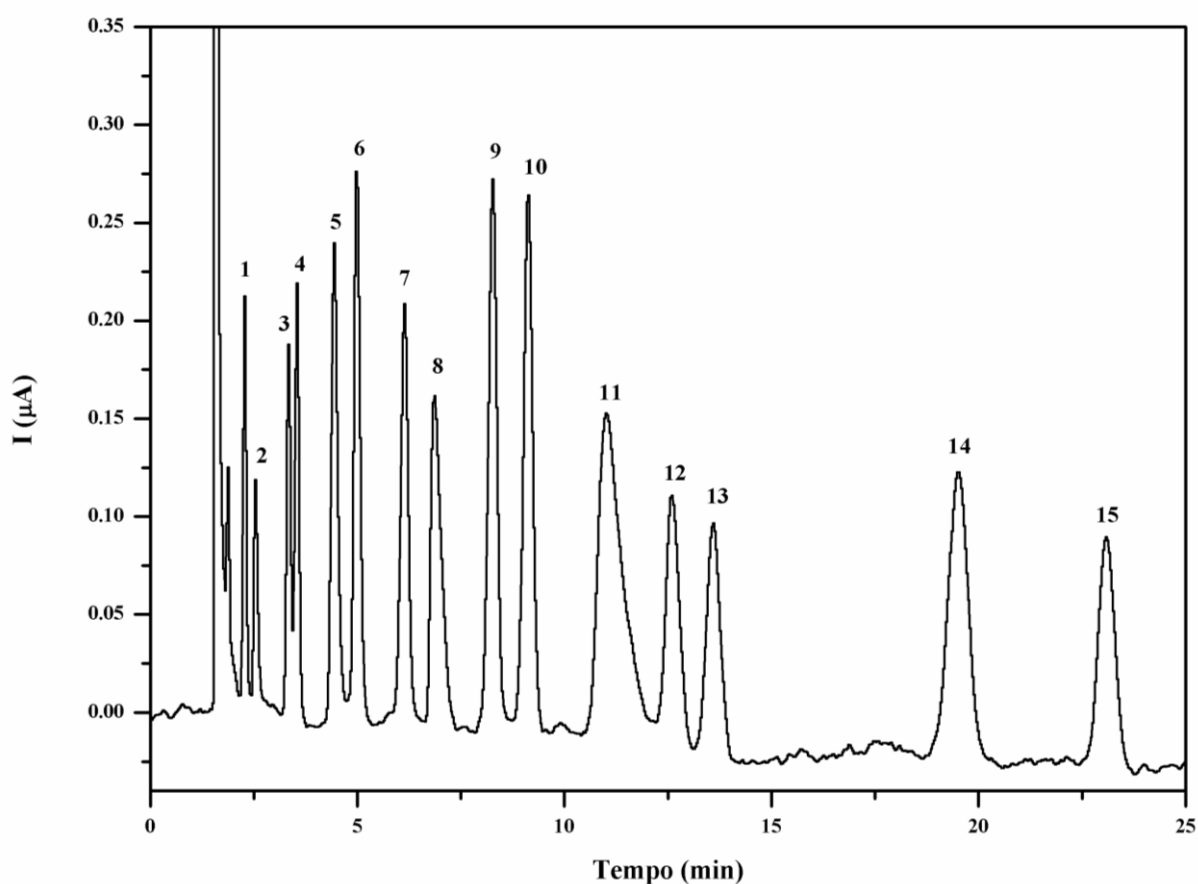
furosemida (17 compostos) foram elencadas para continuação dos estudos por apresentarem tais características.

Devido ao conhecimento prévio de coincidência de tempo de retenção para alguns dos fármacos testados, o segundo critério para escolha daqueles que seriam mantidos nos testes de otimização do método, foi a análise teórica daqueles que ofereciam maior importância analítica pela natureza das amostras e que provavelmente teriam mais chances de serem encontrados (CHEN; BRYDEN, 2015; SKALICKA-WOZZNIAK; GEORGIEV; ORHAN, 2016; MOREIRA, et al. 2016; CARVALHO, et al. 2010 (a); CARVALHO, et al. 2012). De tal modo, 7 compostos foram incluídos no método de separação cromatográfica sendo estes, furosemida, fluoxetina, sertralina, tadalafil, sildenafil, ioimbina e bisacodil.

Embora fosse notável que muitos analitos possuíam bons sinais ao serem injetados individualmente (picos bem resolvidos, finos, sem cauda e estáveis na linha base), a capacidade de separação da coluna era limitada devido as suas características físicas (dimensões e tamanho de partícula). O cromatógrafo utilizado para realização das separações, mais especificamente a bomba de alta pressão, possuíam adicionalmente uma limitação de pressão no sistema. Por exemplo, ao testarem-se colunas de diâmetro de partícula menor que 5  $\mu\text{m}$ , as conexões não eram capazes de resistir a pressão gerada. Além do aumento do comprimento da coluna como forma de crescer o número de pratos teóricos, a outra opção convencional seria diminuir o tamanho de partícula, o que poderia proporcionar uma melhor separação e permitiria a adição de mais compostos ao método de *screening* (LANÇAS, 2011). Para a coluna com fase estacionária bifenil, nenhuma destas opções era possível naquele momento.

Logo, após a criteriosa escolha dos fármacos, deu-se continuidade aos testes de aperfeiçoamento das condições da fase móvel. Nesta oportunidade, o ajuste realizado em relação a concentração de metanol, foi suficiente para obter-se um perfil de separação satisfatório para os 15 compostos escolhidos. O cromatograma com as condições finais apresentadas pelo método pode ser visto na Figura 23. Apenas algumas ressalvas serão feitas a respeito de duas escolhas para o método de separação. Para os picos 3 e 4, referentes a ioimbina e cafeína respectivamente, é evidente que não há resolução entre os picos. Mesmo assim, os dois fármacos foram mantidos no método, uma vez que são importantes por serem relatados em trabalhos anteriores e por se tratar de um método multiclases de *screening*.

Figura 23: Cromatograma de separação em fase reversa de multiclasses de adulterantes: (1) Femproporex 3 mg L<sup>-1</sup> (2) Anfepramona 100 mg L<sup>-1</sup> (3) Ioimbina 3 mg L<sup>-1</sup> (4) Cafeína 40 mg L<sup>-1</sup> (5) Furosemida 5 mg L<sup>-1</sup> (6) Fluoxetina 30 mg L<sup>-1</sup> (7) Flurazepam 5 mg L<sup>-1</sup> (8) Sildenafil 80 mg L<sup>-1</sup> (9) Lorazepam 10 mg L<sup>-1</sup> (10) Clonazepam 20 mg L<sup>-1</sup> (11) Midazolam 10 mg L<sup>-1</sup> (12) Sertralina 20 mg L<sup>-1</sup> (13) Tadalafil 10 mg L<sup>-1</sup> (14) Bisacodil 20 mg L<sup>-1</sup> (15) Diazepam 60 mg L<sup>-1</sup>. Condições: fase móvel acetate de amônio 10 mmol L<sup>-1</sup> (pH 4.0); metanol 64 % (v/v); coluna bifenil; potencial de detecção: +0.8 V (0.4s); potenciais de limpeza: +1.0 V (0.4s) e -0.2 V (1.2s). Fluxo: 1.0 mL/min; temperatura: 40°C.



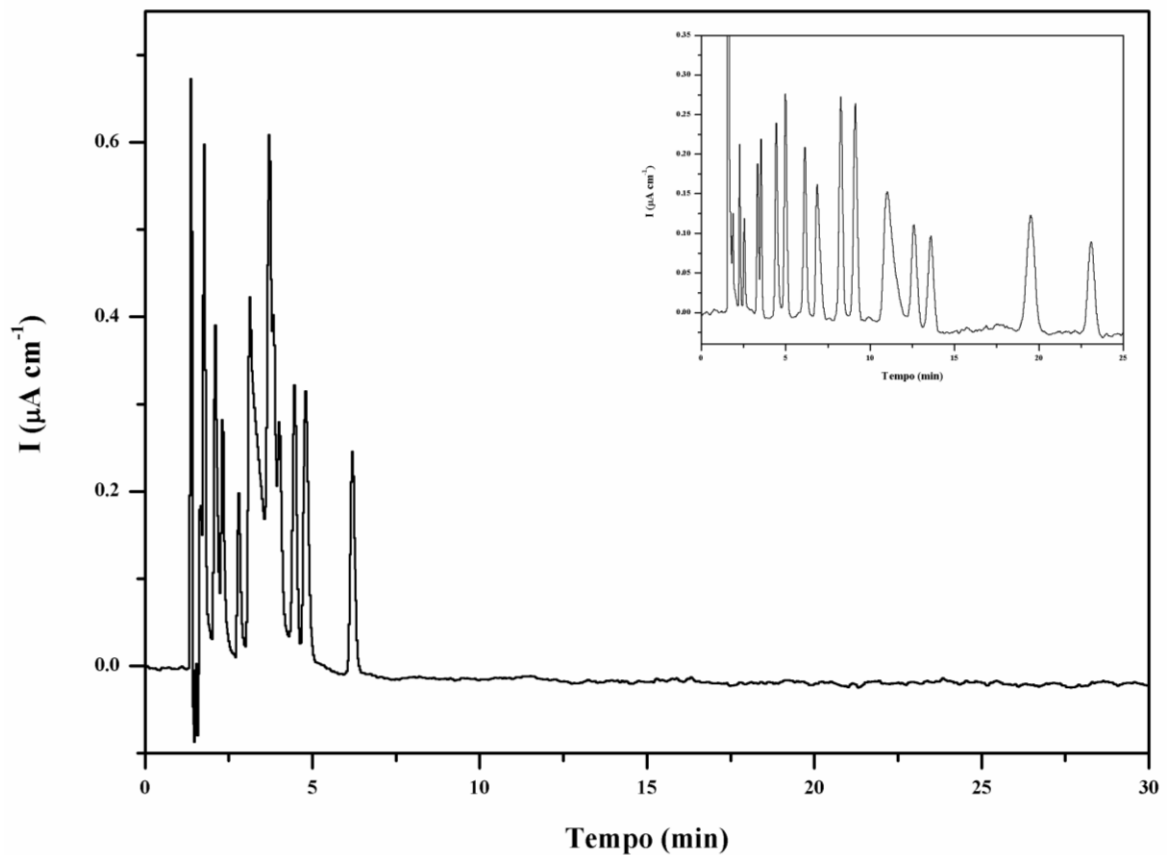
Fonte: Autora.

Como pode ser observado no cromatograma da Figura 23, os fármacos 1 (femproporex) e 2 (anfepramona); 3 (ioimbina) e 4 (cafeína) possuem visualmente baixa resolução. A preferência por manter ambos os compostos no método se deu pelo fato de que em ambos os casos os compostos são de mesma classe farmacológica (2 anorexígenos e 2 estimulantes). Mesmo que não fosse esperada a presença de mais de um composto da mesma classe em amostras de suplementos, caso ocorresse algum episódio neste sentido, a análise seria qualitativa, uma vez que o método é considerado de *screening* de multiclasses de fármacos.

Ao final da otimização do perfil cromatográfico para os 15 compostos, finalmente iniciaram-se os ensaios de validação. As figuras de mérito para o método de separação são discutidas no item 5.1.5.

Para demonstrar a influência da fase estacionária na separação dos compostos, como teste final, o método otimizado foi reproduzido nas mesmas condições, porém, utilizando a coluna C18 anteriormente testada. Conforme previsto, devido a polaridade e massa molecular características das moléculas de interesse, é possível notar que a os grupos bifenil promovem uma melhor interação com os analitos, permitindo uma separação satisfatória.

Figura 24: Cromatograma de separação em fase reversa de multiclassas de adulterantes: (1) Femproporex 3 mg L<sup>-1</sup> (2) Anfepramona 100 mg L<sup>-1</sup> (3) Ioimbina 3 mg L<sup>-1</sup> (4) Cafeína 40 mg L<sup>-1</sup> (5) Furosemida 5 mg L<sup>-1</sup> (6) Fluoxetina 30 mg L<sup>-1</sup> (7) Flurazepam 5 mg L<sup>-1</sup> (8) Sildenafil 80 mg L<sup>-1</sup> (9) Lorazepam 10 mg L<sup>-1</sup> (10) Clonazepam 20 mg L<sup>-1</sup> (11) Midazolam 10 mg L<sup>-1</sup> (12) Sertralina 20 mg L<sup>-1</sup> (13) Tadalafil 10 mg L<sup>-1</sup> (14) Bisacodil 20 mg L<sup>-1</sup> (15) Diazepam 60 mg L<sup>-1</sup>. Condições: fase móvel acetate de amônio 10 mmol L<sup>-1</sup> (pH 4.0); metanol 64 % (v/v); coluna C18; potencial de detecção: +0.8 V (0.4s); potenciais de limpeza: +1.0 V (0.4s) e -0.2 V (1.2s). Fluxo: 1.0 mL/min; temperatura: 40°C.



Fonte: Autora.

### 5.1.3 Detecção Pulso–Amperométrica em Eletrodo de Ouro (HPLC–PAD)

Conforme mencionado no item 5.1.1, a otimização do potencial de detecção consiste na etapa que precede o início do desenvolvimento do método de separação. Para este trabalho, a escolha do potencial de detecção envolveu, assim como no desenvolvimento dos métodos por C18 e bifenil, duas etapas distintas. De acordo com a estratégia inicial, primeiramente seriam analisados os ansiolíticos (alprazolam, bromazepam, clordiazepóxido, clonazepam, diazepam, flurazepam, medazepam, midazolam e lorazepam), seguidos dos estimulantes (caféina e sinefrina) e anorexígenos (sibutramina, anfepramona e femproporex). Desta forma, o estudo partiu do comportamento eletroquímico dos compostos citados, na presença de fosfato de sódio, primeiro sal testado como componente da fase móvel. O resultado desta otimização inicial, mesmo com exclusões e inclusões de compostos no método de separação foi mantido como parâmetro para definição do potencial de detecção. Ao final do desenvolvimento do método então, como segunda etapa no estudo do comportamento eletroquímico dos fármacos e escolha do potencial de detecção, foi realizado o ensaio de varredura de potenciais para os compostos que foram adicionados ao método e que, portanto, não tinham seu comportamento estudado no eletrodo de ouro até o momento. Este segundo estudo foi realizado na presença de eluente acetato de amônio  $5 \text{ mmol L}^{-1}$  e em pH 4,0 ajustado com ácido acético.

Os potenciais foram estudados no eletrodo de ouro na faixa de  $-0,2 \text{ V}$  a  $+1,0 \text{ V}$ , variando-se  $0,2 \text{ V}$  a cada ensaio. As injeções foram feitas diretamente no eletrodo (sem coluna) iniciando-se em  $-0,2$ ; após  $0,0$ ;  $+0,2$ ;  $+0,4$ ;  $+0,6$ ;  $+0,8$  e finalmente  $+1,0 \text{ V}$ . Os potenciais de limpeza utilizados ( $+1,0 \text{ V} - 0,4 \text{ s}$  e  $-0,2 \text{ V} - 1,2$ ) foram previamente otimizados em trabalho realizado por Carvalho e colaboradores (2013).

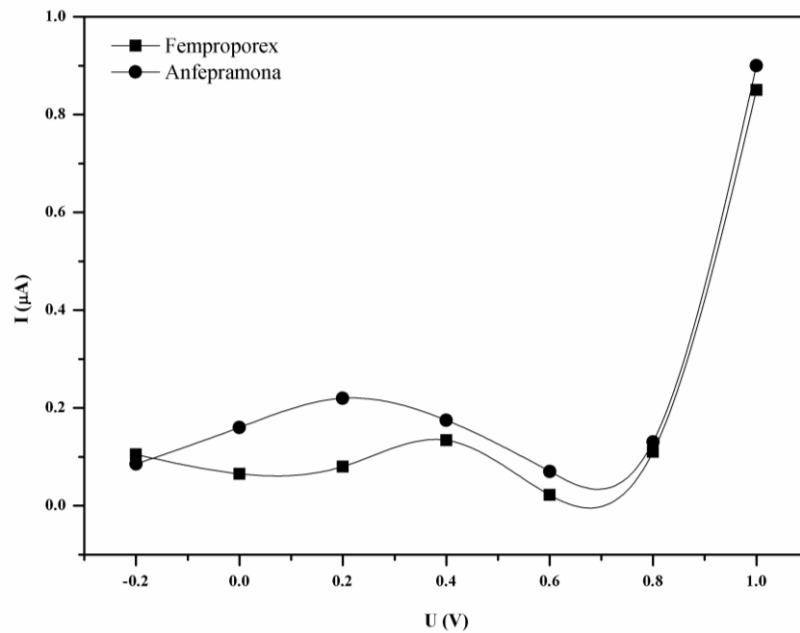
O comportamento eletroquímico dos compostos depende, entre outros fatores, das funções químicas presentes em suas moléculas. De acordo com Flanagan e coautores (2005), a maioria dos grupos funcionais apresenta algum grau de eletroatividade. Métodos envolvendo um ou mais grupos oxidáveis e reduzíveis na mesma molécula são comuns. Em geral, compostos eletroativos são tipicamente aromáticos e contém grupos como, por exemplo, hidroxila ( $-\text{OH}$ ), metoxil ( $\text{R}-\text{O}-\text{CH}_3$ ) ou amino ( $\text{R}-\text{NH}_2$ ) uma vez que são capazes de se oxidar ou reduzir frente a determinados eletrodos em condições favoráveis. Todos os fármacos estudados neste trabalho possuem pelo menos um grupamento amina na molécula. Além do mais, todas as moléculas, exceto a caféina, possuem um ou mais anéis aromáticos. Por outro lado, apenas fluoxetina, sertralina e midazolam possuem apenas grupos potencialmente



oxidáveis em suas moléculas (R–NH, R=N). Os outros compostos possuem ambos, sítios oxidáveis e redutíveis na mesma estrutura (R–NH, R=N; R–CO–R, R–X, C≡N, SO<sub>2</sub>, –NO<sub>2</sub>). É possível perceber que em maior ou menor grau, todas as moléculas podem apresentar comportamento eletroativo.

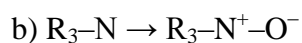
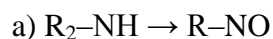
Os voltamogramas hidrodinâmicos obtidos para os compostos foram agrupados de acordo com suas respectivas classes farmacológicas. A seguir podem ser visualizadas as figuras com os resultados obtidos para o comportamento eletroquímico de cada substância.

Figura 25: Voltamogramas hidrodinâmicos de corrente direta (DC) dos compostos de interesse Anfepiramona e Femproporex a 20 mg L<sup>-1</sup> no eletrodo de ouro. Eluente: Fosfato de sódio 5 mmol L<sup>-1</sup>, pH 5,0, fluxo 0,5 mL/min, temperatura ambiente.



Fonte: Autora.

Conforme pode ser visto na Figura 25, os anorexígenos anfepiramona e femproporex possuem sinais de oxidação mais pronunciados em +0,2 e +0,4 V respectivamente. Para ambos os compostos, um sinal bem definido é observado a partir de +0,8 V. Este perfil é apresentado principalmente devido a oxidação do grupo amina, conforme as reações propostas (SOLOMONS; FRIHLE, 2001):

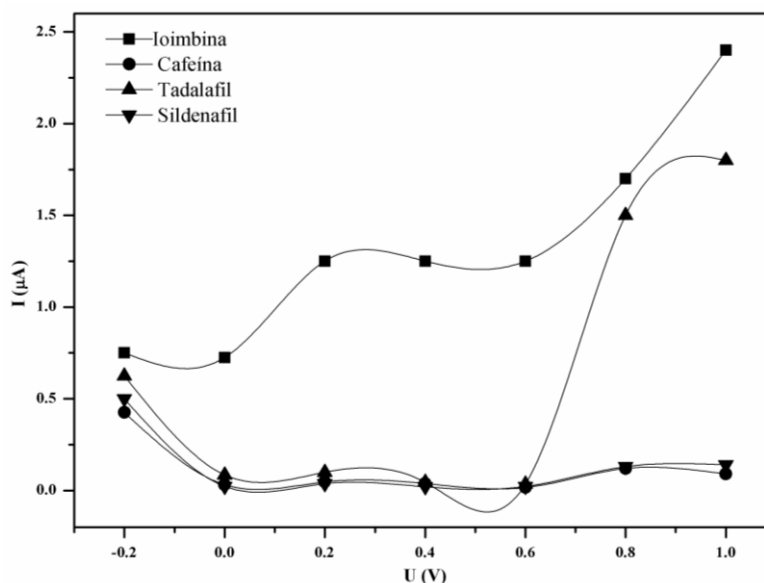


Na verdade, para todos os fármacos estudados é suposto que o mesmo mecanismo irá ocorrer no grupo amina. O comportamento de ambos estes fármacos já foi estudado por voltametria de micropartículas (VMP) em eletrodo de grafite (DOMÉNECH-CARBÓ, et al. 2013). No trabalho citado, os compostos apresentaram sinais de oxidação em potencial +0,2 V em tampão acetato, o que esta de acordo com os sinais observados no eletrodo de Au.

Na sequência, a Figura 26 traz o comportamento para os estimulantes sexuais e cafeína. Para ioimbina e tadalafil, um sinal de oxidação bem definido é observado de +0,8 V a +1,0 V. Para ioimbina, um sinal intenso foi obtido a partir de +0,2 V até +1,0 V. Além da oxidação do grupo amina, o grupo alcoólico presente na estrutura da ioimbina que também pode ser oxidado a uma cetona (SOLOMONS; FRIHLE, 2001) contribuindo para o sinal observado. O esquema da possível reação é o seguinte:



Figura 26: Voltamogramas hidrodinâmicos de corrente direta (DC) dos compostos de interesse Ioimbina, Tadalafil e Sildenafil a 20 mg L<sup>-1</sup> no eletrodo de ouro. Eluente: Fosfato de sódio 5 mmol L<sup>-1</sup>, pH 5,0, fluxo 0,5 mL/min, temperatura ambiente. Cafeína a 20 mg L<sup>-1</sup>. Eluente: Acetato de amônio 5 mmol L<sup>-1</sup>, pH 4,0, fluxo 0,5 mL/min, temperatura ambiente.



Fonte: Autora.

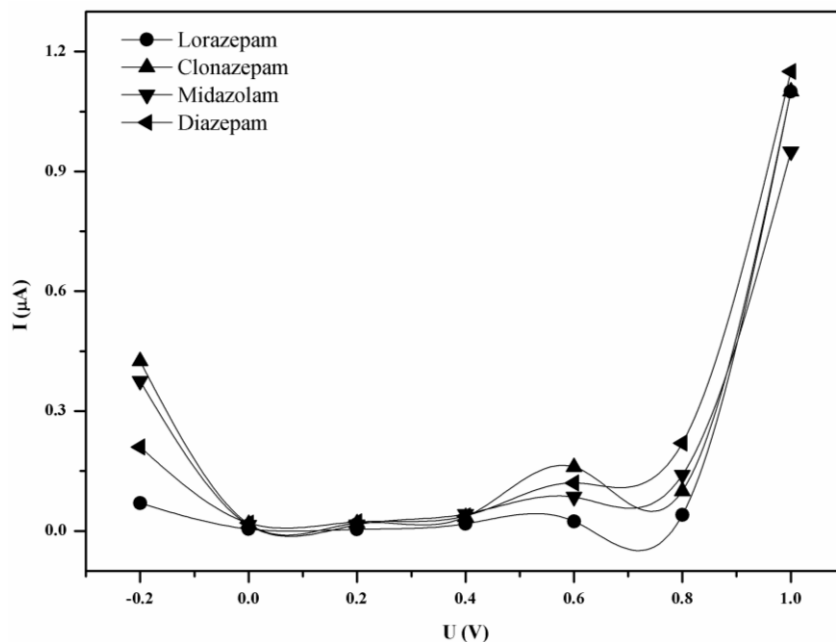
Conforme relatado por Švorc e Kalcher (2014), ioimbina apresentou sinal voltamétrico em tampão Britton–Robson (pH 7,0), iniciando o processo de oxidação em +0,7 V elevando-

se até +1,2 V em eletrodo de carbono vítreo (GCE, do inglês, *glassy carbon electrode*) dopado com boro. Para o tadalafil, o comportamento foi estudado por detecção eletroquímica direta em diferentes eletrodos modificados de carbono vítreo. Esse trabalho mostrou em todos os casos, a oxidação do tadalafil partindo de +0,5 V até +1,2 V (YANG; et al. 2015).

Cafeína e sildenafil possuem um sinal menos intenso na faixa de potenciais investigados, comparado a ioimbina e tadalafil. Entretanto, já é conhecido que a molécula de cafeína tem seu potencial de oxidação relativamente alto (+1,3 V) em eletrodos de carbono (SACIOTO, CERVINI, CAVALHEIRO, 2013; ZHANG, et al. 2017). Neste trabalho, o potencial de +0,8 V é capaz de oxidar cafeína suficientemente para uma detecção sensível. Ainda em relação aos estimulantes estudados, o perfil eletroquímico do sildenafil foi estudado utilizando eletrodo de mercúrio (HMDE) e eletrodos de carbono (BERZAS, et al. 2000; BARANOWSKA, KOPER, MARKOWSKI, 2008). Mais recentemente, este composto foi também sistematicamente estudado em eletrodo de ouro e apresentou sinal de oxidação no potencial de +0,8 V (LOVIĆ et al., 2016) devido a oxidação do anel piperazínico da sua molécula (BARANOWSKA; KOPER; MARKOWSKI, 2009).

Em relação aos ansiolíticos estudados diazepam, midazolam, clonazepam e lorazepam apresentaram uma onda suave de oxidação na região de potencial compreendida entre +0,4 V e +0,7 V. Como pode ser visto, a intensidade da oxidação é claramente mais elevada a partir de +0,8 V. Para esta classe de compostos, a maioria dos estudos indica que os sinais obtidos em diferentes eletrodos podem ser atribuídos a reação de redução irreversível dos grupos amina (MARTINS; et al. 2010; NAGGAR, et al. 2016). Entretanto, no eletrodo de ouro, os sites amínicos presentes nos benzodiazepínicos podem ser oxidados em potenciais mais positivos, o que pode ser comprovado pelos sinais observados nos voltamogramas hidrodinâmicos na Figura 27. Além disso, lorazepam em particular, possui um grupamento hidroxil no anel diazepínico, o qual também poderá ser oxidado a uma cetona (reação c).

Figura 27: Voltamogramas hidrodinâmicos de corrente direta (DC) dos compostos de interesse Lorazepam, Clonazepam, Midazolam e Diazepam a  $20 \text{ mg L}^{-1}$  no eletrodo de ouro. Eluente: Fosfato de sódio  $5 \text{ mmol L}^{-1}$ , pH 5,0, fluxo  $0,5 \text{ mL/min}$ , temperatura ambiente.

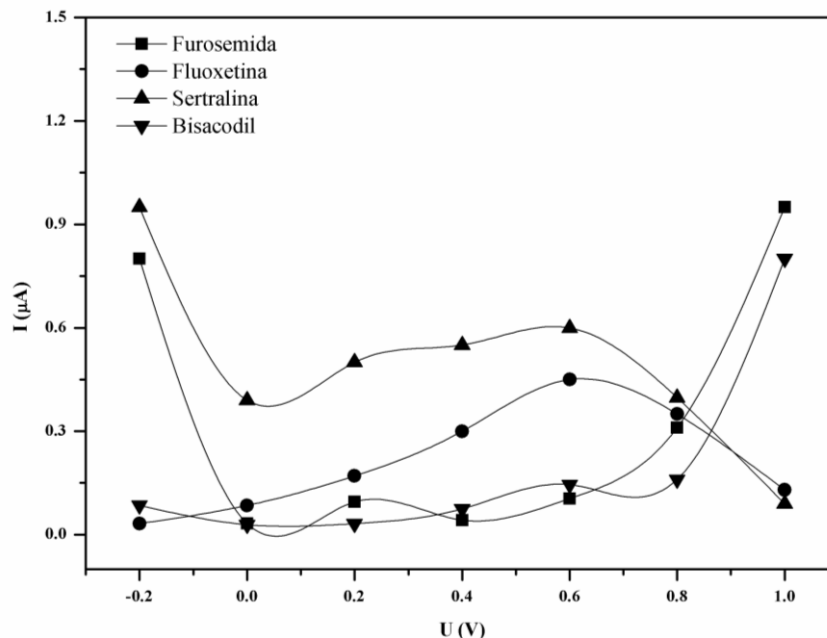


Fonte: Autora.

É importante ressaltar neste momento, que o Flurazepam (fármaco presente no método de separação) não está incluído no estudo do comportamento eletroquímico. Durante o desenvolvimento do trabalho, o padrão sólido para preparo deste analito foi totalmente utilizado. Paralelamente ao período em que o método foi validado, as tentativas de compra diretamente das distribuidoras de medicamentos falharam, mesmo com a posse de receituário. As farmácias de manipulação e distribuidoras alegaram que este princípio ativo não estava mais sendo comercializado. Desta forma, o flurazepam não foi inteiramente excluído do método, entretanto, os estudos de validação foram inviabilizados.

Por fim, foi realizado o estudo do comportamento das demais classes abrangidas pelo método. Os processos reacionais observados na faixa de potenciais estudada para furosemda, fluoxetina, sertralina e bisacodil, na presença de acetato de amônio  $5 \text{ mmol L}^{-1}$  pH 4,0 podem ser encontrados na Figura 28.

Figura 28: Voltamogramas hidrodinâmicos de corrente direta (DC) dos compostos de interesse Furosemida, Fluoxetina, Sertralina e Bisacodil a  $20 \text{ mg L}^{-1}$  no eletrodo de ouro. Eluente: Fosfato de sódio  $5 \text{ mmol L}^{-1}$ , pH 5,0, fluxo  $0,5 \text{ mL/min}$ , temperatura ambiente.



Fonte: Autora.

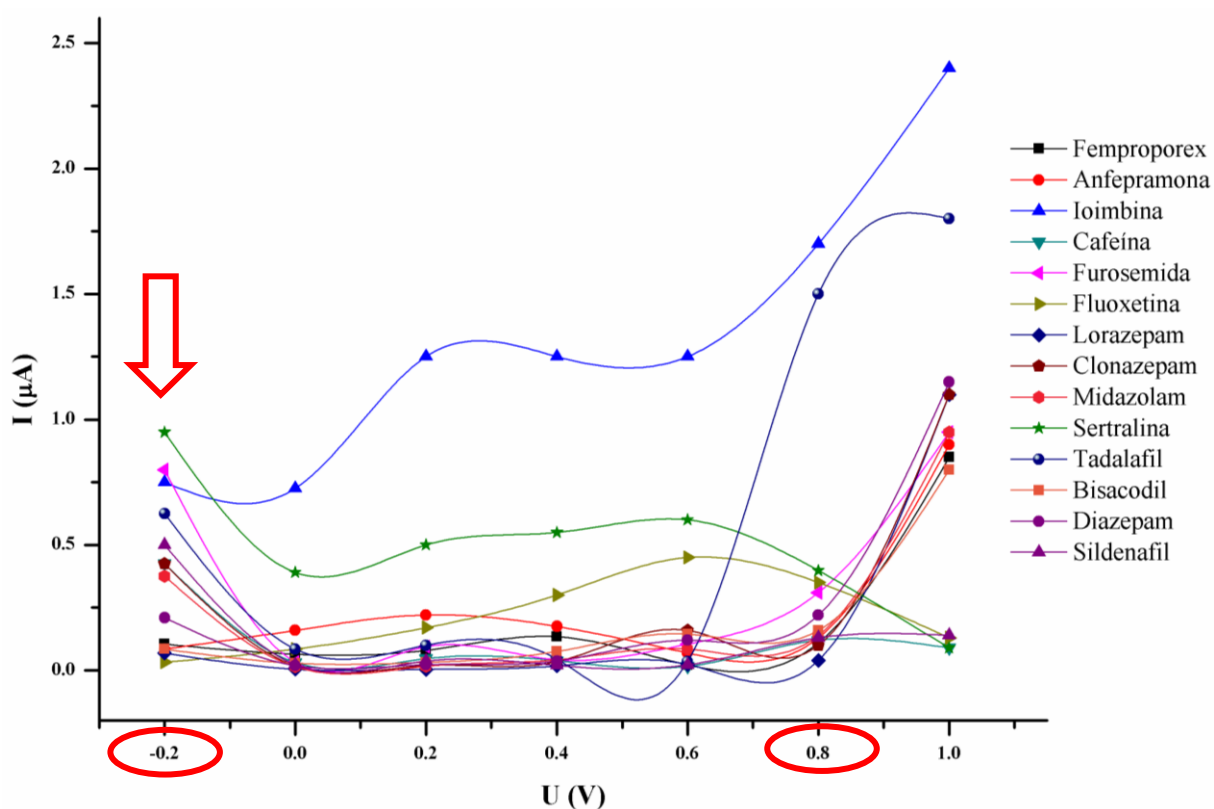
Para os antidepressivos sertralina e fluoxetina, os sinais de oxidação ocorrem entre  $+0,2 \text{ V}$  até  $+0,6 \text{ V}$ . Em comparação, eletrodos feitos de pasta de grafite/grafeno foram utilizados para determinação de fluoxetina (ALIZADEH; AZIZI, 2016) e o comportamento foi similar ao observado neste trabalho. Sertralina foi também estudada em eletrodo modificado de carbono, onde processos de oxidação próximos a  $0,0 \text{ V}$  foram também observados (SHOJA; RAFATI; GHODSI, 2016). Como pode ser visto no voltamograma hidrodinâmico, a sertralina apresentou um processo de oxidação iniciando em  $0,0 \text{ V}$  no eletrodo de ouro. A furosemida, importante diurético, teve um aumento de sinal a partir de  $+0,7 \text{ V}$  até  $+1,0 \text{ V}$  relativo a processos de oxidação (CARVALHO, et al. 2013). Por fim, para o laxante bisacodil, estudos mostraram um sinal de oxidação ao redor de  $+1,0 \text{ V}$  em microeletrodo de ouro (DANESHGAR; NOROUZI; GANJALI, 2009) relativo à oxidação do grupo amina (reação b), similarmente ao comportamento observado no presente trabalho.

Finalmente, para os compostos estudados, é possível notar possíveis processos de redução próximos a  $-0,2 \text{ V}$ . Uma vez que a faixa de potenciais negativos não é apropriada para o eletrodo de ouro devido a facilidade na redução de íons  $\text{H}^+$ , principalmente em meio ácido (pH 4,0), é possível que esse fenômeno mascare ou mesmo sobreponha o sinal eletroquímico

de reações referentes às substâncias na superfície do eletrodo de trabalho e portanto, torna esta região inadequada como escolha do potencial de detecção.

A Figura 29 mostra todos os compostos estudados no mesmo voltamograma, indicando os processos de redução.

Figura 29: Voltamogramas hidrodinâmicos de corrente direta (DC) de todos os compostos de interesse.



Fonte: Autora.

Portanto, baseando-se no comportamento observado para os fármacos no eletrodo de ouro, o potencial de detecção de +0,8 V foi escolhido. Apesar do sinal amperométrico em alguns casos ser mais intenso em potenciais mais elevados que +0,8 V, existem grandes possibilidades de aumento de interferências nesta região. Adicionalmente, uma vez que o ciclo de potenciais aplicado no eletrodo para remoção de substâncias adsorvidas na sua superfície é essencial para a reprodutibilidade de medidas por PAD, a diferença entre os potenciais E1 (detecção) e E2 (limpeza oxidativa) deverá ser a maior possível.

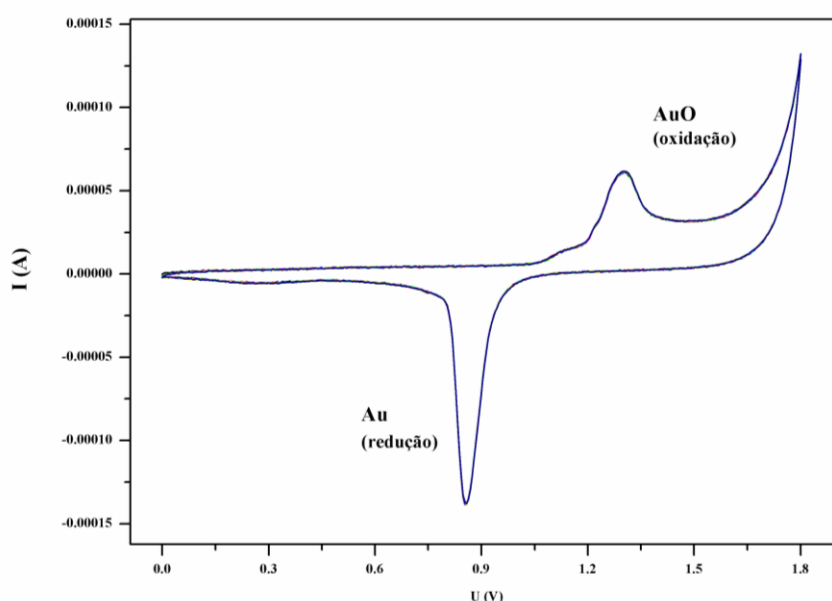
### 5.1.4 Voltametria Cíclica em Eletrodo de Ouro (CV)

Na tentativa de observar com mais clareza o comportamento dos compostos de interesse no eletrodo de ouro, foi realizado adicionalmente o estudo por voltametria cíclica. A grande vantagem deste tipo de voltametria é a capacidade de mostrar que o produto de uma reação redox, pode ser avaliado na primeira etapa da varredura (ida) e novamente na segunda etapa de varredura (volta) (PACHECO, et al. 2013).

Todos os testes foram realizados na presença de acetato de amônio  $10 \text{ mmol L}^{-1}$  com pH 4,0 (ajustado  $\text{CH}_3\text{COOH}_{(\text{conc.})}$ ). De forma a simular o eluente otimizado na separação cromatográfica, apenas o metanol foi retirado dos testes para não influenciar na sensibilidade da análise, uma vez que o solvente diminuiria a condutividade do meio, podendo mascarar a reação. Foram testadas as concentrações de 100 e 500  $\text{mg L}^{-1}$ , na velocidade de varredura de 500  $\text{mV/s}$  repetindo-se 8 leituras para cada composto. Serão mostrados os voltamogramas para as concentrações (100 ou 500  $\text{mg L}^{-1}$ ) que apresentaram melhores resultados.

Antes de determinações voltamétricas em eletrodos sólidos como ouro e carbono, é realizado um pré-tratamento conhecido como condicionamento eletroquímico. Esse processo visa uniformizar a superfície sólida do eletrodo bem como verificar as condições de resposta do mesmo (GOULARTE, 2016).

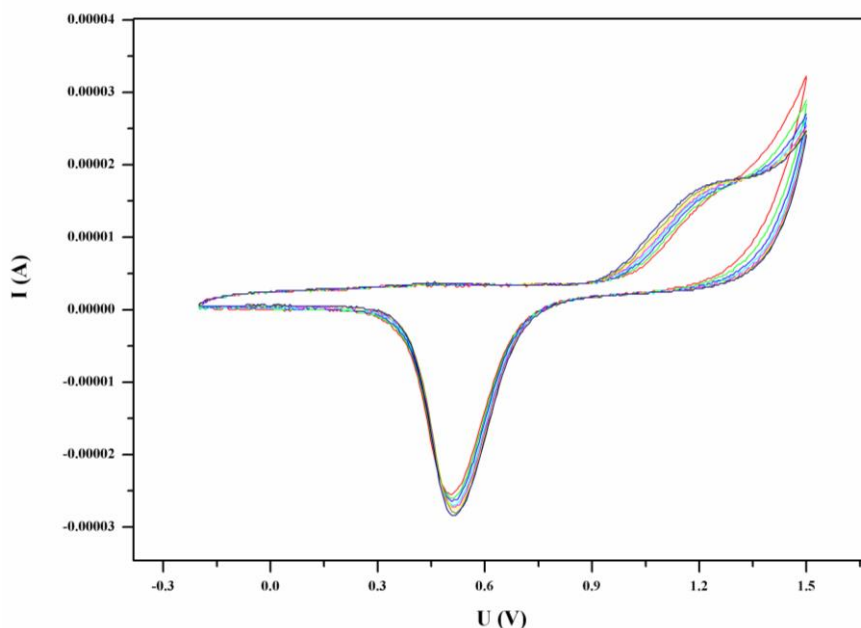
Figura 30: Sinais voltamétricos do condicionamento da superfície do eletrodo de ouro por voltametria cíclica (10 ciclos), velocidade de varredura 500  $\text{mV/s}$ . Eletrólito de suporte:  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ .



Fonte: Autora.

Após o condicionamento, foi obtido o voltamograma do eletrólito de suporte para observar o comportamento da linha base (acetato de amônio  $10 \text{ mmol L}^{-1}$  pH 4,0) na faixa de potenciais de  $-0,3 \text{ V}$  a  $+1,5 \text{ V}$ .

Figura 31: Sinais voltamétricos obtidos para o eletrólito de suporte. Eletrodo de disco rotatório de ouro, voltametria cíclica (8 ciclos), velocidade de varredura  $500 \text{ mV/s}$ , eletrólito de suporte: Acetato de amônio  $10 \text{ mmol L}^{-1}$  pH 4,0.



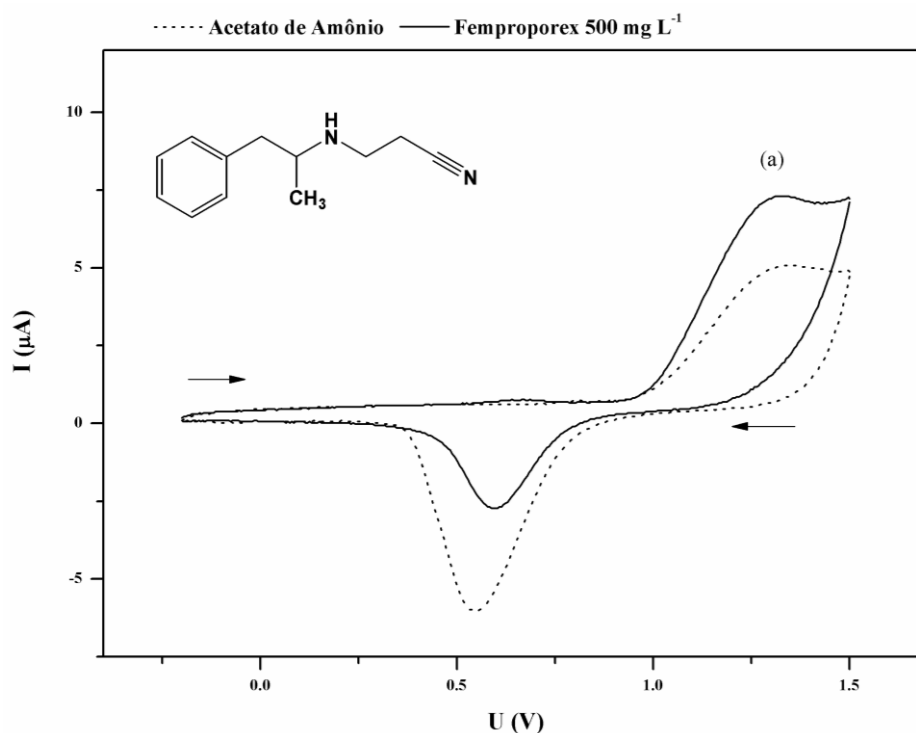
Fonte: Autora.

Com base neste voltamograma é possível inferir que sinais diferentes deste perfil, poderiam ser atribuídos aos compostos adicionados à célula. Ainda, alterações no perfil voltamétrico também poderiam ser inferidas devido à mudança na composição da solução na célula eletroquímica, uma vez que os padrões de fármacos foram adicionados a partir da solução estoque, preparada em metanol. Os compostos serão apresentados, assim como para o estudo de potencial de detecção, de acordo com suas classes farmacológicas.

Na Figura 32, é possível perceber que, assim como no estudo hidrodinâmico, o femproporex apresenta um sinal voltamétrico de oxidação a partir de  $+1,0 \text{ V}$  em (b).



