



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS  
FACET- FACULDADE DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA - MESTRADO**

**USO DO SISTEMA PORTÁTIL DE ANÁLISE POR INJEÇÃO EM  
BATELADA (BIA) COM DETECÇÃO ELETROQUÍMICA PARA  
RÁPIDAS DISCRIMINAÇÕES ENTRE MEDICAMENTOS  
CONTENDO CITRATO DE SILDENAFILA**

**Camila Garcia Cardozo**

Orientador: Prof<sup>o</sup>. Dr. Rodrigo Amorim Bezerra da Silva

Co-orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Adriana Evaristo de Carvalho

Dourados / MS

2016



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS  
FACET- FACULDADE DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA - MESTRADO**

**USO DO SISTEMA PORTÁTIL DE ANÁLISE POR INJEÇÃO EM  
BATELADA (BIA) COM DETECÇÃO ELETROQUÍMICA PARA  
RÁPIDAS DISCRIMINAÇÕES ENTRE MEDICAMENTOS  
CONTENDO CITRATO DE SILDENAFILA**

**Camila Garcia Cardozo**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-  
Graduação em Química – Nível Mestrado – da  
Universidade Federal da Grande Dourados  
para obtenção do título de Mestre em Química

Orientador: Prof<sup>o</sup>. Dr. Rodrigo Amorim Bezerra da Silva  
Co-orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Adriana Evaristo de Carvalho

Dourados / MS  
2016

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).**

C266u Cardozo, Camila Garcia.  
Uso do sistema portátil de Análise por Injeção em Batelada (BIA) com detecção eletroquímica para rápidas discriminações entre medicamentos contendo citrato de sildenafil. / Camila Garcia Cardozo. – Dourados, MS : UFGD, 2016.  
52f.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Amorim Bezerra da Silva.  
Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal da Grande Dourados.

1. Análise por Injeção em Batelada (BIA). 2. Citrato de Sildenafil. 3. Viagra®. 4. Amperometria de Múltiplos Pulsos. 5. Diamante Dopado com Boro. 6. Classificação. I. Título.

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central – UFGD.**

**©Todos os direitos reservados. Permitido a publicação parcial desde que citada a fonte.**



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS  
FACULDADE DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

---

### Termo de Aprovação

Após a apresentação, arguição e apreciação pela banca examinadora foi emitido o parecer APROVADO, para a dissertação intitulada: “Uso do Sistema Portátil de Análise por Injeção em Batelada (BIA) com Detecção Eletroquímica para Rápidas Discriminações Entre Medicamentos Contendo Citrato de Sildenafil”, de autoria de Camila Garcia Cardozo, apresentada ao Programa de Mestrado em Química da Universidade Federal da Grande Dourados.

Prof. Dr. Rodrigo Amorim Bezerra da Silva (Orientador-UFU)  
Presidente da Banca Examinadora

Prof. Dr. Wallans Torres Pio dos Santos  
Membro Examinador (UFVJM)

Prof. Dr. Rodrigo Alejandro Abarza Muñoz  
Membro Examinador (UFU)

Dourados/MS, 26 de fevereiro de 2016

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por estar sempre presente na minha vida e tornar minhas conquistas possíveis.

Agradeço aos meus pais e as minhas irmãs por todo apoio, carinho e incentivo, por apostarem em mim e se orgulharem pelo meu trabalho.

Ao meu amor André Carlesso, por estar ao meu lado acreditando que sempre posso mais.

Ao meu orientador Prof<sup>o</sup>. Dr. Rodrigo Amorim Bezerra da Silva pela credibilidade e orientação, por ser exemplo de profissional e me ajudar no caminho da ciência.

À professora e co-orientadora Dr<sup>a</sup>. Adriana Evaristo de Carvalho, por todo o auxílio e conhecimentos prestados.

Aos membros da banca de qualificação Prof<sup>o</sup>. Dr. Cauê Alves Martins e Prof<sup>o</sup>. Dr. Magno Aparecido Gonçalves Trindade, pelas sugestões e idéias para o melhoramento deste trabalho.

Aos membros da banca Prof<sup>o</sup>. Dr. Rodrigo Alejandro Abarza Munoz (IQ-UFU) e Prof<sup>o</sup>. Dr. Wallans Torres Pio dos Santos (IQ-UFVJM) pelo aceite em participar desta defesa de mestrado e contribuições para este trabalho.

Ao Prof. Dr. Thiago Regis Longo Cesar da Paixão (IQ-USP) pela colaboração no tratamento dos dados voltamétricos e classificação quimiométrica das formulações.

Aos meus colegas de laboratório Rafael, Leticia, Priscila, Tamires, Leonardo, Luis e Camila por todos os momentos vividos, seja para estudos ou comemorações. Sempre os levarei no meu coração e em minhas lembranças.

À minha amiga Ana Carolina Roveda.

Aos órgãos de fomento CNPq e CAPES pelo apoio financeiro e à Fundect pela bolsa de mestrado concedida.

Ao programa de Pós-Graduação em Química da UFGD.

A todos os servidores da UFGD pela parceria e ajuda sempre prestadas.

## SUMÁRIO

|  |     |
|--|-----|
| LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS .....   | I   |
| LISTA DE FIGURAS .....   | II  |
| LISTA DE TABELAS .....   | IV  |
| RESUMO .....   | V   |
| ABSTRACT .....   | VI  |
| TRABALHOS REALIZADOS DURANTE O MESTRADO .....  | VII |
| 1. INTRODUÇÃO.....   | 00  |
| 1.1 Considerações gerais.....  | 00  |
| 1.2. Teoria.....   | 01  |
| 1.2.1. Métodos eletroanalíticos.....   | 01  |
| 1.2.1.1 Técnicas Voltamétricas.....  | 01  |
| 1.2.1.2 Técnicas Amperométricas.....   | 04  |
| 1.2.2. Eletrodo de Diamante Dopado com Boro.....   | 06  |
| 1.2.3. Análise por injeção em batelada ( <i>BIA</i> ) com detecção por <i>MPA</i> .....  | 07  |
| 1.3. Revisão Bibliográfica.....  | 10  |
| 1.3.1. Breve histórico de medicamentos para disfunção erétil masculina.....  | 10  |
| 1.3.2. Remédio falsificado e contrabandeado: Conceitos e histórico no Brasil.....  | 11  |
| 1.3.3. Análises de medicamentos falsificados e contendo <i>CS</i> .....  | 13  |
| 2. OBJETIVOS.....  | 17  |
| 3. EXPERIMENTAL.....   | 18  |
| 3.1. Reagentes, soluções e amostras.....   | 18  |
| 3.2. Instrumentação.....   | 19  |
| 4. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....  | 22  |
| 4.1. Detecção de <i>CS</i> por voltametria hidrodinâmica e classificação por métodos quimiométricos ( <i>PCA</i> e <i>HCA</i> )..... | 22  |
| 4.1.1. Desempenho eletroquímico de <i>CS</i> no <i>DDB</i> em condições hidrodinâmicas.....  | 22  |

|  |    |
|--|----|
| 4.1.2. Detectabilidade de CS em <i>DDB</i> em distintas técnicas voltamétricas.....              | 25 |
| 4.1.3. Comportamento eletroquímico de CS em distintos eletrólitos suportes.....                  | 27 |
| 4.1.4. Medidas eletroquímicas das soluções dos medicamentos por <i>VOQ</i> .....                 | 28 |
| 4.1.5. Classificação das formulações por métodos quimiométricos ( <i>PCA</i> e <i>HCA</i> )..... | 31 |
| 4.2. Detecção de CS por Amperometria de Múltiplos Pulsos e classificação não quimiométrica.....  | 36 |
| 4.2.1. Comportamento eletroquímico de CS por <i>MPA</i> .....                                    | 36 |
| 4.2.2. Escolha da sequência de três pulsos aplicados no <i>DDB</i> .....                         | 37 |
| 4.2.3. Detecção por <i>MPA</i> e classificação das amostras por correntes e razões.....          | 37 |
| 5. CONCLUSÕES.....   | 46 |
| 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....   | 47 |

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

BIA - Análise por Injeção em Batelada (do inglês "*Batch Injection Analysis*")

CA – Cafeína

CLAE - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

CLUE - Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência

CS – Citrato de sildenafila

DI – Dipirona

DDB - Diamante dopado com boro

DPR –Desvio Padrão Relativo

$E_{pa}$  - Potencial de pico anódico

$E_{pc}$  - Potencial de pico catódico

EA – Eletrodo auxiliar

ER – Eletrodo de referência

ET - Eletrodo de trabalho

FIA - Análise de Injeção em Fluxo (do inglês "*Flow Injection Analysis*")

FRX - Fluorescência de raios-X

HCA-Análise de Agrupamentos Hierárquicos (do inglês "*Hierarchical Cluster Analysis*")

$I_{pa}$  - Corrente de pico anódica

$I_{pc}$  - Corrente de pico catódica

MPA - Amperometria de Múltiplos Pulsos (do inglês "*Multiple Pulse Amperometry*")

OMS - Organização Mundial da Saúde

PA - Paracetamol

PCA - Análise de Componentes Principais (do inglês "*Principal Component Analysis*")

PCR - Regressão por Componentes Principais (do inglês "*Principal Component Regression*")

RMN - Ressonância Magnética Nuclear

TA – Tadalafila

TBR - Tampão Britton Robinson

VI - Viagra®

VC - Voltametria Cíclica

VL - Voltametria Linear

VOQ - Voltametria de Onda Quadrada

VPD - Voltametria de pulso diferencial



## LISTA DE FIGURAS

|   |           |
|---|-----------|
| <b>Figura 1</b> - Representação da voltametria cíclica e linear: Variação do potencial em função do tempo para <i>VL</i> (a) e <i>VC</i> (c) e respectivas curvas potencial-corrente para <i>VL</i> (b) e <i>VC</i> (d).....  | <b>02</b> |
| <b>Figura 2</b> - Decaimento da corrente faradáica e capacitiva em função do tempo.....   | <b>03</b> |
| <b>Figura 3</b> - Degrau único de potencial aplicado na amperometria (a) e três degraus aplicados em sequência na <i>MPA</i> e respectivos sinais coletados por amperometria (c) ou <i>MPA</i> (d). .....   | <b>05</b> |
| <b>Figura 4</b> - Esquema de uma célula de <i>BIA</i> semelhante à utilizada neste trabalho [13].....   | <b>07</b> |
| <b>Figura 5</b> - Etapas operacionais de um sistema <i>BIA</i> com detecção amperométrica [15].....   | <b>08</b> |
| <b>Figura 6</b> - Estrutura Química do Citrato de Sildenafil.....   | <b>10</b> |
| <b>Figura 7</b> - Imagem dos componentes da célula <i>BIA</i> : a) <i>ER</i> ; b) <i>EA</i> ; c) Orifício para encaixe da pipeta eletrônica; d) Abertura para a inserção de agitador; e) Pipeta eletrônica MultipetteStream; f) Agitador mecânico conectado à fonte universal.....  | <b>20</b> |
| <b>Figura 8</b> - Voltamograma cíclico hidrodinâmico obtido na ausência (a) e na presença de <i>CS</i> $75 \mu\text{mol L}^{-1}$ (b). Eletrólito Suporte: $\text{H}_2\text{SO}_4$ $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ; Volume injetado: $1,0 \text{ mL}$ ; Velocidade de Injeção: $24 \mu\text{L s}^{-1}$ ; Velocidade de varredura: $100 \text{ mV s}^{-1}$ .....  | <b>23</b> |
| <b>Figura 9</b> - Voltamogramas cíclicos para (a) injeção incompleta de solução de <i>CS</i> $75 \mu\text{mol L}^{-1}$ e (Varredura 2) e posteriores à injeção (após 7s da varredura 2 até a 13) e (b) cinco injeções hidrodinâmicas completas e sequenciais (repetibilidade) (b). Eletrólito Suporte: $\text{H}_2\text{SO}_4$ $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ; Volume injetado: $1,0 \text{ mL}$ ; Velocidade de Injeção: $143 \mu\text{L s}^{-1}$ (em a) e $48 \mu\text{L s}^{-1}$ (em b); Velocidade de varredura: $200 \text{ mV s}^{-1}$ ..... | <b>24</b> |
| <b>Figura 10</b> - Voltamogramas hidrodinâmicos obtidos após injeções de solução de <i>CS</i> $75 \mu\text{mol L}^{-1}$ e detecção por distintas técnicas voltamétricas ( <i>VC</i> , <i>VL</i> , <i>DPV</i> e <i>VOQ</i> ); Condições: Eletrólito: $\text{H}_2\text{SO}_4$ $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ; Vazão: $48 \mu\text{L s}^{-1}$ ; Volume injetado: $1,0 \text{ mL}$ .....   | <b>26</b> |
| <b>Figura 11</b> - <i>VOQ</i> hidrodinâmicos nas condições otimizadas* para injeções de <i>CS</i> $75 \mu\text{mol L}^{-1}$ em <i>TBR</i> em distintos pHs (1, 2, 4, 6, 8 e 10). * Vazão: $48 \mu\text{L s}^{-1}$ , Volume injetado: $1,0 \text{ mL}$ . Frequência: $30 \text{ Hz}$ , Amplitude: $30 \text{ mV}$ , Incremento de potencial: $5 \text{ mV}$ .....  | <b>27</b> |
| <b>Figura 12</b> - Voltamogramas hidrodinâmicos de onda quadrada para (a) uma injeção de cada solução de formulação comercial ( <i>VI</i> e <i>G</i> ) e contrabandeada ( <i>C</i> ) e (b) para cinco injeções sequenciais da solução de <i>C</i> <sub>2</sub> . Condições voltamétricas e de injeção iguais à Fig. 11.....   | <b>29</b> |
| <b>Figura 13</b> - <i>VOQ</i> hidrodinâmicos uma injeção de cada solução de (a) <i>VI</i> e <i>VI</i> adulterados ( <i>A<sub>PA</sub></i> , <i>A<sub>DI</sub></i> , <i>A<sub>CA</sub></i> , <i>A<sub>TA1</sub></i> ou <i>A<sub>TA2</sub></i> ) e (b) cinco injeções em sequência de uma solução de <i>A<sub>PA</sub></i> . Condições  | <b>30</b> |

|   |           |
|---|-----------|
| voltamétricas e de injeção iguais à Fig. 11; $[CS]_{amostras} = 0,31 \text{ g L}^{-1}$ .....  |           |
| <b>Figura 14</b> - Gráfico de escores da $PC_1 \times PC_2 \times PC_3$ referente às sete amostras comerciais VI e genéricas ( $G_1 - G_6$ ), e a duas amostras contrabandeados ( $C_1$ e $C_2$ ).....  | <b>32</b> |
| <b>Figura 15</b> - Gráfico de escores da $PC_1 \times PC_2 \times PC_3$ referente a amostra de VI e cinco amostras adulteradas ( $A_{PA}$ , $A_{DI}$ , $A_{CA}$ , $A_{TA1}$ ou $A_{TA2}$ ).....   | <b>33</b> |
| <b>Figura 16</b> - Dendograma obtido pela HCA para as formulações comerciais de VI e genéricas ( $G_1 - G_6$ ) e duas formulações contrabandeadas ( $C_1$ e $C_2$ ).....  | <b>34</b> |
| <b>Figura 17</b> - Dendograma obtido pela HCA para a formulação comercial de VI e as formulações adulteradas em laboratório ( $A_{PA}$ , $A_{DI}$ , $A_{CA}$ , $A_{TA1}$ ou $A_{TA2}$ ).....  | <b>35</b> |
| <b>Figura 18</b> - (a) Esquema da sequência de pulsos de potencial aplicados no DDB;; (b) Amperogramas de múltiplos pulsos para injeção em triplicata de solução de CS $75 \mu\text{mol L}^{-1}$ ; (c) Respective voltamogramas hidrodinâmicos. Volume injetado: $300 \mu\text{L}$ ; Velocidade de injeção: $87 \mu\text{L s}^{-1}$ . Tempo de pulso: 70 ms. Eletrólito: $\text{H}_2\text{SO}_4$ $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ .....   | <b>36</b> |
| <b>Figura 19</b> - (a) Esquema da sequência de pulsos aplicados no DDB; (b) MPA obtidos para injeções em triplicata das soluções de VI, genéricos ( $G_1 - G_6$ ) e contrabandeados ( $C_1$ , $C_2$ ) na célula BIA; (c) Gráfico 3D das correntes de pico nos três pulsos de potencial (x: $i_{+1,3V}$ , y: $i_{+1,6V}$ , z = $i_{+2,1V}$ ). Velocidade de injeção: $100 \mu\text{L s}^{-1}$ ; Volume injetado: $200 \mu\text{L}$ . Eletrólito suporte: $\text{H}_2\text{SO}_4$ $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ . Tempo de pulso: 50 ms..... | <b>39</b> |
| <b>Figura 20</b> - (a) Esquema da sequência de pulsos aplicados no DDB; (b) MPA obtidos para injeções em triplicata das soluções de VI, adulterados ( $A_{DI}$ , $A_{PA}$ , $A_{CA}$ , $A_{TA1}$ e $A_{TA2}$ ); (c) Gráfico 3D das correntes de pico nos três pulsos de potencial (x: $i_{+1,3V}$ , y: $i_{+1,6V}$ , z = $i_{+2,1V}$ . Velocidade de injeção: $100 \mu\text{L s}^{-1}$ ; Volume injetado: $200 \mu\text{L}$ . Tempo de pulso: 50 ms.....  | <b>40</b> |
| <b>Figura 21</b> - Amperogramas obtidos nos três pulsos (+1,3 V, +1,6 V e +2,1 V) após injeções de soluções de concentrações crescentes de CS (5, 10, 25, 50, 75, 100 e $150 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) (A) e respectivas correntes de pico (B) e razões entre as correntes de pico nos três pulsos ( $R_1 = i_{+1,6V}/i_{+1,3V}$ , $R_2 = i_{+2,1V}/i_{+1,6V}$ , $R_3 = i_{+2,1V}/i_{+1,3V}$ ).....   | <b>42</b> |
| <b>Figura 22</b> - Amperogramas obtidos nos três pulsos (+1,3 V, +1,6 V e +2,1 V) após injeções de soluções da amostra adulterada com paracetamol ( $A_{PA}$ ) submetidas a distintas diluições (A) e respectivas correntes de pico (B) e razões entre as correntes de pico nos três pulsos ( $R_1 = i_{+1,6V}/i_{+1,3V}$ , $R_2 = i_{+2,1V}/i_{+1,6V}$ , $R_3 = i_{+2,1V}/i_{+1,3V}$ ). .....  | <b>43</b> |
| .   |           |
| <b>Figura 23</b> - Gráfico 3D das razões calculadas (x: $R_1$ , y: $R_2$ e z: $R_3^*$ ) a partir das correntes de pico das amostras de VI, genéricos e contrabandeados (A) e VI e adulterados (B).....  | <b>44</b> |