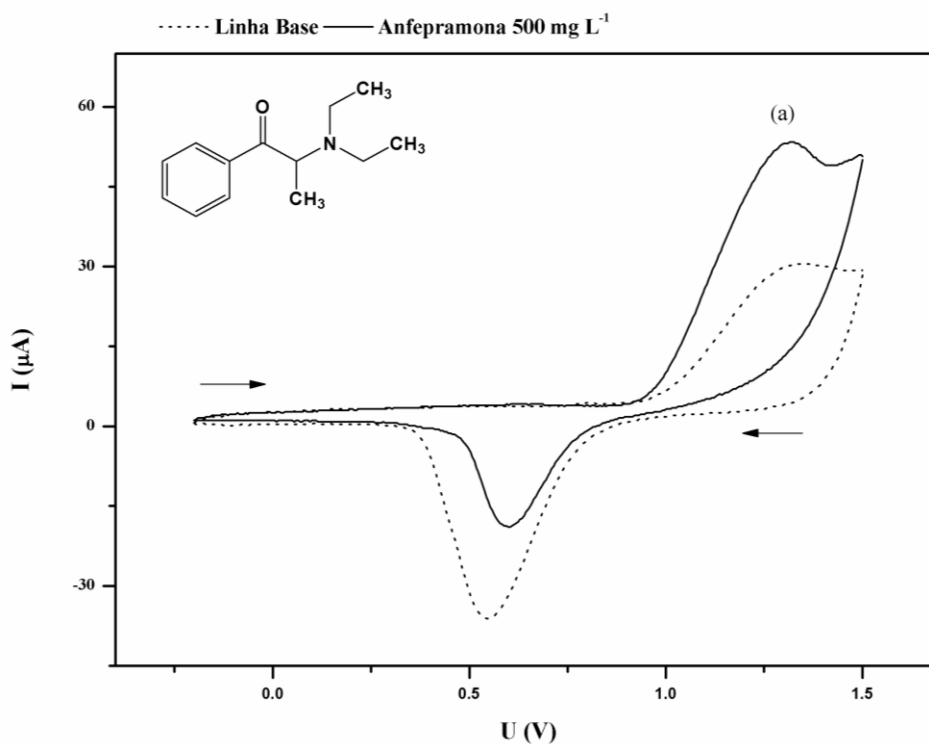
Figura 32: Sinais voltamétricos para o Femproporex, concentração  $500 \text{ mg L}^{-1}$ . Eletrodo de disco rotatório de ouro, voltametria cíclica (8 ciclos), velocidade de varredura  $500 \text{ mV/s}$ , eletrólito de suporte: Acetato de amônio  $10 \text{ mmol L}^{-1}$  pH 4,0.



Fonte: Autora.

Para a anfepramona (Figura 33), o comportamento observado é semelhante ao femproporex. Assim como ocorre na varredura hidrodinâmica, sinais de oxidação podem ser observados. Na voltametria cíclica, um sinal intenso é exibido a partir de  $+1,0 \text{ V}$  em (a). O comportamento observado para ambos os compostos, confirma os mecanismos de reação propostos anteriormente para a oxidação de amins com base na varredura hidrodinâmica.

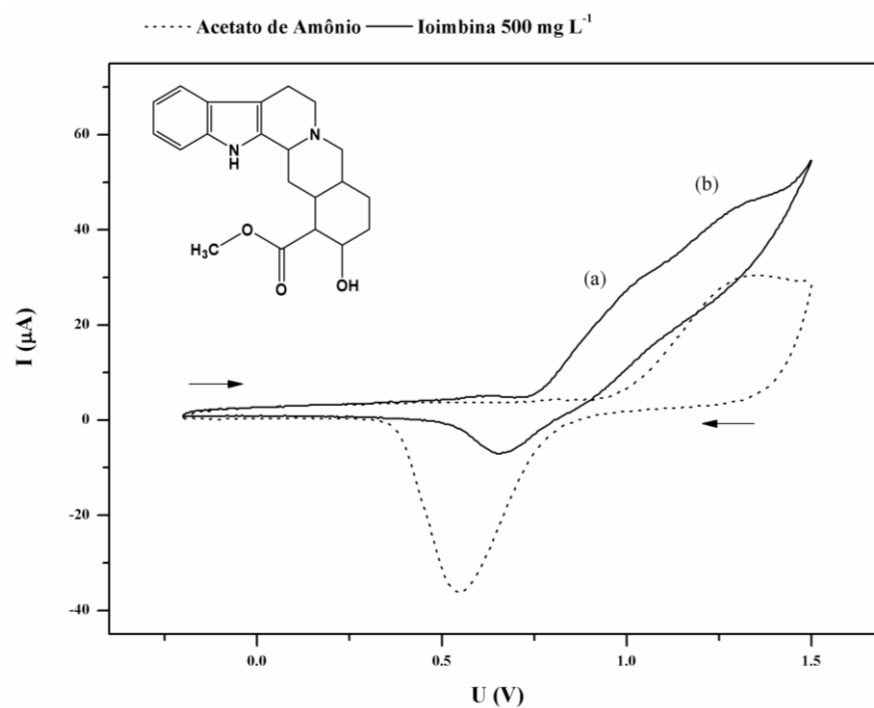
Figura 33: Sinais voltamétricos para Anfepramona, concentração  $500 \text{ mg L}^{-1}$ . Eletrodo de disco rotatório de ouro, voltametria cíclica (8 ciclos), velocidade de varredura  $500 \text{ mV/s}$ , eletrólito de suporte: Acetato de amônio  $10 \text{ mmol L}^{-1}$  pH 4,0.



Fonte: Autora.

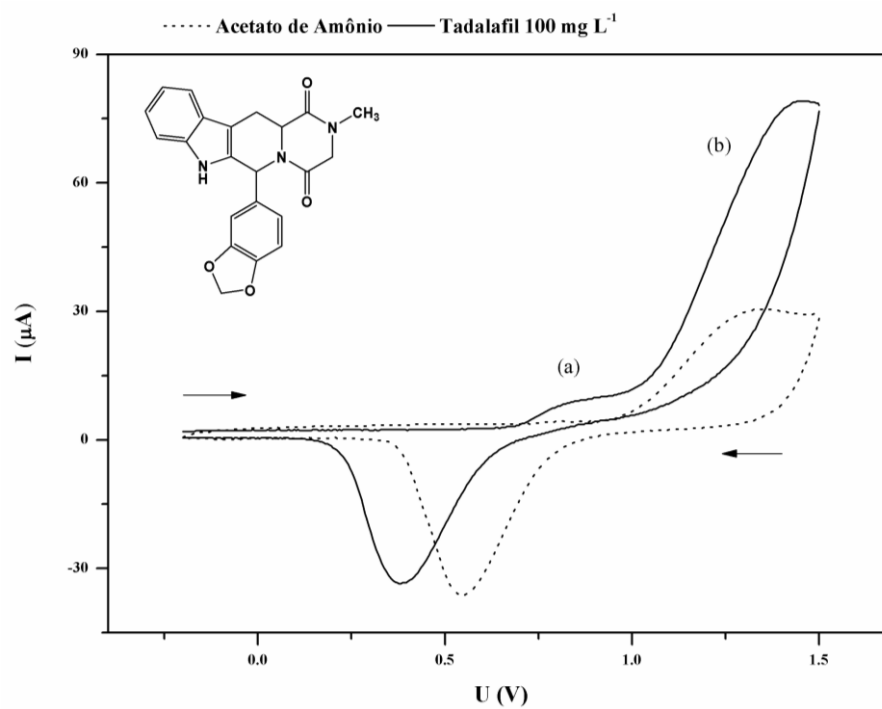
Para os estimulantes ioimbina (Figura 34) e tadalafil (Figura 35), o comportamento observado foi bastante semelhante tanto na varredura hidrodinâmica quanto na varredura cíclica. Para ioimbina, dois picos de oxidação podem ser observados em (a) e (b), onde b ocorre próximo a  $+1,0 \text{ V}$  e c próximo a  $+1,2 \text{ V}$ . Estes sinais indicam o comportamento oxidativo da ioimbina (ŠVORC; KALCHER, 2014) e juntamente com os resultados obtidos na análise hidrodinâmica, corroboram os fenômenos observados de oxidação do grupamento amina e grupamento alcoólico da molécula.

Figura 34: Sinais voltamétricos para Ioimbina, concentração  $500 \text{ mg L}^{-1}$ . Eletrodo de disco rotatório de ouro, voltametria cíclica (8 ciclos), velocidade de varredura  $500 \text{ mV/s}$ , eletrólito de suporte: Acetato de amônio  $10 \text{ mmol L}^{-1}$  pH 4,0.



Fonte: Autora.

Figura 35: Sinais voltamétricos para Tadalafil, concentração  $100 \text{ mg L}^{-1}$ . Eletrodo de disco rotatório de ouro, voltametria cíclica (8 ciclos), velocidade de varredura  $500 \text{ mV/s}$ , eletrólito de suporte: Acetato de amônio  $10 \text{ mmol L}^{-1}$  pH 4,0.

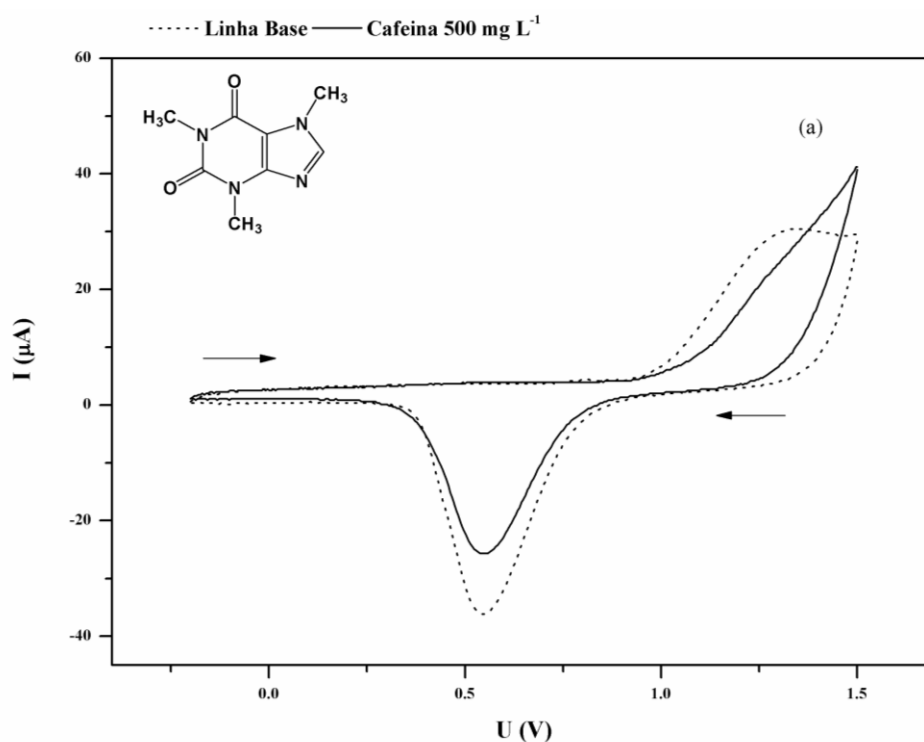


Fonte: Autora.

Quanto ao comportamento observado para o tadalafil, confirmando a varredura hidrodinâmica, dois sinais são observados no sentido da varredura de potenciais positivos. Em aproximadamente +0,8 V (a) é observado o primeiro sinal e a partir de +1,0 V (b) é iniciada a segunda onda de oxidação dos sítios amino.

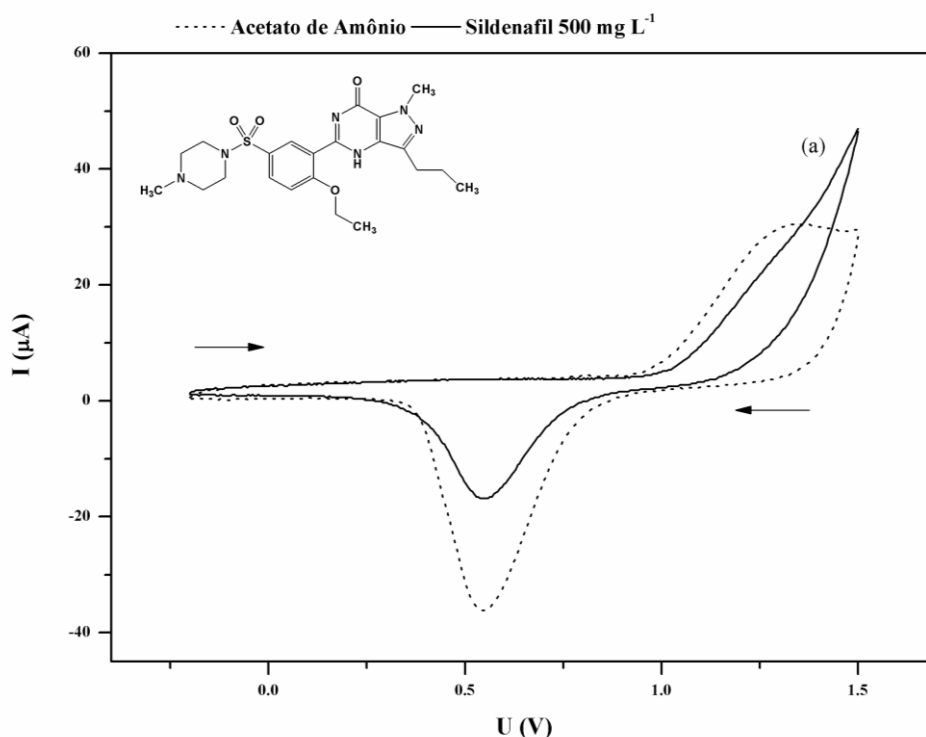
Para a estimulante cafeína (Figura 36) e sildenafil (Figura 37), o comportamento é bastante semelhante ao observado na varredura hidrodinâmica. Ambos compostos apresentam sinais (a) de oxidação menos intensos em relação aos fármacos já discutidos até aqui. O comportamento adquirido demonstrou que é possível diferenciar os adulterantes da linha base, entretanto, de forma bastante sutil.

Figura 36: Sinais voltamétricos para Cafeína, concentração  $500 \text{ mg L}^{-1}$ . Eletrodo de disco rotatório de ouro, voltametria cíclica (8 ciclos), velocidade de varredura  $500 \text{ mV/s}$ , eletrólito de suporte: Acetato de amônio  $10 \text{ mmol L}^{-1}$  pH 4,0.



Fonte: Autora.

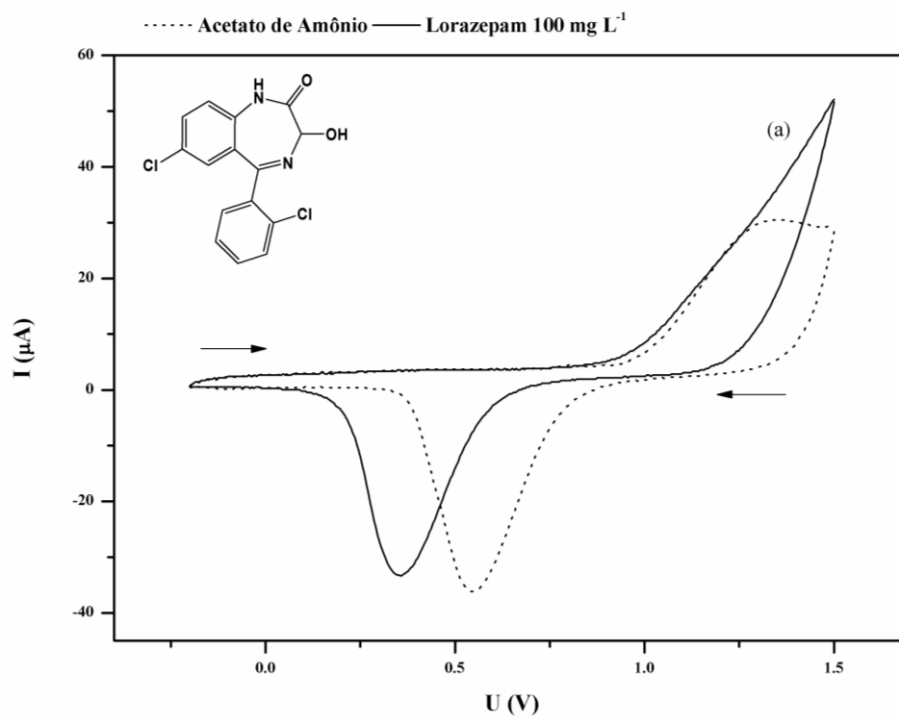
Figura 37: Sinais voltamétricos para Sildenafil, concentração  $500 \text{ mg L}^{-1}$ . Eletrodo de disco rotatório de ouro, voltametria cíclica (8 ciclos), velocidade de varredura  $500 \text{ mV/s}$ , eletrólito de suporte: Acetato de amônio  $10 \text{ mmol L}^{-1}$  pH 4,0.



Fonte: Autora.

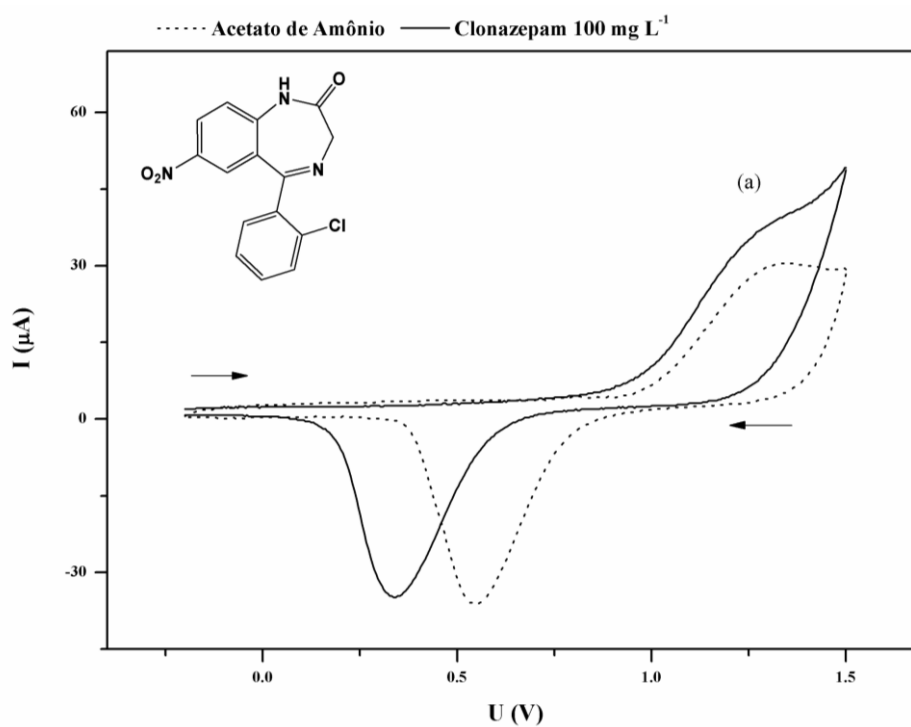
Para os ansiolíticos lorazepam, clonazepam, midazolam e diazepam (Figuras 38, 39, 40 e 41 respectivamente), o comportamento eletroquímico determinado pela varredura cíclica foi semelhante ao verificado por voltametria hidrodinâmica. Embora todos tenham apresentado comportamentos parecidos entre si, a análise por voltametria cíclica indicou sinais de oxidação menos intensos ocorrendo a partir de  $+1,0 \text{ V}$  vistos em (a), se comparados com a intensidade dos sinais obtidos pela varredura hidrodinâmica. Apesar disso, os sinais observados confirmam a proposta inicial de que todos os quatro benzodiazepínicos possuindo moléculas com anéis aromáticos e grupamentos amina, são capazes de sofrerem oxidação.

Figura 38: Sinais voltamétricos para Lorazepam, concentração  $100 \text{ mg L}^{-1}$ . Eletrodo de disco rotatório de ouro, voltametria cíclica (8 ciclos), velocidade de varredura  $500 \text{ mV/s}$ , eletrólito de suporte: Acetato de amônio  $10 \text{ mmol L}^{-1}$  pH 4,0.



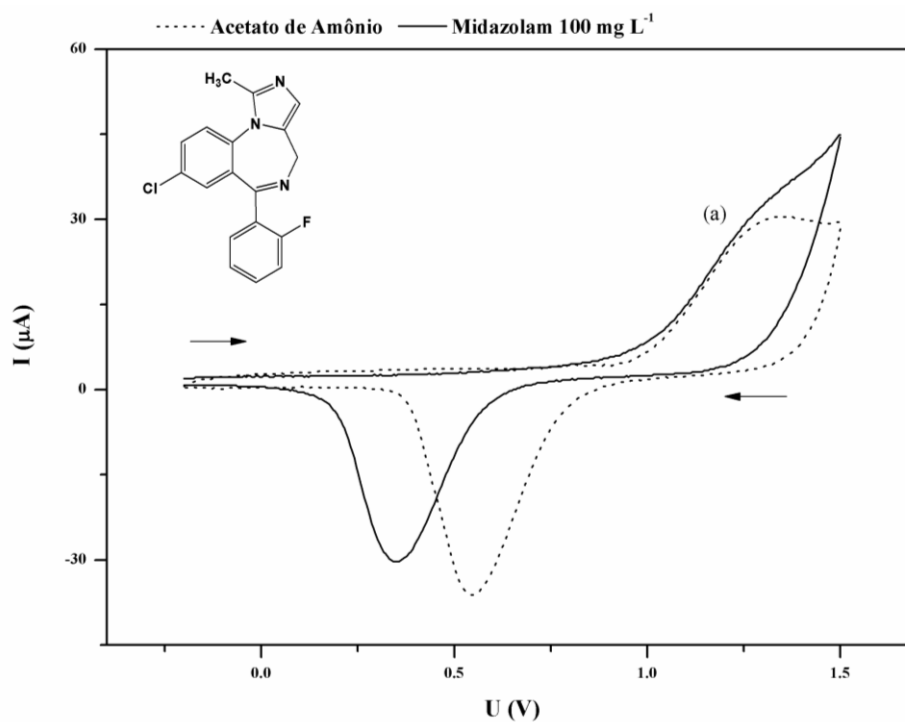
Fonte: Autora.

Figura 39: Sinais voltamétricos para Clonazepam, concentração  $100 \text{ mg L}^{-1}$ . Eletrodo de disco rotatório de ouro, voltametria cíclica (8 ciclos), velocidade de varredura  $500 \text{ mV/s}$ , eletrólito de suporte: Acetato de amônio  $10 \text{ mmol L}^{-1}$  pH 4,0.



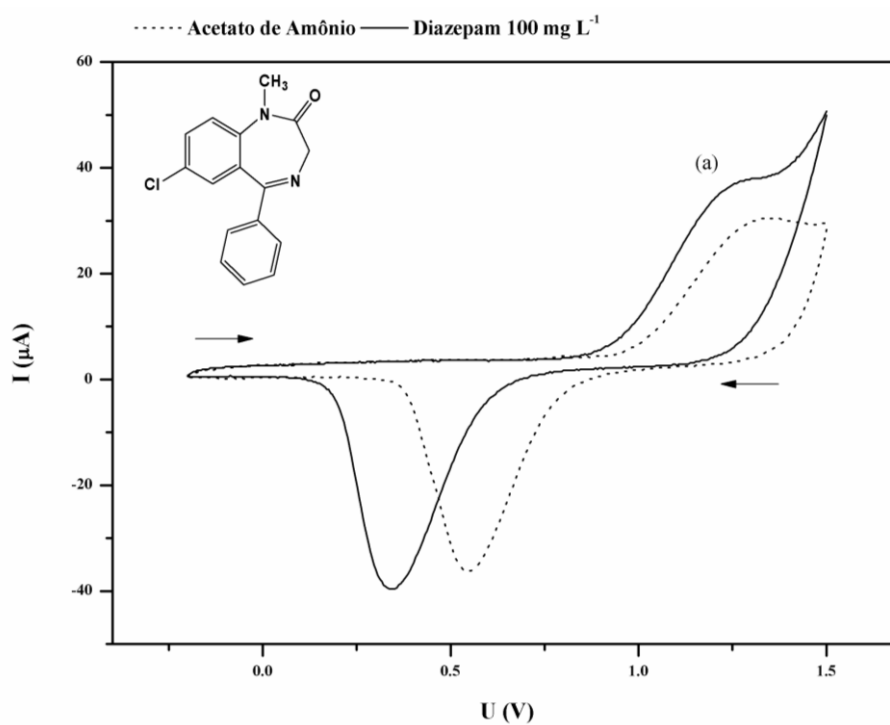
Fonte: Autora.

Figura 40: Sinais voltamétricos para Midazolam, concentração  $100 \text{ mg L}^{-1}$ . Eletrodo de disco rotatório de ouro, voltametria cíclica (8 ciclos), velocidade de varredura  $500 \text{ mV/s}$ , eletrólito de suporte: Acetato de amônio  $10 \text{ mmol L}^{-1}$  pH 4,0.



Fonte: Autora.

Figura 41: Sinais voltamétricos para Diazepam, concentração  $100 \text{ mg L}^{-1}$ . Eletrodo de disco rotatório de ouro, voltametria cíclica (8 ciclos), velocidade de varredura  $500 \text{ mV/s}$ , eletrólito de suporte: Acetato de amônio  $10 \text{ mmol L}^{-1}$  pH 4,0.

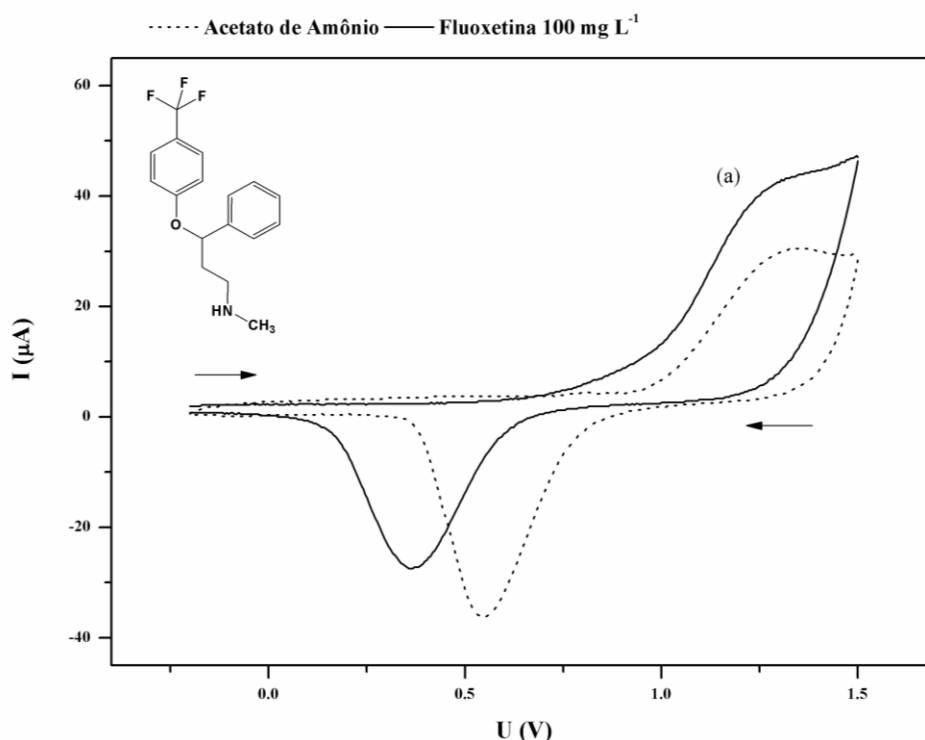


Fonte: Autora.

Para os compostos representativos das demais classes estudadas, diuréticos, laxantes e antidepressivos, o comportamento eletroquímico na varredura por voltametria cíclica apresentou condições divergentes para alguns dos compostos. Para a fluoxetina (Figura 42), o sinal observado no teste por voltametria hidrodinâmica para escolha do potencial de detecção indicou que fenômenos de oxidação ocorrem próximos a +0,6 V e decaem de intensidade a partir de +0,8 V. No entanto, o comportamento observado por voltametria cíclica indica que a oxidação do grupamento amina ocorre aproximadamente a partir do potencial de +0,8 V, seguindo até +1,5 V em (a). Caso semelhante ocorreu para a sertralina (Figura 43). Enquanto o voltamograma hidrodinâmico demonstra processos de oxidação próximos a +0,6 V com decaimento de intensidade a partir de +0,8 V, o voltamograma cíclico indica que os fenômenos ocorrem em potenciais mais positivos (acima de +1,0 V (a)). De qualquer forma, este “deslocamento” de potencial não torna inadequada a atribuição do sinal eletroquímico à oxidação dos grupos R–NH.

Por fim, os últimos dois compostos abordados (Figuras 44 e 45), furosemidá e bisacodil, confirmaram o comportamento eletroquímico observado anteriormente na varredura hidrodinâmica. Ambos apresentaram sinais de oxidação na região próxima a +1,0 V (a).

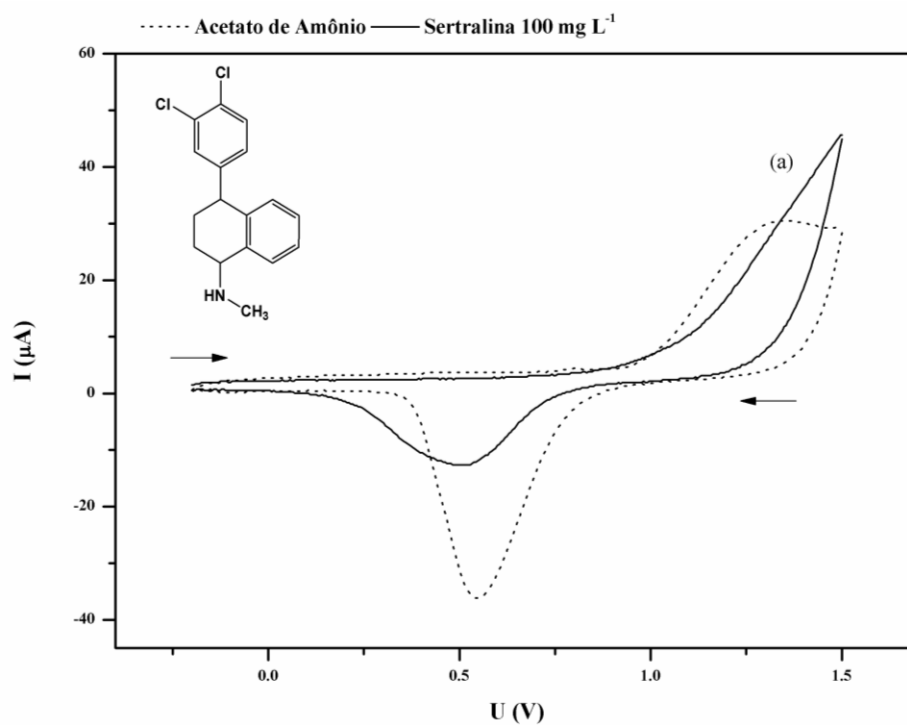
Figura 42: Sinais voltamétricos para Fluoxetina, concentração  $100 \text{ mg L}^{-1}$ . Eletrodo de disco rotatório de ouro, voltametria cíclica (8 ciclos), velocidade de varredura  $500 \text{ mV/s}$ , eletrólito de suporte: Acetato de amônio  $10 \text{ mmol L}^{-1}$  pH 4,0.



Fonte: Autora.

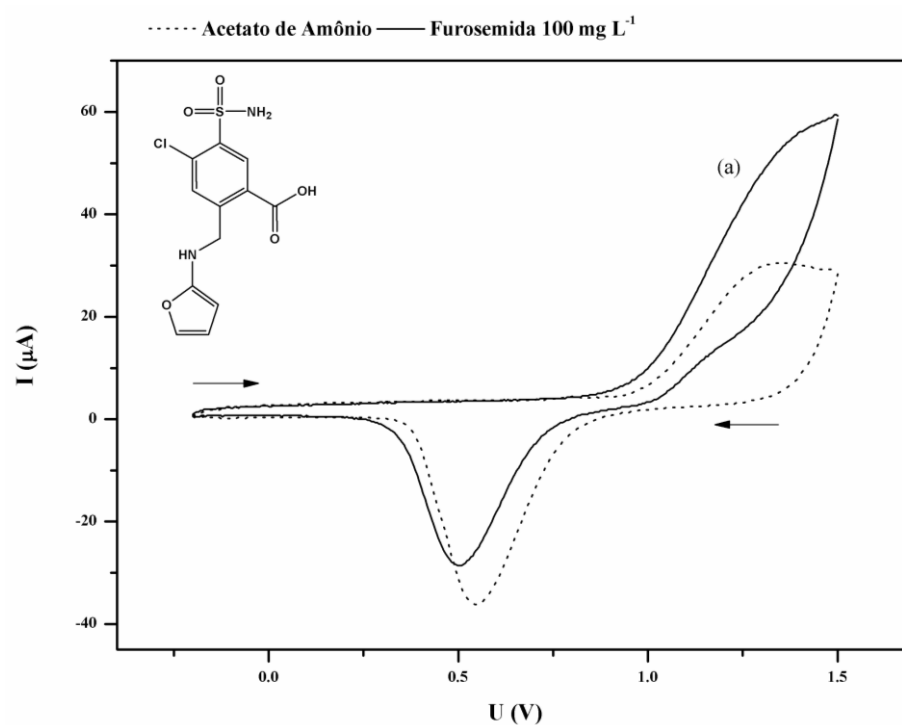


Figura 43: Sinais voltamétricos para Sertralina, concentração  $100 \text{ mg L}^{-1}$ . . Eletrodo de disco rotatório de ouro, voltametria cíclica (8 ciclos), velocidade de varredura  $500 \text{ mV/s}$ , eletrólito de suporte: Acetato de amônio  $10 \text{ mmol L}^{-1}$  pH 4,0.



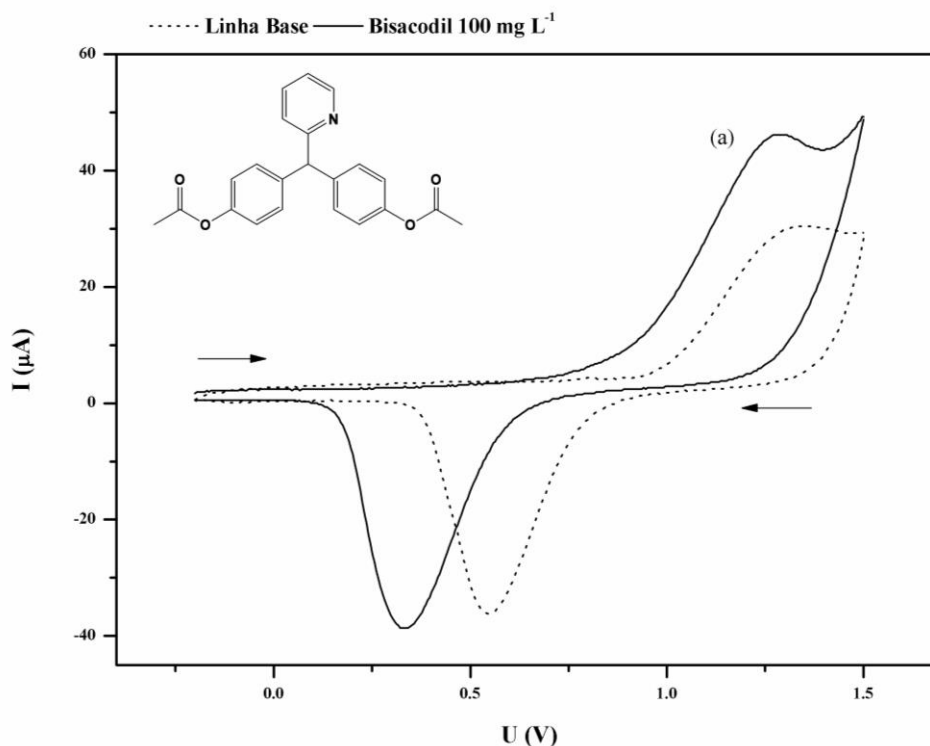
Fonte: Autora.

Figura 44: Sinais voltamétricos para Furosemda, concentração  $100 \text{ mg L}^{-1}$ . . Eletrodo de disco rotatório de ouro, voltametria cíclica (8 ciclos), velocidade de varredura  $500 \text{ mV/s}$ , eletrólito de suporte: Acetato de amônio  $10 \text{ mmol L}^{-1}$  pH 4,0.



Fonte: Autora.

Figura 45: Sinais voltamétricos para Bisacodil, concentração  $100 \text{ mg L}^{-1}$ . Eletrodo de disco rotatório de ouro, voltametria cíclica (8 ciclos), velocidade de varredura  $500 \text{ mV/s}$ , eletrólito de suporte: Acetato de amônio  $10 \text{ mmol L}^{-1}$  pH 4,0.



Fonte: Autora.

Para nenhum dos compostos foi observado o mesmo comportamento apresentado na varredura hidrodinâmica na região de potenciais mais negativos (próximos a  $-0,2 \text{ V}$ ). Além de a varredura cíclica ser pouco sensível, é provável que os sinais observados na região negativa nos voltamogramas hidrodinâmicos estivessem mascarados pela redução do  $\text{H}^+$ . Embora tenham sido feitas comparações entre os comportamentos apresentados por voltametria cíclica x hidrodinâmica, é necessário salientar que as varreduras são distintas do ponto de vista da amostragem de sinal. Na voltametria de corrente direta há uma lacuna de  $200 \text{ mV}$  entre cada ponto amostrado em relação à amostragem cíclica, isso provavelmente explica as diferenças encontradas na variação dos potenciais de oxidação para os analitos estudados. Como observação final, todos os fármacos apresentaram sistemas reversíveis de maior ou menor intensidade, de acordo com os sinais observados na análise por voltametria cíclica. Podem ser observados sinais bem definidos na varredura de ida (parte superior do voltamograma) e também na varredura de volta (parte inferior do voltamograma).

### 5.1.5 Validação do Método (HPLC–PAD)

Conforme citado anteriormente, os parâmetros de validação foram avaliados de acordo com o guia para métodos em laboratório direcionados a suplementos dietéticos da AOAC (AOAC, 2013). Para tanto, foram avaliados os seguintes parâmetros analíticos:

- ❖ Seletividade
- ❖ Faixa linear de trabalho
- ❖ Limite de detecção
- ❖ Limite de quantificação
- ❖ Precisão Intra e Inter dia
- ❖ Exatidão

#### 5.1.5.1 Seletividade

Durante o desenvolvimento do método, foram testados diversos fármacos para inclusão no método de separação. Os compostos que apresentaram sinal positivo, mas que, entretanto, não puderam ser incluídos no método de *screening*, foram analisados a partir da perspectiva da seletividade. Os seguintes compostos foram estudados então, como interferentes:

Tabela 7: Compostos testados como interferentes para avaliação da seletividade do método de separação cromatográfico.

Classe Farmacológica	Fármacos Testados (20 mg L <sup>-1</sup> )	Interferente	Observação
Diuréticos	Hidroclorotiazida	–	Não apresenta sinal em 30 minutos de corrida.
	Espironolactona	–	Não apresenta sinal em 30 minutos de corrida.
	Amilorida	–	Elui junto ao volume morto.
	Acetozolamida	+	Elui próximo a cafeína e ioimbina.
	Clortalidona	+	Elui próximo a cafeína e ioimbina.
Antidepressivos	Venlafaxina	+	Possível coeluição com cafeína.
	Nortriptilina	+	Possível coeluição com clonazepam.
	Imipramina	+	Possível coeluição com lorazepam.

	Amitriptilina	+	Possível coeluição com lorazepam ou clonazepam.
	Hordenina	–	Elui junto ao volume morto.
	Tiramina	–	Elui junto ao volume morto.
	Octopamina	–	Elui junto ao volume morto.
	Bupropiona	–	Não apresenta sinal em 30 minutos de corrida.
	Citalopram	+	Sinal largo, atrapalha picos iniciais.
	Seleginina	+	Coeluição com anfepramona.
	Paroxetina	+	Possível coeluição com clonazepam.
Estimulantes sexuais	Vardenafil	+	Coeluição com sildenafil.
Hormônios	Testosterona	–	Não apresenta sinal em 30 minutos de corrida.
Laxantes	Fenolftaleína	+	Sinal largo, atrapalha picos iniciais.
Antidiabéticos	Clorpropramida	+	Possível coeluição com fluoxetina.
	Metformina	–	Elui junto ao volume morto.
	Glibenclamida	–	Não apresenta sinal em 30 minutos de corrida.
	Glipizida	+	Possível coeluição com sertralina.
Anti-hipertensivo	Valsartan	+	Sinal largo, encobre o bisacodil.
	Propranolol	+	Possível coeluição com furosemida.
	Atenolol	–	Elui junto ao volume morto.
	Captopril	+	Dois sinais largos, atrapalha picos iniciais.
	Metoprolol	+	Provável coeluição com anfepramona.
	Losartan	+	Possível coeluição com midazolam, sertralina ou tadalafil.
	Enalapril	–	Não apresenta sinal em 30 minutos de corrida.

Fonte: Autora.

Como mostra a Tabela 7, foram encontrados 2 diuréticos (acetazolamida e clortalidona), 7 antidepressivos (venlafaxina, nortriptilina, imipramina, amitriptilina, citalopram, paroxetina e seleginina), 1 estimulante sexual (vardenafil), 1 laxante (fenolftaleína), 2 antidiabéticos (clorpropramida e glipizida) e 5 antihipertensivos (valsartan, propranolol, captopril, metoprolol e losartan) totalizando 18 compostos com sinal positivo, além dos escolhidos como analitos.

O número de compostos com sinal positivo encontrado foi elevado, o que pode gerar várias interferências no método. Como não era possível a inclusão de todos esses fármacos na separação, foram escolhidos aqueles que provavelmente teriam mais chances de ser encontrados nas amostras, conforme comentado no item 5.1.2 que trata da otimização do método de separação.

#### 5.1.5.2 Faixa linear, limites de detecção e quantificação

A faixa linear foi avaliada para cada composto separadamente. Foram injetadas concentrações baixas até que o pico não fosse mais distinguível da linha base no cromatograma. Então, a partir da obtenção desse valor de concentração, foram preparadas curvas analíticas dobrando a concentração a cada ponto da curva. Após obtenção da área, foi plotada a curva analítica e observando-se o  $R^2$  foram feitos ajustes de concentração para adequação da curva para cada composto. Quando curvas analíticas com  $R^2$  de no mínimo 0,99 foram obtidas, foram repetidas três curvas de 6 pontos para cada composto e a média dos valores de área foram utilizados para a regressão linear. Os limites de detecção e quantificação foram determinados com base na inclinação da curva analítica, calculados de acordo com as equações especificados no item 4.3.3. A seguir podem ser encontrados os dados obtidos para a faixa linear e limites de detecção e quantificação para cada composto.

Tabela 8: Dados de validação obtidos para os adulterantes estudados por cromatografia com detecção amperométrica: Faixa linear (equação da reta,  $R^2$ ), limites de detecção e quantificação.

Adulterante	Faixa Linear (mg L <sup>-1</sup> )	Equação da Reta	R <sup>2</sup>	LD (mg L <sup>-1</sup> )	LQ (mg L <sup>-1</sup> )
Femproporex	0,25 – 10,00	$y = 0,3366x + 0,0698$	0,9934	0,044	0,134
Anfepramona	10,00 – 90,00	$y = 0,0062x + 0,0748$	0,9905	2,723	8,252
Ioimbina	0,25 – 50,00	$y = 0,3370x + 0,7939$	0,9914	0,075	0,228
Cafeína	2,50 – 80,00	$y = 0,0256x + 0,1372$	0,9902	0,322	0,975
Furosemida	0,50 – 30,00	$y = 0,3957x + 0,4634$	0,9946	0,124	0,375
Fluoxetina	1,00 – 50,00	$y = 0,1086x + 0,2257$	0,9934	0,336	1,017
Sildenafil	40,00 – 100,00	$y = 0,0275x - 0,8982$	0,9980	1,597	4,840
Lorazepam	0,50 – 70,00	$y = 0,3292x + 0,4924$	0,9951	0,124	0,377

Clonazepam	1,00 – 70,00	$y = 0,1729x + 0,2192$	0,9948	0,264	0,801
Midazolam	1,00 – 20,00	$y = 1,4789x + 0,1331$	0,9988	0,146	0,441
Sertralina	3,00 – 70,00	$y = 0,1382x + 0,4704$	0,9946	0,918	2,781
Tadalafil	1,00 – 70,00	$y = 0,3798x + 0,7675$	0,9979	0,232	0,702
Bisacodil	5,00 – 80,00	$y = 0,2156x - 0,1624$	0,9966	0,745	2,259
Diazepam	20,00 – 45,00	$y = 0,1304x - 0,4083$	0,9953	0,434	1,316

Fonte: Autora.

### 5.1.5.3 Precisão

Os ensaios de precisão foram realizados para cada analito em separado. Foram preparadas curvas analíticas de 5 pontos a cada dia e com base nesta, foram determinadas as concentrações de 3 pontos, sendo um ponto de baixa concentração, um de média e um de alta concentração. Com base na calibração externa, foram obtidos os valores para cada um dos diferentes pontos ( $n=3$ ), sendo o coeficiente de variância dos padrões para cada ponto a precisão intra dia. Todo o procedimento foi repetido em mais 2 diferentes dias, sendo o coeficiente de variância para o total de pontos de mesma concentração dos 3 dias ( $n=9$ ) a precisão inter dia. Os resultados para cada nível de concentração podem ser encontrados na Tabela 9.