**LISTA DE TABELAS**

|   |           |
|---|-----------|
| <b>Tabela 1</b> - Dados sobre os medicamentos inibidores da PHD5 ( <i>VI</i> , Ciális e Levitra)..... | <b>11</b> |
| <b>Tabela 2</b> - Principais trabalhos sobre métodos de diagnóstico em inibidores da PDH5....         | <b>15</b> |
| <b>Tabela 3</b> - Dados comerciais e da bula dos comprimidos de <i>VI</i> e genéricos.....            | <b>18</b> |
| <b>Tabela 4</b> - Dados das preparações das amostras adulteradas.....                                 | <b>19</b> |
| <b>Tabela 5</b> - Vazão e tempos de injeção obtidos com a micropipeta eletrônica.....                 | <b>25</b> |
| <b>Tabela 6</b> - Velocidades de varredura em experimentos por voltametria cíclica* .....             | <b>25</b> |
| <b>Tabela 7</b> - Técnicas eletroquímicas e respectivos parâmetros instrumentais avaliados....        | <b>26</b> |
| <b>Tabela 8</b> - Potenciais e correntes de pico obtidos dos voltamogramas da Fig. 11.....            | <b>27</b> |
| <b>Tabela 9</b> – Média e variações para as correntes de pico e respectivas razões.....               | <b>42</b> |

## RESUMO

Citrato de Sildenafil (CS) é o princípio ativo do Viagra® (VI), medicamento mais vendido para o tratamento da disfunção erétil masculina e uma das drogas mais falsificadas no mundo. Nos laboratórios periciais ou em algumas metodologias da literatura que verificam a autenticidade de VI, geralmente é utilizada a cromatografia líquida de alta eficiência. No entanto, fatores como o elevado custo, tempo de análise e dimensões dos instrumentos impedem a realização das análises e obtenção de laudos no local da apreensão. Neste trabalho propomos o uso de um sistema de análise por injeção em batelada (BIA) com um eletrodo de trabalho de diamante dopado com boro para a discriminação de formulações farmacêuticas contendo CS, referência, genéricos, contrabandeados e adulterados. Nesta perspectiva, duas estratégias foram propostas: 1. Detecção voltamétrica e classificação quimiométrica: Empregando voltametria de onda quadrada (*Amplitude*: 30 mV; *frequência*: 30 Hz) hidrodinâmica (vazão da pipeta eletrônica: 48  $\mu\text{L s}^{-1}$ ) em meio de ácido sulfúrico 0,1 mol L<sup>-1</sup> foi possível realizar uma triagem rápida ( $t = 12 \text{ s}$ ) e reprodutível ( $DPR \approx 2,5 \%$ ,  $n = 5$ ) de cada amostra. Após o tratamento dos voltamogramas por dois algoritmos quimiométricos (análise de componentes principais ou análise de agrupamentos hierárquicos) as amostras foram classificadas em grupos. 2. Detecção amperométrica de múltiplos pulsos e classificação não-quimiométrica: Cada amostra foi injetada em triplicata no sistema BIA de modo reprodutível ( $DPR < 3\%$ ,  $n = 3$ ) por uma pipeta eletrônica (volume injetado: 200  $\mu\text{L}$ ; velocidade de injeção: 100  $\mu\text{L s}^{-1}$ ) enquanto três pulsos de potencial eram aplicados no eletrodo de DDB +1,3 V, +1,6V e +2,1V. Deste modo, a classificação de cada amostra necessita apenas das correntes de pico anódicas obtidas em cada pulso ( $i_{+1,3V}$ ,  $i_{+1,6V}$  e  $i_{+2,1V}$ ) ou razões entre estas ( $R_1 = i_{+1,6V}/i_{+1,3V}$ ,  $R_2 = i_{+2,1V}/i_{+1,6V}$ ,  $R_3 = i_{+2,1V}/i_{+1,3V}$ ). Utilizando ambas as estratégias 1 ou 2, foi possível realizar a discriminação entre VI referência e genérico de duas formulações contrabandeadas, bem como VI e cinco formulações adulteradas em laboratório. No entanto, a segunda estratégia, proposta pela primeira vez na literatura para discriminação de qualquer amostra, é mais rápida e simples, pois uma injeção tem duração menor do que dez segundos e a classificação não requer nenhum tratamento quimiométrico. Além disso, o sistema BIA é de baixo custo e portátil, podendo ser facilmente utilizado no local da apreensão.

**Palavras chave:** Análise por Injeção em Batelada (BIA), Citrato de Sildenafil, Viagra®, Amperometria de Múltiplos Pulsos, Diamante Dopado com Boro, Classificação.

## ABSTRACT

Sildenafil citrate (CS) is the active principle of Viagra® (VI), more selling drug for treatment of erectile dysfunction and one of the counterfeiter drugs in the world. In forensic laboratories or in the literature some methodologies for quality control of VI employ the high-performance liquid chromatography. However, some drawbacks such elevated costs, time consumption and high size of instruments allows the expedition of chemical analyses reports just after the arrest operation. In this work we propose a batch injection analysis (BIA) system and boron-doped diamond working electrode for simple discrimination of pharmaceutical formulations containing sildenafil citrate (reference, generic, counterfeit and adulterated). In this perspective, two strategies were proposed: 1. Voltammetric detection and chemometric classification: Employing hydrodynamic square wave voltammetry (Amplitude: 30 mV; frequency: 30 Hz; dispensing rate: 48  $\mu\text{L s}^{-1}$ ) with 0.1 mol L<sup>-1</sup> sulfuric acid supporting electrolyte was possible to carry out a fast and reproducible screening ( $RSD = 2,5 \%$ ) which acts as a fingerprint of each drug. After a chemometric treatment (method of principal component analysis and hierarchical cluster analysis) the samples were classified in groups. 2. Multiple pulse amperometry (MPA) detection and non-chemometric classification: Each sample was dispensed in the BIA cell by an electronic micropipette (dispensing rate: 100 $\mu\text{L s}^{-1}$ , injection volume: 200  $\mu\text{L}$ ) reproducibly ( $RSD < 3 \%$ ,  $n = 3$ ) while three potential pulses were applied at BDD electrode +1.3 V, 1.6 V + and + 2.1V. The identification of each sample was performed using only the anodic peak currents obtained in each pulse ( $i_{+1.3V}$ ,  $i_{1.6V}$  and  $i_{+2.1V}$ ) or ratios among these peak currents ( $R_1 = i_{+1.6V}/i_{+1.3V}$ ,  $R_2 = i_{+2.1V}/i_{+1.6V}$ ,  $R_3 = i_{+2.1V}/i_{+1.3V}$ ). Using both strategies 1 or 2 was possible to discriminate between VI (reference and generic) and two counterfeit formulations and VI from five adulterated formulations in the laboratory. However the second strategy, proposed in the first time in literature for discrimination of any sample, is faster and simpler since that the peak current is obtained in a very short time (less than 10 seconds) and the classification does not require any chemometric method. Finally, BIA system proposed is inexpensive, portable and is able to be used in place of the seizure.

**Keywords:** Batch Injection Analysis, Sildenafil Citrate, Viagra®, Multiple Pulse Amperometry, Boron-Doped Diamond, Classification.

## **TRABALHOS REALIZADOS DURANTE O MESTRADO**

Cardozo, C. G.; Carvalho, A. E.; Selva, T. M. G.; Paixão, T. R. L. C; Silva, R. A. B. Fast and simple non chemometric classification of pharmaceutical samples employing Batch Injection Analysis with Multiple Pulse Amperometric Detection. Em redação.

Cardozo, C. G.; Carvalho, A. E.; Selva, T. M. G.; Paixão, T. R. L. C; Silva, R. A. B. Discriminação rápida e simples de medicamentos contendo citrato de sildenafil (Viagra<sup>®</sup>) e adulterantes empregando BIA e Amperometria de Múltiplos pulsos. Apresentação oral, XX Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica (XX SIBEE), 17 a 21 de agosto de 2015, Uberlândia-MG.

Ferreira, P. A.; Cardozo, C. G.; Silva, R. A. B. Monitoramento qualitativo da pureza e análise quantitativa de Tadalafila (Cialis<sup>®</sup>) em medicamentos empregando BIA e detecção amperométrica de múltiplos pulsos. Apresentação de pôster, XX Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica (XX SIBEE), 17 a 21 de agosto de 2015, Uberlândia-MG.

Cardozo, C. G.; Carvalho, A. E.; Selva, T. M. G.; Paixão, T. R. L. C; Silva, R. A. B. Discriminação de Viagra<sup>®</sup> e contrabandeados empregando BIA com detecção eletroquímica e associada ou não as técnicas quimiométricas. Apresentação de pôster, Reunião da Sociedade Brasileira de Química de Mato Grosso do Sul, VIII Semana integrada de Química, 05 a 08 de outubro de 2015, Dourados-MS.

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. Considerações gerais

O consumo de remédios falsificados, contrabandeados ou sem registro de órgãos reguladores vem crescendo não somente no Brasil, mas em todo o mundo. Este aumento se deve ao fato de que os medicamentos falsificados ou contrabandeados são comercializados a preços baixos, são facilmente adquiridos e dispensam receita médica. Com isso, as redes criminosas alcançam lucros tão grandes que chegam a superar aos obtidos no tráfico de drogas. No Brasil, os estados que fazem fronteira com o Paraguai, Paraná e Mato Grosso do Sul, são regiões com elevada incidência de apreensões [1, 2]. Dentre os medicamentos apreendidos pela Polícia Federal Brasileira no ano de 2012, 66 % foram para o tratamento de disfunção erétil masculina (*VI* e *Cialis*<sup>®</sup>) [1].

Após a apreensão, a Organização Mundial da Saúde (*OMS*) [3] sugere que as análises das formulações suspeitas sejam realizadas por ordem crescente de complexidade e custo: 1) Exame organoléptico; 2) Emprego de métodos de diagnóstico qualitativos portáteis para uma rápida triagem das amostras suspeitas; 3) Uso de métodos instrumentais dispendiosos como a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detecção ultra-violeta (*CLAE-UV*) e Espectrometria de Massas (*MS*) para uma análise qualitativa e quantitativa dos princípios ativos presentes no medicamento. Vale ressaltar que, o número de análises necessárias (1, 2 e/ou 3) depende do grau de semelhança física e química entre o medicamento falsificado e o autêntico.

Especificamente em relação ao *VI* não foram encontrados métodos de diagnóstico oficiais em nenhum compêndio nacional ou internacional. Devido a isso, quando um exame organoléptico não é suficiente para discriminar o *VI* e contrafeitos, em geral o departamento de perícia da Polícia Federal executa as análises das formulações suspeitas através da *CLAE*. Fatores como, o transporte das amostras até um laboratório devido às dimensões dos cromatógrafos e o tempo requerido pelos respectivos protocolos analíticos, resulta na expedição tardia de laudos ou insuficiente para o número de amostras solicitadas, o que pode ser um fator limitante na execução de punições adequadas aos falsificadores devido à falta de provas.

Neste sentido, o uso de métodos analíticos para diagnóstico, rápidos, portáteis, utilizáveis “in loco” e de baixo custo é muito vantajoso sob o ponto de vista temporal, legal e econômico. Para isso, o uso do sistema de análise por injeção em batelada (*BIA*) com detecção eletroquímica acoplada a um mini potenciostato, notebooks e eletrodos pode fornecer informações qualitativas suficientes para discriminar o *VI* de seus falsificados, eliminando a etapa quantitativa instrumental.

## 1.2. Teoria

### 1.2.1. Métodos eletroanalíticos

A eletroanalítica é um ramo da Química Analítica que compreende a um conjunto de métodos analíticos baseados nas propriedades elétricas de uma solução do analito presente em uma célula eletroquímica [4]. Estas medidas possibilitam o estabelecimento de relações diretas entre a concentração do analito e alguma propriedade elétrica como corrente, potencial, condutividade, resistência ou carga, que são utilizadas no desenvolvimento de metodologias analíticas em vários setores, como o farmacêutico, biotecnológico, alimentício, de combustíveis, ambiental, forense, etc.

Abaixo são listadas algumas vantagens comuns aos métodos eletroanalíticos:

- Adição de uma quantidade pequena de reagentes e menor volume de resíduos gerados, quando comparada a outras técnicas, pois o analito interage diretamente com a superfície do eletrodo. Características estas que contribuem para a Química Verde;
- Análise em meios coloridos ou contendo partículas sólidas dispersas;
- - Aparelhagem relativamente barata em relação a outras técnicas instrumentais;
- Disponibilidade de instrumentos portáteis, úteis para aplicações em campo.

Para a realização das medidas eletroquímicas é necessário o uso de uma célula eletroquímica, na qual é inserida uma solução do eletrólito suporte, contendo ou não o analito, bem como os eletrodos de referência (*ER*), auxiliar (*EA*) e de trabalho (*ET*). Estes são conectados a um potenciostato interfaceado a um computador, que realiza o controle das variáveis da técnica eletroquímica utilizada e registra os resultados obtidos. Dentre as técnicas eletroquímicas mais utilizadas, destacam-se a voltametria linear (*VL*), a voltametria cíclica (*VC*), as voltametrias de pulso (onda quadrada - *VOQ*, pulso normal, pulso diferencial - *VPD*), a amperometria (potencial constante) e a amperometria de múltiplos pulsos (*MPA*). Nas seções posteriores será dada ênfase apenas às técnicas eletroquímicas (*VL*, *VC*, *VOQ*, *VPD* e *MPA*) empregadas e o *ET* (*DDB*) utilizados nesta dissertação.

#### 1.2.1.1. Técnicas voltamétricas

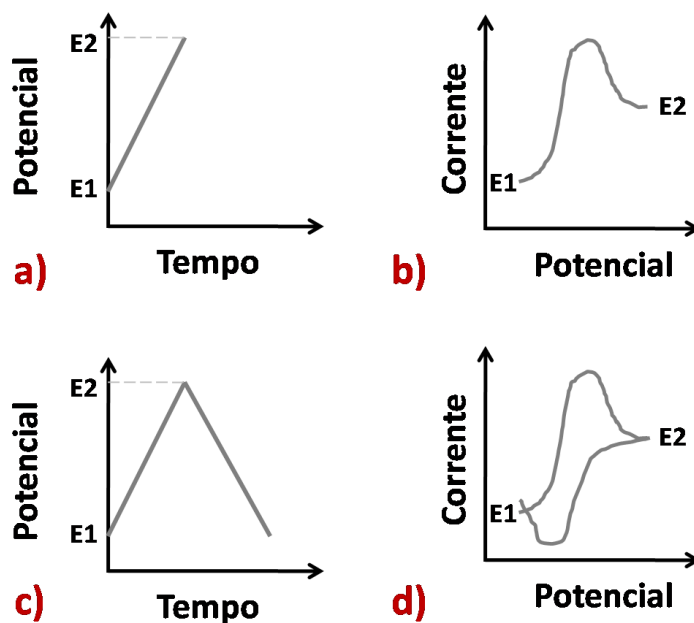
As técnicas voltamétricas compreendem um grupo de técnicas nas quais é aplicada uma diferença de potencial no *ET* versus o *ER*. Como resposta a esta perturbação, a corrente flui entre o *ET* e *EA*, sendo então registrada. Em função do tempo, este potencial



aplicado pode ser constante (amperometria) ou variável (voltametrias). No último caso, o incremento de potencial pode ser linear (*VL* e *VC*) ou pulsado (*VOQ* e *VPD*).

Na voltametria de *VL*, um intervalo de potencial ( $E_1 - E_2$ ) linear em função do tempo é aplicado no *ET*, Fig. 1a, e uma curva de potencial x corrente ou voltamograma é obtido como resposta, Fig. 1b. Na *VC*, uma rampa linear também é aplicada no eletrodo de trabalho, porém perfazendo o sentido direto e inverso de varredura, ou seja, no intervalo  $E_1 - E_2 - E_1$  (Fig. 1c). A resposta da *VC*, o voltamograma cíclico, é a união de duas curvas de potencial x corrente, uma no sentido direto e outra no sentido inverso. Em ambas técnicas *VL* e *VC*, deve ser selecionado o potencial inicial e final, bem como a velocidade de varredura (em  $V s^{-1}$ ).

**Figura 1** - Representação da voltametria cíclica e linear: Variação do potencial em função do tempo para *VL* (a) e *VC* (c) e respectivas curvas potencial-corrente para *VL* (b) e *VC* (d).



Um voltamograma linear ou cíclico indica em qual ( $i_s$ ) potencial ( $i_s$ ) um analito será oxidado ou reduzido na superfície de um eletrodo de trabalho. No entanto, o *VC* fornece maiores informações, pois permite visualizar a oxidação e redução na mesma medida, ao contrário da *VL* que mostra apenas oxidação ou a redução, Fig. 1. Um voltamograma cíclico fornece outras informações como: reversibilidade de um sistema redox reversível, quase-reversível ou irreversível, número de elétrons, área efetiva do eletrodo, etc. Estas técnicas não são muito usadas para fins analíticos, devido à baixa sensibilidade. Esta limitação ocorre porque a aplicação de uma rampa linear de potencial resulta na geração de elevada corrente capacitiva que acaba sobrepondo a faradáica, ou seja, a corrente relativa à oxidação e/ou redução da espécie na superfície do eletrodo.

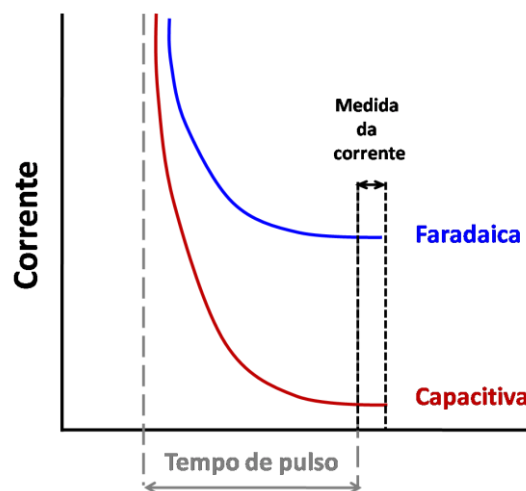
Desde que o eletrólito suporte esteja em excesso, em relação ao analito, o transporte de massa da espécie eletroativa até a superfície do eletrodo de trabalho pode ocorrer por:

- Difusão, na qual a espécie eletroativa é direcionada até a superfície do ET devido à sua concentração na camada de Nernst ser inferior à sua concentração no seio da solução. Neste caso a técnica é denominada voltametria estacionária;
- Convecção, na qual a espécie eletroativa alimenta a camada de Nernst pelo movimento da solução, criado devido a uma agitação mecânica ou fluxo direcionado ao eletrodo. Neste caso a técnica é denominada voltametria hidrodinâmica.