De acordo com os dados obtidos, o método apresentou uma ótima precisão e reprodutibilidade nos resultados avaliados, sendo que todos os coeficientes de variância ficaram abaixo de 6 %, valor indicado pela AOAC para a faixa de concentração a nível de  $\text{mg L}^{-1}$ .

Tabela 9: Valores obtidos para precisão intra e interdia em três níveis de concentração para os compostos analisados pelo método de separação cromatográfico.

Adulterante mg L <sup>-1</sup>	R <sup>2</sup> (curva do dia)			Precisão Intra dia <sup>1</sup> (n=3)			Precisão Inter dia <sup>2</sup> (n=9)
	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 1	Dia 2	Dia 3	
Femproporex							
0,30	0,996	0,993	0,993	3,58	5,64	4,72	0,72
2,50				4,22	5,37	4,41	0,59
5,00				4,11	0,83	1,76	1,68
Anfepramona							
10,00	0,990	0,991	0,997	4,65	5,33	3,26	0,62
40,00				4,34	5,19	1,80	1,82
80,00				1,25	4,58	0,62	1,92
Ioimbina							
1,00	0,991	0,991	0,986	4,04	4,35	4,88	2,35
10,00				1,30	0,21	1,19	0,59
25,00				1,59	0,68	0,92	0,47
Cafeína	0,986	0,976	0,973				
5,00				4,08	0,55	5,27	2,44
10,00				2,06	5,09	1,77	1,97
50,00				0,78	1,00	2,97	1,21
Furosemida	0,995	0,994	0,995				
2,00				1,76	3,71	1,53	1,51
5,00				2,09	2,03	1,35	0,55
25,00				1,33	0,23	0,86	0,56

Adulterante mg L <sup>-1</sup>	R <sup>2</sup> (curva do dia)			Precisão Intra dia			Precisão Inter dia
Fluoxetina	0,990	0,978	0,991				
1,00				5,29	1,93	1,64	2,10
5,00				4,57	5,80	0,39	2,52
25,00				2,81	2,20	0,68	1,14
Sildenafil	0,995	0,990	0,993				
40,00				2,31	1,08	3,51	1,31
60,00				1,45	2,29	1,26	0,54
80,00				0,84	2,82	2,57	1,07
Lorazepam	0,998	0,999	0,998				
1,00				3,78	5,62	5,14	2,01
10,00				2,39	1,45	1,07	0,69
30,00				0,48	0,51	0,38	0,06
Clonazepam	0,995	0,993	0,990				
5,00				5,01	5,57	5,74	0,80
15,00				1,93	4,40	3,17	1,24
50,00				2,09	0,54	0,92	0,81
Midazolam	0,973	0,990	0,992				
2,00				0,60	5,75	2,79	3,16
10,00				2,43	1,33	1,18	0,75
20,00				0,29	0,68	1,70	0,77
Sertralina	0,985	0,997	0,997				
5,00				1,84	4,58	0,17	2,33
15,00				4,46	1,26	1,59	1,83



Adulterante mg L <sup>-1</sup>	R <sup>2</sup> (curva do dia)			Precisão Intra dia			Precisão Inter dia
Sertralina (continuação)							
30,00				0,54	2,57	2,36	1,07
Tadalafil	0,997	0,999	0,997				
1,00				1,85	5,43	5,52	1,76
10,00				2,57	2,47	1,24	0,78
20,00				0,87	0,98	0,23	0,41
Bisacodil	0,999	1,000	0,998				
5,00				4,34	4,00	3,31	0,48
15,00				0,75	1,43	1,38	0,37
30,00				2,35	1,73	0,96	0,72
Diazepam	0,991	0,990	0,993				
20,00				0,77	0,94	2,04	0,98
30,00				1,63	0,14	3,00	1,46
40,00				5,06	1,32	1,65	2,03

<sup>1,2</sup> Todos os valores de precisão foram calculados pelo desvio padrão das amostras (n=3 ou n=9), dividido pela média de concentração obtida multiplicado por 100 (CV%).

Fonte: Autora.

#### 5.1.5.4 Exatidão

A exatidão foi avaliada a partir de ensaios de fortificação. Oito amostras foram aleatoriamente escolhidas para passarem pelo processo de extração, sendo uma extração com adição de concentração conhecida dos padrões de fármacos e uma extração sem adição de padrões. Os 14 compostos incluídos nos estudos de validação, foram distribuídos em 8 amostras de diferentes características de matriz de acordo com seus tempos de retenção, para facilitar a quantificação. Por exemplo, os analitos cafeína e ioimbina eluem muito próximos um do outro, então, os mesmos foram adicionados em amostras separadamente. Exatidão para o femproporex, amostra 89 (suplemento de cafeína para atletas); anfepramona, amostra 05 (pó para preparo de bebida com extrato de guaraná, chá verde e laranja amarga), ioimbina, furosemida, midazolam, bisacodil e diazepam, amostra 29 (fibra de laranja amarga); cafeína, amostra 11 (proteína de soro de leite hidrolisada e isolada); sildenafil e tadalafil, amostra 15 (guaraná, colina, psillium e vitaminas); lorazepam, amostra 45 (*Citrus aurantium*, chá verde, colina, minerais e vitaminas), clonazepam, amostra 50 (cafeína, taurina, chá verde, *Citrus aurantium*, gengibre e pimenta vermelha); sertralina, amostra 58 (soro de leite, leite em pó desnatado, proteína isolada de soja, fibra de aveia, vitaminas e minerais, ácido pantotênico, óleo vegetal de côco em pó). Após a extração, inicialmente foi executada a varredura nas amostras que não continham adição de padrão. Aquelas que apresentaram o composto a ser analisado para exatidão foram quantificadas para que o valor fosse levado em consideração no cálculo de recuperação. Foram realizadas três determinações para cada amostra fortificada (n=3) pelo método da adição de padrão na amostra. Foram preparados três pontos da curva + amostra (y=0). Segundo os parâmetros da AOAC, os valores de recuperação podem constar entre 80 a 115 %. Para os analitos do presente método, todos apresentaram recuperação dentro da faixa determinada. A Tabela 10, por fim, apresenta em destaque os dados de recuperação calculados para todos os adulterantes estudados pelo método de separação e ainda, um resumo dos demais dados de validação obtidos.

Tabela 10: Dados de exatidão e demais valores obtidos para a determinação dos adulterantes de interesse.

Adulterante	Faixa Linear (mg L <sup>-1</sup> )	LD (mg L <sup>-1</sup> )	LQ (mg L <sup>-1</sup> )	Precisão <sup>1</sup> (CV%)	<b>Exatidão (%)</b>
Femproporex	0,25 – 10,00	0,04	0,13	0,59 – 1,68	<b>114,82</b>

Adulterante	Faixa Linear (mg L <sup>-1</sup> )	LD (mg L <sup>-1</sup> )	LQ (mg L <sup>-1</sup> )	Precisão (CV%)	Exatidão (%)
Anfepramona	10,00 – 90,00	2,72	8,25	0,62 – 1,92	<b>105,24</b>
Ioimbina	0,25 – 50,00	0,08	0,23	0,47 – 2,35	<b>106,89</b>
Cafeína	2,50 – 80,00	0,32	0,98	1,21 – 2,44	<b>108,54</b>
Furosemida	0,50 – 30,00	0,12	0,38	0,55 – 1,51	<b>96,97</b>
Fluoxetina	1,00 – 50,00	0,34	1,02	1,14 – 2,52	<b>96,05</b>
Sildenafil	40,00 – 100,00	1,60	4,84	0,54 – 1,31	<b>107,06</b>
Lorazepam	0,50 – 70,00	0,12	0,38	0,06 – 2,01	<b>107,23</b>
Clonazepam	1,00 – 70,00	0,26	0,80	0,80 – 1,24	<b>102,60</b>
Midazolam	1,00 – 20,00	0,15	0,44	0,75 – 3,16	<b>113,68</b>
Sertralina	3,00 – 70,00	0,92	2,78	1,07 – 2,33	<b>113,95</b>
Tadalafil	1,00 – 70,00	0,23	0,70	0,41 – 1,76	<b>86,24</b>
Bisacodil	5,00 – 80,00	0,74	2,26	0,37 – 0,72	<b>93,09</b>
Diazepam	20,00 – 45,00	0,43	1,32	0,98 – 2,03	<b>97,59</b>

<sup>1</sup> Precisão expressa de acordo com os valores de CV% (menor e maior dos três pontos de concentração) obtidos para a precisão inter dia..

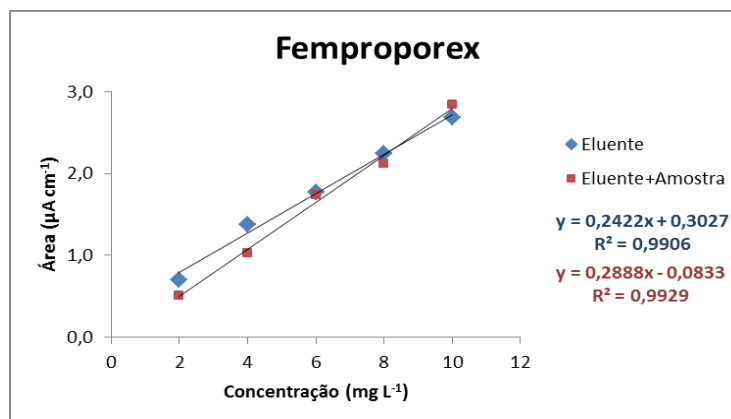
Fonte: Autora.

#### 5.1.5.5 Estudo do efeito de matriz

Como teste final antes da análise de quantificação das amostras, foram realizados ensaios para avaliação da influência da matriz no estudo dos adulterantes. Para tanto foram preparadas duas curvas analíticas contendo cinco pontos de concentração, sendo uma na presença da amostra (diluída 5 vezes) e outra apenas no eluente de trabalho. Dois grupos de padrões foram preparados para facilitar desta forma, a quantificação de picos de baixa resolução, conforme já comentado nos ensaios realizados de exatidão. O primeiro grupo (femproporex, ioimbina, furosemida, sildenafil, clonazepam, sertralina, bisacodil e dizepam) foi testado em amostra contendo maltodextrina, soro de leite, leite em pó desnatado, proteína isolada de soja, fibra de aveia, vitaminas e minerais, ácido pantotênico, óleo vegetal de coco em pó. O segundo grupo (anfepramona, cafeína, fluoxetina, lorazepam, midazolam e tadalafil) foi testado em amostra contendo proteína do soro de leite hidrolisada. Os resultados mostrados a seguir, indicam que nenhum dos analitos sofre influência significativa da matriz nas condições otimizadas. Foram observadas as diferenças no coeficiente a, que significaria

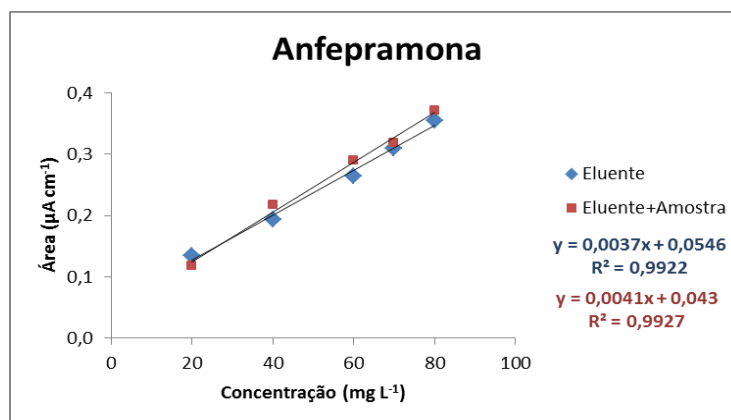
que os componentes da matriz introduzem um erro sistemático proporcional e as diferenças para o coeficiente b, que significaria que houve um erro sistemático constante e por fim, os R(s) quadrados obtidos (PINHO, et al. 2009).

Figura 46: Estudo da influência da matriz em amostra de suplemento alimentar do grupo 1 para Femproporex.



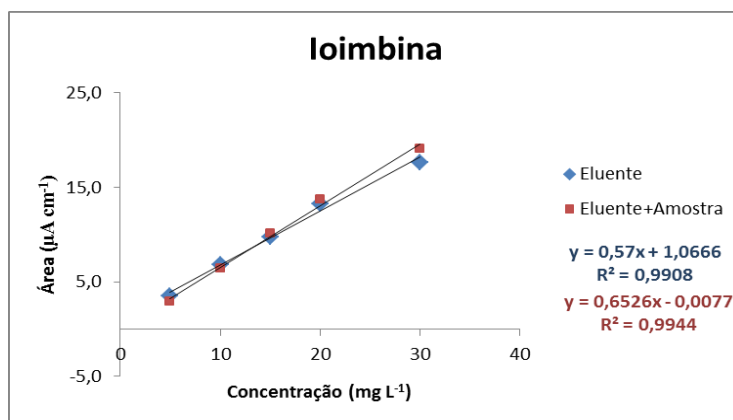
Fonte: Autora.

Figura 47: Estudo da influência da matriz em amostra de suplemento alimentar do grupo 2 para Anfepramona.



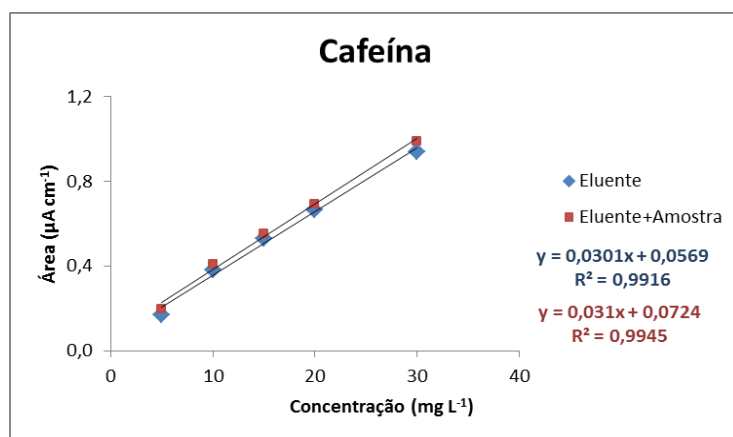
Fonte: Autora.

Figura 48: Estudo da influência da matriz em amostra de suplemento alimentar do grupo 1 para Ioimbina.



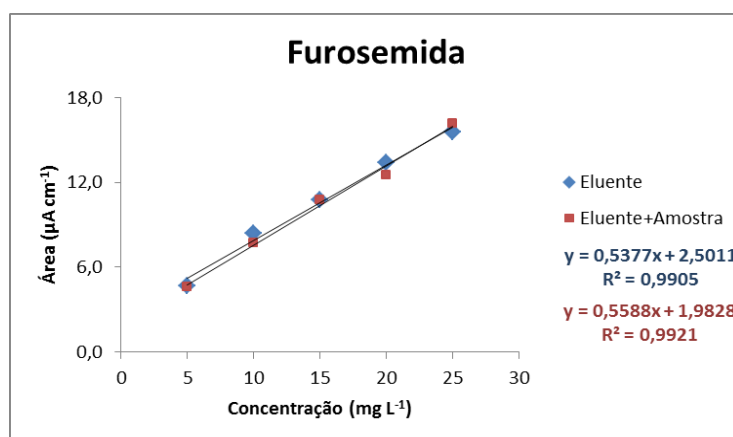
Fonte: Autora.

Figura 49: Estudo da influência da matriz em amostra de suplemento alimentar do grupo 2 para Cafeína.



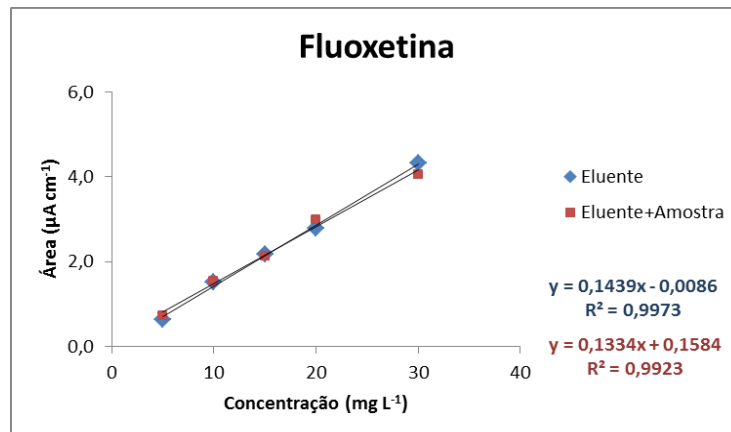
Fonte: Autora.

Figura 50: Estudo da influência da matriz em amostra de suplemento alimentar do grupo 1 para Furosemida.



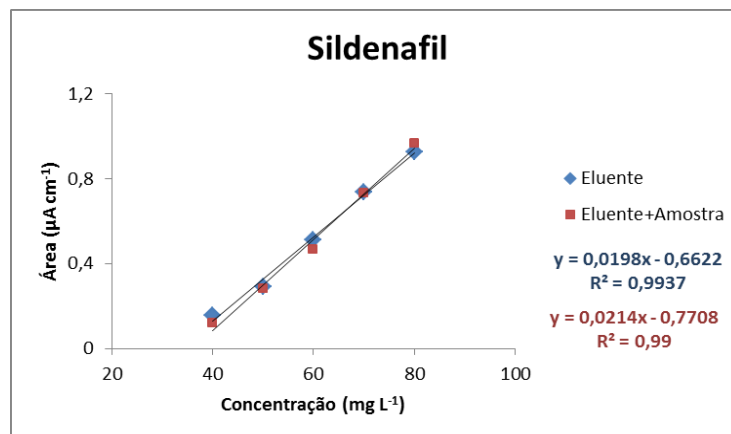
Fonte: Autora.

Figura 51: Estudo da influência da matriz em amostra de suplemento alimentar do grupo 2 para Fluoxetina.



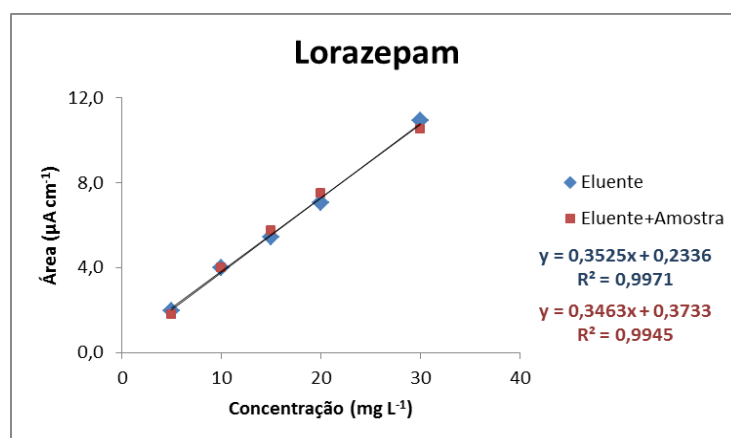
Fonte: Autora.

Figura 52: Estudo da influência da matriz em amostra de suplemento alimentar do grupo 1 para Sildenafil.



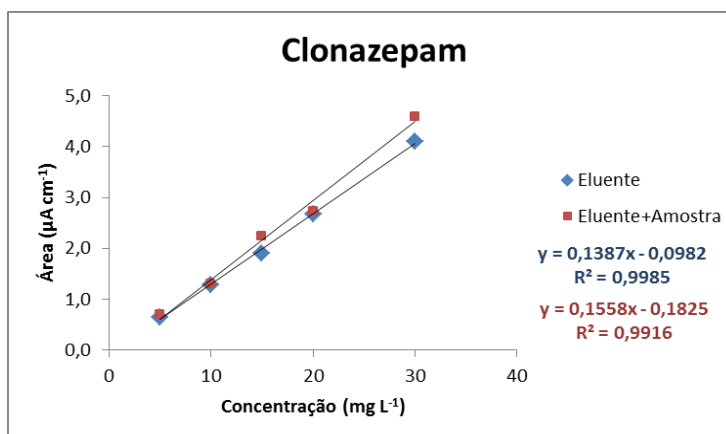
Fonte: Autora.

Figura 53: Estudo da influência da matriz em amostra de suplemento alimentar do grupo 2 para Lorazepam.



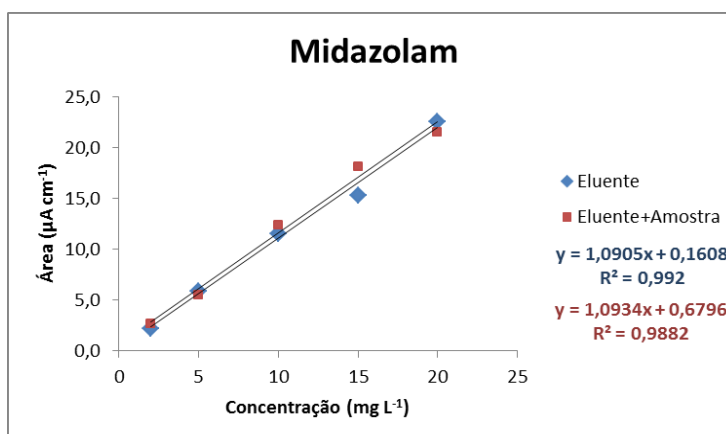
Fonte: Autora.

Figura 54: Estudo da influência da matriz em amostra de suplemento alimentar do grupo 1 para Clonazepam.



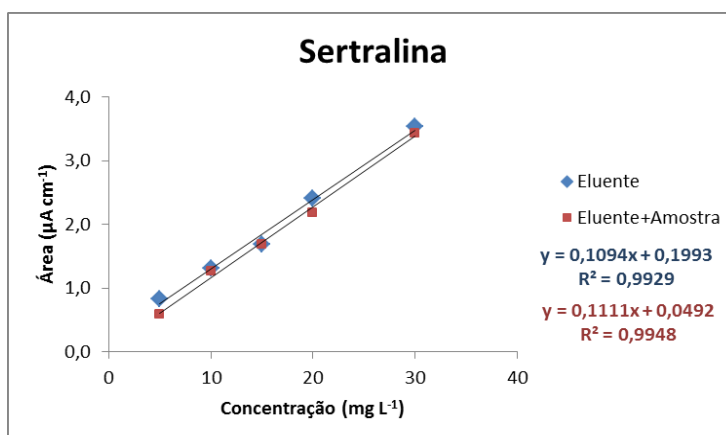
Fonte: Autora.

Figura 55: Estudo da influência da matriz em amostra de suplemento alimentar do grupo 2 para Midazolam.



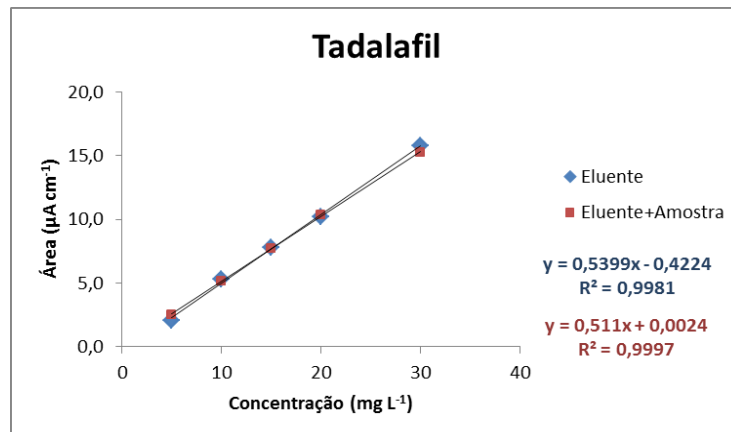
Fonte: Autora.

Figura 56: Estudo da influência da matriz em amostra de suplemento alimentar do grupo 1 para Sertralina.



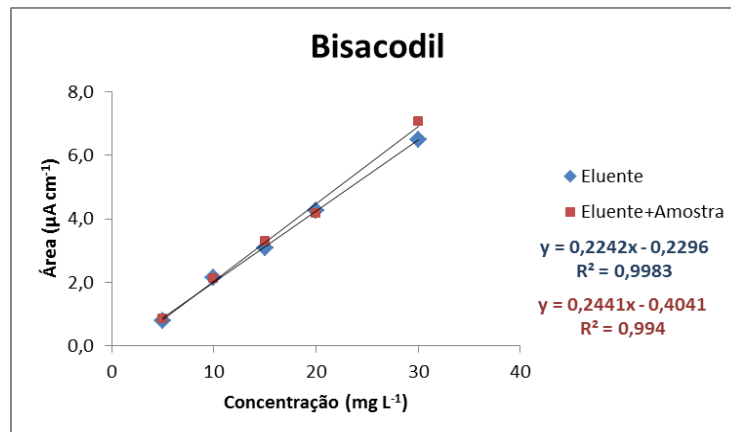
Fonte: Autora.

Figura 57: Estudo da influência da matriz em amostra de suplemento alimentar do grupo 2 para Tadalafil.



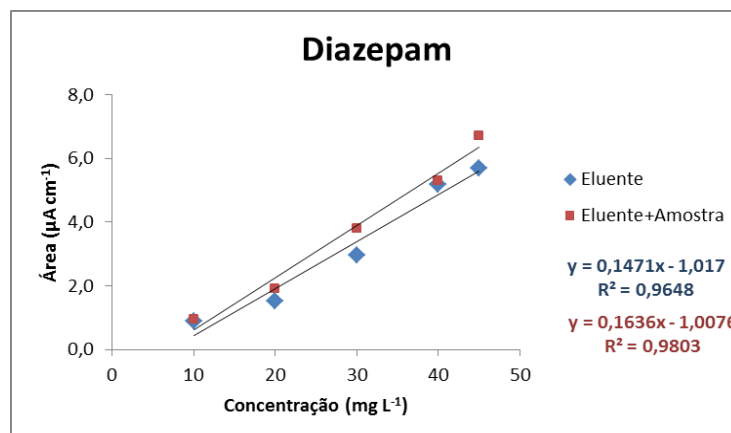
Fonte: Autora.

Figura 58: Estudo da influência da matriz em amostra de suplemento alimentar do grupo 1 para Bisacodil.



Fonte: Autora.

Figura 59: Estudo da influência da matriz em amostra de suplemento alimentar do grupo 1 para Diazepam.



Fonte: Autora.



## 5.2 ANÁLISE VOLTAMÉTRICA DE FÁRMACOS COMO ADULTERANTES

### 5.2.1 Voltametria em meio não aquoso no eletrodo de Mercúrio (DPV-ACN)

O início da otimização do método de determinação de adulterantes no eletrodo de trabalho de mercúrio envolveu a escolha do eletrólito mais adequado. A água é o solvente mais popular. No entanto, utilizando solventes não aquosos adequados, substâncias que são insolúveis em água podem ser dissolvidas, substâncias que são instáveis na água permanecem estáveis em solventes orgânicos e as reações químicas que são impossíveis na água tornam-se possíveis. Os ambientes de reação são marcadamente mais amplos em solventes não aquosos do que em água (IZUTSU, 2009).

Uma vez que os métodos de extração e pré-concentração de compostos orgânicos envolvem entre outros aspectos, a escolha de solventes em que o analito seja o mais solúvel possível, a transposição de técnicas voltamétricas do meio aquoso, para métodos que utilizem solventes orgânicos como via úmida de análise é uma excelente alternativa. Além disso, diversas amostras de suplementos alimentares são comercializadas na forma de cápsula oleosa, o que dificultaria a análise em eletrólitos aquosos devido a baixa solubilidade, mesmo em soluções diluídas.

Em análise eletroquímica por voltametria, destacam-se os solventes acetona, acetonitrila, dimetilformamida, dimetilsulfóxido, diclorometano associados a eletrólitos de suporte como sais quaternários de amônio, por exemplo, brometo, tetrafluorborato ou perclorato de tetraetil ou de tetrabutyl amônio devido as suas propriedades de solubilidade, resistividade e condutividade à diluição infinita em diferentes solventes orgânicos. Desta forma, este fenômeno está ligado tanto ao soluto no eletrólito quanto ao próprio analito em relação ao transporte em solução (AGOSTINHO, et al. 2004).

A escolha do eletrólito em solvente orgânico foi otimizada por Goularte (2016) e Silva (2016), ambos trabalhos de mestrado desenvolvidos no LACHEM (Laboratório de Análises Químicas) da UFSM. A Tabela 11 resume os solventes e sais testados e suas respectivas concentrações.

Tabela 11: Sais e solventes testados como eletrólitos de suporte para análise em meio não aquoso.

Sal	Solventes <sup>1</sup>	Concentração (mol L <sup>-1</sup> )
LiClO <sub>4</sub> (perclorato de lítio)	DMSO, ACN, DMF	0,1; 0,01
<b>NaClO<sub>4</sub></b> (perclorato de sódio)	DMSO, <b>ACN</b> , DMF	0,1; <b>0,01</b>
TBAI (iodeto de tetra-n-butilamônio)	DMSO, ACN, DMF	0,1
LiCl (cloreto de lítio)	DMSO, DMF	0,1
TBAPF <sub>6</sub> (tetrabutilamônio hexafluorofosfato)	DMSO	0,01

<sup>1</sup> DMSO – dimetilsulfóxido, ACN – acetonitrila, DMF – dimetilformamida

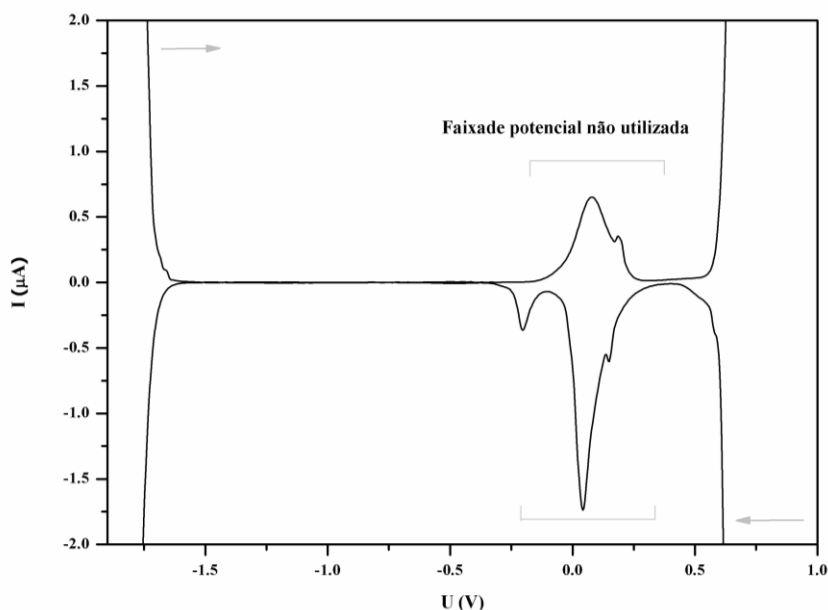
Fonte: Adaptado de SILVA, 2016.

De acordo com os testes realizados, o eletrólito que apresentou a janela de trabalho mais ampla e com maior estabilidade de corrente foi a combinação de perclorato de sódio em acetonitrila na concentração de 0,01 mol L<sup>-1</sup>. Todos os testes foram realizados em 100 % de solvente orgânico utilizando o eletrodo de referência modificado de Ag/AgCl – LiCl<sub>(sat.)</sub> em etanol.

A Figura 60 mostra o voltamograma da faixa de potenciais para o eletrólito escolhido. Observa-se na faixa de potenciais compreendida entre -0,3 V e +0,3 V em ambas as varreduras (sentido dos potenciais positivos – anódica e sentido dos potenciais negativos – catódica) sinais característicos do eletrólito em questão. Esta faixa não pode ser utilizada como “analítica”. Uma vez que o eletrólito de suporte não é promovedor de sinais de redução/oxidação, supõe-se que o comportamento observado é correspondente ao fenômeno de transporte dos íons em solução. Nas extremidades do voltamograma, os limites da janela de potencial são atribuídas às características do próprio solvente orgânico.

Portanto, o restante da faixa de potenciais disponíveis foi utilizado para varredura e estudo qualitativo e quantitativo para cada fármaco como adulterante. A direção da varredura é indicada em todos os voltamogramas por flechas. Varreduras anódicas sempre foram executadas previamente a varredura catódica.

Figura 60: Voltamograma obtido para  $\text{NaClO}_4$  em ACN  $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ . Condições: HMDE operando no modo pulso diferencial, velocidade varredura:  $30 \text{ mV/s}$ , amplitude do pulso:  $50 \text{ mV (+/-)}$  tempo de pulso:  $30 \text{ ms}$ .

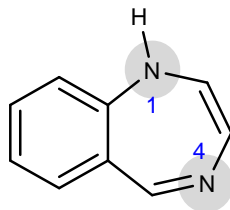


Fonte: Autora.

Os ensaios para otimização dos parâmetros analíticos do método para os adulterantes iniciaram pela adição de cada fármaco individualmente, repetidas vezes na célula eletroquímica. Para todos foram mantidas as condições de velocidade de varredura ( $30 \text{ mV/s}$ ), amplitude do pulso:  $50 \text{ mV (+/-)}$  tempo de pulso:  $30 \text{ ms}$ . Vale ressaltar que para o método voltamétrico no eletrodo de mercúrio, foram testados todos os fármacos presentes no método de separação, mais os analitos de interesse inicial da classe dos ansiolíticos. Além destes, foram ainda avaliados os fármacos furosemida, amilorida, hidroclorotiazida, clortalidona, bupropiona, cafeína, sinefrina e sibutramina.

Serão mostrados apenas os compostos que apresentaram sinais bem definidos nas condições de varredura especificadas. Apenas serão destacados no voltamograma sinais mais intensos. A primeira classe a ser abordada foi a classe dos benzodiazepínicos. Os 1,4-benzodiazepínicos possuem em sua estrutura molecular a presença de dois anéis (Figura 61). O anel de sete membros heterociclo em 1,4 com átomos de nitrogênio é ligado a um anel benzênico e que por sua vez, pode ser substituído com grupamentos eletroativos como  $-\text{NO}_2$  como é o caso do clonazepam.

Figura 61: Estrutura molecular básica em comum para os benzodiazepínicos.



Fonte: Adaptado de SANTOS; FAMILA; GONÇALVES, 2002.

Esta estrutura também conhecida como grupo funcional azometina, é facilmente reduzida em eletrodo de mercúrio através de uma reação envolvendo a transferência de dois elétrons. Adicionalmente, o anel benzênico presente na molécula confere aos benzodiazepínicos a facilidade de adsorção na superfície do mercúrio (SANTOS; FAMILA; GONÇALVES, 2002; HONEYCHURCH; HART, 2014). Diversos trabalhos utilizando este eletrodo para determinação de ansiolíticos já foram publicados no meio científico, dada a importância desta classe de fármacos em diversas áreas. Entretanto, a maioria destes estudos é realizada em meios aquosos. Os mecanismos associados a estes compostos são mais bem abordados em Carvalho, et al. 2010 (b), onde em pH abaixo de 10 os sinais voltamétricos são atribuídos a redução dos grupos  $N \rightarrow O$ ,  $C=O$ ,  $C=N$ ,  $C-N$  e  $NO_2$  enquanto em pH igual ou acima de 10, os sinais são atribuídos as reações de redução para os grupos  $N \rightarrow O$  e  $NO_2$  (CARVALHO, et al. 2010 (b)). Em meios não aquosos as reações de redução para compostos orgânicos é muito complexa, uma vez que sofrem vários processos sequenciais redutivos ou oxidativos, dependendo do potencial (IZUTSU, 2009). Apesar disso, os potenciais de redução/oxidação de substâncias estruturalmente mais simples são conhecidos. Por exemplo, para compostos contendo nitrogênio, como nitrobenzeno, azobenzeno, o potencial de reação encontrado variou na faixa de  $-0,69$  V a  $-1,62$  V. Esses dados confirmam os resultados obtidos para os benzodiazepínicos, bem como para os demais compostos que contêm grupamentos amina. Neste mesmo sentido, compostos contendo halogênios são capazes de promover sinais de redução em potenciais mais negativos, em torno de  $-1,40$  V a  $-2,7$  V (IZUTSU, 2009). Em um caso semelhante, a molécula de antranquinona e seus derivados, por exemplo, possuem oxigênios ligados a anéis aromáticos. Caram e coautores (2017) atribuíram potenciais de redução dos sítios contendo oxigênio testando diferentes eletrólitos. A rota proposta apresentou sinais de  $-1,19$  V a  $-1,91$  V (em DMF).

Uma vez que as varreduras no eletrólito otimizado só chegam até  $-1,8$  V o processo de redução neste trabalho fica limitado à faixa de potencial negativo. Por fim, substâncias contendo oxigênio em suas estruturas como, por exemplo,  $p$ -benzoquinona, benzaldeído, antraquinona, podem apresentar sinais na faixa compreendida em  $-0,54$  V a  $-1,80$  V (IZUTSU, 2009). Com base nestas informações (Tabela 12), é possível inferir algumas suposições a respeito dos sinais observados no trabalho desenvolvido.

Tabela 12: Exemplos de compostos orgânicos reduzíveis e oxidáveis e seus potenciais da primeira etapa de reação em solventes não aquosos.

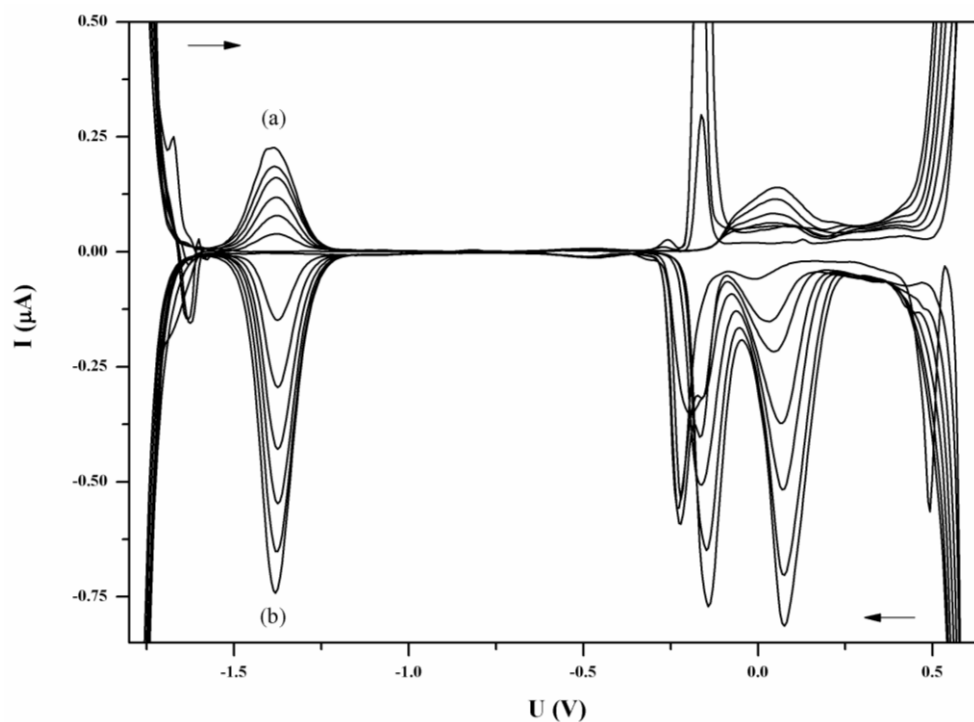
Composto	Solvente	Eletrólito de Suporte	RE	Potencial (V)
<b>Potenciais de Redução</b>				
<b>Contendo Oxigênio</b>				
$p$ -benzoquinona	DMF	$\text{Et}_4\text{NClO}_4$	SCE	$-0,54$
1,4-Naphtoquinona	DMF	$\text{Et}_4\text{NClO}_4$	SCE	$-0,60$
9,10-Antraquinone	DMF	$\text{Et}_4\text{NClO}_4$	SCE	$-0,98$
Benzofenona	DMF	$\text{Et}_4\text{NI}$	SCE	$-1,72$
Benzil	DMSO	$\text{Et}_4\text{NClO}_4$	SCE	$-1,04$
<b>Contendo Nitrogênio</b>				
$t$ -Nitrobutano	ACN	$\text{Bu}_4\text{NBr}$	SCE	$-1,62$
Nitrobenzeno	ACN	$\text{Pr}_4\text{NClO}_4$	SCE	$-1,15$
$\rho$ -Cloronitrobenzeno	ACN	$\text{Pr}_4\text{NClO}_4$	SCE	$-1,06$
$\rho$ -Bromonitrobenzeno	ACN	$\text{Pr}_4\text{NClO}_4$	SCE	$-1,05$
1,2-Dinitrobenzeno	ACN	$\text{Pr}_4\text{NClO}_4$	SCE	$-0,69$
Azobenzeno	DMF	$\text{Pr}_4\text{NClO}_4$	SCE	$-1,36$
<b>Contendo Halogênios</b>				
Benzil brometo	DMF	$\text{Et}_4\text{NClO}_4$	SCE	$-1,68$
Benzil cloreto	DMF	$\text{Et}_4\text{NClO}_4$	SCE	$-1,90$
Pentaclorobenzeno	DMF	$\text{Et}_4\text{NClO}_4$	SCE	$-1,60$
Hexaclorobenzeno	DMF	$\text{Et}_4\text{NClO}_4$	SCE	$-1,40$
<b>Potenciais de Oxidação</b>				
<b>Contendo Nitrogênio</b>				
Dietilamina	ACN	$\text{NaClO}_4$	Ag/AgCl	$+1,01$
Trietilamina	ACN	$\text{NaClO}_4$	Ag/AgCl	$+0,66$
Dimetilformamida	ACN	$\text{NaClO}_4$	Ag/AgCl	$+1,21$
Piridina	ACN	$\text{NaClO}_4$	SCE	$+1,82$
<b>Contendo Enxofre</b>				
Tiofenol	$\text{CH}_2\text{Cl}_2$	$\text{CF}_3\text{COOH}$	Ag/AgCl	$+1,65$

Dimetilsulfeto	ACN	NaClO <sub>4</sub>	Ag/AgCl	+1,41
Metil fenil sulfeto	ACN	NaClO <sub>4</sub>	Ag/AgCl	+1,00
<b>Contendo Oxigênio</b>				
Fenol	ACN	Et <sub>4</sub> NClO <sub>4</sub>	SCE	+1,55
4-metilfenol	ACN	Et <sub>4</sub> NClO <sub>4</sub>	SCE	+1,35
Anisol	ACN	Et <sub>4</sub> NClO <sub>4</sub>	SCE	+1,75

Fonte: Adaptado de Izutsu, 2009.

Iniciando pelo alprazolam (Figura 62), há dois sinais bem definidos (anódico (a) e catódico (b)) na região próxima a  $-1,40$  V. Com base nos potenciais encontrados e sabendo-se que o alprazolam possui em sua molécula átomos de nitrogênio e um halogênio (Cl), então o sinal apresentado é referente provavelmente à redução de ambos os grupos. Observando-se as correntes geradas, é possível dizer ainda que há maior facilidade de redução dos grupos funcionais na varredura catódica, ou seja, no sentido dos potenciais mais negativos.

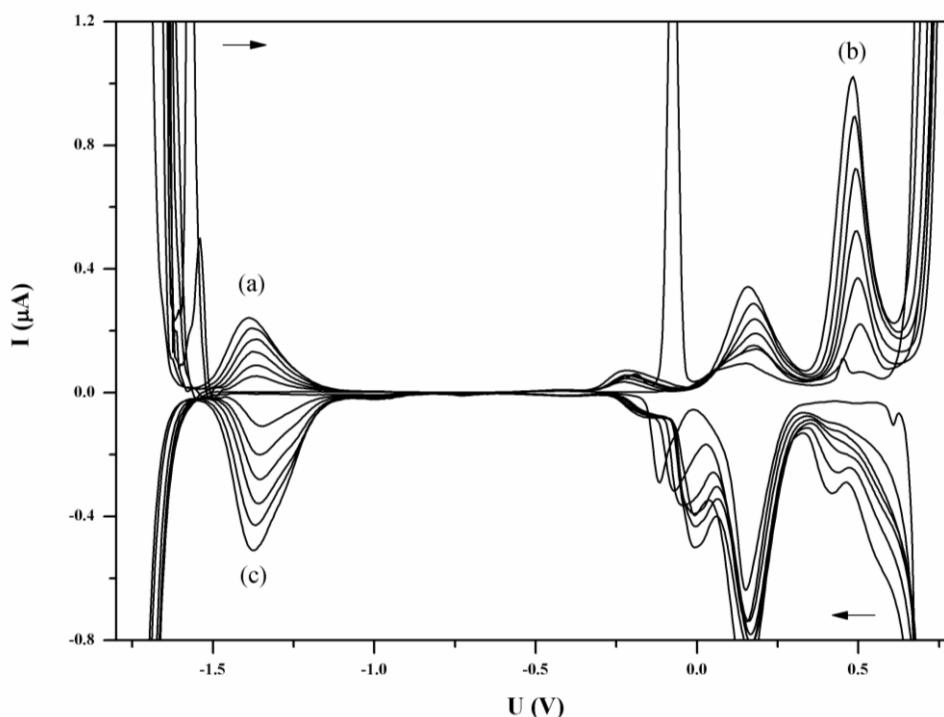
Figura 62: Voltamograma obtido para Alprazolam (6 adições na célula de  $10 \text{ mg L}^{-1}$ /adição). Condições: NaClO<sub>4</sub> em ACN  $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ , HMDE operando no modo pulso diferencial, velocidade varredura:  $30 \text{ mV/s}$ .



Fonte: Autora.

Para o bromazepam, há também dois sinais bem definidos (anódico (a) e catódico (c)) na região próxima a  $-1,40$  V. Neste caso, foi observado ainda, sinal em potencial positivo próximo a  $+0,50$  V (anódico (b)). Da mesma forma, os sinais na região negativa de potenciais podem ser atribuídos à fenômenos de redução referentes aos grupos amina da molécula, bem como ao átomo de bromo presente no anel benzênico ligado ao heterociclo. Para o sinal na região positiva, segundo Izutsu (2009), ao usar um solvente de basicidade fraca e um eletrólito de suporte que é difícil de oxidar, compostos contendo nitrogênio, oxigênio e enxofre podem apresentar sinais de oxidação em regiões mais positivas de potencial.

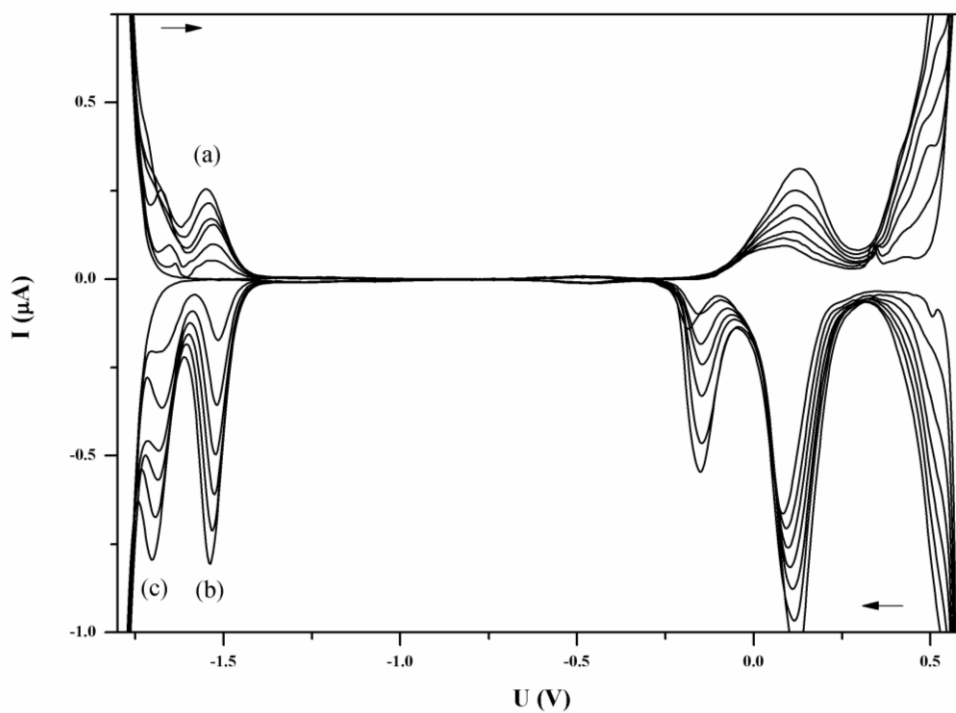
Figura 63: Voltamograma obtido para Bromazepam (6 adições na célula de  $10 \text{ mg L}^{-1}$ /adição). Condições:  $\text{NaClO}_4$  em ACN  $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ , HMDE operando no modo pulso diferencial, velocidade varredura:  $30 \text{ mV/s}$ .



Fonte: Autora.

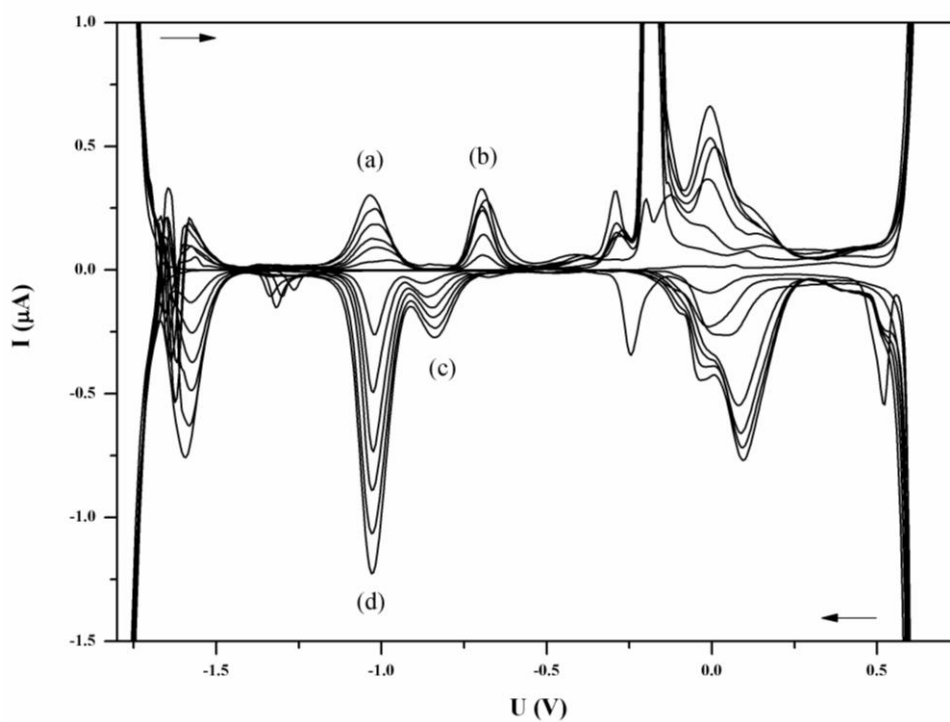
O clordiazepóxido apresentou um sinal de redução na varredura no sentido dos potenciais positivos e dois sinais na varredura no sentido dos potenciais negativos, sendo que todos os três fenômenos ocorreram na região de potenciais negativos da janela de trabalho. Além de conter grupos amina, o clordiazepóxido contém em sua molécula um átomo de cloro e um átomo de oxigênio, grupos redutíveis no eletrodo de mercúrio.

Figura 64: Voltamograma obtido para Clordiazepóxido (6 adições na célula de  $10 \text{ mg L}^{-1}$  / adição). Condições:  $\text{NaClO}_4$  em ACN  $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ , HMDE operando no modo pulso diferencial, velocidade varredura:  $30 \text{ mV/s}$ .



Fonte: Autor.

Figura 65: Voltamograma obtido para Clonazepam (6 adições na célula de  $10 \text{ mg L}^{-1}$  / adição). Condições:  $\text{NaClO}_4$  em ACN  $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ , HMDE operando no modo pulso diferencial, velocidade varredura:  $30 \text{ mV/s}$ .



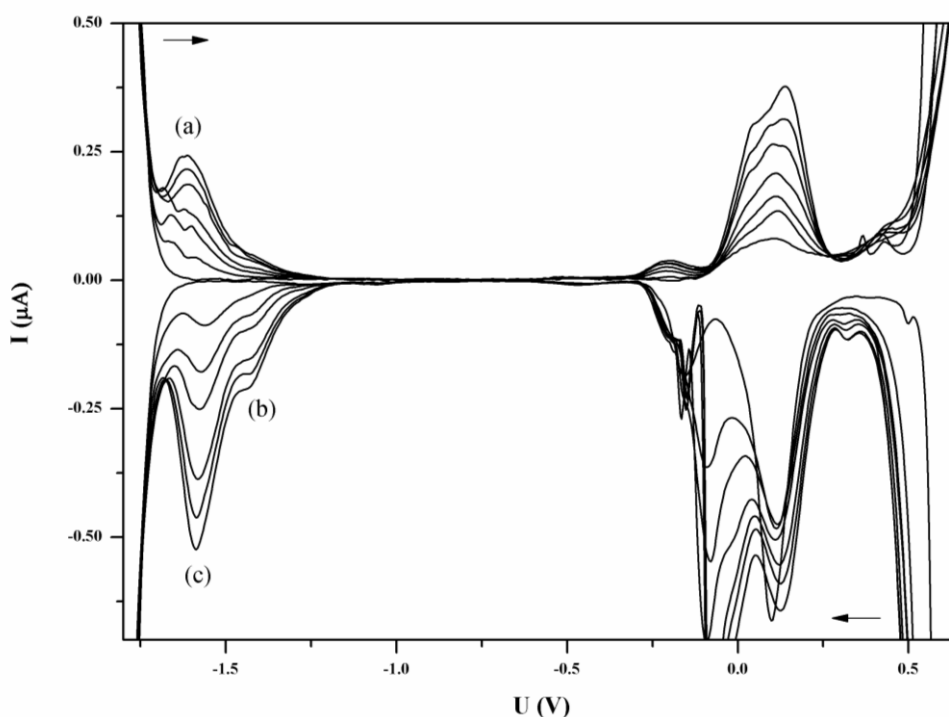
Fonte: Autora.



A análise do adulterante clonazepam mostrou que sinais de redução são observados em regiões intermediárias de potenciais, próximas a +1,0 V (Figura 65). Dos benzodiazepínicos estudados, o clonazepam é o único que possui em sua molécula um grupamento  $-\text{NO}_2$ , além de átomos de nitrogênio e um átomo de cloro na sua estrutura, conferindo propriedades de redução.

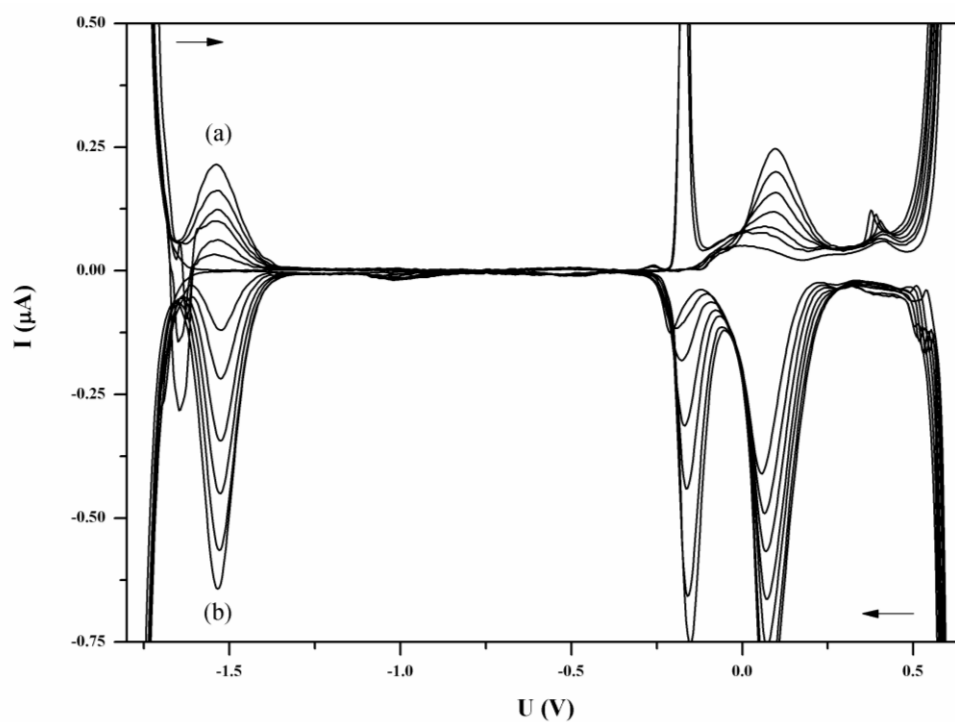
Para o lorazepam (Figura 66), foram encontrados 3 sinais voltamétricos na região de potenciais mais negativo, sendo que um dos sinais em aproximadamente -1,52 V em (c) mostrou-se mais intenso. Se comparado aos demais benzodiazepínicos discutidos até o momento, o sinal apresenta-se semelhante em intensidade de corrente e faixa de potenciais, embora apresente um perfil diferenciado dos demais. Uma vez que a estrutura e os grupamentos eletroativos são praticamente os mesmos dos demais compostos, este comportamento era de certa forma esperado. Este mesmo caso ocorre para o diazepam (Figura 67), onde dois sinais bem definidos de redução podem ser encontrados na região de potenciais negativos no eletrodo de mercúrio.

Figura 66: Voltamograma obtido para Lorazepam (6 adições na célula de  $10 \text{ mg L}^{-1}$  / adição). Condições:  $\text{NaClO}_4$  em ACN  $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ , HMDE operando no modo pulso diferencial, velocidade varredura:  $30 \text{ mV/s}$ .



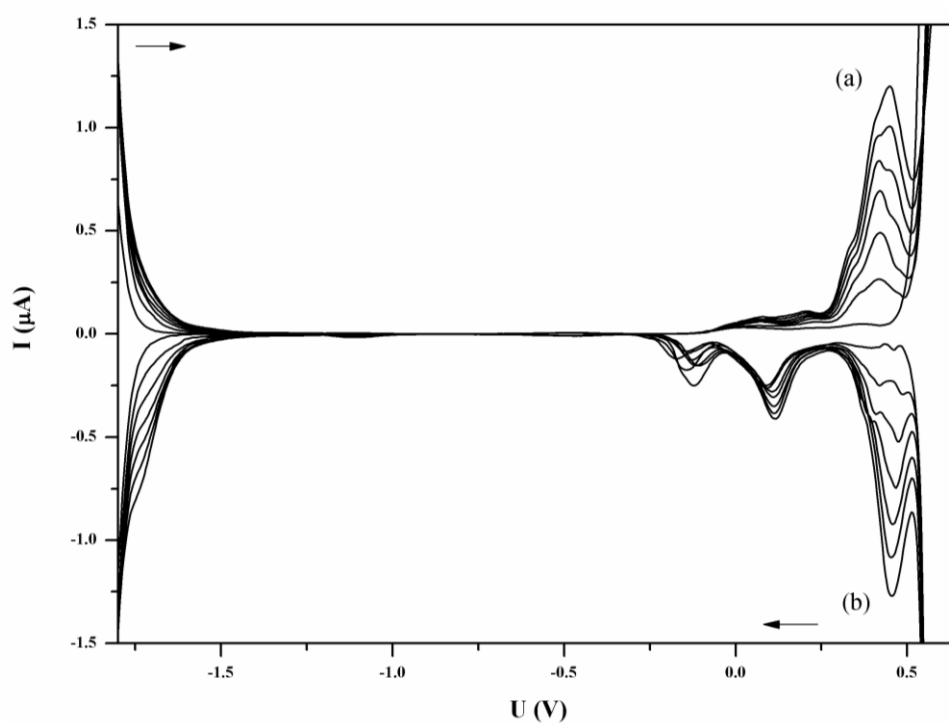
Fonte: Autora.

Figura 67: Voltamograma obtido para Diazepam (6 adições na célula de 10 mg L<sup>-1</sup> / adição). Condições: NaClO<sub>4</sub> em ACN 0,01 mol L<sup>-1</sup>, HMDE operando no modo pulso diferencial, velocidade varredura: 30 mV/s.



Fonte: Autora.

Figura 68: Voltamograma obtido para Medazepam (6 adições na célula de 10 mg L<sup>-1</sup> / adição). Condições: NaClO<sub>4</sub> em ACN 0,01 mol L<sup>-1</sup>, HMDE operando no modo pulso diferencial, velocidade varredura: 30 mV/s.

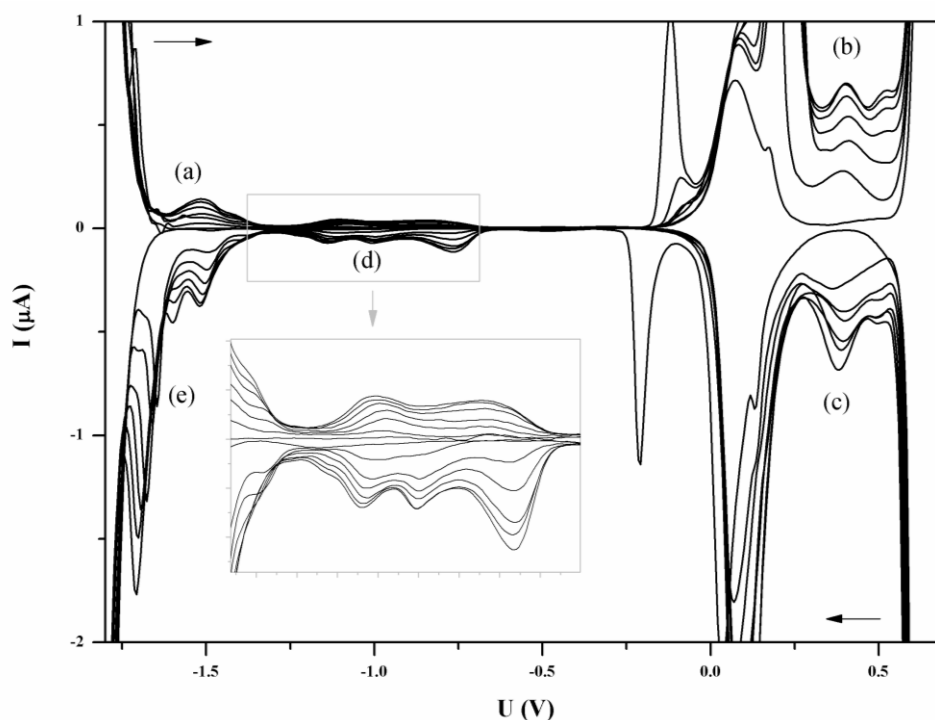


Fonte: Autora.

Dos compostos da classe dos ansiolíticos o medazepam (Figura 68) foi o fármaco a apresentar o comportamento mais distinto. Como é possível perceber, apenas sinais de oxidação próximos a +0,5 V em ambas as varreduras foram observados em (a, b). A diferença no perfil do medazepam em relação aos demais benzodiazepínicos não pode ser explicada pela sua estrutura de acordo com a análise feita até o momento, uma vez que sua molécula possui sítios amina e um átomo de cloro ligado a um dos anéis benzênicos. De qualquer forma, este composto não pode ser validado, uma vez que, assim como para o flurazepam, o padrão sólido foi totalmente utilizado e mais uma vez as tentativas de compra foram barradas nas distribuidoras de fármacos ou farmácias de manipulação. Desta forma, a partir desta etapa, o medazepam não será mais abordado.

O último dos benzodiazepínicos estudado, o midazolam apresentou diversos sinais em boa parte da janela de potenciais disponível. Além de ter apresentado um perfil diferenciado de sinais, este composto, assim como o alprazolam, possui um anel de cinco membros em sua molécula, enquanto os demais ansiolíticos não o possuem.

Figura 69: Voltamograma obtido para Midazolam (6 adições na célula de  $10 \text{ mg L}^{-1}$  / adição). Condições:  $\text{NaClO}_4$  em ACN  $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ , HMDE operando no modo pulso diferencial, velocidade varredura:  $30 \text{ mV/s}$ .

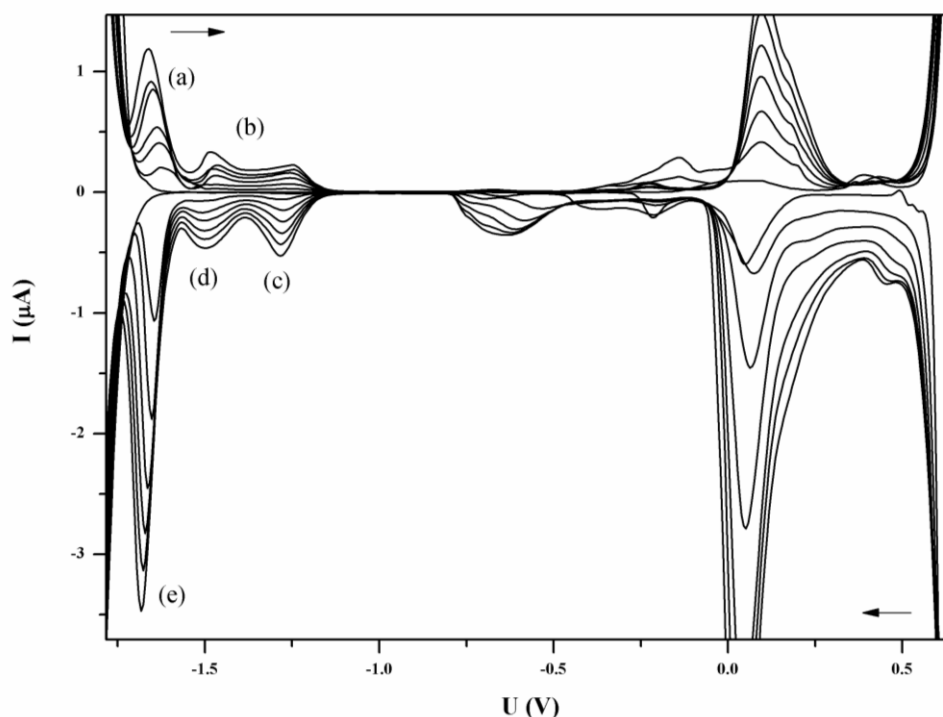


Fonte: Autora.

A quantidade de sinais observados sugere que o midazolam sofre uma série de mecanismos de redução e oxidação e que estes processos são neste caso visíveis de acordo com os fenômenos observados na janela de trabalho em (a, b, c, d, e). O mais interessante para este fármaco, consiste na quantidade de sinais visualizados que podem ser utilizados analiticamente para seu estudo e identificação.

Dos diuréticos estudados, apenas a amilorida apresentou sinais analíticos na região de potenciais negativos da janela de trabalho em (a, b, c, d, e). Este diurético possui sete sítios amina em sua molécula e ainda, a presença de átomos de oxigênio e um átomo de cloro que conjuntamente, conferem a capacidade de redução do composto no eletrodo de mercúrio.

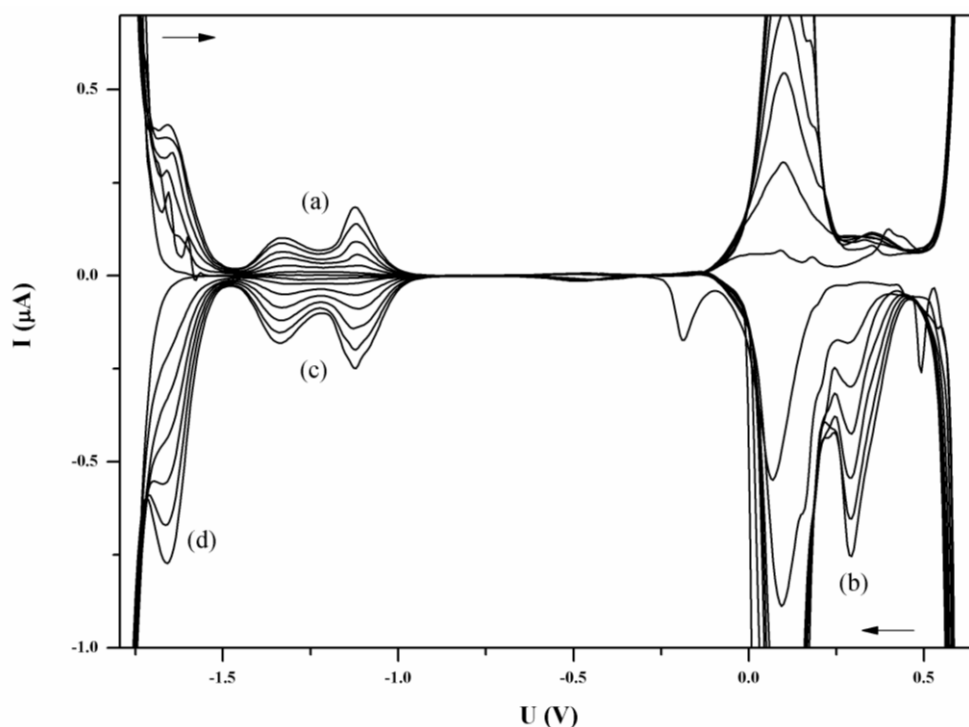
Figura 70: Voltamograma obtido para Amilorida (6 adições na célula de  $10 \text{ mg L}^{-1}$  / adição). Condições:  $\text{NaClO}_4$  em ACN  $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ , HMDE operando no modo pulso diferencial, velocidade varredura:  $30 \text{ mV/s}$ .



Fonte: Autora.

Para os antidepressivos estudados, a bupropiona (Figura 71) foi o composto que apresentou sinal de redução na região de potenciais tanto positivos quanto negativos em (a, b, c, d). A capacidade de redução da bupropiona é conferida devido a presença de cloro, oxigênio e um grupo amina na sua estrutura molecular.

Figura 71: Voltamograma obtido para Bupropiona (6 adições na célula de 10 mg L<sup>-1</sup> / adição). Condições: NaClO<sub>4</sub> em ACN 0,01 mol L<sup>-1</sup>, HMDE operando no modo pulso diferencial, velocidade varredura: 30 mV/s.

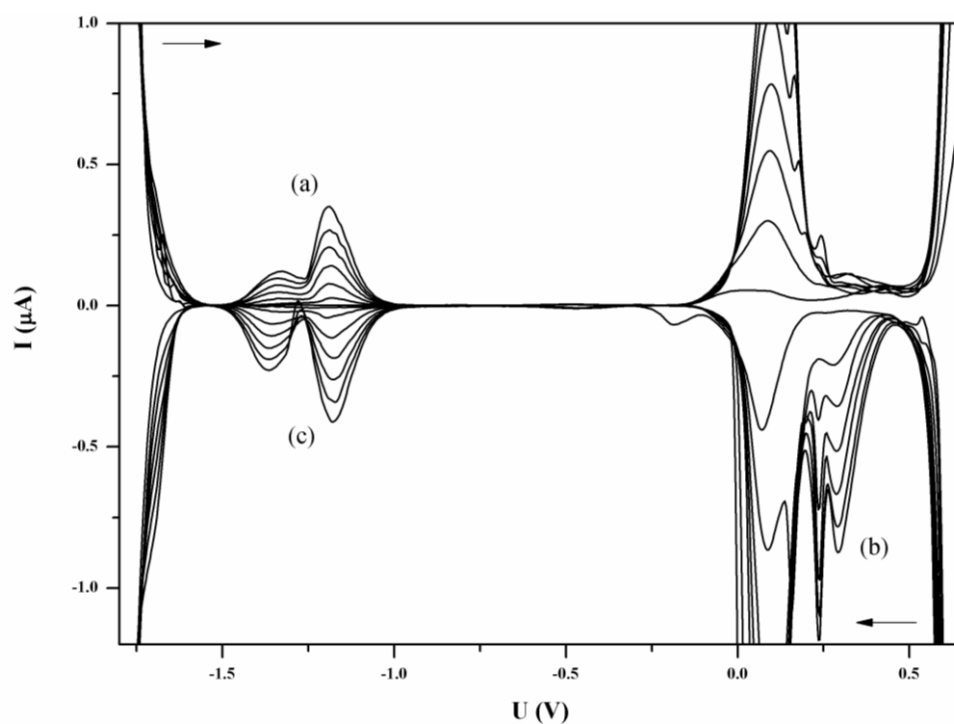


Fonte: Autora.

Por fim, os últimos analitos que apresentaram sinais empregáveis na janela de potenciais estudada foram da classe dos anorexígenos. Foram testados sibutramina, anfepramona e femproporex sendo que apenas a sibutramina não apresentou sinal analítico no eletrodo de mercúrio. Este dado é bastante interessante uma vez que este anorexígeno possui grupos (cloro e amina) considerados eletroativos e capazes de se reduzir em potenciais mais negativos. Anfepramona e femproporex apresentaram comportamentos semelhantes. Ambos apresentaram sinais de redução em (a; c) nas duas varreduras na região mais negativa. Também foram observados sinais na varredura catódica na região de potenciais positivos em (b). Assim como quase totalidade dos demais fármacos que apresentaram sinais positivos, ambos possuem em sua molécula átomos de nitrogênio e oxigênio capazes de conferir fenômenos de redução.

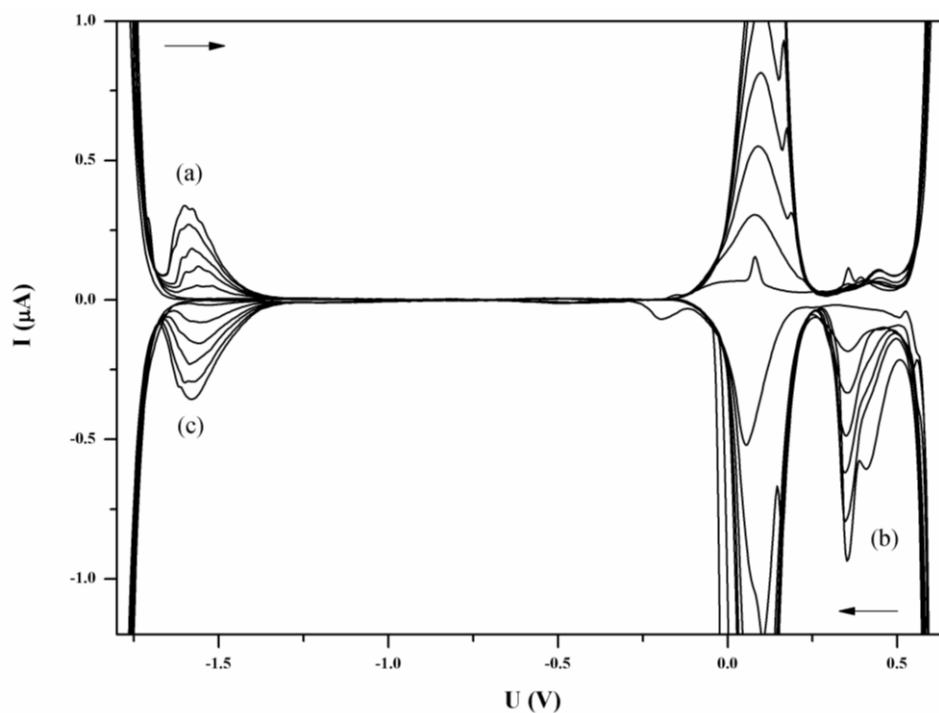
Finalmente, do total de compostos testados a sibutramina, sinefrina, cafeína, ioimbina, sildenafil, tadalafil, fluoxetina, sertralina, clortalidona, furosemida, hidroclortiazida e bisacodil, não apresentaram sinais passíveis de serem estudados por voltametria nas condições testadas.

Figura 72: Voltamograma obtido para Anfepramona (6 adições na célula de  $10 \text{ mg L}^{-1}$  / adição). Condições:  $\text{NaClO}_4$  em ACN  $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ , HMDE operando no modo pulso diferencial, velocidade varredura:  $30 \text{ mV/s}$ .



Fonte: Autora.

Figura 73: Voltamograma obtido para Femproporex (6 adições na célula de  $10 \text{ mg L}^{-1}$  / adição). Condições:  $\text{NaClO}_4$  em ACN  $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ , HMDE operando no modo pulso diferencial, velocidade varredura:  $30 \text{ mV/s}$ .



Fonte: Autora.

Para finalizar a análise dos fármacos no meio orgânico, algumas observações podem ser feitas com base nas semelhanças de perfil apresentadas na janela de trabalho. Por exemplo, ao observar o perfil dos compostos anfepramona e bupropiona, é possível perceber que ambos possuem sinais muito parecidos na região de potenciais negativos da faixa de trabalho (próximos a  $-1,25$  V). Exceto pelo átomo de cloro presente na molécula de bupropiona ligado ao anel aromático, ambas as moléculas são bastante semelhantes, tanto em arranjo quanto em grupamentos eletroativos. Caso semelhante ocorre para os ansiolíticos, diazepam, clordiazepóxido, bromazepam e alprazolam. Todos estes benzodiazepínicos possuem moléculas semelhantes, com anéis aromáticos, grupos amina (N), átomos de oxigênio e halogênios, logo, supõe-se que os mecanismos de reação são semelhantes. Entretanto, mesmo que a reação no eletrodo seja atribuída aos mesmos sítios ativos, todos os fármacos, nos dois casos citados, apresentam diferenças entre si, principalmente em relação a variações no potencial de meia onda característico do composto, na região de potenciais negativos. Atribuem-se estas variações aos fenômenos de transporte difusional do analito pelo eletrólito de trabalho, uma vez que moléculas tendem a se movimentar de formas distintas umas das outras pelo meio até a superfície do eletrodo.

### 5.2.2 Validação do Método (DPV-ACN)

Assim como para o método de separação cromatográfico, para a análise por voltametria em meio não aquosos, os parâmetros de validação foram avaliados de acordo com o guia da AOAC. Os itens a seguir foram avaliados:

- ❖ Seletividade
- ❖ Faixa linear de trabalho
- ❖ Limite de detecção
- ❖ Limite de quantificação
- ❖ Precisão
- ❖ Exatidão

#### 5.2.2.1 Seletividade

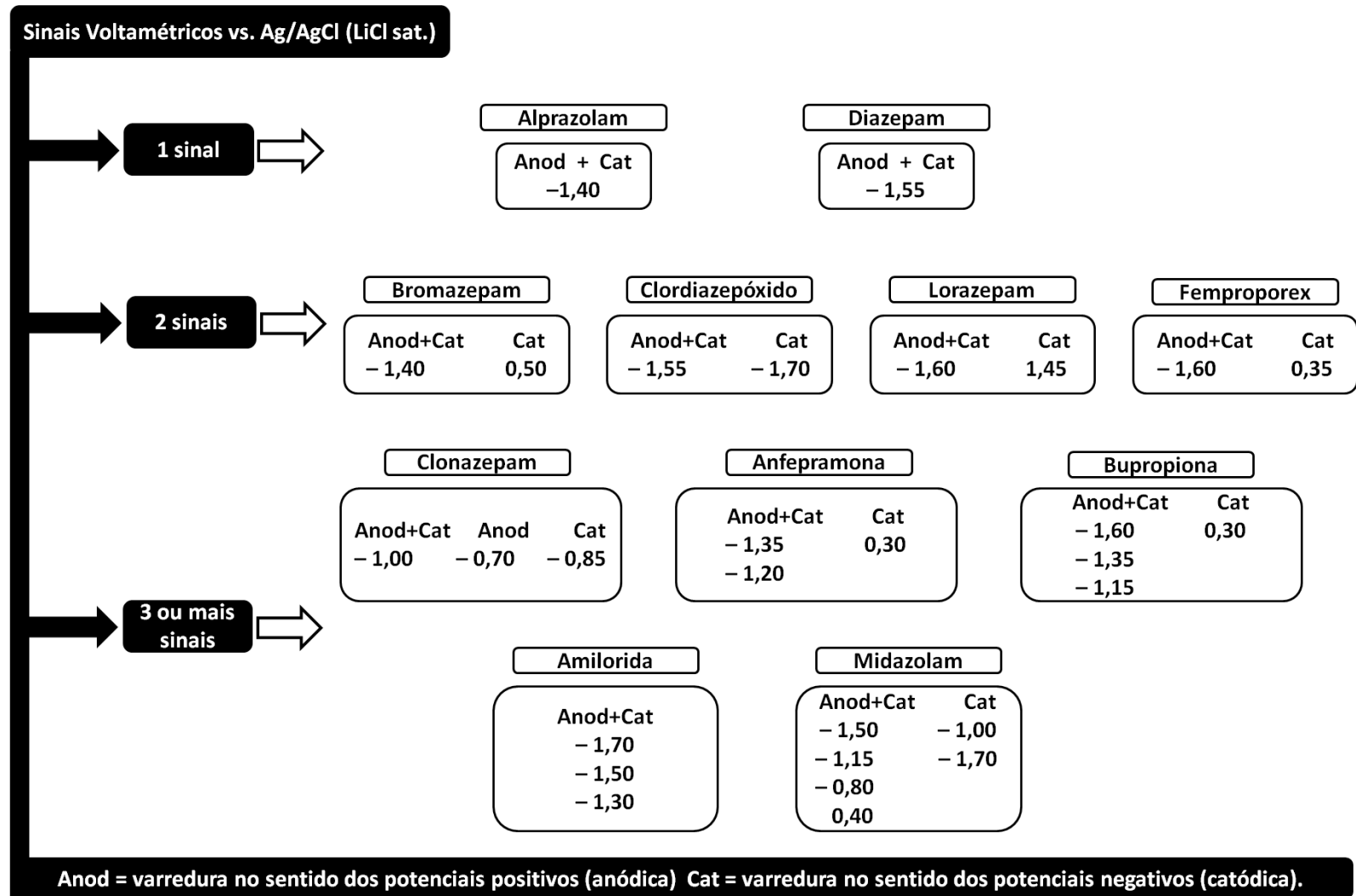
A seletividade foi avaliada paralelamente a otimização do método de análise de adulterantes. Os fármacos que não apresentam sinal não são interferentes. Todos os demais analitos podem de alguma forma interferir entre si, dependendo do sinal observado caso sejam

identificados em uma mesma amostra. Desta forma, a estratégia criada para analisar todos os adulterantes que exibem sinal analítico positivo foi o agrupamento de acordo com a quantidade de sinais encontrados e a região de potencial característica. O fluxograma a seguir (Figura 74) resume o número de sinais e seus respectivos potenciais. Serão contabilizados apenas os principais sinais para fins de identificação.

A partir da identificação pelo perfil apresentado no voltamograma, foi feita uma análise dos sinais para cada um dos compostos farmacêuticos. De acordo com a intensidade do pico e levando-se em consideração a menor ocorrência de interferência mútua entre as substâncias estudadas, foi atribuído um sinal principal a cada adulterante. O sinal escolhido seria utilizado para avaliação de todos os parâmetros de validação analítica. Estas informações estão contidas na Tabela 13.



Figura 74: Fluxograma do agrupamento de sinais proposto para identificação dos fármacos como adulterantes em meio não aquoso.



Fonte: Autora.

Tabela 13: Análise dos sinais apresentados pelos fármacos, sinal principal escolhido para quantificação e interferências mútuas de acordo com o sinal escolhido.

ADULTERANTE	SINAIS APRESENTADOS		SINAL PRINCIPAL <sup>1</sup>	INTERFERENTES (sinal principal – quantificação) <sup>2</sup>
	Sentido Positivo (V)	Sentido Negativo (V)		
Alprazolam	-1,40	-1,40	-1,40 (-)	Bromazepam Lorazepam Bupropiona Anfepramona
Bromazepam	-1,40/0,40	0,40/-1,40	0,40 (+)	Midazolam
Clonazepam	-1,00/-0,7	-0,85/-1,00	-1,00 (-)	Midazolam
Clordiazepóxido	-1,55	-1,55/-1,70	-1,55 (-)	Diazepam Lorazepam Midazolam Amilorida Bupropiona
Diazepam	-1,55	-1,55	-1,55 (-)	Clordiazepóxido Lorazepam Midazolam Amilorida Bupropiona Femproporex
Lorazepam	-1,60	-1,45/-1,60	-1,45 (-)	Alprazolam Bromazepam Midazolam Amilorida Bupropiona Anfepramona
Midazolam	-1,50/-1,15/-0,80/0,40	0,40/-0,80/-1,00/-1,15/-1,50/-1,70	-0,80 (-)	Clonazepam
Amilorida	-1,70/-1,50/-1,30	-1,30/-1,50/-1,70	-1,30 (-)	Bupropiona Anfepramona
Bupropiona	-1,60/-1,35/-1,15	0,30/-1,15/-1,35/-1,60	0,30 (-)	Femproporex
Anfepramona	-1,35/-1,20	-1,20/-1,35/0,30	-1,35 (-)	Alprazolam Bromazepam Amilorida Bupropiona
Femproporex	-1,60	0,35/-1,60	-1,60 (-)	Clordiazepóxido Diazepam Lorazepam Bupropiona

<sup>1</sup> Sinal principal para validação e quantificação escolhido priorizando 1) intensidade de sinal e 2) menor interferência dos demais fármacos.

<sup>2</sup> Interferências mútuas consideradas a partir da variação de  $\pm 0,10$  V, apenas para o sinal principal.

Fonte: Autora.

### 5.2.2.2 Faixa linear, limites de detecção e quantificação

A faixa linear foi estudada para cada composto em separado. A análise individual foi executada apenas na faixa de potencial referente ao pico escolhido como principal (Tabela 14).

Tabela 14: Parâmetros voltamétricos de validação individuais para os adulterantes em suplementos alimentares. Condições: NaClO<sub>4</sub> em ACN 0,01 mol L<sup>-1</sup>, HMDE operando no modo pulso diferencial, velocidade varredura: 30 mV/s.

Adulterante	Faixa de Potencial		Varredura (sentido de potenciais)	Sinal Principal
	Início (V)	Fim (V)		
Alprazolam	-1,0	-1,8	Negativo (-)	-1,40
Bromazepam	0,1	1,0	Positivo (+)	0,40
Clonazepam	-0,7	-1,8	Negativo (-)	-1,00
Chlordiazepóxido	-1,25	-1,8	Negativo (-)	-1,55
Diazepam	-1,2	-1,8	Negativo (-)	-1,55
Lorazepam	-1,0	-1,8	Negativo (-)	-1,45
Midazolam	-0,1	-1,3	Negativo (-)	-0,80
Amilorida	-1,0	-1,6	Negativo (-)	-1,3
Bupropiona	0,8	-0,1	Negativo (-)	0,3
Anfepramona	-1,8	-0,7	Negativo (-)	-1,35
Femproporex	-1,0	-1,9	Negativo (-)	-1,60

Fonte: Autora.

Foram injetadas concentrações baixas até que o pico não fosse mais distinguível da linha base no voltamograma. Então, a partir da obtenção desse valor de concentração, foram preparadas curvas analíticas dobrando a concentração a cada ponto da curva. Após obtenção da altura do pico pelo sistema de integração de picos própria do analisador (VA trace analyser 760), foi plotada a curva analítica e observando-se o R<sup>2</sup> foram feitos ajustes de concentração para adequação da curva para cada composto. Quando curvas analíticas com R<sup>2</sup> de no mínimo 0,99 foram obtidas, foram repetidas três curvas de sete pontos para cada composto e a média dos valores de área foram utilizados para a regressão linear. Os limites de detecção e quantificação foram determinados com base na inclinação da curva analítica, calculados de acordo com as equações especificados no item 4.3.3. A seguir podem ser encontrados os

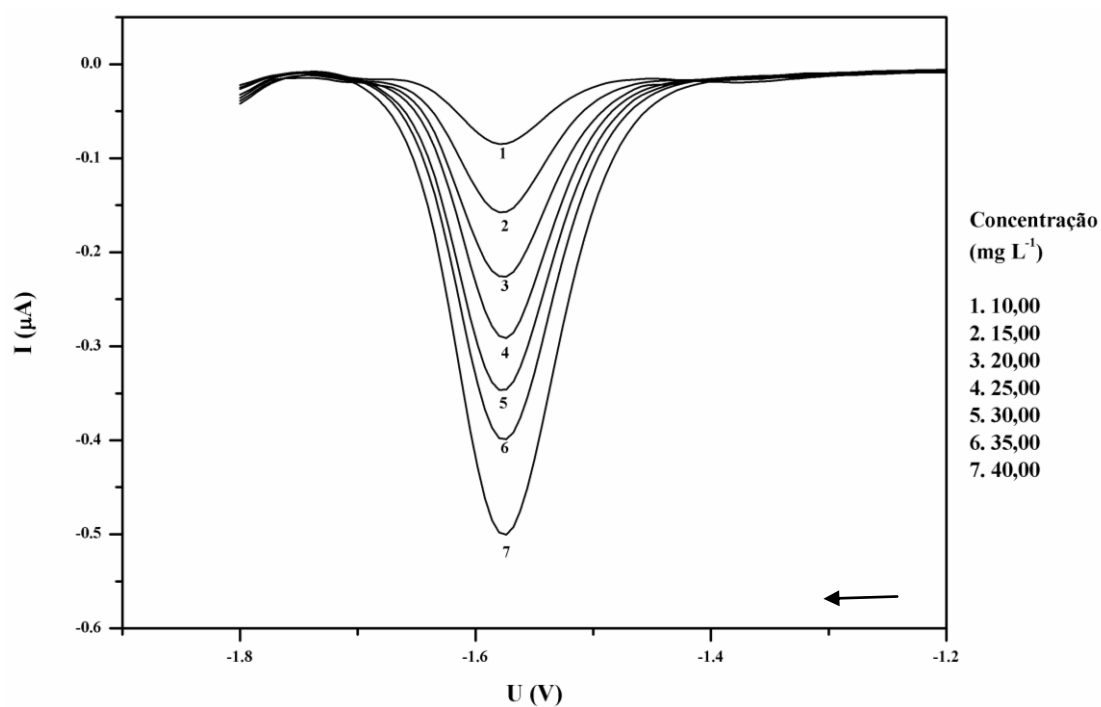
dados obtidos para a faixa linear e limites de detecção e quantificação, bem como o voltamograma registrado para cada composto na região determinada.