Nas técnicas voltamétricas de pulso, o incremento de potencial aplicado no *ET* não é linear, a perturbação aplicada é uma sequência de pulsos de potenciais. O modo de aplicação destes pulsos é o que define cada uma destas técnicas. As técnicas de pulso se baseiam na medida da corrente elétrica em função do tempo de aplicação de um determinado pulso de potencial. A corrente medida está relacionada com a largura do pulso e com o degrau de potencial que é aplicado no eletrodo para promover o processo faradáico.

A idéia principal dos métodos voltamétricos de pulso é medir a corrente no momento em que a diferença entre corrente faradáica de interesse e corrente capacitiva, interferente seja grande. A Fig. 2 mostra a dependência da corrente capacitiva e faradáica em função do tempo, após a aplicação de um pulso de potencial. O decaimento da corrente capacitiva é mais rápido (função exponencial:  $e^{-t/RC}$ ) do que o decaimento da faradáica (função linear:  $t^{-1/2}$ ) [5]. A corrente no final do pulso tem uma contribuição do processo redox do analito muito maior do que a corrente capacitiva. A sensibilidade das técnicas de pulso é maior do que a obtida com as técnicas de varredura linear. A *VOQ* e a *VPD* são as técnicas de pulso mais utilizadas.

**Figura 2** - Decaimento da corrente faradáica e capacitiva em função do tempo.



Na *VPD*, pulsos de amplitude fixos concomitantes a uma rampa de potencial crescente são aplicados ao *ET*. Duas medições de correntes são realizadas, uma antes da

aplicação do pulso e outra no final do pulso aplicado. A corrente do início é subtraída da segunda, e esta diferença é automaticamente plotada pelo software do potenciostato em voltamograma de pulso diferencial, curva potencial x corrente, que consiste de picos de corrente de forma gaussiana, cuja área ou altura é diretamente proporcional à concentração do analito [5]. A finalidade de utilizar a subtração das duas correntes está baseada na correção da corrente capacitiva, restando apenas a corrente faradáica. Uma limitação da *VPD* é a baixa velocidade de varredura, o que representa uma lenta obtenção dos voltamogramas (3 a 5 minutos por medida) [6]. Porém, destaca-se a desvantagem da *VPD* apresentar melhores resultados em soluções estacionárias e não hidrodinâmicas como realizadas neste trabalho.

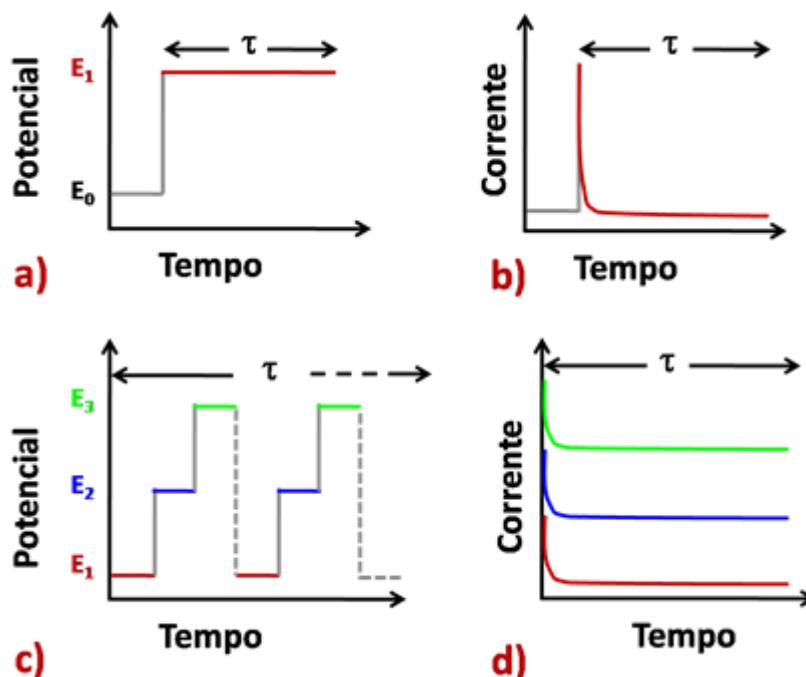
A *VOQ* é uma técnica na qual o pico resultante é proveniente da sobreposição de pulsos de potencial com certa amplitude, largura e frequência. As medidas de corrente são feitas no final dos pulsos diretos e reversos, para o decaimento da corrente capacitiva, e após derivação, o sinal é a intensidade de corrente resultante [7]. As correntes produzidas pelo pulso direto catódico e o inverso anódico são somadas em módulo, e um voltamograma com pico proporcional à concentração é obtido. Uma das grandes vantagens da *VOQ* é aliar uma excelente sensibilidade, rejeição à contribuição da capacitiva com uma velocidade de varredura muito alta, sem perda na resolução dos picos. Velocidades de varredura típicos estão no intervalo de 100 a 1000  $\text{mV s}^{-1}$ , o que permite a obtenção de voltamogramas de 3 a 10 s [6], uma redução considerável em relação a *VPD*.

### 1.2.1.2. Técnicas amperométricas

A amperometria é baseada na aplicação de um degrau de potencial constante ( $E_1$ ) durante certo período ( $\tau$ ) no *ET*, tal como representado na Fig. 3a. Como resposta o detector monitora a corrente elétrica que decai exponencialmente com o tempo, Fig. 3b. Este registro da corrente em função do tempo é conhecido como amperograma.

A *MPA* é uma técnica disponível software GPES (Metrohm Autolab), e permite a aplicação de dois a dez degraus (pulsos) de potencial seguidos no mesmo *ET*. Na Fig. 3c é apresentado um esquema no qual são aplicados três pulsos de potencial ( $E_1$ ,  $E_2$ ,  $E_3$ ) em sequência no *ET*, durante um certo período ( $\tau$ ). Como resposta a *MPA* fornece amperogramas distintos, cada qual correspondendo a um pulso aplicado, Fig. 3d. As variáveis a ser definidas no software são a sequência de pulsos de potencial (“wave form”) e o tempo de aplicação de cada pulso, mínimo de 30 milissegundos. Apesar do tempo de aplicação de pulso ser em geral muito pequena, a leitura da corrente é efetuada apenas nos últimos 5 milissegundos, também com o objetivo do decaimento da corrente capacitiva.

**Figura 3** - Degrau único de potencial aplicado na amperometria (a) e três degraus aplicados em sequência na MPA e respectivos sinais coletados por amperometria (c) ou MPA (d).



Ambas amperometrias são utilizadas em eletroanálise desde que seja selecionado um potencial suficiente para promover um processo faradáico, oxidação ou redução na superfície do *ET*. Na amperometria a corrente capacitiva é mínima, pois a dupla camada elétrica é constante no decorrer de toda a medida. Uma das grandes limitações da amperometria é a adsorção de impurezas, de espécies eletroativas ou produtos de reações redox na superfície do *ET*, causando o envenenamento gradativo do *ET* e proporcional diminuição dos sinais de corrente, o que compromete diretamente na reprodutibilidade dos sinais. Para contornar este problema, é proposto na literatura o uso da *MPA*, pois o envenenamento do *ET* pode ser eliminado ou minimizado pela aplicação de pulsos de limpeza ou de condicionamento alternados com o(s) pulso(s) de detecção [8]. Apesar desta e outras vantagens, a *MPA* é uma técnica ainda não muito popular entre os pesquisadores da eletroquímica e da eletroanalítica.

### 1.2.2. Eletrodo de Diamante Dopado com Boro

O diamante é uma forma alotrópica do carbono formado por ligações simples entre carbonos numa geometria tetraédrica (hibridização  $sp^3$ ), e apresenta propriedades como elevada condutividade térmica, dureza, inércia química e resistividade elétrica. Devido a esta última propriedade, para ser utilizado como eletrodo em medidas eletroquímicas a condutividade do diamante deve ser aumentada pela dopagem com outro átomo contendo número de elétrons na camada de valência distinto do carbono. Quando utiliza-se o boro, é obtido o diamante dopado com boro (*DDB*), um semi-condutor do tipo p.

O primeiro filme de *DDB* foi obtido em 1973 por Pofelr *et al.*[9], através da técnica de deposição química a partir de vapor (*CVD*, do inglês “chemical vapor deposition”), na qual são introduzidos em um reator moléculas gasosas contendo carbono (metano, acetona, etc.) e derivados do dopante boro, diborano, por exemplo. Atualmente a técnica de *CVD* ainda é muito utilizada para a síntese do *DDB*, sendo possível a obtenção de materiais com variadas condutividades, dependendo do nível de dopagem, comumente de 500 a 10.000 ppm.

Nos últimos anos, o eletrodo de filme de *DDB* vem recebido destaque na eletroquímica e eletroanalítica, devido a propriedades superiores em relação a outros eletrodos de carbono (grafite, carbono vítreo). Dentre outras, pode-se destacar [10]:

- Baixa corrente capacitiva (corrente de fundo);
- Ampla janela de potenciais em meio aquoso (Até 5 V);
- Rápida cinética de transferência de elétrons em vários sistemas redox;
- Fraca adsorção molecular de espécies na superfície do eletrodo (baixa passivação);
- Resistência à corrosão mesmo após a aplicação de potenciais extremos.

Para que estas propriedades possam ser perceptíveis, é necessário tomar alguns cuidados ao adaptar um eletrodo de *DDB* em uma célula eletroquímica, como: a) Manter um bom contato elétrico entre o substrato e o suporte de eletrodo; b) Vedar bem as bordas do eletrodo, de forma que somente o *DDB* fique em contato com a solução de medida. Caso contrário ocorrerá a infiltração da solução no suporte, piorando muito o contato elétrico entre o *DDB* e o suporte, pelo elevado aumento na resistência ôhmica.