Tabela 15: Dados de validação obtidos para os adulerantes estudados por voltametria em meio não aquoso: Faixa linear (equação da reta,  $R^2$ ), limites de detecção e quantificação.

<b>Adulterante</b>	<b>Faixa Linear (mg L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Equação da Reta</b>	<b>R<sup>2</sup></b>	<b>LD (mg L<sup>-1</sup>)</b>	<b>LQ (mg L<sup>-1</sup>)</b>
Alprazolam	10,00 – 40,00	$y = 8,5583x + 54,918$	0,9908	0,74	2,25
Bromazepam	10,00 – 40,00	$y = 16,100x + 94,604$	0,9940	0,89	2,70
Clonazepam	2,00 – 35,00	$y = 21,419x + 34,998$	0,9921	0,45	1,37
Clordiazepóxido	5,00 – 35,00	$y = 13,846x + 71,39$	0,9949	0,83	2,53
Diazepam	5,00 – 60,00	$y = 7,912x + 16,071$	0,9960	1,46	4,42
Lorazepam	15,00 – 45,00	$y = 3,9596x - 41,582$	0,9946	2,92	8,84
Midazolam	25,00 – 110,00	$y = 2,4153x - 35,908$	0,9964	6,00	18,20
Amilorida	20,00 – 80,00	$y = 3,2192x - 29,065$	0,9936	5,40	16,36
Bupropiona	5,00 – 70,00	$y = 10,008x - 14,902$	0,9970	0,98	2,97
Anfepramona	25,00 – 55,00	$y = 3,2003x - 29,017$	0,9966	7,81	23,65
Femproporex	15,00 – 45,00	$y = 3,9596x - 41,582$	0,9946	2,92	8,84

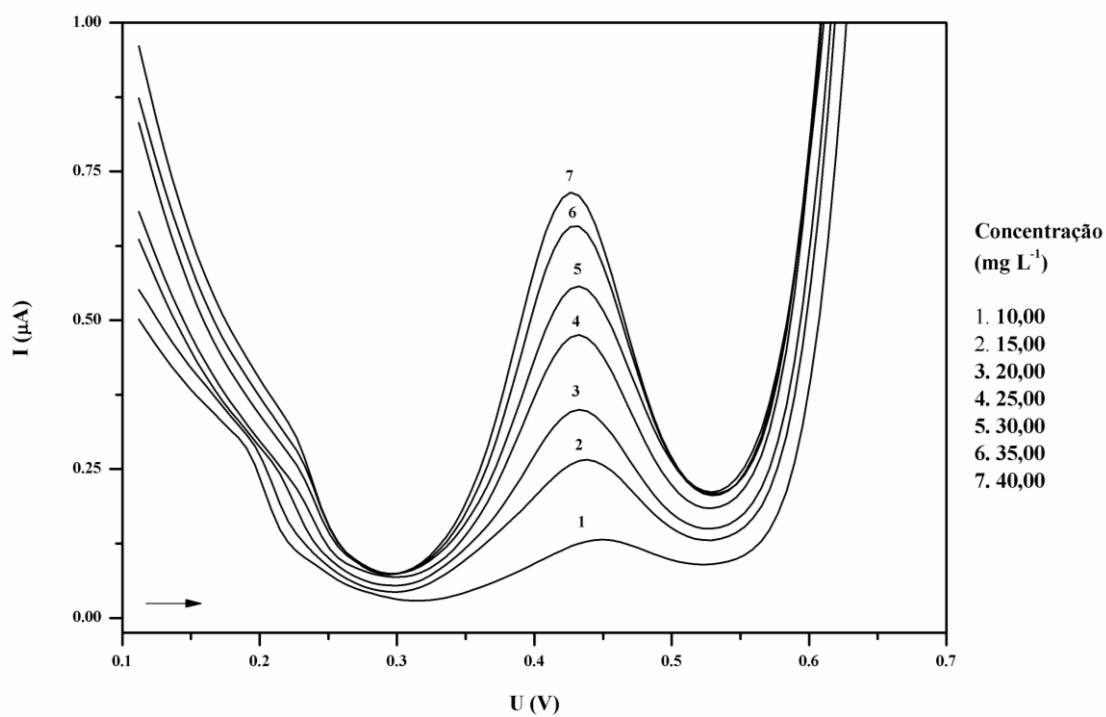
Fonte: Autora.

Figura 75: Sinal eletroquímico observado em eletrodo de mercúrio para faixa linear do Alprazolam em 0,01 mol L<sup>-1</sup> NaClO<sub>4</sub> em ACN.



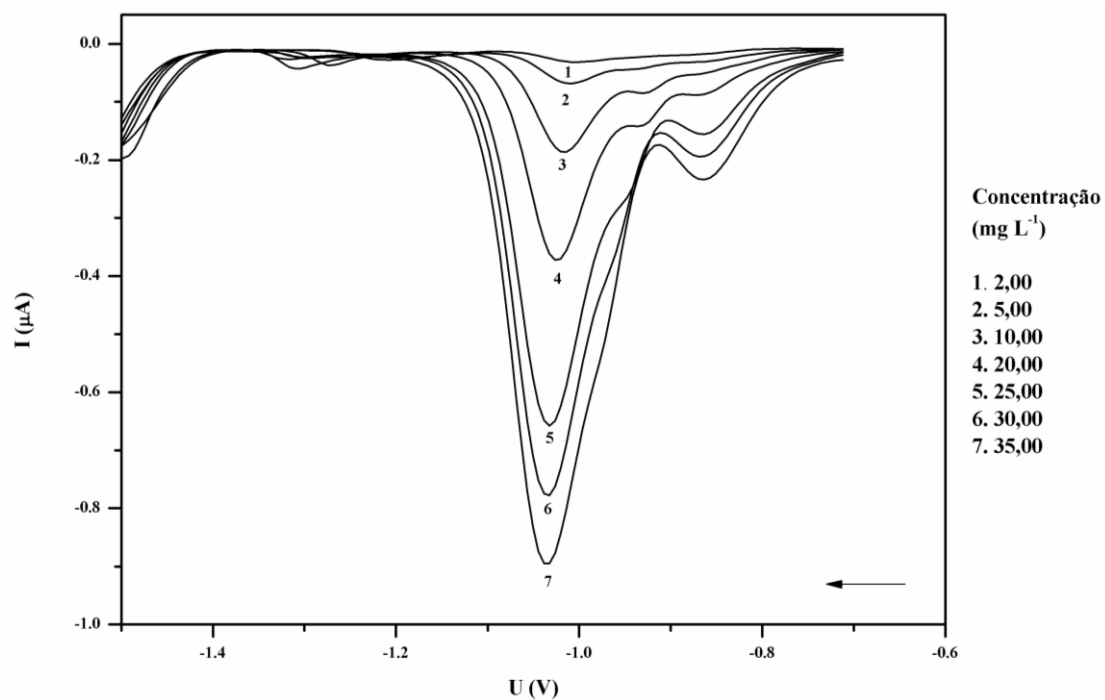
Fonte: Autora.

Figura 76: Sinal eletroquímico observado para faixa linear do Bromazepam. Condições: NaClO<sub>4</sub> em ACN 0,01 mol L<sup>-1</sup>, HMDE operando no modo pulso diferencial, velocidade varredura: 30 mV/s.



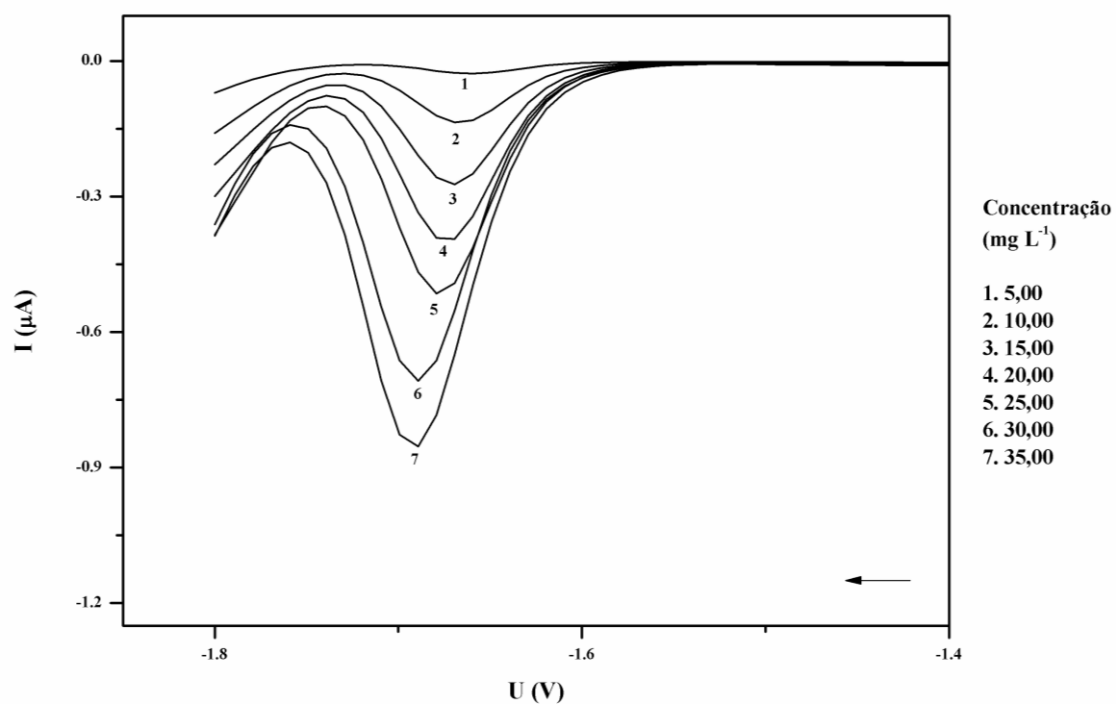
Fonte: Autora.

Figura 77: Sinal eletroquímico observado para faixa linear do Clonazepam. Condições:  $\text{NaClO}_4$  em ACN  $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ , HMDE operando no modo pulso diferencial, velocidade varredura:  $30 \text{ mV/s}$ .



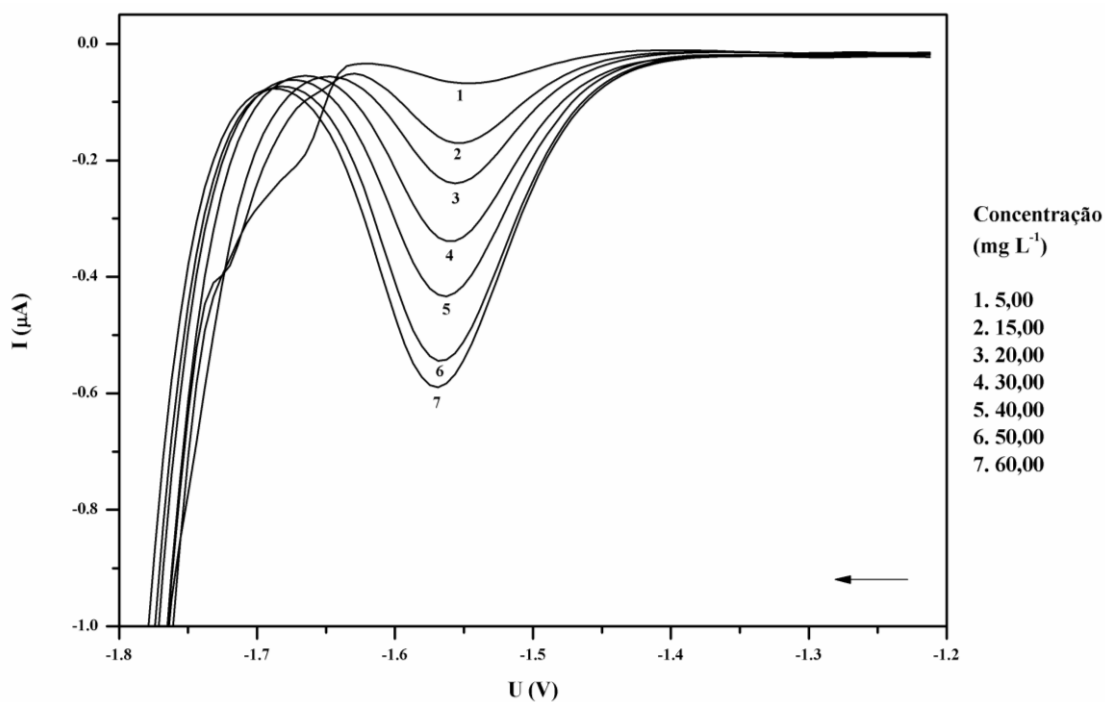
Fonte: Autora.

Figura 78: Sinal eletroquímico observado para faixa linear do Clordiazepóxido. Condições:  $\text{NaClO}_4$  em ACN  $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ , HMDE operando no modo pulso diferencial, velocidade varredura:  $30 \text{ mV/s}$ .



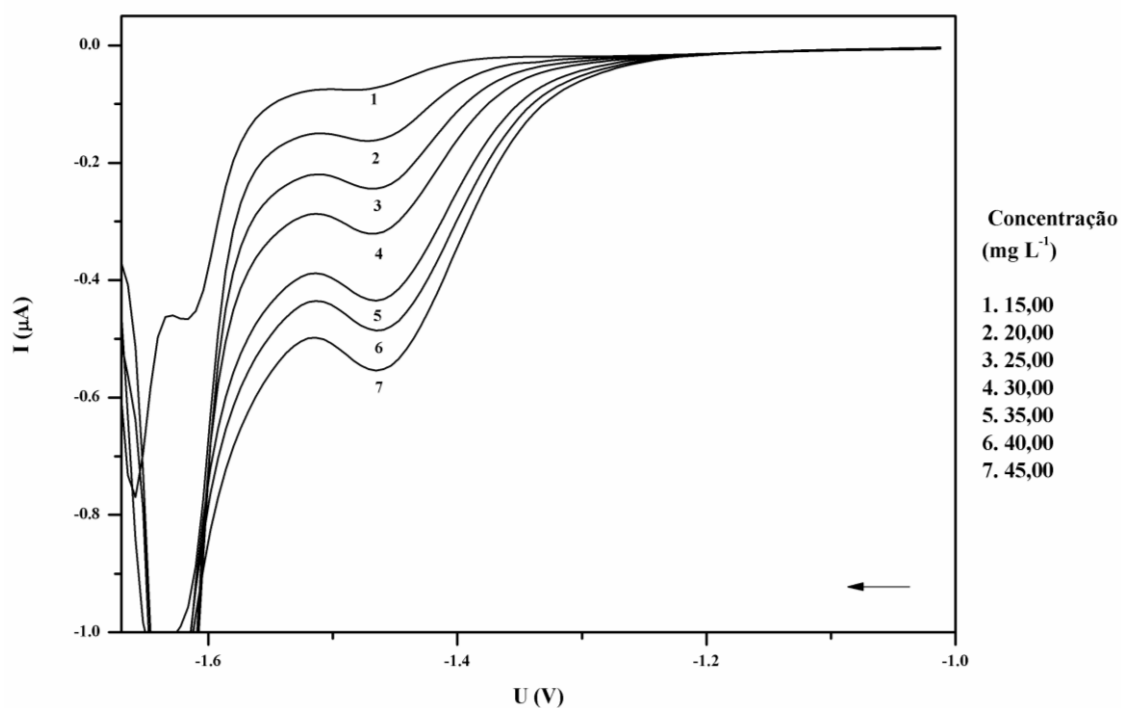
Fonte: Autora.

Figura 79: Sinal eletroquímico observado para faixa linear do Diazepam. Condições: NaClO<sub>4</sub> em ACN 0,01 mol L<sup>-1</sup>, HMDE operando no modo pulso diferencial, velocidade varredura: 30 mV/s.



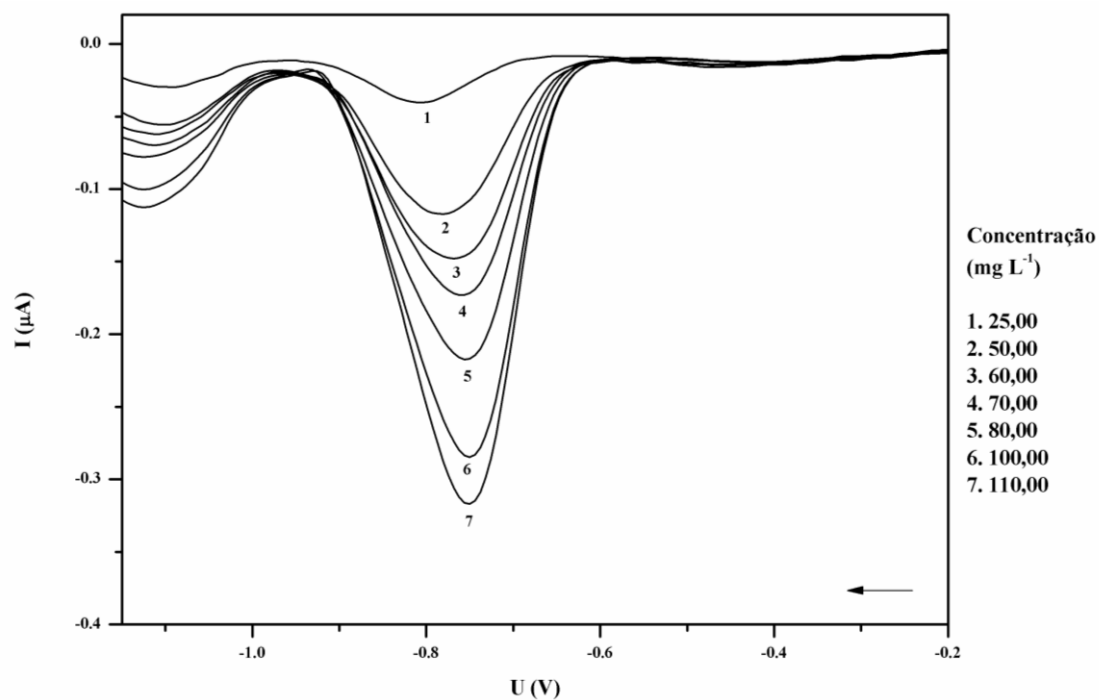
Fonte: Autora.

Figura 80: Sinal eletroquímico observado para faixa linear do Lorazepam. Condições: NaClO<sub>4</sub> em ACN 0,01 mol L<sup>-1</sup>, HMDE operando no modo pulso diferencial, velocidade varredura: 30 mV/s.



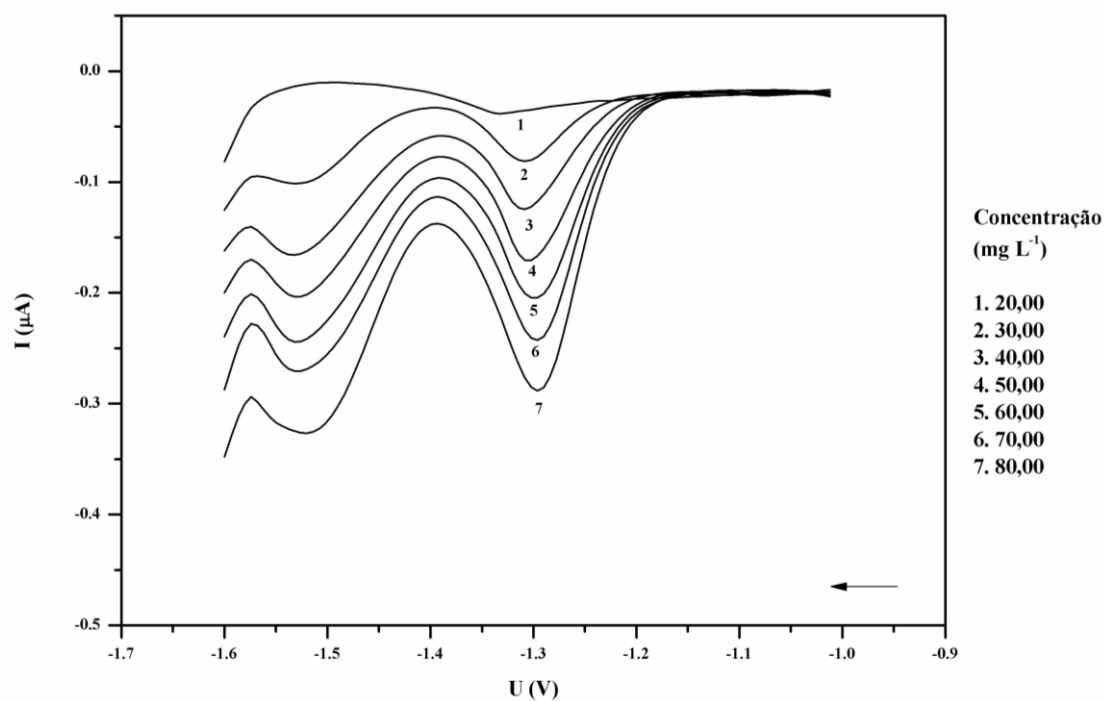
Fonte: Autora.

Figura 81: Sinal eletroquímico observado para faixa linear do Midazolam. Condições:  $\text{NaClO}_4$  em ACN  $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ , HMDE operando no modo pulso diferencial, velocidade varredura:  $30 \text{ mV/s}$ .



Fonte: Autora.

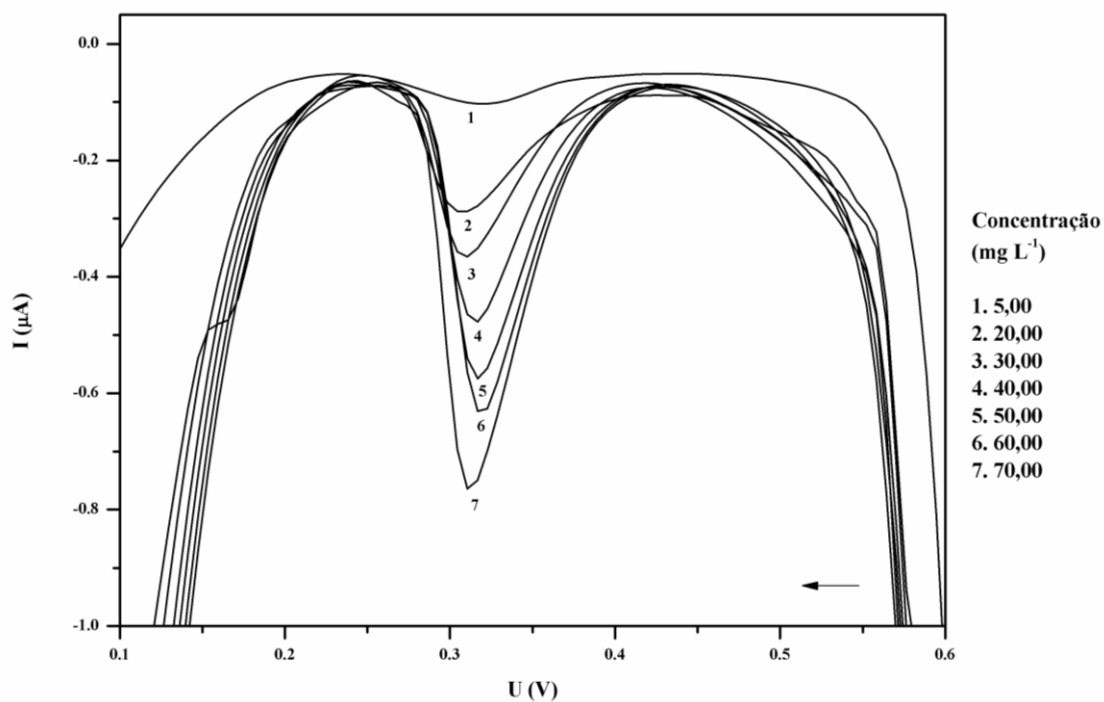
Figura 82: Sinal eletroquímico observado para faixa linear do Amilorida. Condições:  $\text{NaClO}_4$  em ACN  $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ , HMDE operando no modo pulso diferencial, velocidade varredura:  $30 \text{ mV/s}$ .



Fonte: Autora.

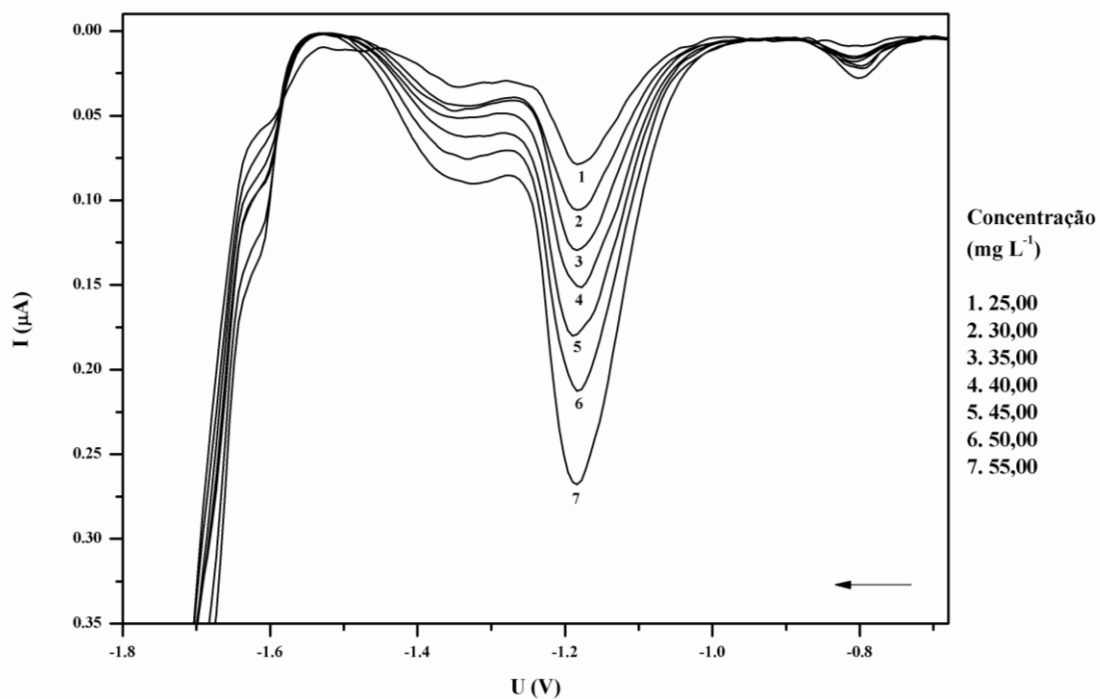


Figura 83: Sinal eletroquímico observado para faixa linear do Bupropiona. Condições:  $\text{NaClO}_4$  em ACN  $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ , HMDE operando no modo pulso diferencial, velocidade varredura:  $30 \text{ mV/s}$ .



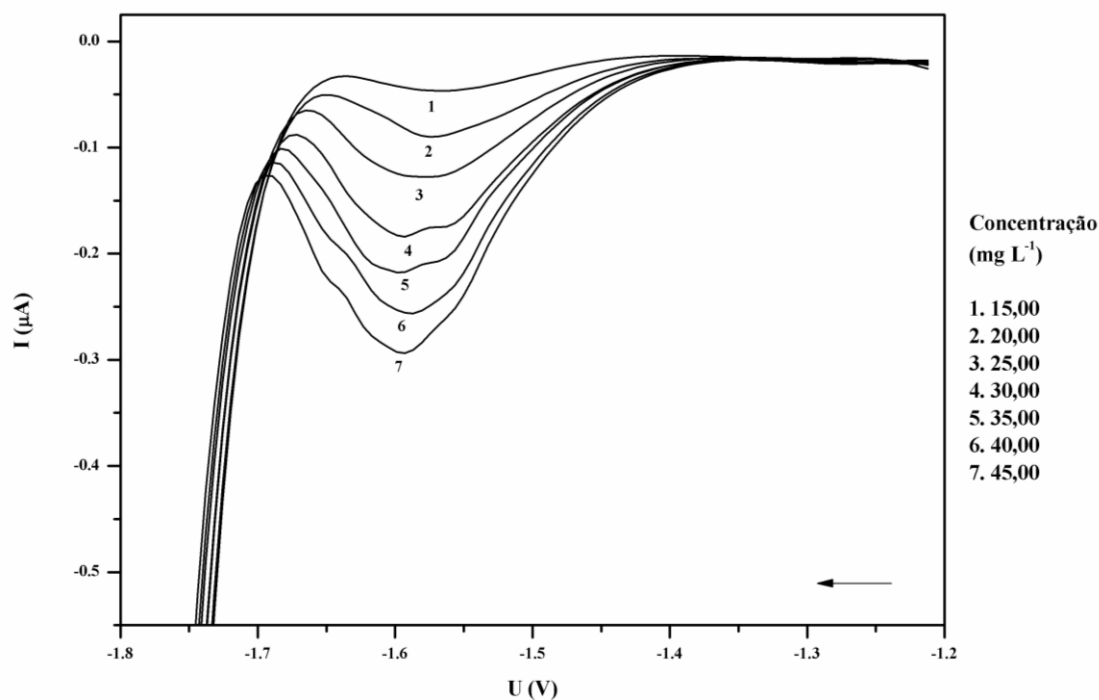
Fonte: Autora.

Figura 84: Sinal eletroquímico observado para faixa linear do Anfepramona. Condições:  $\text{NaClO}_4$  em ACN  $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ , HMDE operando no modo pulso diferencial, velocidade varredura:  $30 \text{ mV/s}$ .



Fonte: Autora.

Figura 85: Sinal eletroquímico observado para faixa linear do Femproporex. Condições: NaClO<sub>4</sub> em ACN 0,01 mol L<sup>-1</sup>, HMDE operando no modo pulso diferencial, velocidade varredura: 30 mV/s.



Fonte: Autora.

### 5.2.2.3 Precisão e Exatidão

Antes de iniciar os estudos de precisão e exatidão, foi necessário uma otimização prévia da diluição adequada das amostras. Foram testadas diferentes composições de matrizes dos suplementos alimentares e chegou-se a conclusão de que a matriz de uma forma geral exerce grande influência na interface eletrólito/eletrodo de trabalho, impedindo a observação das reações redox referentes aos fármacos. Foi determinado desta forma, que uma diluição da amostra de no mínimo 100 vezes deveria ser executada para realização de todos os ensaios envolvendo amostras reais mediante testes de várias diluições que partiram de 5 chegando até 500 vezes.

Assim, os ensaios de precisão e exatidão foram realizados para cada analito em separado na presença da amostra. Foi analisado um ponto de baixa concentração da curva analítica para cada fármaco. O método da adição padrão foi utilizado para quantificação das amostras fortificadas com os analitos de interesse. Foram realizados dois ensaios para determinação da precisão e exatidão na amostra. Os testes consistiram no preparo de células voltamétricas contendo:

	<b>Amostra</b>	<b>Diluição</b>	<b>Célula Voltamétrica</b>
Teste 1	Sem fortificação	100 x	100 µL amostra + Padrão Fármaco = v.f. 10 mL
Teste 2	Com fortificação	100 x	100 µL amostra contendo Padrão Fármaco = v.f. 10 mL

Estas soluções foram submetidas a varredura na faixa de potencial individual de cada adulterante e após o processo de obtenção da altura do pico, o fármaco foi quantificado. Uma repetição do teste 1 foi realizada enquanto que o teste 2 foi realizado em triplicata (n=3). A partir destes dados, obtiveram-se os valores de precisão intra dia (CV %) e exatidão (Recuperação em %). Para o teste 1 foi utilizada amostra contendo suplemento manipulado *Long Jack* (amostra 21/2014), e para o teste 2 foi empregada amostra contendo proteína do soro do leite isolada e hidrolisada (amostra 11/2014) conforme pode ser visto na Tabela 17.

É necessário salientar que para o lorazepam não foi possível finalizar os testes de precisão e exatidão. Mesmo com a diluição de 100 vezes da amostra, este fármaco não apresentou sinal na varredura realizada. Para este composto a influência da matriz é tal que impede sua determinação e *screening* nas condições otimizadas para este método. Na tentativa de visualizar o sinal na presença da amostra foi analisada uma maior concentração do mesmo. Acima de 30 mg L<sup>-1</sup> um sinal suave era visível no voltamograma. Porém, o limite máximo da faixa linear para o lorazepam é 45 mg L<sup>-1</sup>. Adicionando-se 5 mg L<sup>-1</sup> a cada leitura para haverem no mínimo três adições de padrão na amostra, as leituras de concentração se tornaram muito próximas, impedindo a quantificação com precisão ou exatidão adequadas. Portanto, não serão apresentados resultados referentes a estes parâmetros para o ansiolítico lorazepam.

Tabela 16: Figuras de mérito obtidas para os adulterantes estudados por voltametria em meio não aquoso.

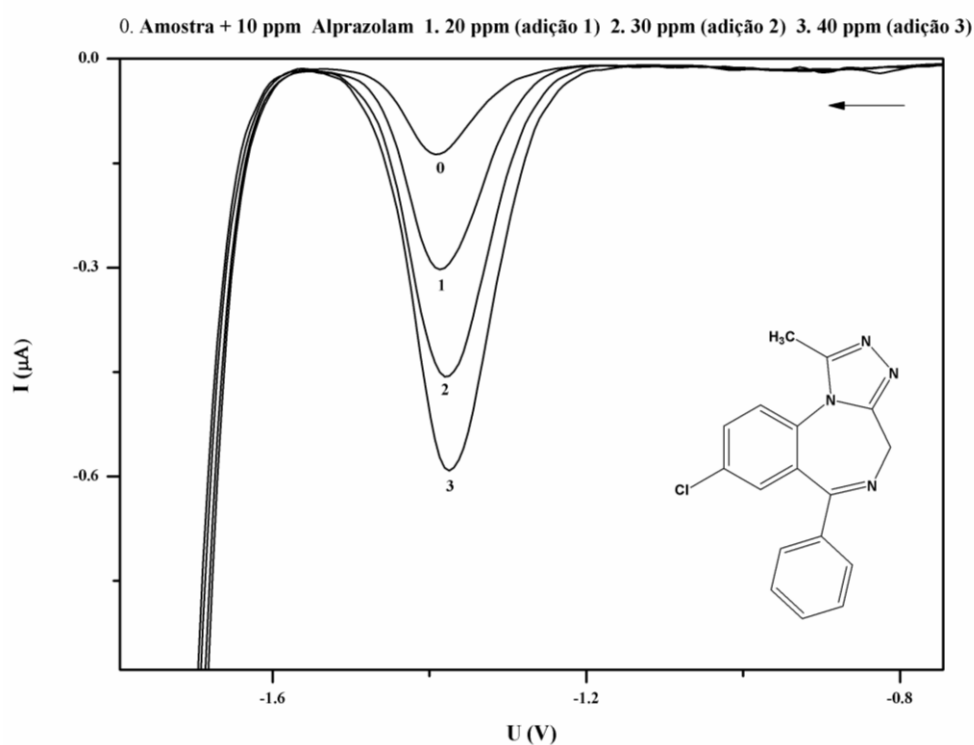
Adulterante	Faixa Linear (mg L <sup>-1</sup> )	LD (mg L <sup>-1</sup> )	LQ (mg L <sup>-1</sup> )	Precisão (CV%)	Exatidão (%)
Alprazolam	10,00 – 40,00	0,74	2,25	5,649	111,53
Bromazepam	10,00 – 40,00	0,89	2,70	3,24	121,55
Clonazepam	2,00 – 35,00	0,45	1,37	3,41	95,19
Clordiazepóxido	5,00 – 35,00	0,83	2,53	1,07	116,90
Diazepam	5,00 – 60,00	1,46	4,42	5,71	114,67

Midazolam	25,00 – 110,00	6,00	18,20	5,00	117,33
Amilorida	20,00 – 80,00	5,40	16,36	8,27	88,96
Bupropiona	5,00 – 70,00	0,98	2,97	3,71	93,24
Anfepramona	25,00 – 55,00	7,81	23,65	4,05	104,15
Femproporex	15,00 – 45,00	2,92	8,84	5,60	112,28

Fonte: Autora.

A seguir serão mostrados os voltamogramas para os sinais analíticos adquiridos para os fármacos na presença da amostra após o processo de extração. É importante salientar que são observadas algumas alterações no potencial principal para alguns analitos na presença da amostra. Isso é esperado uma vez que a matriz modifica a composição da solução do eletrólito. Essa mudança por sua vez, pode aumentar ou diminuir o potencial do pico característico dos compostos. Entretanto, para nenhum dos fármacos esta mudança alterou o perfil eletroquímico particular frente ao eletrodo de mercúrio.

Figura 86: Sinal eletroquímico obtido para quantificação de amostra fortificada com Alprazolam. Condições: NaClO<sub>4</sub> em ACN 0,01 mol L<sup>-1</sup>, HMDE operando no modo pulso diferencial, velocidade varredura: 30 mV/s.



Fonte: Autora.

Figura 87: Sinal eletroquímico obtido para quantificação de amostra fortificada com Bromazepam. Condições:  $\text{NaClO}_4$  em ACN  $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ , HMDE operando no modo pulso diferencial, velocidade varredura:  $30 \text{ mV/s}$ .

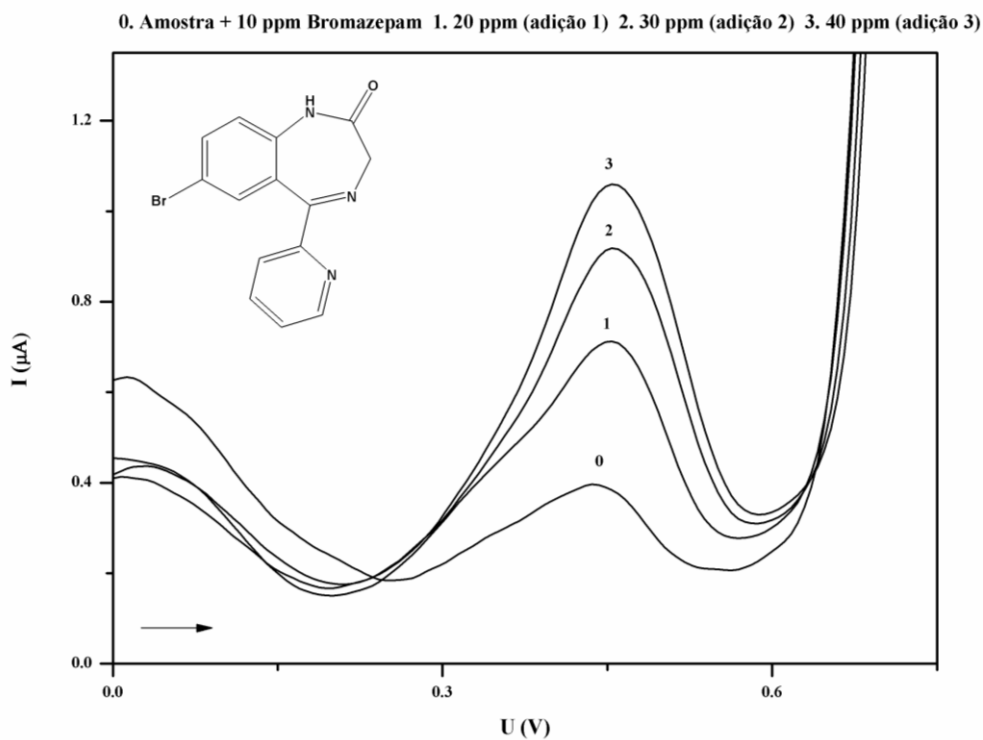


Figura 88: Sinal eletroquímico obtido para quantificação de amostra fortificada com Clonazepam. Condições:  $\text{NaClO}_4$  em ACN  $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ , HMDE operando no modo pulso diferencial, velocidade varredura:  $30 \text{ mV/s}$ .

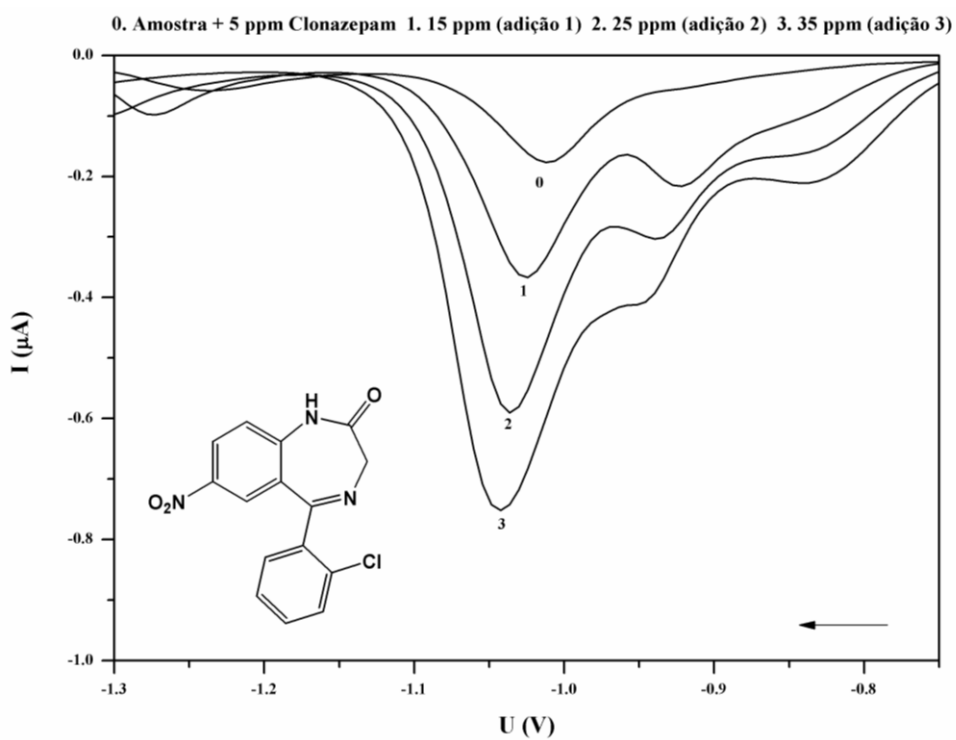
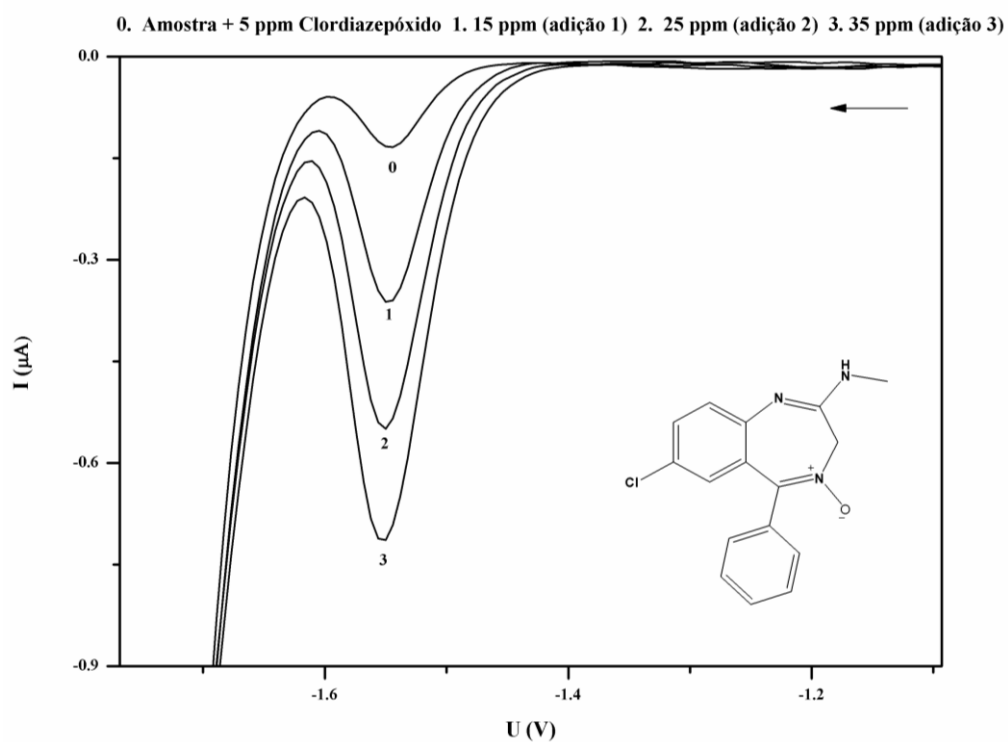
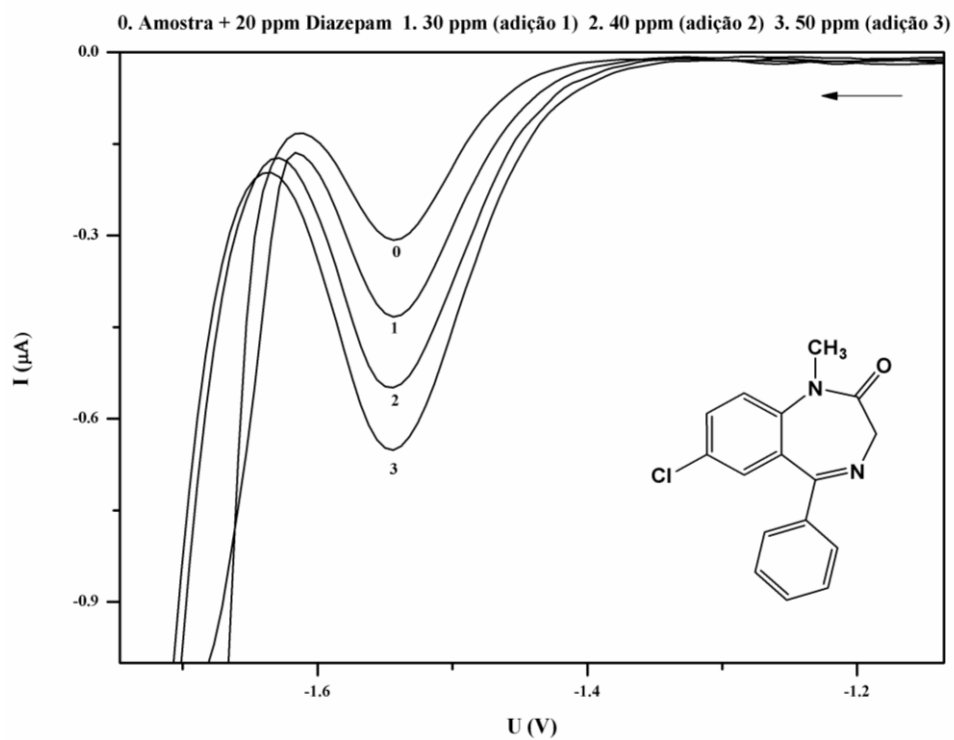


Figura 89: Sinal eletroquímico obtido para quantificação de amostra fortificada com Clordiazepóxido. Condições:  $\text{NaClO}_4$  em ACN  $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ , HMDE operando no modo pulso diferencial, velocidade varredura:  $30 \text{ mV/s}$ .



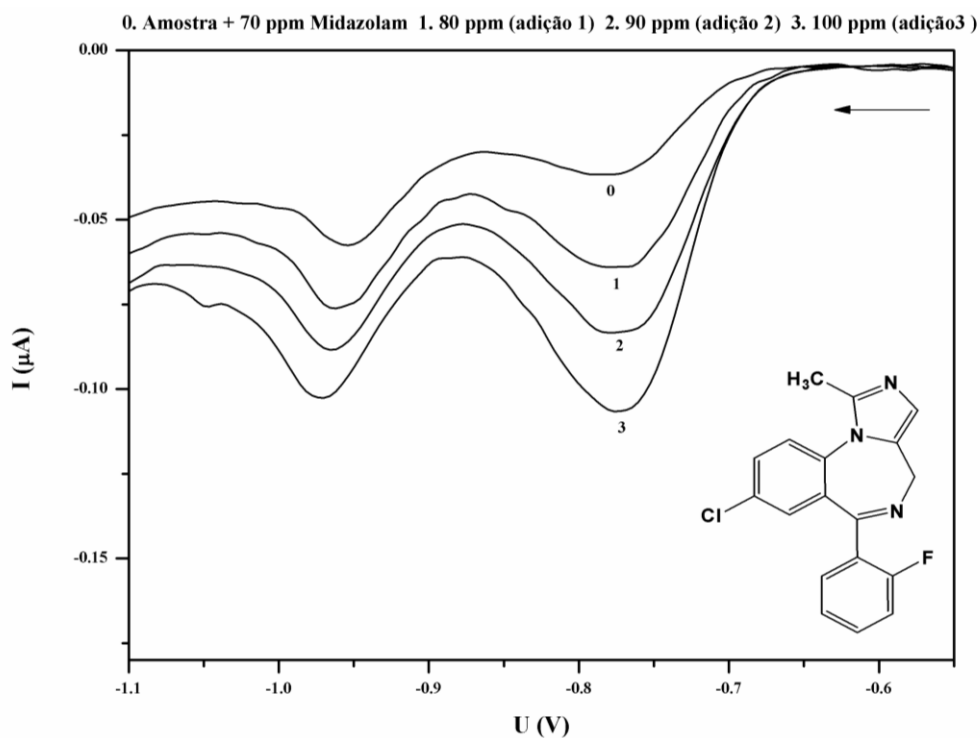
Fonte: Autora.

Figura 90: Sinal eletroquímico obtido para quantificação de amostra fortificada com Diazepam. Condições:  $\text{NaClO}_4$  em ACN  $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ , HMDE operando no modo pulso diferencial, velocidade varredura:  $30 \text{ mV/s}$ .



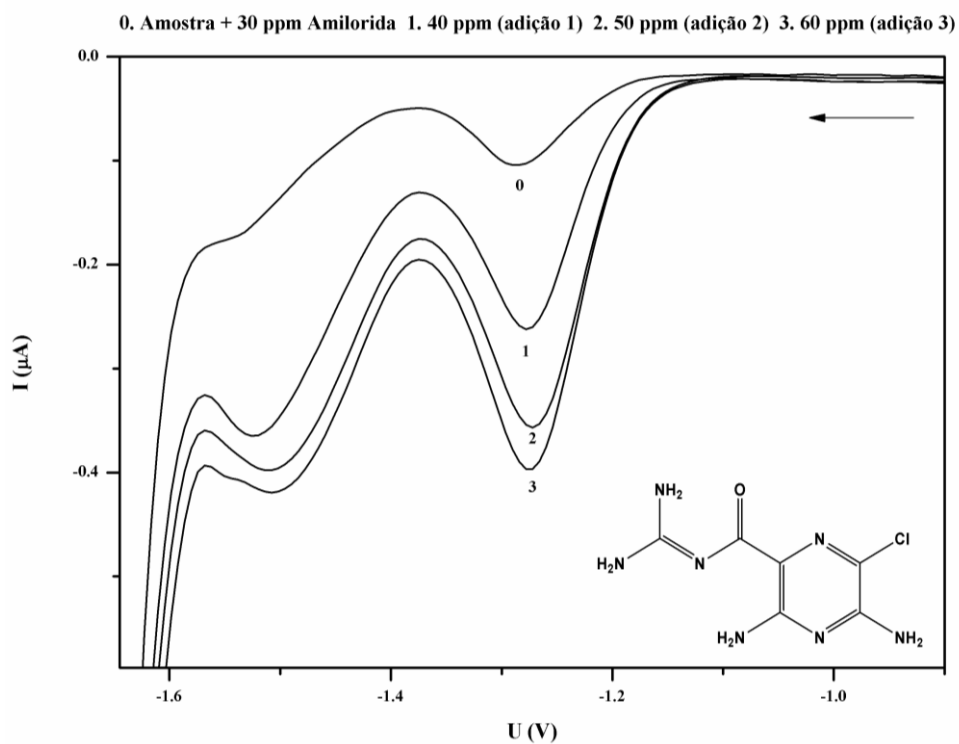
Fonte: Autora.

Figura 91: Sinal eletroquímico obtido para quantificação de amostra fortificada com Midazolam. Condições:  $\text{NaClO}_4$  em ACN  $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ , HMDE operando no modo pulso diferencial, velocidade varredura:  $30 \text{ mV/s}$ .



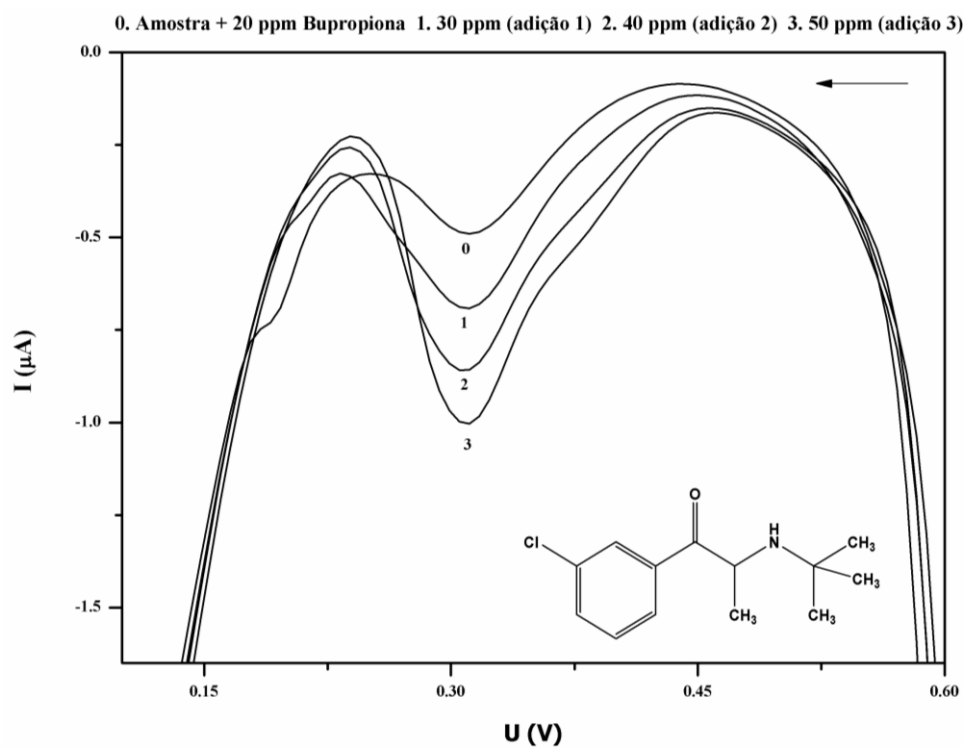
Fonte: Autora.

Figura 92: Sinal eletroquímico obtido para quantificação de amostra fortificada com Amilorida. Condições:  $\text{NaClO}_4$  em ACN  $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ , HMDE operando no modo pulso diferencial, velocidade varredura:  $30 \text{ mV/s}$ .



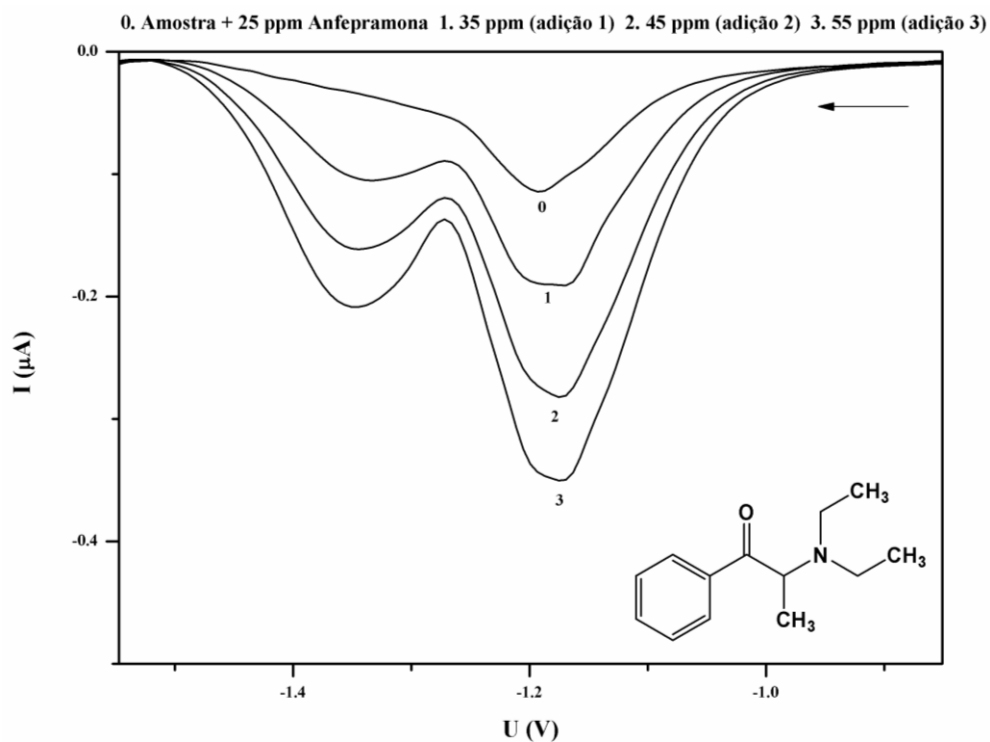
Fonte: Autora.

Figura 93: Sinal eletroquímico obtido para quantificação de amostra fortificada com Bupropiona. Condições:  $\text{NaClO}_4$  em ACN  $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ , HMDE operando no modo pulso diferencial, velocidade varredura:  $30 \text{ mV/s}$ .



Fonte: Autora.

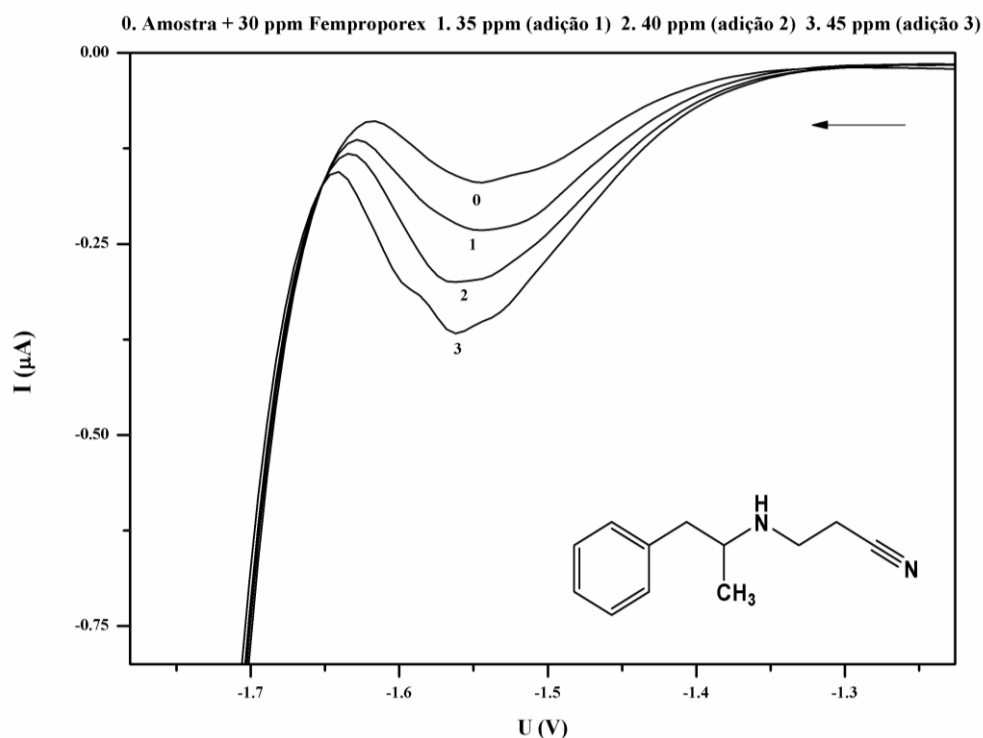
Figura 94: Sinal eletroquímico obtido para quantificação de amostra fortificada com Anfepramona. Condições:  $\text{NaClO}_4$  em ACN  $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ , HMDE operando no modo pulso diferencial, velocidade varredura:  $30 \text{ mV/s}$ .



Fonte: Autora.



Figura 95: Sinal eletroquímico obtido para quantificação de amostra fortificada com Femproporex. Condições:  $\text{NaClO}_4$  em ACN  $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ , HMDE operando no modo pulso diferencial, velocidade varredura:  $30 \text{ mV/s}$ .



Fonte: Autora.

### 5.3 ANÁLISE DE SUPLEMENTOS ALIMENTARES

#### 5.3.1 Análise de Amostras por HPLC-PAD

Após a otimização e validação do método de separação cromatográfico, partiu-se para análise das amostras de suplementos alimentares. Um conjunto total de 81 amostras foi analisado. Após o processo de extração descrito no item 4.4, todas as amostras passaram por um *screening* com diluição de 10 vezes. De acordo com a área no cromatograma dos adulterantes encontrados, as diluições foram ajustadas para realizar o processo de quantificação. Três adições de padrão foram realizadas em cada amostra e o processo foi executado em triplicata. É importante destacar que a cada início de dia análise, após o condicionamento do sistema e da coluna de separação, o primeiro teste antes da injeção das amostras consistia na injeção de um mix dos 14 fármacos validados para verificação de pequenas variações no tempo de retenção. Caso este fenômeno ocorresse, um novo cromatograma de referência era gravado. Poucas alterações foram observadas ao longo do desenvolvimento do trabalho. Entretanto esta verificação inicial foi mantida durante todas as determinações nas amostras de suplementos alimentares.

Das amostras analisadas (n=81), foi encontrado um total de: 1 amostra contendo o femproporex (1,23 %), 1 amostra contendo anfepramona (1,23 %), 5 amostras contendo ioimbina (6,17 %) 43 amostras contendo cafeína (53,10 %), 1 amostra contendo furosemida (1,23 %), 1 amostra contendo tadalafil (1,23 %) e 8 amostras contendo diazepam (9,87 %). Deste total de amostras, foram encontrados dois ou mais fármacos em 14,81 % dos suplementos analisados. Para esta análise preliminar não foram levadas em consideração as informações sobre a composição declarada no rótulo dos produtos.

A Tabela 17 reúne as informações sobre todas as amostras analisadas e a média de concentração (n=3) do adulterante encontrado. A numeração das amostras segue o padrão de identificação interno de controle.

Tabela 17: Composição, dose diária recomendada e resultados obtidos para análise de adulterantes em amostras de suplementos alimentares por cromatografia com detecção amperométrica.

Número da amostra	Composição (rótulo)	Forma de dosagem	Dose diária recomendada	Fármaco declarado	Fármaco encontrado	Concentração encontrada (mg dia <sup>-1</sup> )	CV (%) n=3
<b>Amostras adquiridas em 2014</b>							
01	Guaraná, mate, cálcio, colina, cromo, niacina, ácido pantotênico, vitamina B2 e vitamina B1	Cápsula em pó	4 cápsulas	Cafeína 225 mg	Cafeína	217,51	6,17
02	Guaraná em pó, dióxido de silício	Cápsula em pó	2 cápsulas	Cafeína 280 mg	Cafeína	176,42	4,43
04	Maltodextrina, fenilalanina	Pó a granel	40 g	–	Diazepam	19,96	1,66
05	Maltodextrina, guaraná, laranja amarga, chá verde, cromo, niacina, vitamina C	Pó a granel	8 g	–	Cafeína Diazepam	368,72 21,30	4,274 3,90
06	Extrato de acerola, extrato de café verde, extrato de chá verde, extrato de goji berry, vit C, vit A, vit E, picolinato de cromo, selênio quelato, zinco quelato	Cápsula em pó	2 cápsulas	Cafeína	Cafeína	7,02	6,87
07	Extrato de acerola, café verde, picolinato de cromo, vit C, amido de milho, vit A, vit E, selênio quelato, zinco quelato	Cápsula em pó	4 cápsulas	Cafeína	–	–	–
08 (a)	Cafeína anidra, fibra de laranja, psillium, quitosana, vitaminas e minerais	Cápsula em pó	4 cápsulas	Cafeína	Ioimbina Diazepam	2,82 3,38	4,65 2,40
08 (b)	Cafeína anidra, fibra de laranja, psillium, quitosana, vitaminas e minerais	Cápsula em pó	1 cápsula	Cafeína	Cafeína	210,83	1,10
09	Amido de milho ceroso (carboidrato complexo)	Pó a granel	60 g	–	–	–	–
10	Proteína de leite hidrolizada e isolada	Pó a granel	100 g	–	–	–	–

11	Proteína do soro do leite isolada e hidrolizada	Pó a granel	30 g	–	Cafeína	63,27	2,24
14	Cafeína	Comprimido revestido	1 comprimido	Cafeína 220 mg	Cafeína	23,20	6,17
15	Guaraná, colina, psillium, vitaminas	Cápsula em pó	4 cápsulas	Cafeína	Cafeína	193,79	7,15
17	Maltodextrina, colina, magnésio, vitaminas, cromo, ácido fólico, extrato de chá verde, extrato de guaraná, extrato de laranja amarga, extrato de canela	Cápsula em pó	4 cápsulas	Cafeína	Cafeína	64,86	0,31
18	Cafeína	Cápsula em pó	1 cápsula	Cafeína	Cafeína	157,66	6,61
19	Quitosana, psyllium, farelo de aveia	Cápsula em pó	4 cápsulas	–	–	–	–
21	Suplemento manipulado Long Jack ( <i>Eurycoma longifolia</i> )	Cápsula em pó	2 cápsulas	–	–	–	–
22	Guaraná em pó com alta concentração de cafeína, citrus, café verde, picolinato de cromo, suplemento vitamínico e mineral	Cápsula em pó	4 cápsulas	Cafeína 280 mg	Cafeína	213,56	12,63
23	Psyllium, abacaxi, acerola, açaí, amora, ameixa, banana, laranja, maçã, mamão, morango, maracujá, tamarindo, uva, berinjela, beterraba, brócolis, cenoura, espinafre, tomate, guaraná, cogumelo <i>Agaricus blazei</i> , gérmen de soja, aveia, trigo, linhaça, gergelim, cacau, alho	Cápsula em pó	9 cápsulas	Cafeína	Cafeína	75,00	6,92
24	L-valina, L-leucina, L-isoleucina, vit. B6, arginine	Cápsula em pó	4 cápsulas	–	–	–	–
25	Cromo, colina, cálcio, silício, zinco, magnésio, café verde, vit. C, vit. B3, ácido fólico	Cápsula em pó	3 cápsulas	–	Cafeína	44,32	11,11
26	Chá verde, colágeno, inulina, gengibre, vitaminas e minerais	Pó a granel	15 g	Cafeína	Cafeína	19,20	14,10

27	Termogênico, cafeína, fosfato dicálcico, dióxido de silício, chá verde, leucina, tirosina, extrato de casca de pinheiro, garcinia	Tabletes	4 tabletes	Cafeína	Cafeína	40,54	3,45
28	Colágeno Hidrolisado, betacaroteno e vitamina C	Pó a granel	10 g	–	–	–	–
29	Fibra de laranja amarga	Cápsula em pó	4 cápsulas	–	Femproporex Anfepramona Ioimbina	0,20 30,44 0,20	7,92 11,32 11,17
30	Cafeína anidra	Cápsula em pó	2 cápsulas	Cafeína 420 mg	Cafeína	383,07	5,90
31	Cafeína anidra	Cápsula em pó	2 cápsulas	Cafeína	Cafeína	419,43	11,81
33	Triglicerídeos de cadeia média	Pó a granel	10 g	–	–	–	–
35	Aminopolissacarídeo	Cápsula em pó	6 cápsulas	–	Cafeína	1,75	12,47
36	Proteína do soro do leite, albumina, caseína, L-leucina, L-valina, L-isoleucina	Pó a granel	25 g	–	–	–	–
37	Chá branco, colágeno, <i>Phaseolus vulgaris</i> , cromo	Sachês em pó	1 sachê	Cafeína	Cafeína Diazepam	5,00 17,12	10,96 7,08
38	Cafeína anidra	Comprimido revestido	2 comprimidos	Cafeína	Cafeína	92,53	6,89
39	Cafeína anidra	Cápsula em pó	1 cápsula	Cafeína	Cafeína	117,49	4,48
40	Cafeína	Cápsula em pó	2 cápsulas	Cafeína 420 mg	Cafeína	254,85	2,37
41	Proteína do soro do leite isolada, peptídeos do soro do leite	Pó a granel	30 g	–	Cafeína	181,26	13,14
42	Glutamina	Pó a granel	5 g	–	–	–	–
43	Cafeína anidra	Cápsula em pó	2 cápsulas	Cafeína	Cafeína	254,96	2,34
44	Óleo vegetal em pó, triglicerídeos de cadeia média	Pó a granel	10 g	–	–	–	–

45	<i>Citrus aurantium</i> , chá verde, colina, cromo, magnésio, vitamina B3 e B6, vitamina C, ácido fólico	Cápsula em pó	4 cápsulas	–	Ioimbina	1,01	3,90
46	Chá verde, laranja amarga, guaraná, vitaminas e minerais	Sachês em pó	3 sachês	Cafeína	Cafeína Diazepam	21,00 10,19	14,45 4,44
47	Colina, cromo, magnésio e citrus aurantium	Cápsula em pó	2 cápsulas	–	Ioimbina	0,314	5,45
48	Aminoácidos de cadeia ramificada	Pó a granel	14 g	–	–	–	–
49	Proteína de carne bovina hidrolisada e isolada, maltodextrina	Pó a granel	30 g	–	–	–	–
50	Cafeína, taurina, chá verde, citrus aurantium, gengibre e pimenta vermelha	Pó a granel	12 g	Cafeína	Cafeína	138,36	7,89
52	Quitosana	Cápsula em pó	6 cápsulas	–	–	–	–
53	Creatina, arginina, extrato de guaraná com alto teor de cafeína	Cápsula em pó	8 cápsulas	Cafeína 220 mg	Cafeína	253,36	8,84
55	Dextrose, maltodextrina, creatina, guaraná, cálcio arginina quelato, cálcio ornitina quelato, taurina	Pó a granel	15 g	Cafeína	Cafeína	866,88	5,86
56	Carnitina	Cápsula em pó	2 cápsulas	–	–	–	–
57	Cafeína anidra	Cápsula em pó	2 cápsulas	Cafeína 210 mg	Cafeína	328,13	6,80
58	Maltodextrina, soro de leite, leite em pó desnatado, proteína isolada de soja, fibra de aveia, vitaminas e minerais, ácido pantotênico, óleo vegetal de coco em pó	Pó a granel	15 g	–	–	–	–
60	Cafeína	Cápsula em pó	1 cápsula	Cafeína 420 mg	Cafeína	212,11	7,53
61	Cafeína	Tabletes	1 tablete	Cafeína 420 mg	Cafeína	285,29	11,12
66	Cafeína anidra	Cápsula em pó	1 cápsulas	Cafeína 300 mg	Cafeína	77,58	8,78
70	Guaraná, citrato de colina, cromo, nicotinamida,	Cápsula em pó	4 cápsulas	Cafeína 210 mg	Cafeína	111,24	0,57

	pantenoato de cálcio, tiamina						
78	Laranja amarga, guaraná, chá verde, erva mate, canela do ceilão, gengibre, abacaxi, framboesa, maltodextrina	Pó a granel	5 g	Cafeína	Cafeína	255,94	14,14
89	Cafeína anidra	Cápsula em pó	1 cápsula	Cafeína	Cafeína	42,71	2,77
94	Cafeína, carbonato de cálcio, maltodextrina, estearato de magnésio, dióxido de silício	Cápsula em pó	3 cápsulas	Cafeína	Cafeína <sup>1</sup> Ioimbina <sup>1</sup>	–	–
<b>Amostras adquiridas em 2017</b>							
01	Maltodextrina, proteína concentrada do soro do leite, colágeno hidrolisado, albumina [clara de ovo desidratada], cacau em pó	Pó a granel	160 g	–	–	–	–
02	Citrato trissódico, cloreto de potássio, cloreto de sódio, L–glutamina, L–citrulina, L–isoleucina, L–valina	Sachês em pó	1 sachê	–	Diazepam	3,901	3,09
03	L–Leucina, L–Valina, L–Isoleucina, maltodextrina,	Pó a granel	3,5 g	–	–	–	–
04	Maltodextrina, leite em pó desnatado, dextrose, proteína concentrada do soro de leite, albumina desidratada	Pó a granel	160 g	–	–	–	–
05	Gelatina, celulose microcristalina, estearato de magnésio, mix de vitaminas e minerais	Cápsula em pó	2 cápsulas	–	–	–	–
06	Guaraná ( <i>Paullina cupana</i> L., sementes), erva mate ( <i>Ilex paraguariensis</i> St. Hill), banana–prata ( <i>Musa paradisiaca</i> L.), chá verde ( <i>Camellia sinensis</i> L.), chá branco ( <i>Camellia sinensis</i> L.), chá preto ( <i>Camellia sinensis</i> L.), limão ( <i>Citrus limmonia</i> Osbeck)	Pó a granel	5 g	Cafeína	Cafeína	257,65	12,76
07	Guaraná, laranja amarga, <i>Camellia sinensis</i> , gengibre, raiz–forte, pimenta vermelha	Pó a granel	5 g	Cafeína	Cafeína	190,54	10,18

08	L-Leucina, L-Isoleucina, L-Valina, ácido cítrico (acidulante)	Pó a granel	5 g	–	Diazepam	4,33	6,99
09	Cafeína, extratos secos de <i>Citrus aurantiu</i> , chá verde e Gengibre, carbonato de cálcio e dióxido de silício, maltodextrina	Comprimidos	2 comprimidos	Cafeína	Cafeína	82,67	12,78
10	Guaraná ( <i>Paullina cupana</i> L., sementes), erva mate ( <i>Ilex paraguariensis</i> St. Hill), banana-prata ( <i>Musa paradisiaca</i> L.), chá verde ( <i>Camellia sinensis</i> L.), chá branco ( <i>Camellia sinensis</i> L.), chá preto ( <i>Camellia sinensis</i> L.), limão ( <i>Citrus limmonia</i> Osbeck)	Pó a granel	3 g	Cafeína	Cafeína Diazepam	214,11 4,97	12,27 5,01
11	Semente de uva em pó, cálcio de ostra, amido modificado, carbonato de magnésio, ácido ascórbico (Vitamina C)	Cápsula em pó	4 cápsulas	–	–	–	–
12	Semente de uva em pó, cálcio de ostra, amido modificado, carbonato de magnésio, ácido ascórbico (Vitamina C)	Cápsula em pó	4 cápsulas	–	–	–	–
13	Maltodextrina, bisglicinato de zinco, pantotenato de cálcio, piridoxina, tiamina, biotina	Cápsula em pó	1 cápsula	–	–	–	–
14	Mix de minerais, acetato de retinol, colecalciferol, acetato de tocoferol, tiamina, riboflavina, ácido ascórbico, nicotinamida, piridoxina, ácido fólico, cianocobalamina, biotina, pantotenato de cálcio, extrato de soja, lecitina de soja, benzoato de sódio	Cápsula em pó	30 g	–	Cafeína	405,30	6,94
16	Desidroepiandrosterona	Cápsula em pó	1 cápsula	–	–	–	–
17	Desidroepiandrosterona	Tablete	1 tablete	–	Tadalafil	0,48	7,08



19	Arginina, zinco, selênio, <i>Trichillia catiguá Juss</i> , xarope de Cofeeea Arabica, Solanum Sessiliflorum e Taurina	Cápsula em pó	2 cápsulas	–	Cafeína	49,16	12,69
21	Mix de vitaminas e minerais e ácido málico	Tabletes	2 tabletes	–	–	–	–
22	Farinha de Maca peruana, óxido de magnésio, niacina, Vitamina E, sulfeto de zinco, ácido pantotênico, vitamina B2, B6, B12, ácido fólico, biotina	Cápsula em pó	2 cápsulas	–	–	–	–
23	Maca peruana em pó, mix de vitaminas e minerais	Cápsula em pó	4 cápsulas	–	–	–	–
24	Bisglicinato de magnésio, gengibre em pó, maltodextrina, carbonato de cálcio, bisglicinato de zinco, ácido bórico, niacinamida, polietilenoglicol, cianocobalamina, colecalciferol, piridoxina	Comprimidos	2 comprimidos	–	–	–	–
25	Proteína isolada de soja, proteína concentrada de soro de leite	Pó a granel	6 g	–	Cafeína	24,05	15,49
26	Proteína solada de soja, frutose, fibra de aveia, inulina, cacau em pó, óleo vegetal de canola, cloreto de potássio, café em pó, triglicerídeos de cadeia média, caseinato de cálcio, proteína concentrada de soro de leite, mix de vitaminas e minerais, fosfato de cálcio dibásico, óxido de magnésio, canela em pó, gengibre	Pó a granel	26 g	–	–	–	–
27	Boro, magnésio, zinco, mix de vitaminas	Cápsula em pó	2 cápsulas	–	–	–	–

<sup>1</sup> Presença mútua de cafeína e ioimbina impede a quantificação dos dois adulterantes na mesma amostra.

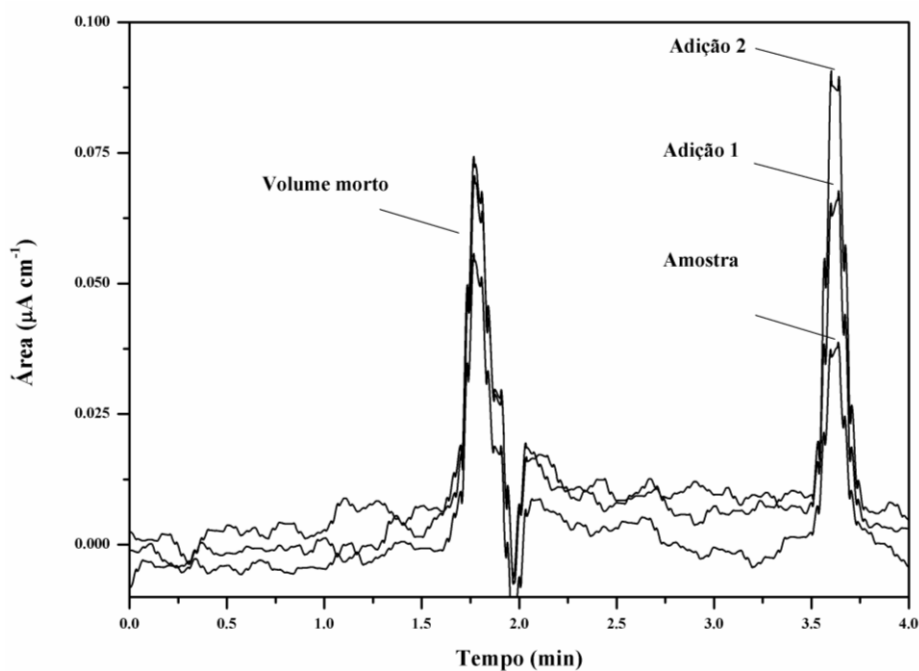
Fonte: Autora.

Foi admitido um valor até 15 % no coeficiente de variância para a triplicata das análises das amostras. Para os suplementos contendo cafeína, em duas amostras a concentração estava acima do indicado, sendo que em uma destas, havia mais de 100 mg por cápsula além do preconizado no rótulo. Dez amostras apresentaram concentração de cafeína abaixo do indicado, sendo que destas, 4 amostras tinham menos da metade da concentração e 2 amostras apresentaram valores até 8 vezes inferior ao indicado para cafeína por unidade do produto. Das 43 amostras positivas para cafeína, 24 amostras traziam no rótulo a declaração sobre a presença de cafeína, entretanto, apenas a metade indicava a concentração do fármaco no rótulo. As demais amostras onde foi encontrado cafeína, não traziam declaração no rótulo da presença do fármaco, entretanto, traziam a declaração no rótulo de ingredientes que são conhecidos por conter cafeína, como o chá verde, chá preto e erva mate. Destas amostras, uma apresentou concentração de cafeína acima da dose diária recomendada em apenas uma dose do suplemento.

Das 5 amostras contendo a presença de diazepam, 1 excedeu a dose diária máxima para o fármaco (20 mg – dose máxima dependendo dos sintomas, 21,30 mg – encontrado). A adição deste fármaco é proibida em alimentos e confere perigo ao consumidor. Em 5 amostras foi encontrada a presença de ioimbina como adulterante. Embora este seja considerado um estimulante de origem natural e tenha sido determinado em baixas concentrações (0,20 a 2,82 mg/dia), este composto não pode estar presente em alimentos e não pode ser vendido como tal em lojas para suplementos. Uma amostra apresentou sinal positivo para anfepramona e femproporex. Nenhum dos fármacos apresentou concentração acima da dose máxima recomendada, entretanto, mais uma vez, a presença de ambos é proibida em alimentos. Por fim, foi determinado em 1 amostra o estimulante tadalafil. O produto contendo este fármaco é indicado para aumento da vitalidade e ganho de força masculina.

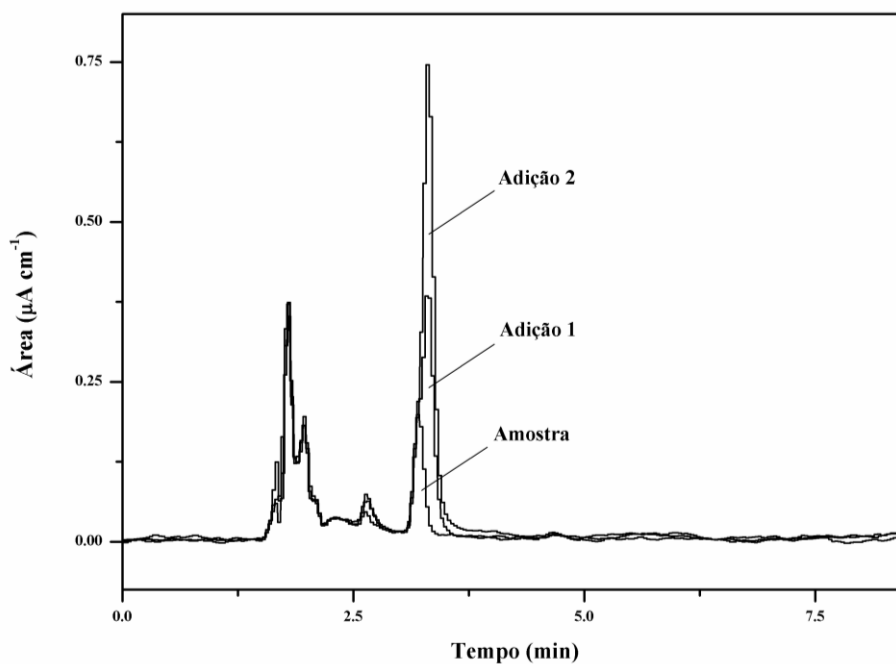
Alguns exemplos dos sinais encontrados para os adulterantes serão mostrados nas Figuras 96, 97, 98 e 99.

Figura 96: Perfil cromatográfico de amostra contendo cafeína. Condições: Fase reversa – bifenil, fase móvel acetato de amônio 10 mmol L<sup>-1</sup> (pH 4.0); metanol 64 % (v/v); coluna bifenil; potencial de detecção: +0.8 V (0.4s); potenciais de limpeza: +1.0 V (0.4s) e -0.2 V (1.2s). Fluxo: 1.0 mL/min; temperatura: 40°C.



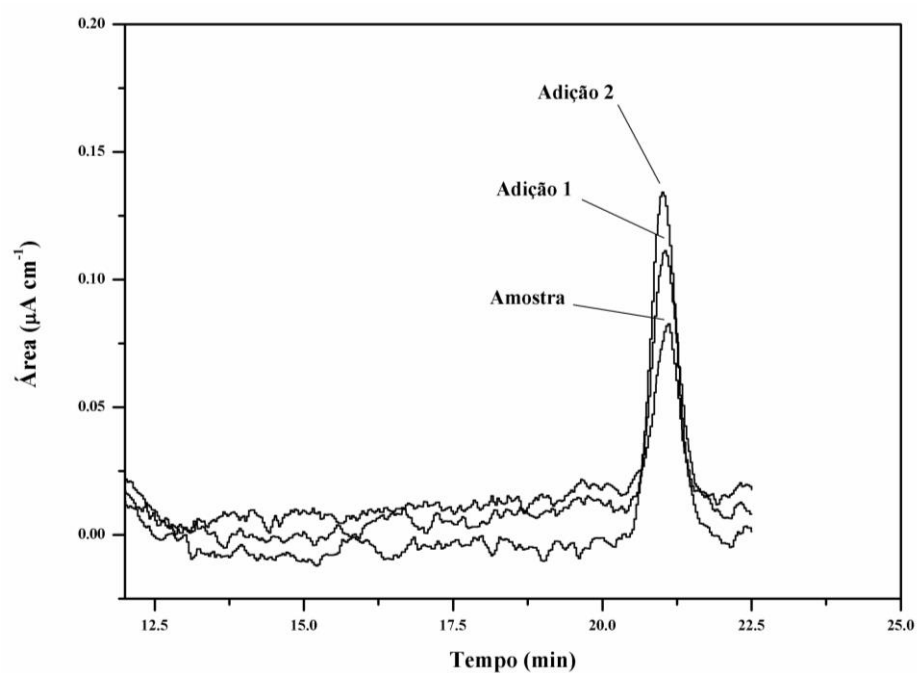
Fonte: Autora.

Figura 97: Perfil cromatográfico de amostra contendo Ioimbina. Condições: Fase reversa – bifenil, fase móvel acetato de amônio 10 mmol L<sup>-1</sup> (pH 4.0); metanol 64 % (v/v); coluna bifenil; potencial de detecção: +0.8 V (0.4s); potenciais de limpeza: +1.0 V (0.4s) e -0.2 V (1.2s). Fluxo: 1.0 mL/min; temperatura: 40°C.



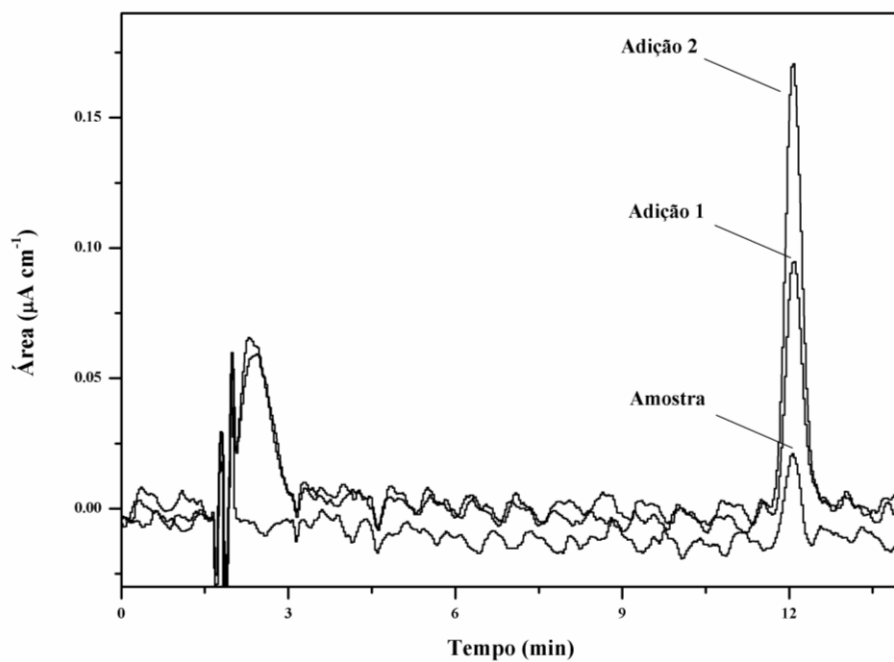
Fonte: Autora.

Figura 98: Perfil cromatográfico de amostra contendo Diazepam. Condições: Fase reversa – bifenil, fase móvel acetato de amônio 10 mmol L<sup>-1</sup> (pH 4.0); metanol 64 % (v/v); coluna bifenil; potencial de detecção: +0.8 V (0.4s); potenciais de limpeza: +1.0 V (0.4s) e -0.2 V (1.2s). Fluxo: 1.0 mL/min; temperatura: 40°C.



Fonte: Autora.

Figura 99: Perfil cromatográfico de amostra contendo Tadalafil. Condições: Fase reversa – bifenil, fase móvel acetato de amônio 10 mmol L<sup>-1</sup> (pH 4.0); metanol 64 % (v/v); coluna bifenil; potencial de detecção: +0.8 V (0.4s); potenciais de limpeza: +1.0 V (0.4s) e -0.2 V (1.2s). Fluxo: 1.0 mL/min; temperatura: 40°C.