Além das recomendações supracitadas, o desempenho do eletrodo de *DDB* é dependente das condições de pré-tratamento do eletrodo limpeza e/ou ativação. Na literatura são encontrados protocolos utilizando polimento mecânico, lavagem com isopropanol, tratamento térmico e polarização eletroquímica [10]. Nesta última, mais usada, em meio de solução de ácido sulfúrico o *DDB* pode ser submetido à polarização [11]:

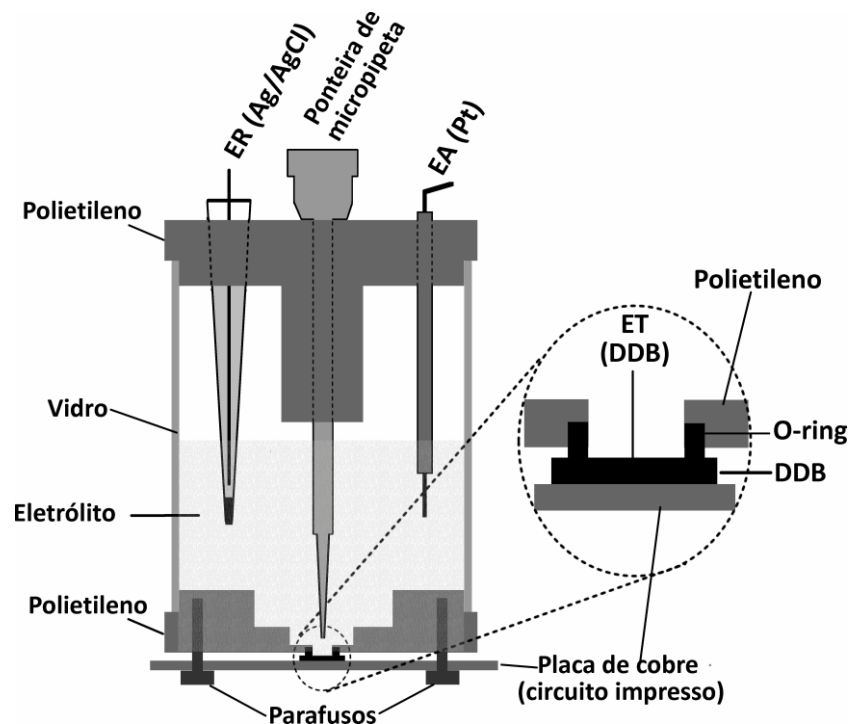
- Anódica, aplicando-se um potencial ou corrente positivo (a) suficiente para promover a oxidação da água (eletrólise) para a geração de gás oxigênio, o que conseqüentemente funcionaliza da superfície do *DDB* com grupos terminados em oxigênio; e/ou
- Catódica, aplicando-se um potencial ou corrente negativo (a) suficiente para ocorrer a redução da água (eletrólise) gerando gás hidrogênio, deixando a superfície do *DDB* funcionalizada com terminações de hidrogênio;

Vale ressaltar que não existe um protocolo de ativação universal apenas anódico ou catódico. Isto ocorre porque cada espécie apresenta melhor desempenho, reversibilidade, detectabilidade, estabilidade, etc. em uma determinada ativação. Para cada molécula a ser detectada, o estudo da ativação deve ser realizado empiricamente.

### 1.2.3. Análise por injeção em batelada (*BIA*) com detecção por *MPA*

*BIA* é uma técnica analítica proposta em 1991 por Wang e Taha [12], na qual a solução de análise é injetada sobre a superfície do *ET* que está previamente posicionado numa célula *BIA* contendo um volume de eletrólito suporte inerte. Na Fig. 4 é apresentado o esquema da célula de *BIA* semelhante à utilizada neste trabalho.

**Figura 4** - Esquema de uma célula de *BIA* semelhante à utilizada neste trabalho [13].

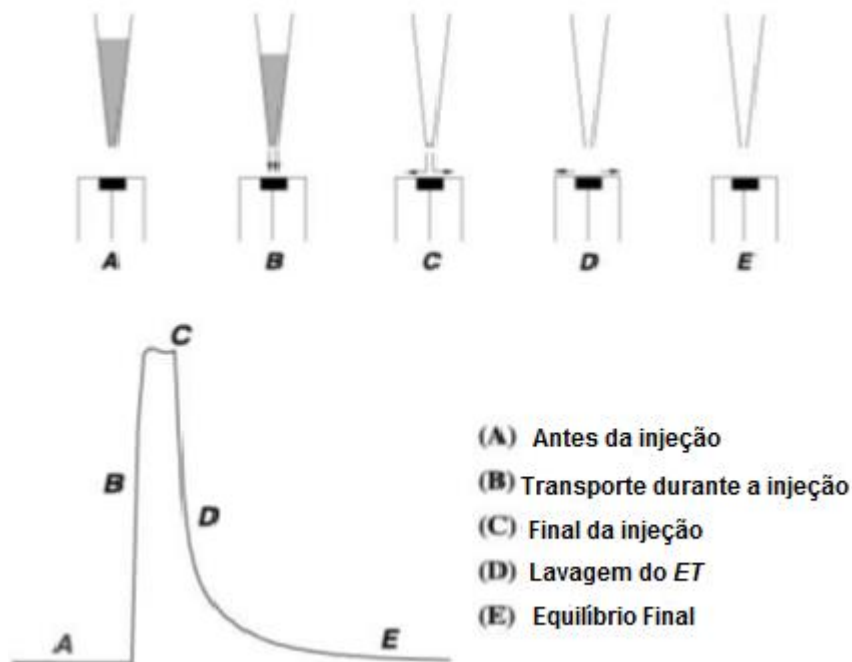


Nesta célula a superfície do *DDB* (*ET*) é inserida na posição oposta à da injeção, configuração “Wall Jet”, realizada de modo reprodutível com o auxílio de uma pipeta

eletrônica [14], pois permite o controle de volume e velocidade de injeção. A ponteira da pipeta é fixada em um orifício central localizado na tampa da célula, que permite o controle fixo da distância entre a ponta da ponteira e o *ET*, Fig. 4. Como o *DDB* é comercializado na forma de pedaços quadrados de substrato de silício (1 cm de lado), este é fixado pressionando-o o seu suporte, uma placa condutora de eletricidade, contra um anel de borracha “o-ring” localizado na parte inferior da célula *BIA*, Fig. 4, que minimiza a tensão aplicada no *ET*, delimita a área do *DDB* exposta à solução e evita vazamentos. Em outros dois orifícios localizados na tampa da célula são fixados o *ER* e *EA*. Por último é inserida a solução do eletrólito em volume suficiente para que os três eletrodos tenham contato elétrico, Fig. 4.

Em vários trabalhos o sistema *BIA* é utilizado com detecção amperométrica de potencial constante. Nestes casos, o sinal obtido é um pico transiente, na qual a altura ou área da corrente de pico é proporcional à concentração do analito. Este comportamento é ilustrado na Fig. 5, retirada de um artigo de revisão publicado por Quintino e Angnes [15].

**Figura 5** - Etapas operacionais de um sistema *BIA* com detecção amperométrica [15].



Conforme apresentado na Fig. 5, as seguintes etapas são observadas:

- (A) Antes da injeção: Corrente de fundo constante, devido apenas a capacitiva do eletrólito, ausência de transferência de elétrons na interface eletrodo/solução;
- (B) Transporte do analito durante a injeção: Aumento significativo da corrente faradáica, devido à reação redox do analito, oxidação ou redução, que é transportado mecanicamente pelo injetor até a superfície do *ET*;

(C) Final da injeção do analito: Obtenção de um máximo de corrente, patamar de corrente faradáica, valor que é constante durante um curto intervalo de tempo;

(D) Lavagem do *ET*: Diminuição acentuada da corrente devido ao fim da injeção mecânica da pipeta eletrônica. Este evento é promovido devido à mudança do transporte mecânico para o difusional, no qual o pacote de amostra é diluído no eletrólito ( $\approx 1000$  vezes).

(E) Equilíbrio final: Após a diluição completa do analito no eletrólito a concentração do analito é pequena e uniforme em toda a célula *BIA*, restabelecendo praticamente o mesmo equilíbrio existente antes da injeção da solução Etapa A. O alcance deste equilíbrio pode ser acelerado pela convecção criada por um agitador inserido na célula *BIA*.

O emprego de sistemas *BIA* com detecção voltamétrica também é relatado na literatura [16, 17]. Neste caso, enquanto o injetor realiza uma operação de injeção da solução analisada o software do potenciostato registra um voltamograma. As duas operações, injeção e detecção devem ser concomitantes, de maneira a garantir o registro completo de um voltamograma hidrodinâmico para cada injeção. De maneira geral, os perfis voltamétricos são semelhantes aos obtidos no modo estacionário. Em um trabalho pioneiro de *BIA* com detecção voltamétrica, Brett *et al.* [17] concluíram que:

- a) Parâmetros termodinâmicos e cinéticos da reação do eletrodo podem ser obtidos junto com a determinação da concentração;
- b) O sistema permite o registro de um voltamograma para cada injeção, o que dispensa a troca de eletrólito entre medidas de soluções distintas.

Neste caso a detecção por *VOQ* foi sugerida, pois mesmo injetando um baixo volume de solução  $\approx 100 \mu\text{L}$  é possível registrar rapidamente um voltamograma praticamente sem corrente capacitiva. Deste modo, a *VOQ* apresentou uma sensibilidade quatro vezes superior do que a amperometria para ferrocianeto.