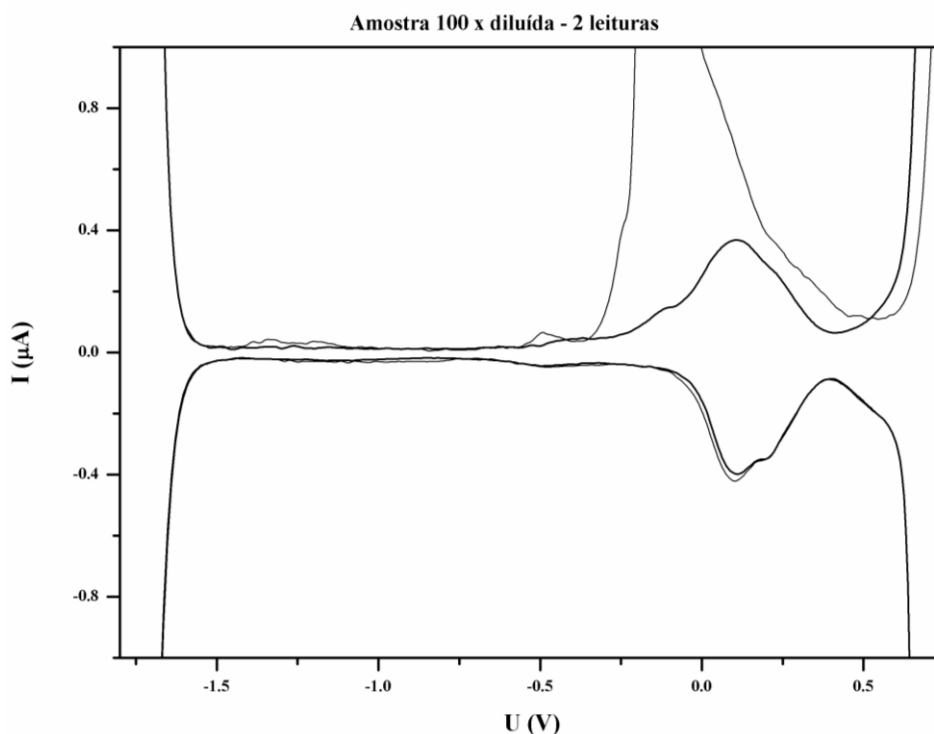


Fonte: Autora.

### 5.3.2 Análise de Amostras por DPV-ACN

De acordo com os testes realizados na etapa de validação do método voltamétrico, a diluição mínima de 100 vezes precisa ser aplicada para visualização dos sinais de reação dos fármacos no eletrodo de mercúrio, devido a influência da matriz. Desta forma, há uma perda significativa de sensibilidade do método. Visto que as amostras precisam estar inicialmente diluídas pelo processo de extração, adicionando-se a diluição exigida pela técnica e somando-se a isso os limites de detecção e quantificação do método, nenhuma amostra das 27 analisadas apresentou sinal para nenhum dos analitos abrangidos pela técnica. Ao comparar-se com os valores obtidos por cromatografia, chegou-se a conclusão que nenhum daqueles analitos poderia ser encontrado pela análise em meio orgânico devido às razões citadas. O voltamograma a seguir demonstra o perfil obtido para as amostras analisadas.

Figura 100: Perfil apresentado para amostras de suplementos alimentares analisados por voltametria em meio não aquoso (diluição 100 x).



Fonte: Autora.

#### 5.4 ADULTERAÇÃO DE SUPLEMENTOS ALIMENTARES COMERCIALIZADOS NO BRASIL

Tendo em mente que o limite de ingestão diária para a cafeína é de cerca de 420 mg, o estudo de suplementos dietéticos realizado neste trabalho mostrou que apenas uma das 43 amostras apresentou concentração acima deste valor (concentração encontrada variou de 0,00 a 866,88 mg/dia). As doses excessivas de cafeína, ou seja, >2000 mg, podem causar efeitos tóxicos, como hipertensão, arritmias, convulsões e até mesmo a morte (GURLEY, STEELMAN, THOMAS, 2015). Efeitos adversos também podem estar presentes em indivíduos mais sensíveis ao composto, mesmo em baixas concentrações (NEVES, CALDAS, 2017). Também é interessante enfatizar que, embora em alguns casos o limite não seja excedido, se a indicação do fabricante for respeitada, a associação com a dieta diária pode promover um excesso.

Em relação a perspectiva de adulteração, ao analisar-se a composição indicada no rótulo, pode-se dizer que das 43 amostras de suplementos em que foi encontrado sinal positivo para cafeína, 6 não indicavam a presença deste fármaco na forma anidra e também não continham ingredientes que contivessem cafeína “natural” em sua composição. Desta forma, é possível inferir que cafeína sintética pode ter sido adicionada ao produto caracterizando fraude. Uma vez que o consumidor não tem ciência sobre a presença dessas drogas em suplementos dietéticos, existe a possibilidade de interação fármaco-fármaco entre fármacos terapêuticos de uso contínuo e medicamentos presentes em um suplemento alimentar como adulterantes, podendo acarretar efeitos colaterais graves.

Recentemente, a legislação brasileira (BRASIL, 2017 (b)) aprovou a produção, comercialização e consumo mediante prescrição médica, dos ansiolíticos anfepramona e femproporex. No entanto, a adição em alimentos é proibida para ambos. A amostra 29 apresentou sinal positivo para anfepramona (dose diária terapêutica 75 mg) em associação com femproporex cuja dose diária máxima recomendada é de 50 mg. O uso continuado desses produtos pode causar vários efeitos colaterais, como humor instável, dores de cabeça, depressão nervosa, irritabilidade, dependência química, interações medicamentosas, problemas cardiovasculares e acidentes vasculares cerebrais (CARVALHO, et al, 2010 (b)). A adição destas substâncias ocorre de forma deliberada, a fim de promover a imagem que o produto realmente funciona. Por outro lado, embora o método de separação tenha apresentado bons resultados em termos de seletividade, é improvável que dois anorexígenos sejam

adicionados a um mesmo produto. Não havendo um método confirmatório, não é possível admitir com certeza tal adulteração.

Os benzodiazepínicos, compostos da classe farmacêutica dos ansiolíticos, também tem sua adição é proibida em alimentos e suplementos. Estas substâncias atuam nos receptores GABA e são utilizados no tratamento agudo da ansiedade (RANG & DALE, 2016). Eles são freqüentemente adicionados como adulterantes em formulações de emagrecimento, a fim de minimizar os efeitos colaterais causados pelos anorexígenos e estimulantes, ou para evitar fenômenos compulsivos na alimentação (CARVALHO et al, 2010 (b)). Para as amostras 04 e 02/2017 foi encontrado diazepam não associado a outro fármaco. Nas amostras 05, 08, 37 e 46, diazepam foi determinado acompanhado de cafeína ou ioimbina. A concentração encontrada excedeu a dose diária máxima apenas para uma das amostras (concentração variou de 3,90 a 21,30 mg/dia). Esta droga adicionada deliberadamente pode causar efeitos adversos como tonturas, esquecimento, perda de faculdades mentais, feridas na boca e desequilíbrio (DEHGHANZADE, ALIPOUR, 2016). As amostras 04, 05 e 38 foram as que apresentaram as concentrações mais altas de diazepam (19,96, 21,30 e 17,12 mg/dia, respectivamente). Para estes três suplementos é necessário mais uma vez uma análise confirmatória. Ansiolíticos nesta concentração podem causar sono profundo em indivíduos “normais” e desta forma, caracteriza um caso improvável de adulteração.

A ioimbina é um conhecido alcalóide que atua principalmente como inibidor da enzima monoamina oxidase (ŠVORK, KALCHER, 2014. Obtido de *Pausinystalia yohimbe* e *Rauvolfia serpentine*, a ioimbina foi encontrada em 5 amostras industrializadas que não declaravam a presença no rótulo. Tradicionalmente usado para disfunção sexual e aumento da satisfação sexual, esse estimulante geralmente é acompanhado de ansiedade, dor de cabeça e aumento da produção urinária (ŠVORK, KALCHER, 2014). Os produtos contendo ioimbina são considerados medicamentos. Conseqüentemente, eles devem apresentar segurança e eficácia comprovada, e serem comercializados em farmácias sob prescrição médica. Os extratos vegetais contendo ioimbina podem ser encaixados como fitoterápicos (RDC – ANVISA 24/2014) desta forma, também devem comprovar segurança e eficácia e serem registrados pela ANVISA.

Adicionalmente, é interessante notar que as relações sinérgicas entre um vasodilatador e agentes anoréxicos podem agravar os efeitos colaterais, como é o caso da amostra 29. Podem ser citadas ações cardiovasculares como taquicardia e infarto agudo do miocárdio (RISVOLL, et al, 2017; ALISSA, 2014).

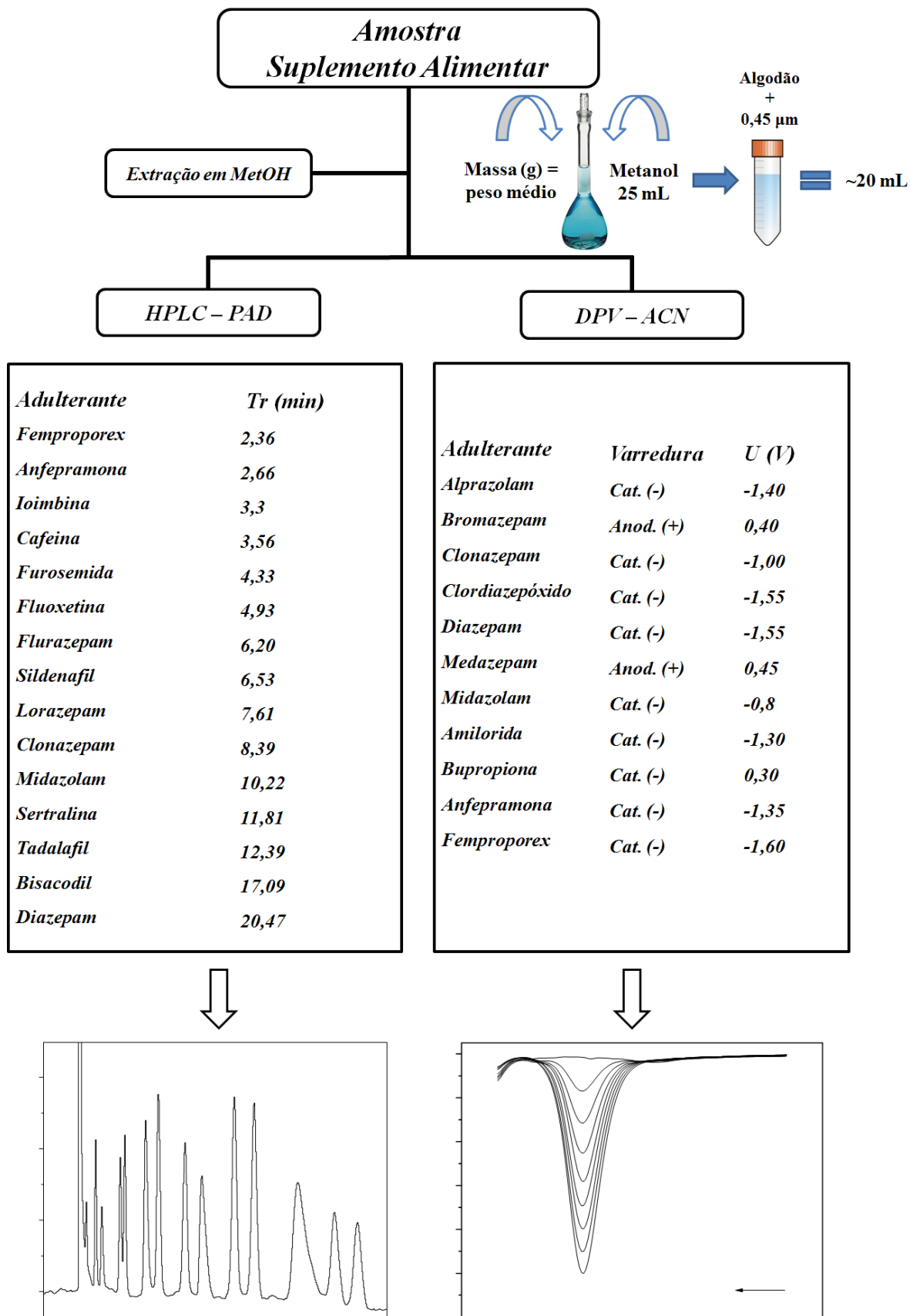
Neste sentido, os métodos propostos inicialmente neste trabalho vêm de encontro a esta atual demanda por informações a respeito das características qualitativas e quantitativas relacionados aos suplementos comercializados no Brasil.

Por fim, para confirmar os possíveis casos de adulteração detectados por cromatografia, o objetivo inicial era utilizar o método por voltametria em meio não aquoso como comparativo para os compostos detectados por ambas as técnicas. Conforme já mencionado, a influência da matriz impediu esta análise confirmatória devido à diminuição de sensibilidade. A utilização de diferentes técnicas de amostragem de corrente, como onda quadrada, por exemplo, não puderam ser testadas devido a falta de tempo hábil na execução deste trabalho de doutorado, mas poderiam ser uma alternativa para aumentar a sensibilidade da detecção. Mesmo assim, de acordo com os parâmetros otimizados, 10 fármacos importantes como adulterantes podem ser identificados e, dependendo da concentração, ser analisados pela metodologia.

O quadro esquemático da Figura 101 resume todos os principais procedimentos envolvidos neste trabalho de doutorado, assim como os métodos desenvolvidos e seus respectivos analitos. Entre os dois métodos, 21 fármacos já citados no meio científico como possíveis adulterantes, são englobados, o que ressalta a validade e importância deste trabalho frente à literatura e aos indivíduos envolvidas na comercialização destes produtos.



Figura 101: Procedimentos analíticos envolvidos na análise de suplementos alimentares por métodos de detecção eletroquímica e separação.



## 6. CONCLUSÕES

A realização deste trabalho de doutorado permitiu o desenvolvimento de duas metodologias para estudo dos possíveis casos de adulteração de suplementos alimentares com fármacos sintéticos comercializados no Brasil e importados. O método de separação cromatográfico com detecção amperométrica utilizando a coluna bifenil abrangeu 15 fármacos seletivamente sendo 2 anorexígenos (anfepiramon e femproporex), 4 estimulantes (cafeína, ioimbina, sildenafil e tadalafil), 1 diurético, 2 antidepressivos (fluoxetina e sertralina), 4 ansiolíticos (lorazepam, clonazepam, midazolam e diazepam) e 1 laxante (bisacodil). É válido destacar que as características relacionadas a coluna de separação neste caso favoreceu o estudo de um grande número de compostos.

Já o método utilizando a técnica voltamétrica de pulso em eletrodo de mercúrio e meio não aquoso, permitiu o estudo de 10 compostos farmacêuticos sendo 6 ansiolíticos (alprazolam, bromazepam, clonazepam, clordiazepóxido, midazolam e diazepam), 1 diurético (amilorida), 1 antidepressivo (bupropiona) e 2 anorexígenos (anfepiramon e femproporex). Para ambos os métodos os parâmetros de validação foram determinados e obtiveram-se valores matemáticos satisfatórios confirmando a confiabilidade do método para posterior aplicação a amostras reais. A vantagem principal associada ao meio orgânico é a facilidade de veicular as amostras para análise após a extração, principalmente referente às amostras de conteúdo oleoso.

O método cromatográfico mostrou-se bastante robusto, sensível e seletivo quando aplicado na determinação de fármacos como adulterantes em suplementos alimentares. Um total de 81 amostras foi analisado. Os resultados obtidos foram satisfatórios do ponto de vista metodológico, onde baixas variações entre leituras ( $n=3$ ) foram obtidas. Por outro lado, o método otimizado por voltametria em meio não aquoso ficou limitado pela sensibilidade associada à intensa influência da matriz nas reações no eletrodo, impedindo a determinação dos analitos em amostras de suplementos alimentares.

Em virtude da baixa sensibilidade associada ao método de análise por voltametria, não foi possível utilizar os dois métodos como comparativos/confirmatórios para os casos de adulteração em que fármaco encontrado fosse determinável por ambas as técnicas. Das amostras analisadas por cromatografia, foi encontrado um total de: 1 amostra contendo o femproporex (1,23 %), 1 amostra contendo anfepiramon (1,23 %), 5 amostras contendo ioimbina (6,17 %) 43 amostras contendo cafeína (53,10 %), 1 amostra contendo furosemida (1,23 %), 1 amostra contendo tadalafil (1,23 %) e 8 amostras contendo diazepam (9,87 %).

Deste total de amostras contendo fármacos declarados ou não, foram encontrados dois ou mais fármacos em 14,81 % dos suplementos analisados. Embora o tempo de retenção e as adições sejam visivelmente compatíveis, para confirmação de uma amostra adulterada é necessário a obtenção de mais dados através de métodos comparativos para conferir fraude.

Partindo-se do princípio que as amostras analisadas por cromatografia no presente trabalho contêm os fármacos determinados e pelos relatos encontrados continuamente na literatura científica, verifica-se a necessidade e importância no desenvolvimento de métodos analíticos. Tais tecnologias devem ser capazes de detectar e quantificar diferentes classes de substâncias de uso terapêutico em produtos utilizados para suplementação alimentar dietética, uma vez que estas substâncias em sua maioria são proibidas, mas que ilegalmente, continuam a ser empregadas nestes produtos.

Finalmente, uma legislação unificada para os produtos conhecidos como suplementos alimentares, asseguraria a clareza e qualidade sem prejuízos à saúde do consumidor brasileiro. De uma forma geral ainda há um caminho longo do ponto de vista legislativo, do controle de qualidade e relativo ao consumidor, para que um modelo de comercialização e consumo consciente seja adequadamente colocado em vigência.

## REFERÊNCIAS

- AGOSTINHO, S. M. L., et al. O eletrólito suporte e suas múltiplas funções em processos de eletrodo. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 813 – 817, 2004.
- ALEIXO, L. M. Voltametria: Conceitos e técnicas. Chemkeys – Liberdade para aprender, 2003. Disponível em: <http://chemkeys.com/br/2003/03/25/voltametria-conceitos-e-tecnicas/> Acesso em 25 jan 2018.
- ALISSA, E. M. Medicinal Herbs and Therapeutic Drugs Interactions. Review article. **Ther Drug Monit**, v. 36, n. 4, p. 423 – 422, 2014.
- ALIZADEH, T.; AZIZI, S. Biosensors and Bioelectronics Graphene / graphite paste electrode incorporated with molecularly imprinted polymer nanoparticles as a novel sensor for differential pulse voltammetry determination of fluoxetine. **Biosensors and Bioelectronics**. v. 81, p. 198–206, 2016.
- ALMEIDA, A. E.; RIBEIRO, M. L.; POLESE, L. Determination of amfepramone hydrochloride, fenproporex, and diazepam in so-called “natural” capsules used in the treatment of obesity. **Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies**, v. 23, n. 7, p. 1109-1118, Feb 2000.
- ALMEIDA, I. M. da C. Segurança e biodisponibilidade de suplementos alimentares. 2014. 139 p. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade do Porto, Porto, 2014.
- APPLEGATE, E. A.; GRIVETTI, L. E. Search for the Competitive Edge: A History of Dietary Fads and Supplements, **The Journal of Nutrition**, v.127, n. 5, p. 857–859, 1997.
- AL-HAWASLI H., AL-KHAYAT M. A., AL-MARDINI M. A. Development of a validated HPLC method for the separation and analysis of a bromazepam, medazepam and midazolam mixture. **Journal of pharmaceutical analysis**, v. 2, n. 6, p. 484 – 491, 2012.
- AOAC. Association of Official Analytical Chemists. Guidelines for dietary supplements and botanicals. AOAC Official methods: Appendix K, p. 32, 2013. Disponível em: [https://www.aoac.org/aoac\\_prod\\_imis/AOAC\\_Docs/StandardsDevelopment/SLV\\_Guidelines\\_Dietary\\_Supplements.pdf](https://www.aoac.org/aoac_prod_imis/AOAC_Docs/StandardsDevelopment/SLV_Guidelines_Dietary_Supplements.pdf) Acesso em: 09 jan 2018.
- ATTLER, A., et al. Dietary Supplement Intake and Associated Factors Among Gym Users in a University Community, **Journal of Dietary Supplements**, 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.1080/19390211.2017.1326430>
- AZEREDO, F. S.; GUIMARÃES, R. I.; PAULA, J. L.; CUNHA, L. C. Validação de técnica analítica em cromatografia em camada delgada comparativa para identificação de fármacos anorexígenos sintéticos em produtos fitoterápicos. **Infarma, Brasil**, v. 17, n. 5-6, p. 86-88, 2005.

BARANOWSKA, I.; KOPER, M.; MARKOWSKI, P. Electrochemical Determination of Carvedilol, Sildenafil and Paracetamol Using Glassy Carbon Electrode. **Chemia Analytyczna (Warsaw)**, v. 53, p. 967 – 981, 2008.

BARROSO, M. B., et al. Determination of piretanide and furosemide in pharmaceuticals and human urine by high-performance liquid chromatography with amperometric detection. **Journal of Chromatography B: Biomedical Applications**, n. 675, p. 303 – 312, 1996.

BERZAS, J. J., et al. Voltammetric behavior of sildenafil citrate (Viagra) using square wave and adsorptive stripping square wave techniques determination in pharmaceutical products. **Analytica Chimica Acta**, v. 417, p. 143 – 148, 2000.

BOGUSZ, M. J.; HASSAN, H.; AL-ENAZI, E.; IBRAHIN, Z.; AL-TUFAIL, M. Application of LC-MSI-MS-MS for detection of synthetic adulterants in herbal remedies. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, England, v. 41, n. 2, p. 554-564, 2006.

BRASIL. Presidência da República. Casa Civil. Decreto–Lei nº 986, de 21 de outubro de 1969. Institui normas básicas para alimentos.

BRASIL. Presidência da República. Casa Civil. Lei nº 5.991, de 17 de dezembro de 1973. Dispõe sobre o Controle Sanitário do Comércio de Drogas, Medicamentos, Insumos Farmacêuticos e Correlatos, e dá outras Providências.

BRASIL. Presidência da República. Casa Civil. Lei nº 6.360, de 23 de setembro de 1976. Dispõe sobre a Vigilância Sanitária a que ficam sujeitos os Medicamentos, as Drogas, os Insumos Farmacêuticos e Correlatos, Cosméticos, Saneantes e Outros Produtos, e dá outras Providências.

BRASIL. Presidência da República. Casa Civil. Lei nº 6.437, de 20 de agosto de 1977. Configura infrações à legislação sanitária federal, estabelece as sanções respectivas, e dá outras providências.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria no 29, de 13 de Janeiro de 1998. Aprova o Regulamento Técnico Referente a Alimentos para Fins Especiais. (a)

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria no 30, de 13 de Janeiro de 1998. Aprova o Regulamento Técnico Referente a Alimentos para Controle de Peso. (b)

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria no 31, de 13 de Janeiro de 1998. Aprova o Regulamento Técnico Referente a Alimentos Adicionados de Nutrientes Essenciais. (c)

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria no 32, de 13 de Janeiro de 1998. Aprova o Regulamento Técnico para a Fixação de Identidade e Qualidade de Suplementos Vitamínicos e ou de Minerais. (d)

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria no 33, de 13 de Janeiro de 1998. Adota valores como IDR para vitaminas, minerais e proteínas. (e)

## BRASIL.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC nº 16, de 30 de Abril de 1999. Aprova o regulamento técnico de procedimentos para registro de Alimentos e Novos ingredientes, constante do anexo desta Portaria. (a)

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC nº 18, de 19 de Novembro de 1999. Regulamento técnico que estabelece as diretrizes para análise e comprovação de propriedade funcionais e ou se saúde alegadas em rotulagem de alimentos. (b)

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC nº 2, de 07 de janeiro de 2002. Aprova o Regulamento Técnico de Substâncias Bioativas e Probióticos Isolados com Alegação de Propriedade Funcional e ou Saúde.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC nº 269, de 22 de setembro de 2005. Aprova o regulamento técnico sobre a ingestão diária recomendada (IDR) de proteína, vitaminas e minerais.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC no 18, de 27 de Abril de 2010. Dispõe sobre alimentos para atletas. (a)

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC no 26, de 13 de Maio de 2014. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos e o registro e a notificação de produtos tradicionais fitoterápicos. (b)

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Suplementos alimentares: Documento de base para discussão regulatória, 2017. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/219201/3322895/Documento+de+base+sobre+regulamenta%C3%A7%C3%A3o+de+suplementos+alimentares> (a) Acesso em: 04 jan 2018.

BRASIL. Presidência da República. Casa Civil. Lei Nº 13.454, de 23 de junho de 2017. Autoriza a produção, a comercialização e o consumo, sob prescrição médica, dos anorexígenos sibutramina, anfepramina, femproporex e mazindol. (b)

BRITO, D.; CALDAS, E. D. Dietary supplements : International legal framework and adulteration profiles, and characteristics of products on the Brazilian clandestine market. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 73, n. 1, p. 93–104, 2015.

BRITO, D.; CALDAS, E. D. Determination of caffeine and identification of undeclared substances in dietary supplements and caffeine dietary exposure assessment. **Food and Chemical Toxicology**, 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2017.03.063>

BROWN, A. C. An overview of herb and dietary supplement efficacy, safety and government regulations in the United States with suggested improvements. Part 1 of 5 series. **Food and Chemical Toxicology**, 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2016.11.001>

CARAM, J. A. Electrochemical behaviour of methylene blue in non–aqueous solvents. **Electrochimica Acta**, v. 164, 353–363, 2015.

CARAM, J. A. et al. Electrochemical behaviour of anthraquinone dyes in non aqueous solvent solution. Part I. Medium effect on the electrochemical behavior. **Electrochimica Acta**, v. 249, 431–445, 2017.

CARVALHO, L. M. De, et al. Determination of synthetic pharmaceuticals in phytotherapeutics by capillary zone electrophoresis with contactless conductivity detection (CZE–C4D). **Microchemical Journal**, v. 96, n. 1, p. 114–119, 2010 (a).

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

CARVALHO, L. M. de, et al. Presence of synthetic pharmaceuticals as adulterants in slimming phytotherapeutic formulations and their analytical determination. **Forensic Science International**, n. 204, p. 6 – 12, 2011.

CARVALHO, L. M. de, et al. A new approach to determining pharmacologic adulteration of herbal weight loss products. **Food Additives & Contaminants: Part A**, v. 29, n. 11, p. 1661 – 1667, 2012.

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

CHEN, P.; BRYDEN, N. Determination of Yohimbine in Yohimbe Bark and Related Dietary Supplements Using UHPLC–UV/MS: Single–Laboratory Validation. **Journal of AOAC International**, v. 98, n. 4, 2015.

CHOI, J. Y. et al. Development and validation of a LC–MS/MS method for the simultaneous analysis of 28 specific narcotic adulterants used in dietary supplements, **Food Additives & Contaminants: Part A**, 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.1080/19440049.2015.1040080>

CIANCHINO, V.; ACOSTA, G.; ORTEGA, C.; MARTÍNEZ, L. D.; GOMEZ, M. R. Analysis of potential adulteration in herbal medicines and dietary supplements for the weight control by capillary electrophoresis. **Food Chemistry**, v. 108, b. 3, p. 1075-1082, 2008.

DAL MOLIN, T. R. Investigação de adulterantes em suplementos alimentares por cromatografia de troca iônica com detecção condutométrica. 2016. 94 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2016.

DANESHGAR, P.; NOROUZI, P.; GANJALI, M. R. Rapid determination of bisacodyl in flowinjection system combination by a novel sensitive adsorptive square–wave voltammetry. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 136, p. 66 – 72, 2009.

DECONINCK, E.; VERLINDE, K.; COURSELLE, P.; BEER, J. O. A validates ultra high pressure liquid chromatographic method for the characterisation of confiscated ilegal slimming products containing anorexics. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, England, v. 59, p. 38-43, Feb 2012.

DEHGHANZADE, M.; ALIPOUR, E. Voltammetric determination of diazepam using a bismuth modified pencil graphite electrode **Analytical Methods**, v. 8, 1995–2004, 2016.

DING, Y., YU, H., MOU, S. Direct determination of free amino acids and sugars in green tea by anion–exchange chromatography with integrated pulsed amperometric detection. **Journal of Chromatography A**, n. 982, p. 237 – 244, 2002.

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

DOMÉNECH–CARBÓ, A.; CARVALHO, L. M. De; MARTINI, M. Voltammetric/amperometric screening of compounds of pharmacological interest. **Rev Anal Chem**, v. 33, n. 3, p. 173–199, 2014.

FDA. Food and Drug Administration. Guidance for Industry: Questions and Answers Regarding the Labeling of Dietary Supplements as Required by the Dietary Supplement and Nonprescription Drug Consumer Protection Act, 2007. Disponível em: <https://www.fda.gov/Food/GuidanceRegulation/GuidanceDocumentsRegulatoryInformation/DietarySupplements/ucm179018.htm> Acesso em: 04 jan 2018.

FENG, L.; SHU, L.; JIAN, L.; GILIANG, C.; YAN, C.; YUNPENG, O.; YIFENG, C.; YUTIAN, W. A new method for testing synthetic drugs adulterated in herbal medicines based on infrared spectroscopy. **Analytica Chimica Acta**, v. 589, n. 2, p. 200–207, 2007.

FERREIRA, et al. Uso de suplementos nutricionais por adolescentes em academias do interior e de são paulo capital. **Revista Brasileira de Nutrição Esportiva**, v. 2, n. 10, p. 154–165, 2008.

FLANAGAN, R. J.; PERRETT, D.; WELPTON, R. Electrochemical Detection in HPLC, Analysis of drugs and poisons, Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, 2005.

GOULART, R. B. Determinação voltamétrica de tiofenos e sulfetos em matrizes asfálticas empregando eletrodo de ouro em meio não aquoso. 2016. 63 p. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2016.

GRANDJEAN, A. C. Diets of Elite Athletes: Has the Discipline of Sports Nutrition Made an Impact? **The Journal of nutrition**, v. 127, n. 5, p. 857–859, 1997.

GURLEY, B. J.; STEELMAN, S. C.; THOMAS, S. L. Review Article Multi–ingredient, Caffeine–containing Dietary Supplements: History, Safety, and Efficacy. **Clinical Therapeutics**, v. 37, n. 2, 2015.

HARRIS, D. C.. Análise química quantitativa 8ª edição: tradução e revisão Oswaldo Esteves Barcia. Rio de Janeiro, 2012.

HARRISON, R. A. et al. Who and how many people are taking herbal supplements? A survey of 21 923 Adults. **International Journal for Vitamin and Nutrition Research**, v. 74, n. 3, p. 183–186, 2004.



HONEYCHURCH, K. C., HART, J. P. Review Paper: Electrochemical Detection of Benzodiazepines, Following Liquid Chromatography, for Applications in Pharmaceutical, Biomedical and Forensic Investigations. **Insciences Journal**, v. 4, n. 1, p. 1–18, 2014.

HYE, E. et al. Reliable screening and confirmation of 156 multi-class illegal adulterants in dietary supplements based on extracted common ion chromatograms by ultra-high-performance liquid chromatography–quadrupole/time of flight–mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1491, p. 43–56, 2017.

INMETRO, Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia. Orientação sobre validação de métodos analíticos. Revisão 5, 2016. Disponível em: [http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/CGCRE/DOQ/DOQ-CGCRE-8\\_05.pdf](http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/CGCRE/DOQ/DOQ-CGCRE-8_05.pdf) Acesso em: 14 jan 2018.

IZUTSU, K. Electrochemistry in Nonaqueous Solutions. Segunda edição, Edição Revisada e Ampliada, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2009.

JIANG, S., et al. Development of an ultra-high-performance liquid chromatography coupled to high-resolution quadrupole–Orbitrap mass spectrometry method for the rapid detection and confirmation of illegal adulterated sedative–hypnotics in dietary supplements. **Food Additives & Contaminants: Part A**, 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.1080/19440049.2015.1041427>

KANAN, S.; ABU-YOUSEF, I. A.; GUNASEKAR, C.; ABDO, N.; NARASIMHAN, S. Detection and quantification of synthetic drugs in herbal slimming formule. **European Journal of Scientific Research**, v.34, n. 3, p.348-357, 2009.

KU, Y.-R.; CHANG, Y.-S.; WEN, K.-C., HO, L.-K. Analysis and confirmation of synthetic anorexics in adulterated traditional Chinese medicines by high-performance capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v. 848, n. 1-2, p. 537-543, 1999.

KWON, H-J., PARK, Y-D. Determination of astragaloside content in Radix Astragali using high-performance liquid chromatography coupled with pulsed amperometric detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1232, p. 212 – 217, 2012.

LANÇAS, F. M. Validação de métodos analíticos de análise. São Carlos, RiMa, 2004.

LANÇAS, F. M. Aumentando a eficiência das colunas de HPLC por meio da diminuição do diâmetro das partículas da fase estacionária: até onde? **Scientia Chromatographica**, v. 3, n.1, p. 17 – 23, 2011.

LIU, S. Y.; WOO, S. O.; KOH, H. L. HPLC and GC-MS screening of Chinese proprietary medicine for undeclared therapeutics substances. **Journal of Pharmacology and Biomedical Analysis**, v. 24, n. 5-6, p. 983-992, Mar 2001.

MALDANER, L.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. Fases estacionárias modernas para cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa. **Química Nova**, v. 33, n. 7, p. 1559 – 1568, 2010.

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

MARTINI, M. Determinação de fármacos sintéticos em formulações farmacêuticas empregando métodos eletroquímicos e de separação. 2014. 138 p. Tese (Doutorado em Química Analítica) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2014.

MARTINS, I. et al. S. Boron–Doped Diamond Electrode Coupled to Liquid Chromatography: Application to Simultaneous Determination of Benzodiazepines. **Electroanalysis**, n. 4, p. 455 – 462, 2009.

MOREIRA, A. P. L. Estudo da adulteração com fármacos de suplementos alimentares para emagrecimento e avaliação *in silico* da interação fármaco–alimento entre sibutramina e grapefruit. 2016. 155 p. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2016.

MOREIRA, et al. Simultaneous analysis of antihypertensive drugs and diuretics as adulterants in herbal–based products by ultra–high performance liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry. **Analytical Methods**, v. 8, p. 1881 – 1888, 2016.

MÜLLER, L. S. et al. Determination of Stimulants and Diuretics in Dietary Supplements for Weight Loss and Physical Fitness by Ion–pair Chromatography and Pulsed Amperometric Detection (PAD). **Current Analytical Chemistry**, 2018. DOI: <http://10.2174/1573411014666171229155726>

NAGGAR, A. H. et al. Use of a Sonogel–Carbon electrode modified with bentonite for the determination of diazepam and chlordiazepoxide hydrochloride in tablets and their metabolite oxazepam in urine, **Talanta**, v. 89, 448 – 454, 2012.

NEVES, D. B. da J. avaliação das falsificações e adulterações de Medicamentos e Suplementos alimentares com esteroides Anabolizantes e cafeína, e desenvolvimento de métodos analíticos. 2016, 157 p. Tese. (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade de Brasília, Brasília, 2016.

PACHECO, W. F. et al. Voltametrias: Uma Breve Revisão Sobre os Conceitos. **Revista Virtual de Química**, n. 5, v. 4, p. 516 – 537, 2013.

PARK, H. N. et al. Identification of a new tadalafil analogue in commercial dietary supplements : isopropyl nortadalafil. **Food Additives & Contaminants: Part A**, 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.1080/19440049.2016.1263878>

PETROCZI, A.; TAYLOR, G.; NAUGHTON, D. P. Mission impossible? Regulatory and enforcement issues to ensure safety of dietary supplements. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, n. 2, p. 393–402, 2011.

PINHO, G. P. et al. Efeito de matriz na quantificação de agrotóxicos por cromatografia gasosa. **Química Nova**, v. 32, n. 4, 987 – 995, 2009.

RANG, H. P.; RITTER, J. M.; FLOWER, R. J.; HENDERSON G. Rang & Dale's pharmacology. 8 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2016.

REBIERE, H.; GUINOT, P.; CIVADE, C.; BONNET, P.-A.; NICOLAS, A. Detection of hazardous weight-loss substances in adulterated slimming formulations using ultrahigh pressure liquid chromatography with diode-array detection. **Food Additives & Contaminants. Part A, Chemistry, analysis, control, exposure & risk assessment**, v. 29, n.2, p. 161-171, 2012.

RISVOLL, H. et al. Direct and indirect risk associated with the use of dietary supplements among persons with dementia in a Norwegian memory clinic. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, 2017. DOI 10.1186/s12906-017-1765-5

ROCHA, et al. Adulteration of Dietary Supplements by the Illegal Addition of Synthetic Drugs: A Review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, n. 15, p. 43 – 62, 2016.

SACIOTO, T. R.; CERVINI, P.; CAVALHEIRO, E. T. G. Simultaneous Voltammetric Determination of Acetaminophen and Caffeine at a Graphite and Polyurethane Screen-Printed Composite Electrode. **J. Braz. Chem. Soc.** v. 24, n. 9, p. 1461 – 1468, 2013.

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

SANTOS, W. T. P. dos, et al. Análise por injeção em fluxo com detecção amperométrica de múltiplos pulsos: potencialidades e aplicações. **Química Nova**, n. 10, p. 1753 – 1761, 2011.

SHI, Y.; SUN, C.; GAO, B.; SUN, A. Development of a liquid chromatography tandem mass spectrometry method for simultaneous determination of eight adulterants in slimming functional food. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, n.42 p. 7655-7662, 2011.

SHOJA, A.; RAFATI, A. A.; GHODSI, J. Department Electropolymerization of Ni-LD metallopolymers on gold nanoparticles enriched multi-walled carbon nanotubes as nano-structure electrocatalyst for efficient voltammetric sertraline detection in human serum. **Electrochimica Acta**, v. 203, p. 281 – 291, 2016.

SILVA, C. H. da determinação voltamétrica de tiofenos, sulfetos, sulfóxidos e sulfonas em matrizes asfálticas empregando eletrodo de mercúrio. 2016, p.62 Dissertação (Mestrado em Química Analítica). Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2016.

SILVEIRA, G. D. da, et al. Determination of Phenolic Antioxidants in Amazonian Medicinal Plants by HPLC with Pulsed Amperometric Detection. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, n. 38, p. 1259 – 1266, 2015.

SKALICKA-WOŹZNIAK, K.; GEORGIEV, M. I.; ORHAN, I. E. Adulteration of herbal sexual enhancers and slimmers: The wish for better sexual well-being and perfect body can be risky. **Food and Chemical Toxicology**, 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2016.06.018>

SOLOMONS, T. W. G.; FRIHLE; C. B., *Organic chemistry*, LTC – Technical and scientific books publisher (translate version), Rio de Janeiro – Brazil, 7th edition, 2001.

ŠVORC, L.; KALCHER, K. Flow–injection amperometric determination of yohimbine alkaloid in dietary supplements using a boron–doped diamond electrode. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 205, p. 215 – 218, 2014.

TAVARES, M. F. M. Mecanismos de separação em eletroforese capilar. **Química Nova**, v. 20, n. 5, p. 493 – 511, 1997.

TOOMEY, V. M., LITZAU, J. J., FLURER, C. L. Isolation and structural characterization of two tadalafil analogs found in dietary supplements. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, n. 59, p. 50 – 57, 2012.

YANG, L. et al. Dual  $\beta$ -cyclodextrin functionalized Au@SiC nanohybrids for the electrochemical determination of tadalafil in the presence of acetonitrile. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 64, p. 126 – 130, 2015.

ZHANG, Y. et al. Electrochemical Determination of Caffeine in Oolong Tea Based on Polyelectrolyte Functionalized Multi–Walled Carbon Nanotube. **International Journal of Electrochemical Science**, n. 12, p. 2552 – 2562, 2017.

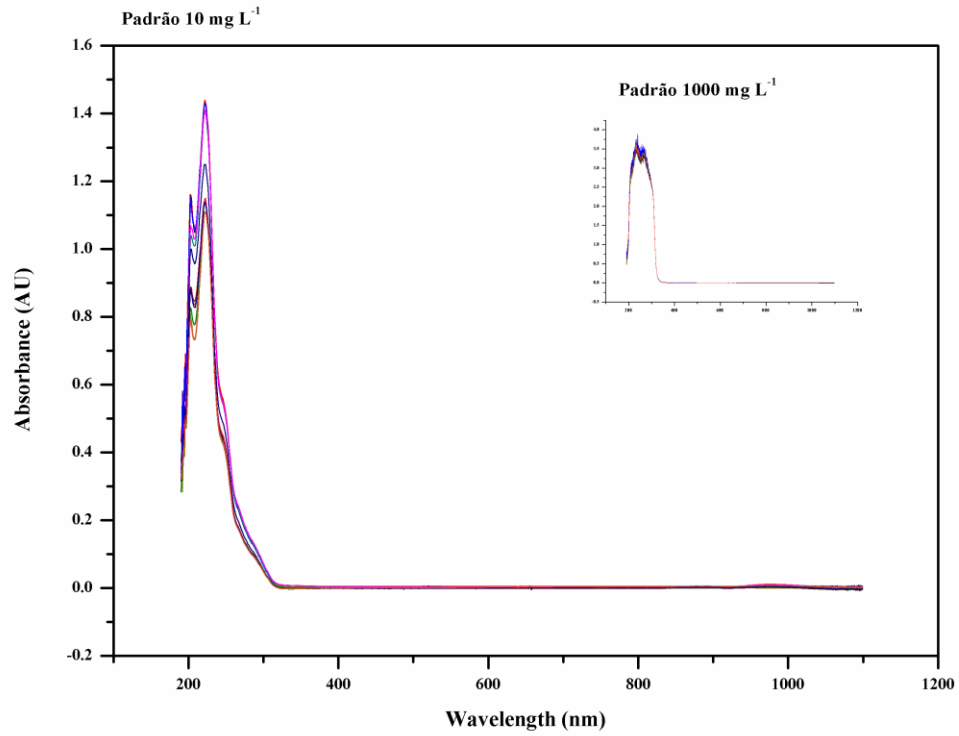
WANG, J.; CHEN, B.; YAO, S. Analysis of six synthetic adulterants in herbal weightreducing dietary supplements by LC electrospray ionization-MS. **Food Additives and Contaminants. Part A, Chemistry, analysis, control, exposure and risk assessment**, v. 25, n. 7, p. 822-830, 2008.

WANG, J.; YANG, D.; WANG, Z.; CHEN, B.; YAO, S. Simultaneous of illegal additives of dietary supplements and traditional medicines by high performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 113, n. 1, p. 227-232, 2009.

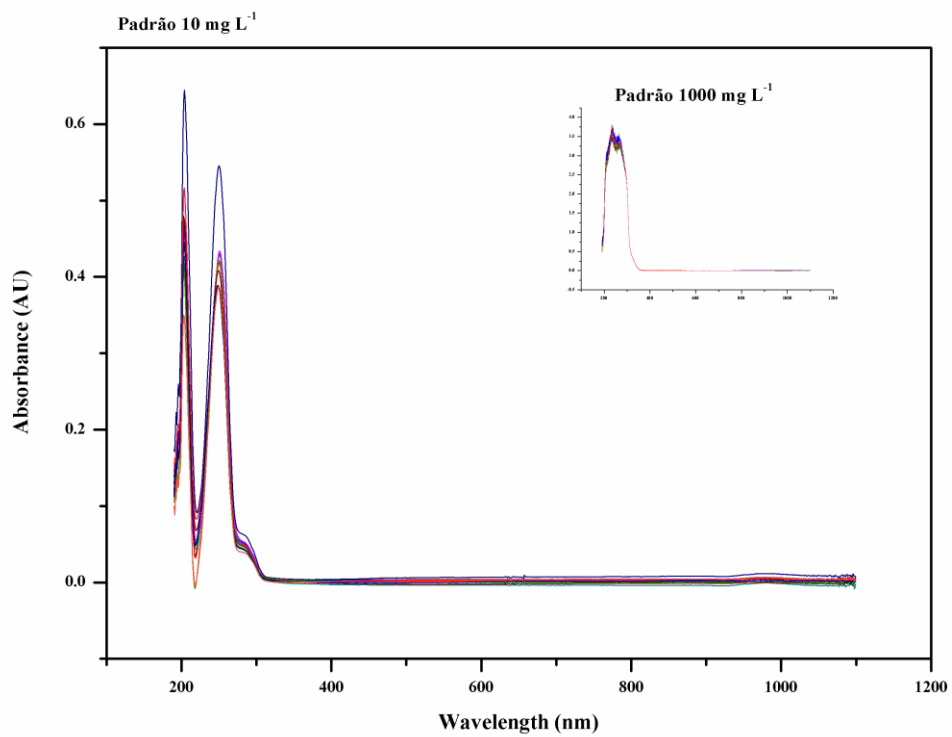


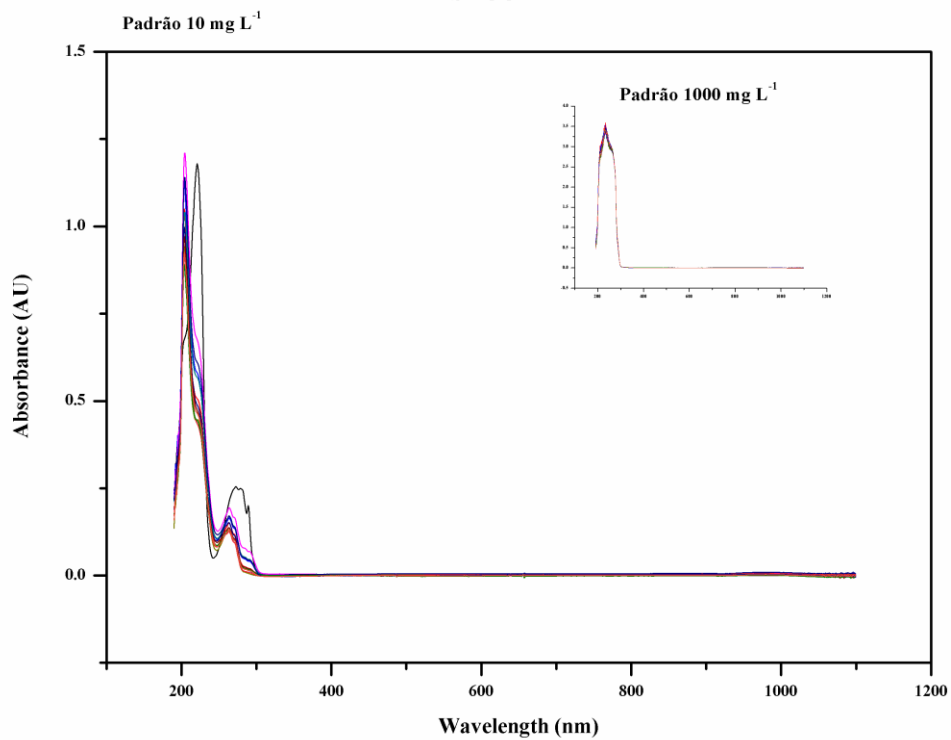
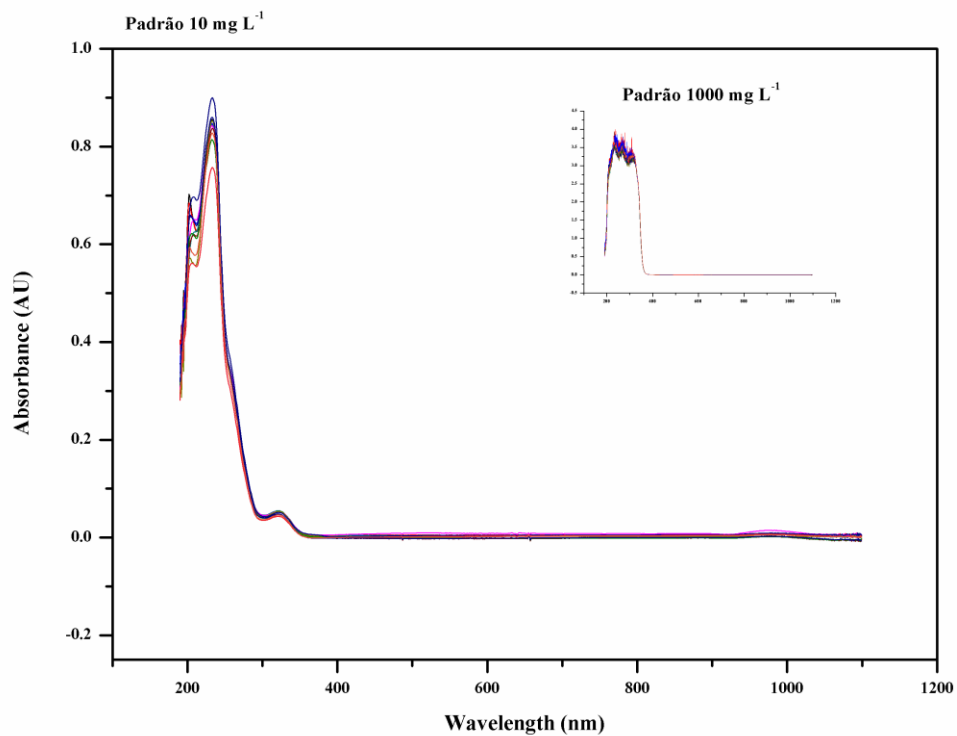
## APÊNDICE A

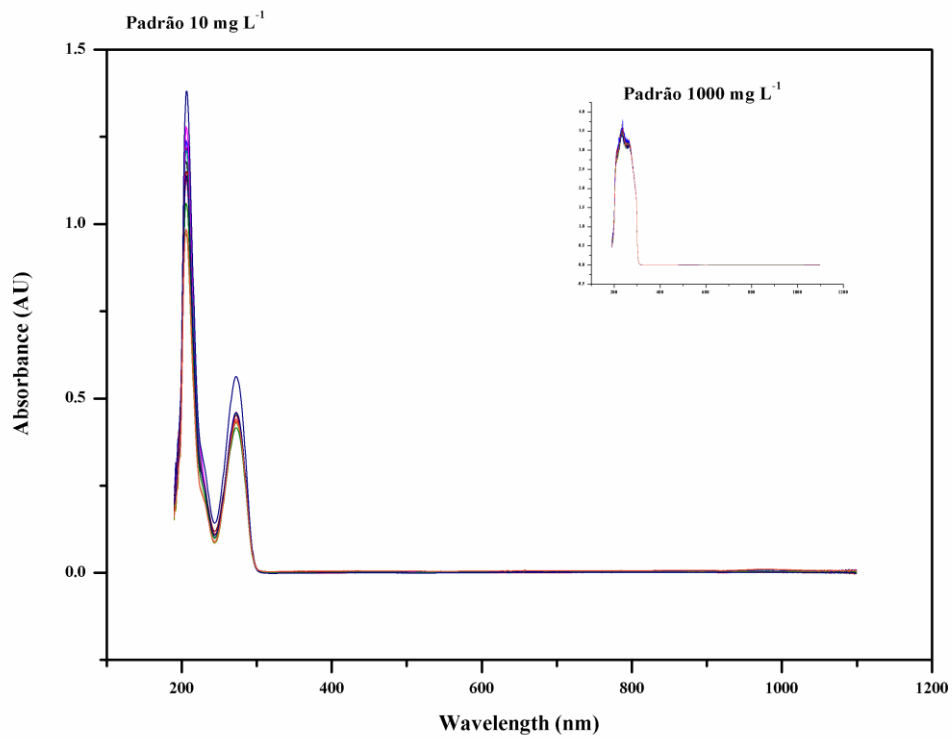
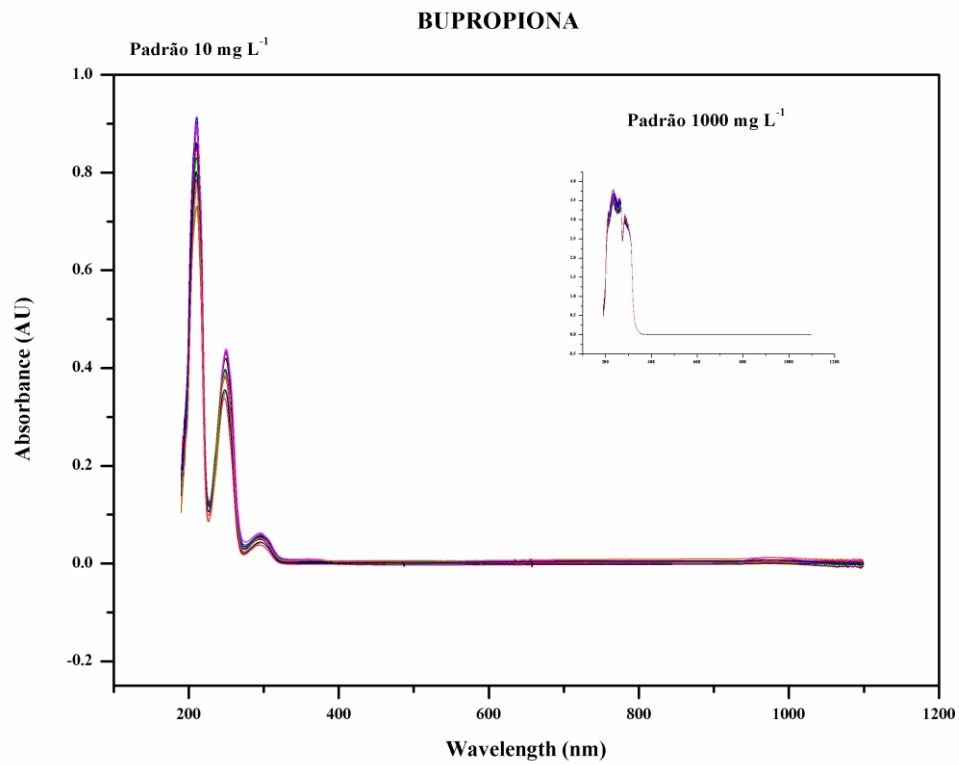
## ALPRAZOLAM



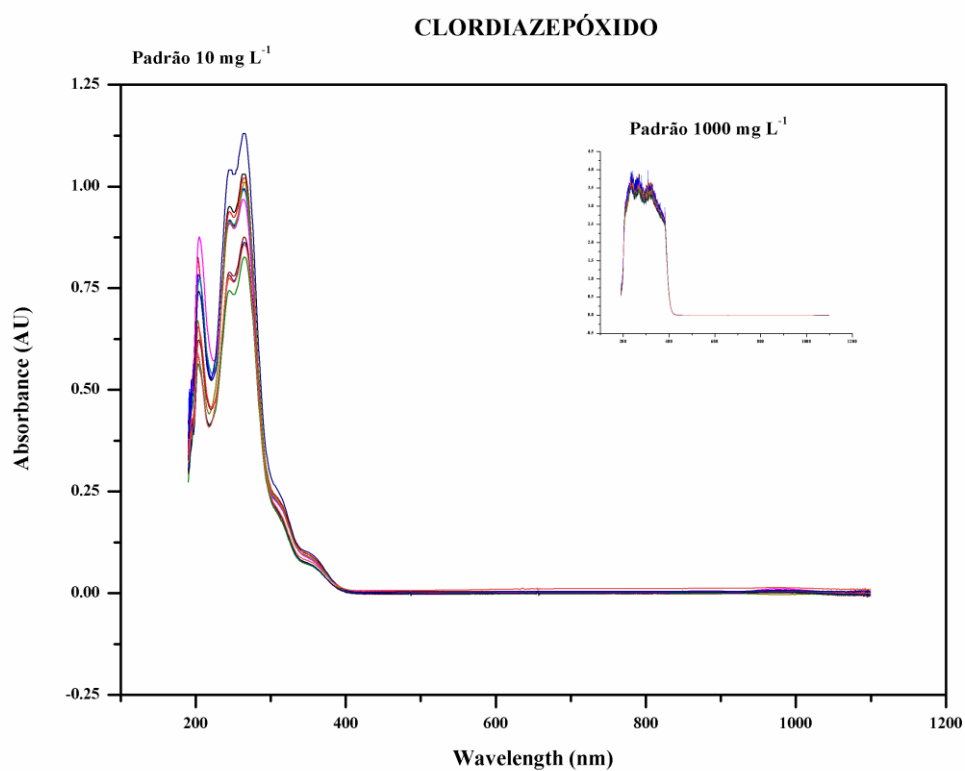
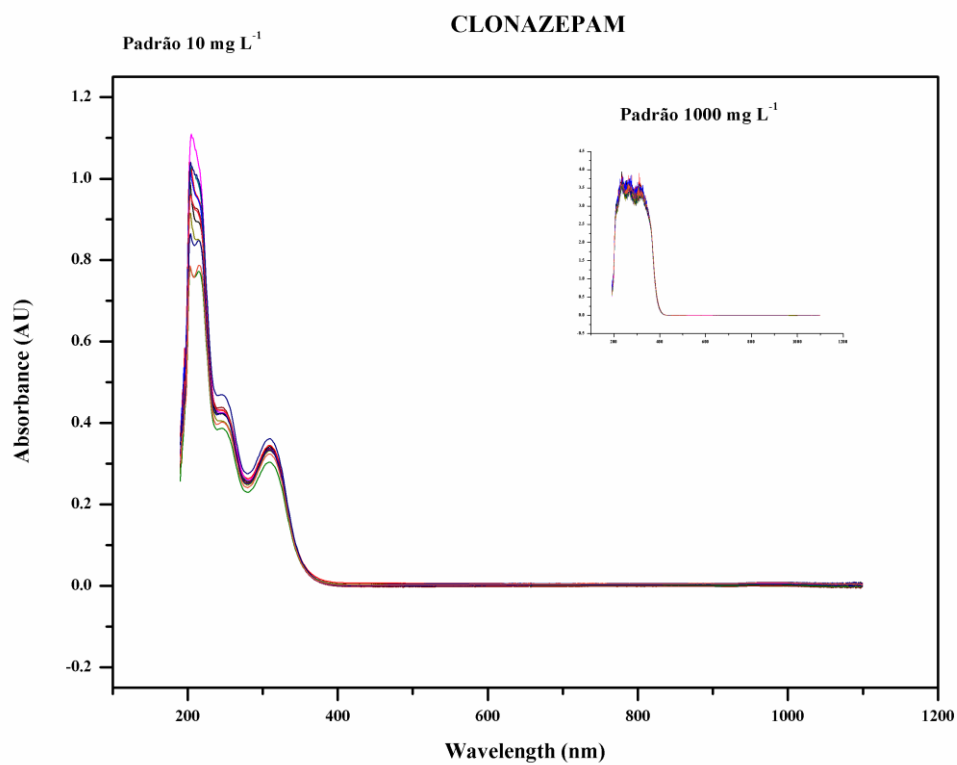
## ANFEPRAMONA

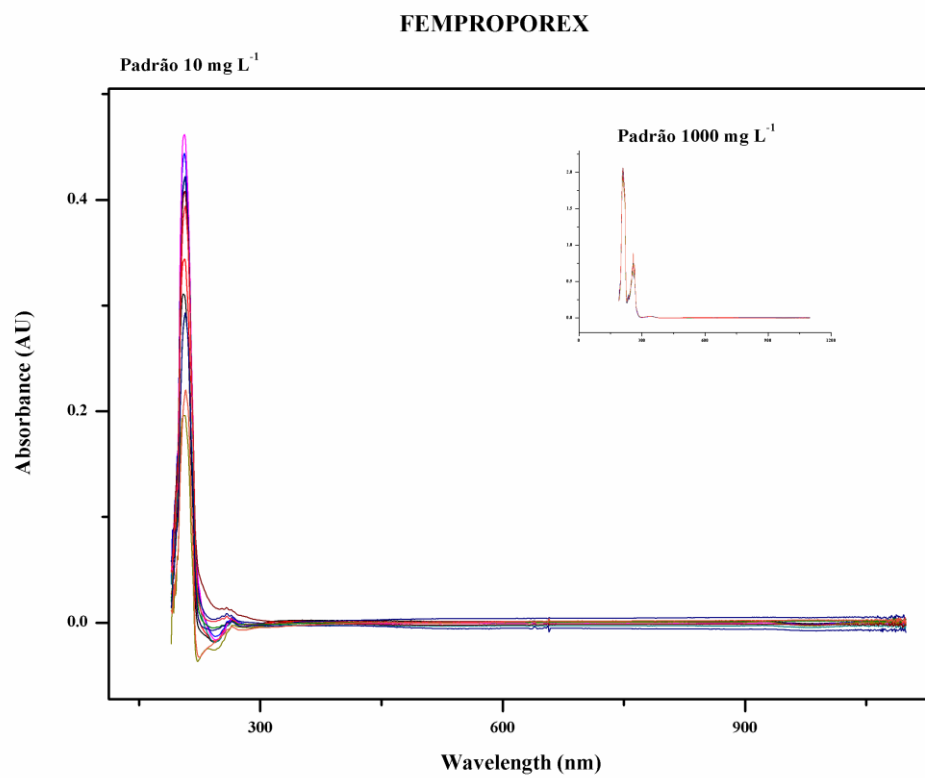
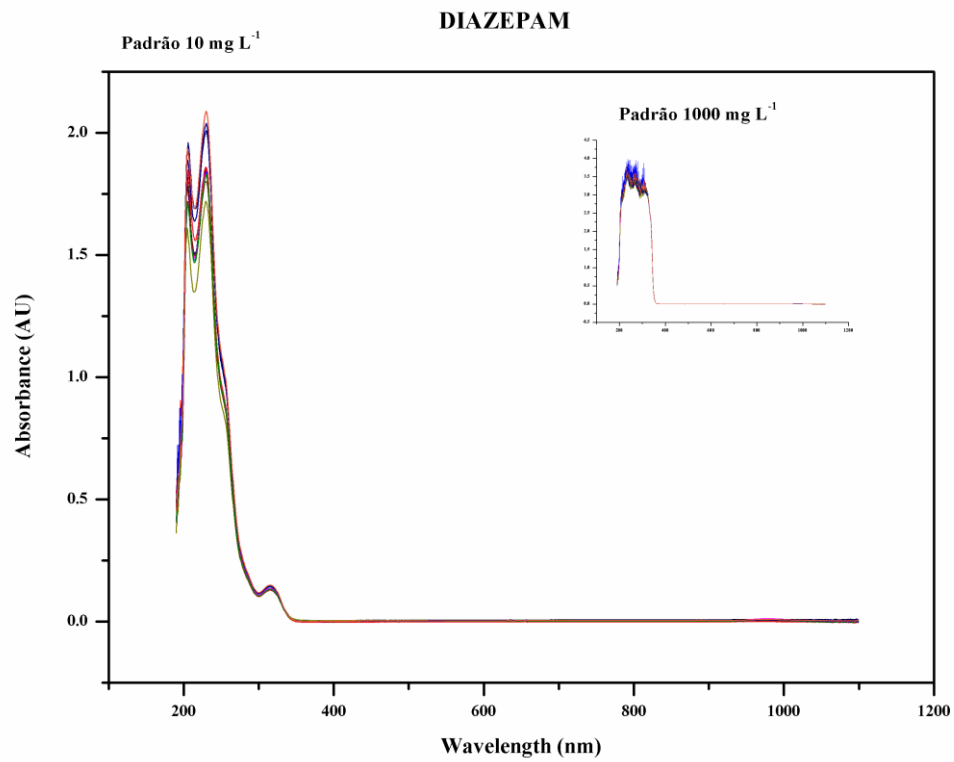


**BISACODIL****BROMAZEPAM**

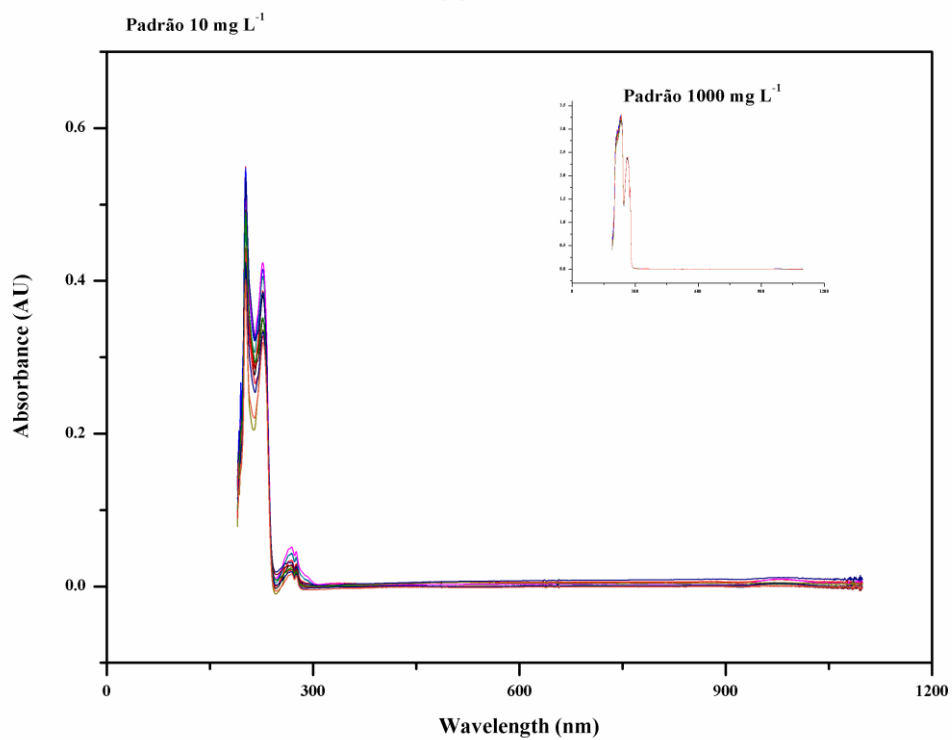




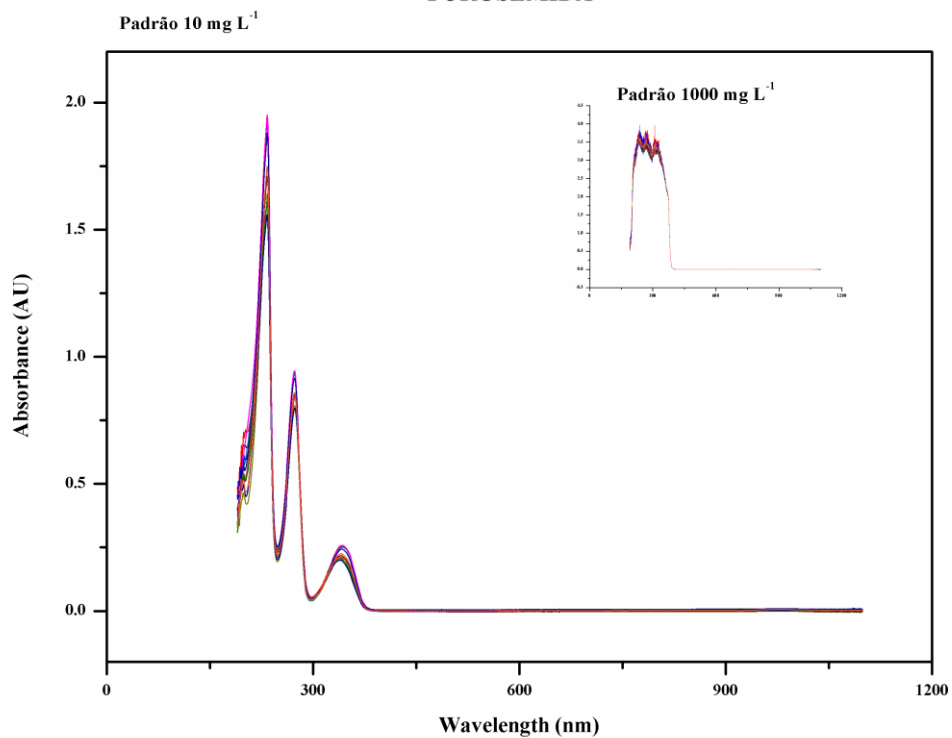


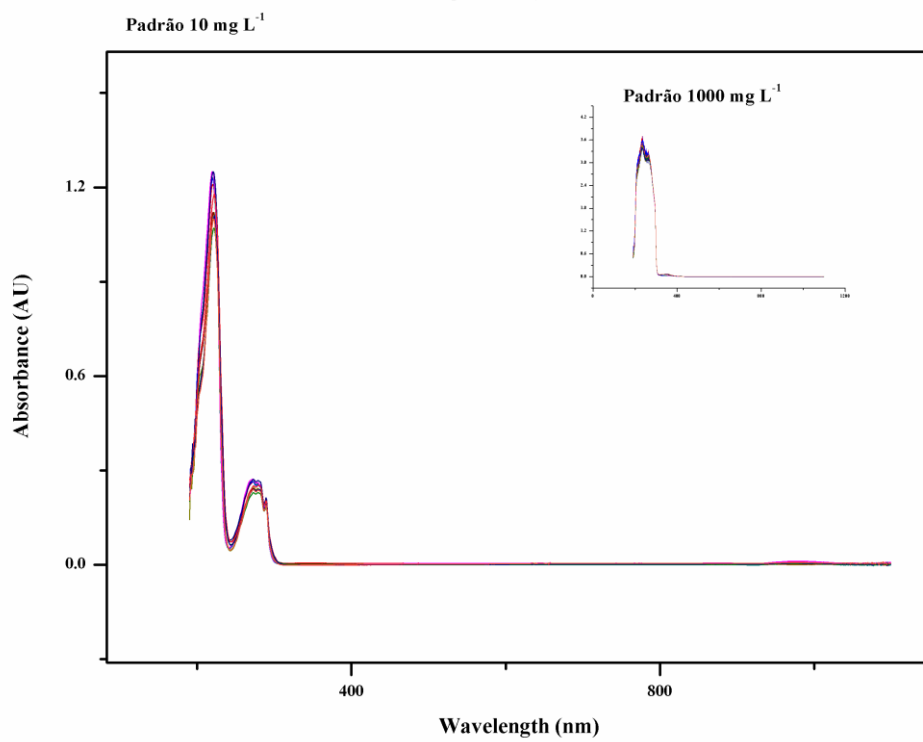
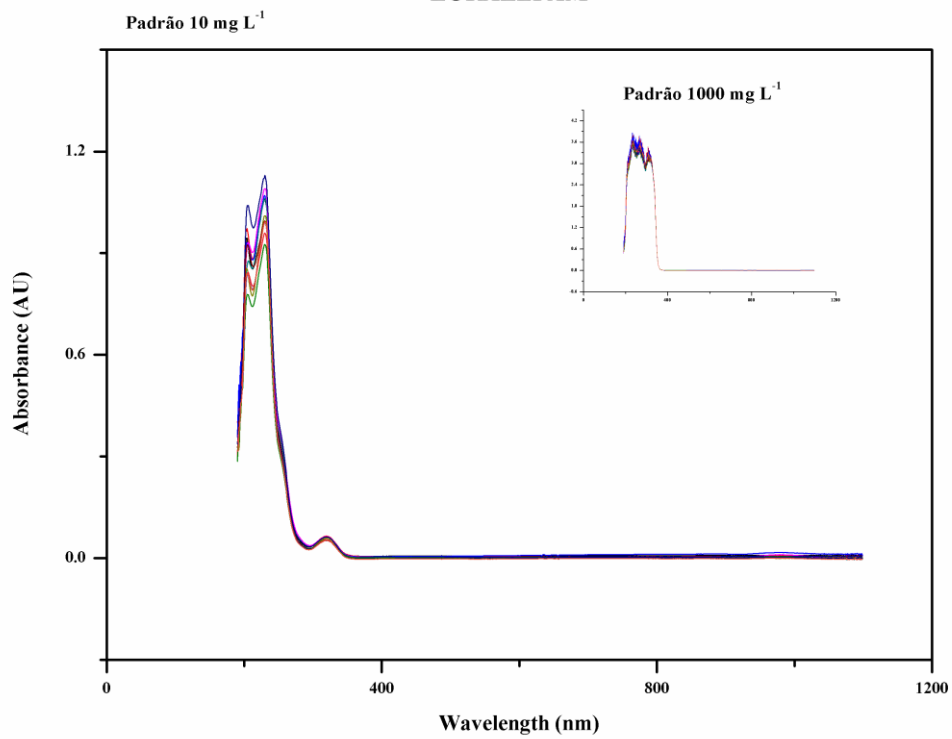


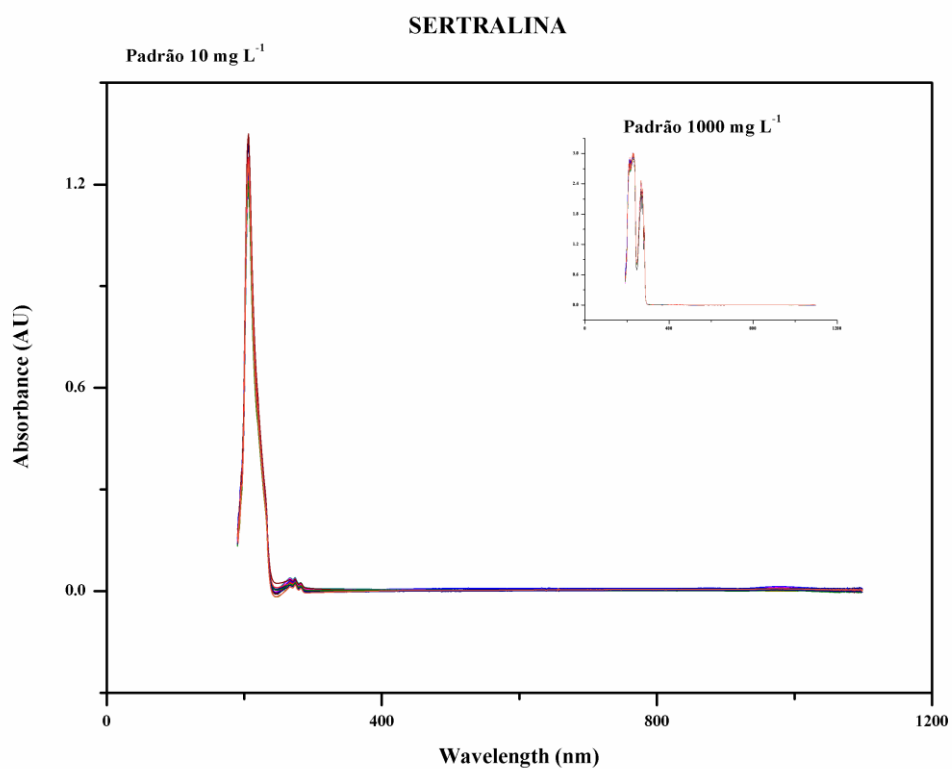
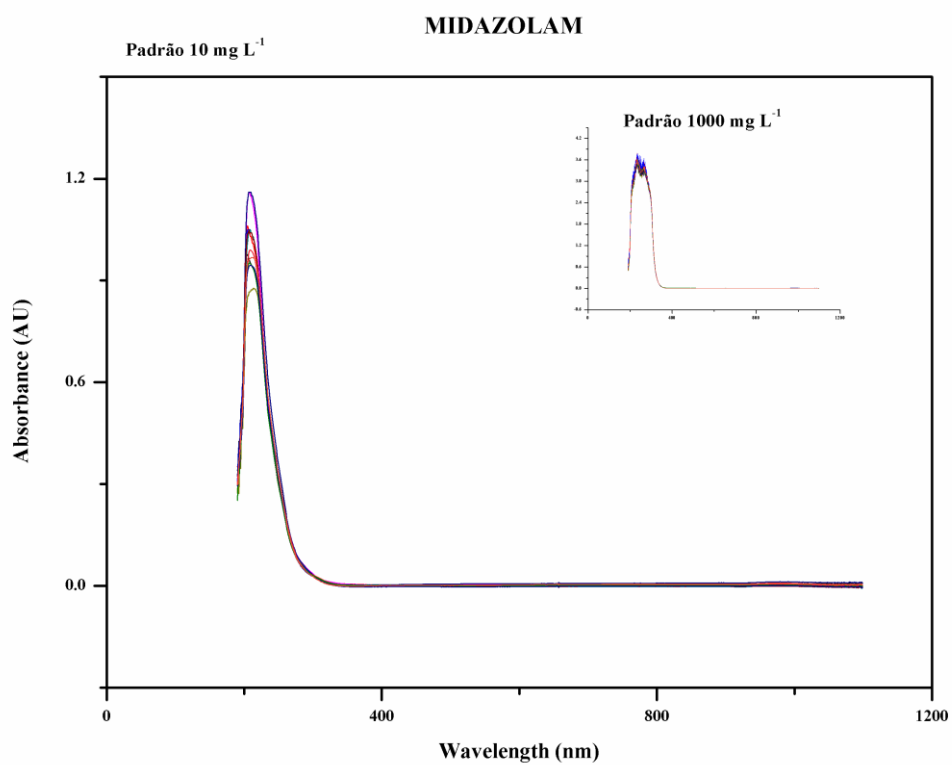
## FLUOXETINA

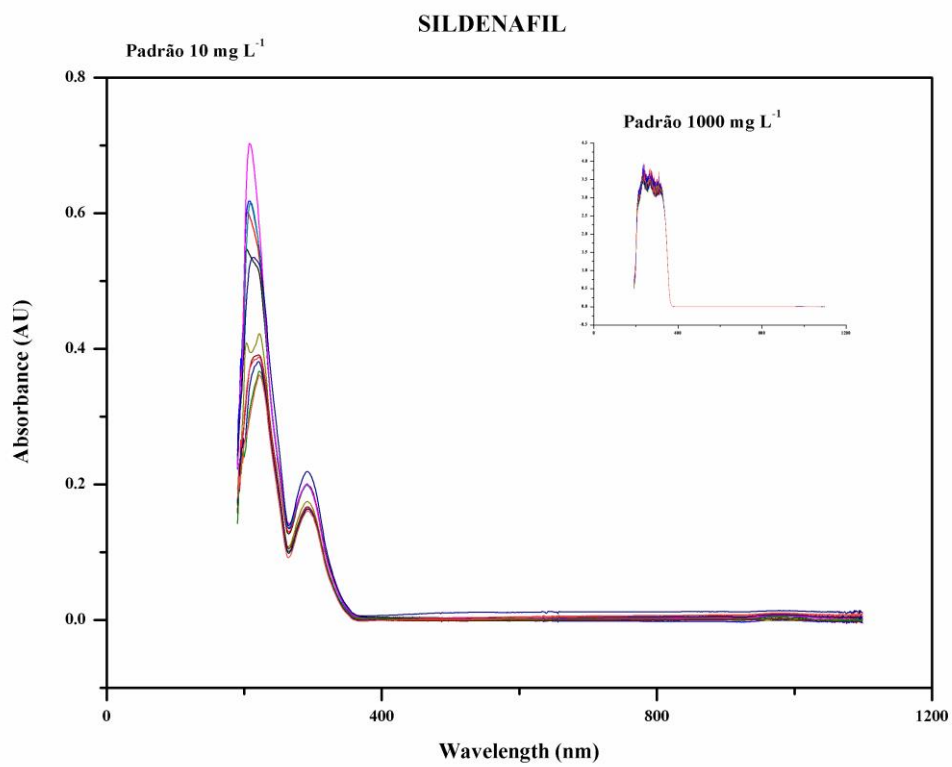
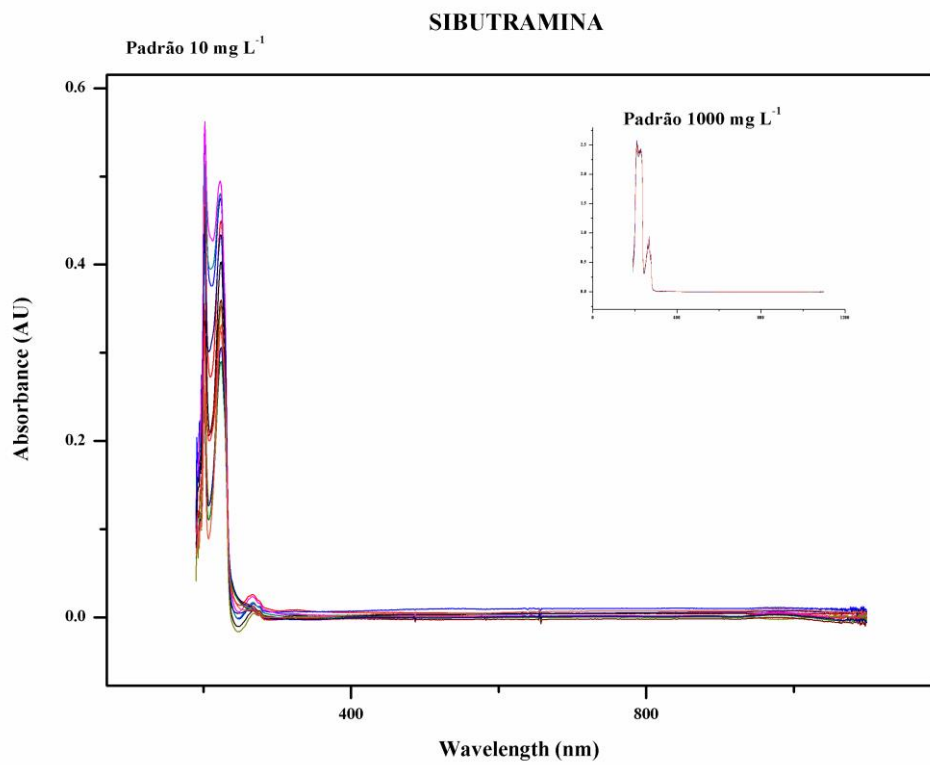


## FUROSEMIDA

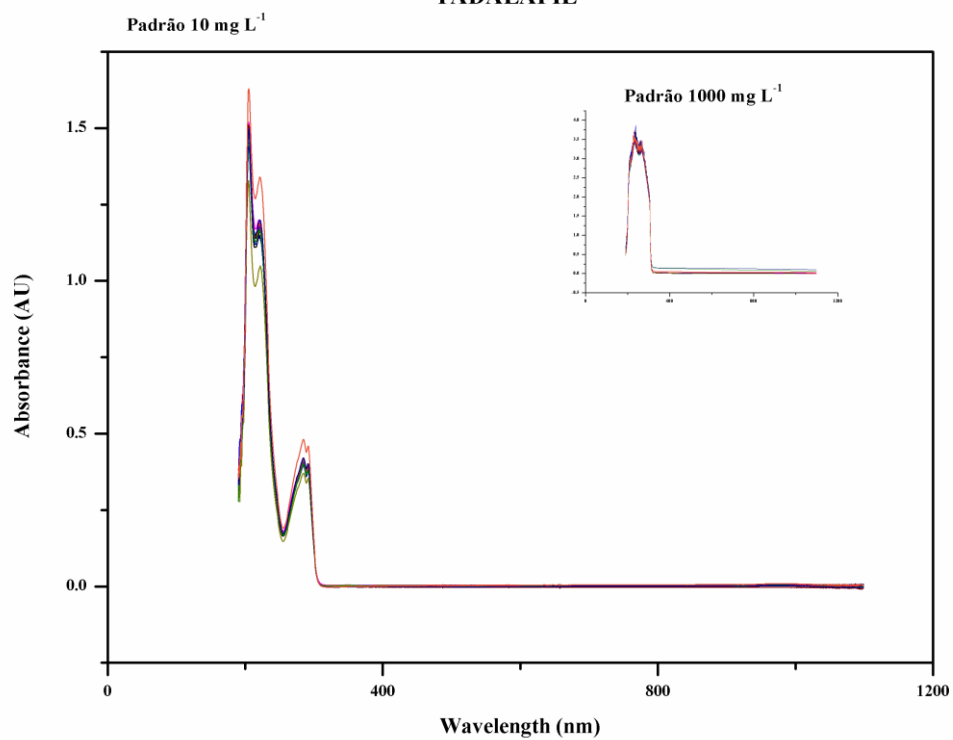


**IOIMBINA****LORAZEPAM**

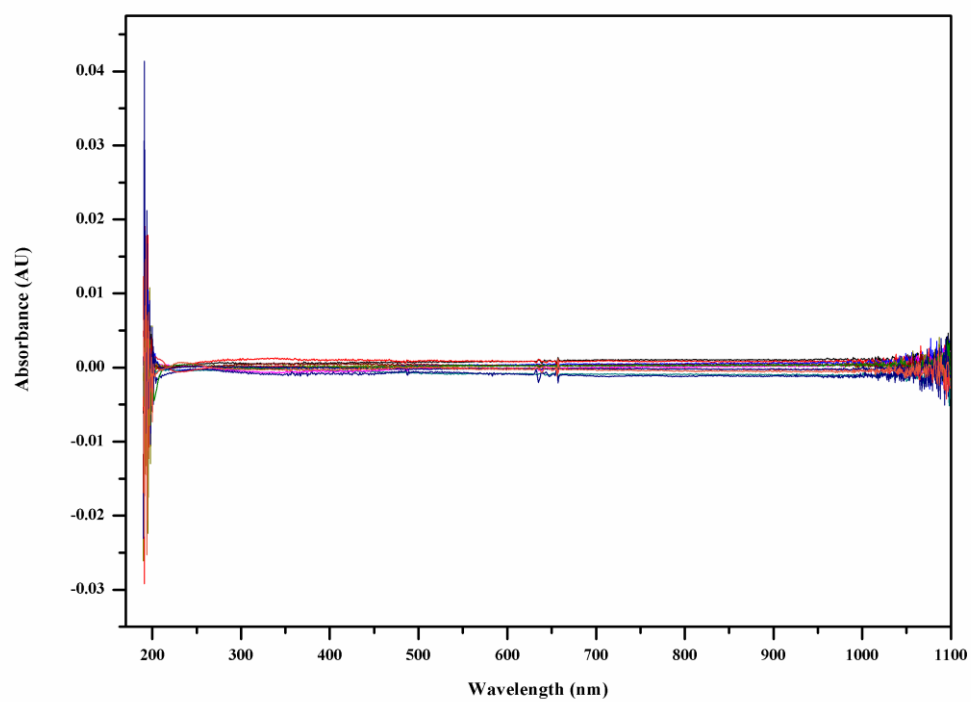




## TADALAFIL



## METANOL



## APÊNDICE B

Artigo submetido:

Submissão em 24 jan 2018.

Analytical Methods



Analytical  
Methods

**Pulsed Amperometric Detection of Pharmacologic  
Adulterants in Dietary Supplements using a Gold Electrode  
coupled to HPLC Separation**

Journal:	<i>Analytical Methods</i>
Manuscript ID	Draft
Article Type:	Paper
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Muratt, Diana; Universidade Federal de Santa Maria Müller, Larissa; Universidade Federal de Santa Maria Ramos Dal Molin, Thais; Universidade Federal de Santa Maria Viana, Carine; Federal University of Santa Maria, Department of Chemistry Carvalho, Leandro; UFSM,

SCHOLARONE™  
Manuscripts



## Pulsed Amperometric Detection of Pharmacologic Adulterants in Dietary Supplements using a Gold Electrode coupled to HPLC Separation

Diana T. Muratt<sup>1</sup>, Larissa S. Müller<sup>2</sup>, Thais Dal Molin<sup>2</sup>, Carine Viana<sup>2</sup>, Leandro M. de Carvalho<sup>1, 2, \*</sup>

<sup>1</sup> Department of Chemistry, Postgraduate Program in Analytical Chemistry (PPGQ), Federal University of Santa Maria (UFSM), PO Box 5051, CEP 97110–970, Santa Maria, RS, Brazil.

<sup>2</sup> Postgraduate Program in Pharmaceutical Sciences (PPGCF), Federal University of Santa Maria (UFSM), CEP 97110–970, Santa Maria, RS, Brazil

\*E-mail: [lemacarvalho@gmail.com](mailto:lemacarvalho@gmail.com)

### Abstract

The enlargement of the dietary supplements market has been observed in several countries around the world. However, the increasing consumption of these products raises concern about their quality and safety. Considering the current scenario, the aim of this study was to develop a new method for screening of multiclass drugs as possible adulterants of dietary supplements. Six drug classes (stimulants, anorexics, anxiolytics, antidepressants, diuretics and laxatives) were studied by high performance liquid chromatography using a biphenyl stationary phase and a gold disc as working electrode for the pulsed amperometric detection (HPLC–PAD). The detection potential of +0.8 V proved to be more appropriate for the detection of all the drugs. A mobile phase consisting of 10 mmol L<sup>-1</sup> ammonium acetate in 64 % (v/v) methanol at pH 4.0 (isocratic system), 1.0 mL min<sup>-1</sup> and 40° C was used as optimal conditions for chromatographic separations. Fenproporex, amfepramone, yohimbine, caffeine, sildenafil, tadalafil, furosemide, sertraline, fluoxetine, lorazepam, clonazepam, midazolam, diazepam and bisacodil were separated after 25 min chromatographic run. Limits of quantification ranged from 0.13 mg L<sup>-1</sup> (fenproporex) to 8.25 mg L<sup>-1</sup> (amfepramone), and accuracies from 86.24 to 114.82 %. Ten samples of dietary supplements were analyzed, in which caffeine and yohimbine were determined among the studied drugs.

**Keywords:** dietary supplements, adulteration, drugs, pulsed amperometric detection, biphenyl stationary phase.