O sistema *BIA* foi proposto com finalidades semelhantes à técnica de análise por injeção em fluxo (*FIA*) [18], ou seja, para o desenvolvimento de métodos analíticos rápidos, reprodutíveis, sensíveis, de menor custo e com mínima intervenção do operador, que são características essenciais para análises de rotina. Em um sistema *BIA* a solução de análise é inserida diretamente na célula por um injetor simples, micropipeta ou seringa, dispensando o uso de bombas peristálticas ou tubulações para a introdução das soluções na célula, tal como no sistema *FIA* [15]. Como o sistema *BIA* apresenta menos componentes, este é mais portátil e de fácil transporte para o uso fora do laboratório. Adicionalmente, o sistema *BIA* é mais robusto e gera menor quantidade de resíduos.

Na literatura são encontrados alguns trabalhos que utilizam o sistema *BIA* com detecção amperométrica como ferramenta para a análise quantitativa de fármacos em medicamentos [16, 19, 20]. O uso de análise por injeção em batelada com detecção por *BIA-MPA* é recente (ano de 2011 até o momento) [21-25]. Em todos estes trabalhos a *MPA*



mostrou ser vantajosa frente à amperometria, pois permite a aplicação de vários pulsos que podem ser utilizados para a quantificação simultânea de dois [21, 23] ou três compostos [22]e/ou para a constante limpeza da superfície do *ET* [24, 25]. Vale ressaltar que em quase todos estes trabalhos o *DDB* foi utilizado, devido à maior estabilidade superficial e menor corrente de fundo, o que permite alcançar maior reprodutibilidade e sensibilidade frente a outros eletrodos.

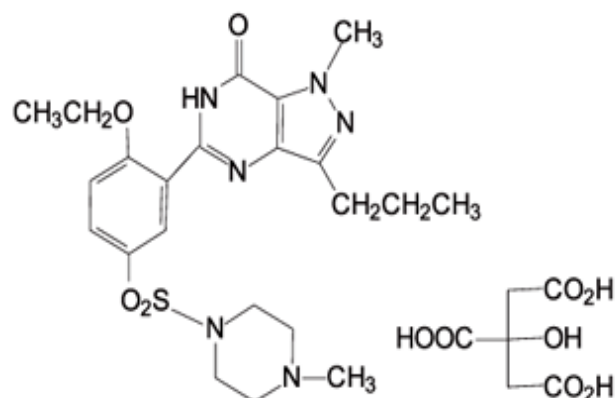
### 1.3. Revisão Bibliográfica

#### 1.3.1. Breve histórico de medicamentos para disfunção erétil masculina

O sildenafil, mais comumente utilizado na forma do seu sal citrato de sildenafil (CS), foi sintetizado por um grupo de farmacêuticos do laboratório Pfizer. Inicialmente foi estudado para combate à hipertensão e angina de peito [26]. No entanto, estudos clínicos demonstraram que o fármaco apresentava pouco efeito na angina de peito e induzia ereção peniana. O mecanismo fisiológico da ereção envolve a liberação de óxido nítrico (*NO*) nos corpos cavernosos durante o estímulo sexual. O sildenafil é um inibidor potente e seletivo da fosfodiesterase tipo 5 (*PDE5*) específica da guanosina monofosfato cíclica (*GMPc*), a enzima responsável pela degradação da *GMPc*. O sildenafil aumenta a *GMPc* nas células do músculo liso dos vasos pulmonares, resultando no seu relaxamento, o qual age restaurando a função erétil resultando em uma resposta natural à estimulação sexual [26].

Quanto às características físico-químicas, o CS apresenta-se como um pó cristalino branco, inodoro, muito solúvel em metanol, solúvel em água e pouco solúvel em etanol[27]. A estrutura química do CS é apresentada na Figura 6.

Figura 6 - Estrutura Química do Citrato de Sildenafil.



O CS é o princípio ativo do VI, primeiro medicamento oral para tratamento da disfunção erétil masculina, lançado em 1998. No entanto, em junho de 2010 a Pfizer teve a patente de fabricação do VI expirada no Brasil, permitindo que vários laboratórios farmacêuticos e farmácias magistrais, farmácias que manipulam medicamentos específicos para cada paciente, pudessem produzir e comercializar medicamentos genéricos, similares e manipulados no país.

Atualmente, outros dois medicamentos de referência também inibidores da PDE5 estão disponíveis no mercado, a tadalafila e a vardenafila. Na Tabela 1 são apresentadas algumas informações sobre os medicamentos inibidores da PHD5 comercializados nas drogarias brasileiras, de acordo com informações da bula dos respectivos laboratórios fabricantes [28]. A diferença básica entre estes três é a duração no efeito do tratamento. De acordo com o “IMS Health”, o VI detém 49% do mercado para tratamentos de disfunção sexual, seguido pelo Ciális, que detém 39,7% e o Levitra, com 8,6% [29].

**Tabela 1** - Dados sobre os medicamentos inibidores da PHD5 (VI, Ciális e Levitra).

| <b>Medicamento</b> | <b>Laboratório fabricante</b> | <b>Princípio ativo</b> | <b>Dosagens disponíveis</b> | <b>Duração do efeito no organismo</b> |
|--------------------|-------------------------------|------------------------|-----------------------------|---------------------------------------|
| Viagra             | Pfizer®                       | Sildenafil             | 25, 50 e 100 mg             | Até 5 horas.                          |
| Ciális             | Lilly Icos®                   | Tadalafila             | 10 e 20 mg                  | Até 36 horas.                         |
| Levitra            | Bayer®                        | Vardenafila            | 5, 10 e 20 mg               | Até 5 horas.                          |
| Cialis diário      | Lilly Icos®                   | Tadalafila             | 2,5 e 5 mg                  | Ação constante.                       |

Apesar da variedade de formulações para tratamento de disfunção erétil masculina encontrada atualmente, os custos de aquisição dos medicamentos pioneiros, Tabela 3, ainda são superiores. Mesmo com a introdução de genéricos do VI a partir de 2010, o consumo de falsificados ou contrabandeados ainda é relativamente alto, provavelmente devido aos custos ainda superiores em relação aos contrabandeados, Tabela 3. De acordo com Ames e Souza [1], os medicamentos Ciális e VI representaram 69 % do total de apreensões de medicamentos falsificados no Brasil em 2007, e 64 % em 2009 e 2010. Além disto, muitos destes medicamentos apresentavam princípio ativo diferente do declarado no rótulo e alguns não apresentaram nenhum princípio ativo [1].

### **1.3.2. Remédio falsificado e contrabandeado: Conceitos e histórico no Brasil**

Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) [30], medicamento constitui em um produto farmacêutico, obtido ou elaborado, com a finalidade profilática, curativa, paliativa ou para fins de diagnóstico. No Brasil, para que qualquer medicamento

referência, genérico ou similar, possa ser comercializado legalmente deve estar registrado na ANVISA, sendo que concessão vinculada a testes clínicos prévios, dentre outros [30].

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) [3], medicamentos falsificados ou contrafeitos são produtos rotulados de maneira fraudulenta quando à sua identidade e/ou origem. Os medicamentos falsificados incluem:

- a) Produtos que não contêm nenhum dos princípios ativos específicos especificados na bula;
- b) Produtos que contenham outros princípios ativos além dos contidos na bula;
- c) Produtos que possuem a origem dos princípios ativos diferente da declarada;
- d) Produtos que contenham o princípio ativo específico, mas em concentrações diferentes daquelas declaradas na bula;
- e) Produtos com quantidades de impurezas diferentes da declarada na bula.

Por sua vez um medicamento contrabandeado ou pirateado pode ser definido como oriundo de um processo de importação clandestina que, mesmo sendo objeto de registro em órgão público competente, é comercializado e/ou distribuído sem a prévia autorização pela agência reguladora, ANVISA, no Brasil.

O consumo de remédios falsificados, contrabandeados ou sem registro de órgãos reguladores vem crescendo no Brasil e no mundo, gerando para as redes criminosas lucros possivelmente até superiores aos obtidos no mercado das drogas [31]. A justificativa para este consumo ilegal é que os medicamentos contrafeitos ou contrabandeados são comercializados a preços baixos, não necessitam de receita médica e podem ser facilmente acessíveis em locais e websites clandestinos. O consumidor deve ter bastante cautela ao consumir tais medicamentos, pois informações relativas ao tipo ou dosagem do princípio ativo podem estar ausentes ou incorretas.

Segundo relatório divulgado pelo Centro de Medicamentos no Interesse Público, nos Estados Unidos, a venda de medicamentos falsos alcançaria US\$ 75 bilhões em 2010, aumento de 92% em relação a 2005 [32]. Estima-se que 10% dos remédios em circulação no mundo são falsos e pelo menos 30% concentram-se nos países pobres [32].

Os medicamentos falsificados figuram como um problema global de saúde pública, matando, incapacitando e ferindo a população. Este problema está enraizado tanto países desenvolvidos quanto em desenvolvimento, sendo maior em nações com menor regulamentação, desde a fabricação até a venda, com sanções penais fracas ou déficit na fiscalização [3].

Seguindo as recomendações internacionais e considerando a realidade do contexto nacional, diversas medidas para o enfrentamento do problema estão sendo adotadas pelo governo brasileiro. Dentre elas, ações conjuntas com as entidades policiais, aduaneiras que tem sido feitas, sob a coordenação e participação da ANVISA com apreensão por todo o

Brasil de medicamentos ilegais e falsificados [33]. Além disto, a ANVISA tem lançado cartilhas de conscientização através da campanha “Medicamento Verdadeiro” [33], para alertar a população sobre os riscos do consumo de medicamentos clandestinos, além de instruir o consumidor como diferenciar um remédio verdadeiro de um falso.

Outras estratégias adotadas por alguns laboratórios credenciados para reduzir o risco ao consumo de medicamentos falsificados é a compra de seus produtos pela internet com entrega a domicílio.

Em um panorama geral sobre o histórico de falsificações e/ou adulterações de medicamentos no Brasil, pode-se destacar o caso do anticoncepcional Microvlar®, laboratório Schering do Brasil Química e Farmacêutica que, em 1998, estava sendo comercializado sem substância ativa, comprimidos “de farinha”, ocasionando vários casos de gravidez indesejada [34].

Entre os anos de 1997 e 2000 foram também descobertos casos de placebo no fármaco Androcur, Schering do Brasil Química e Farmacêutica utilizado no tratamento do câncer de próstata, e no antibiótico Keflex® Eli Lilly do Brasil [34]. Em dados mais recentes apreensões da Polícia Federal Brasileira de 2007 a 2010, foi constatado que os medicamentos contrafeitos com maior número de apreensões foram aqueles destinado são tratamento da disfunção erétil masculina: Ciális e VI, em média 69% seguido pelos esteróides anabolizantes Durateston e Hemogenin, 26 % [35]. Em menor extensão foram os inibidores de apetite derivados da anfetamina e sibutramina e os abortivos (Cytotec) 49 % destes medicamentos eram fabricados pela indústria paraguaia [35].

### **1.3.3. Análises de medicamentos falsificados e contendo CS**

A verificação de um medicamento falsificado é baseada na comparação entre o produto verdadeiro e o suspeito em distintas características como:

- a) Exame organoléptico: Análise visual das embalagens primárias e secundárias, verificando a presença de selos de segurança holográficos, o layout de impressão de bulas; Análise visual da aparência física da fórmula farmacêutica (forma, cor, uniformidade) [3] e verificação da tinta reativa (revela um texto ao friccioná-lo contra um metal) [36]. Análise do odor, toque e som da embalagem e conteúdo [3];
- b) Análise interna: Verificação do(s) princípio(s) ativo(s) mencionado no rótulo, através da identificação e/ou quantificação no interior da forma farmacêutica. Para isto, é necessária a escolha de um método analítico adequado para cada caso.

Em muitos casos, somente um exame organoléptico prévio é suficiente para identificar uma falsificação. Caso este seja inconclusivo, a análise interna torna-se necessária. De acordo com relatório da *OMS* intitulado “Diretrizes para desenvolvimento de medidas de combate a medicamentos falsificados” [3], o controle de qualidade do medicamento suspeito deve ser realizado com uma grande quantidade de amostra para assegurar se houve ou não o cumprimento das boas práticas de fabricação (*BFP*).

Realizar as análises de todas as amostras com as técnicas instrumentais indicadas pelas farmacopéias é muito dispendioso. Para cumprir o requisito da frequência de análises aliada ao número de amostras e a contenção de gastos, o uso de testes simplificados é recomendado. Tais testes simplificados de primeira linha ou métodos de diagnóstico apenas identificariam os produtos que necessitassem de maiores investigações, pois estes fornecem somente uma estimativa da quantidade da substância ativa no medicamento, não necessariamente detectando ou quantificando outras substâncias presentes.

Devido a estas limitações, estes ensaios são insuficientes para substituir os métodos oficiais ou legalmente aceitos. Muitas vezes, os testes são baseados em reações colorimétricas em tubos de ensaio, determinação do ponto de fusão e/ou cromatografia de camada delgada (*CCD*). Testes de diagnóstico interessantes devem ser de baixo custo, sensíveis, específicos, portáteis e aplicáveis para um grande número de amostras. Na literatura está disponível uma lista com testes simples da *OMS* [37] que são a base para a preparação de vários kits utilizados em vários países.

Apesar da eficácia dos testes de diagnóstico em muitos casos, alguns podem ser inconclusivos em situações nas quais o produto falsificado contém o fármaco genuíno em quantidade distinta da declarada. Esta estratégia de incluir apenas uma mínima quantidade do fármaco genuíno na formulação dando um resultado positivo no teste diagnóstico é muito difundida entre os falsificadores, como tentativa de confundir o processo de detecção [3]. Nestes casos, é indicado o uso da *CCD* como técnica semi-quantitativa.

Quando há falsificações sofisticadas, ou seja, aquelas que copiam fielmente a aparência do medicamento original e/ou adulteram as formulações com fármacos análogos ao *CS*, são requeridas técnicas quantitativas avançadas como a *CLAE*, espectrometria de massa, ressonância magnética nuclear, espectrofotometria no infravermelho, etc. Devem ser considerados os custos de aquisição e manutenção dos equipamentos, bem como na capacitação de pessoal [3].

Especificamente em relação ao *CS*, não há registro de método oficial de diagnóstico ou para controle de qualidade de formulações contendo *CS* na Farmacopéia Brasileira, bem como em compêndios internacionais de mesma natureza. Em muitos casos é recomendado que a análise dos fármacos presentes em um medicamento seja realizada através de métodos analíticos baseados na *CLAE* com detecção óptica na região do ultravioleta

(UV). Na literatura são encontradas referências sobre o emprego de *CLAE* (ou *UCLAE*) acoplada a diferentes detectores para determinação simultânea de CS e outros inibidores da PHD5 na presença de vários adulterantes e produtos farmacêuticos [36, 38-41].

Métodos alternativos para a determinação de CS em formulações farmacêuticas por espectrofotometria [42-46], espectrofluorimetria [47], espectroscopia de ressonância magnética nuclear [48], eletroforese capilar [49] e eletroanalítica (potenciometria [50], VOQ [51-54], VPD [52, 55-57], MPA [58] ) são também reportados. Vale ressaltar que os trabalhos supracitados são dedicados para a análise quantitativa de CS em formulações com objetivo de controle de qualidade.

A Tabela 2 apresenta de maneira resumida alguns trabalhos da literatura que tem por finalidade a divulgação de métodos de diagnóstico (triagem) para formulações contendo CS, tendo como objetivo principal a classificação de grande quantidade acima de 80 medicamentos, como autênticos e apreendidos, falsificados e contrabandeados.

**Tabela 2** - Principais trabalhos sobre métodos de diagnóstico em inibidores da PDH5.

| Tipo de análise      | Técnica de detecção                   | Modo de classificação | Referências      |
|----------------------|---------------------------------------|-----------------------|------------------|
| Interna              | CLAE-UV <sup>a</sup>                  | Quimométrico          | [59, 60]         |
| Interna              | CLAE-UV / CLUE-MS <sup>b</sup>        | Quimométrico          | [61]             |
| Externa (Comprimido) | NIRS <sup>c</sup>                     | Quimométrico          | [62-64]          |
| Externa (Comprimido) | NIR-CI <sup>d</sup>                   | Quimométrico          | [65]             |
| Externa (Comprimido) | FTIR <sup>e</sup>                     | Quimométrico          | [63, 64, 66]     |
| Externa (Embalagem)  | FTIR <sup>e</sup>                     | Quimométrico          | [67]             |
| Externa (Comprimido) | Espectroscopia Raman                  | Quimométrico          | [63, 64, 68, 69] |
| Externa (Comprimido) | Visual                                | Quimométrico          | [70]             |
| Interna              | Fluorescência de Raio X               | Quimométrico          | [71]             |
| Externa (Comprimido) | Espectrofotometria (RGB) <sup>f</sup> | Não Quimométrico      | [72]             |
| Interna              | DSC <sup>g</sup>                      | Não Quimométrico      | [73]             |

<sup>a</sup> Cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por ultravioleta;

<sup>b</sup> Cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por espectrometria de massas;

<sup>c</sup> Espectroscopia no infra vermelho próximo;

<sup>d</sup> Espectroscopia de imagem química na região do infravermelho próximo;

<sup>e</sup> Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier;

<sup>f</sup> Padrão de cores vermelho, verde e azul;

<sup>g</sup> Calorimetria exploratória diferencial.

De maneira geral, na maioria destes trabalhos a resposta do instrumento cromatograma, espectro ou curva de Calorimetria Exploratória Diferencial (*DSC*) serve como uma “impressão digital” de cada amostra. Posteriormente, utilizando um método

quimiométrico adequado estes sinais são convertidos em novas variáveis e são classificados por similaridade ou diferença.

O uso de ferramentas quimiométricas de classificação é justificável devido à grande semelhança entre sinais de amostras com composição química muito próxima, como por exemplo, as formulações adulteradas com análogos do CS. Além disso, os métodos quimiométricos auxiliam na representação e interpretação dos resultados para um grande número de amostras.

O entendimento e uso das ferramentas quimiométricas não é tarefa fácil, devido à necessidade de longos períodos para capacitação de pessoal. Neste sentido, operações envolvendo o uso de espaços virtuais para tratamento conversão dos sinais em vetores e matrizes tal como o MATLAB Matrix Laboratory são comuns. Devido a isto, na prática muitas vezes os métodos quimiométricos não são adotados em análises de rotina.

Outra característica em comum na maioria destes trabalhos de triagem, Tabela 2 é o uso apenas de detecção espectroscópica. Apesar de algumas destas técnicas: NIR, FTIR, Raman, Espectrofotometria RGB, serem portáteis, análise em campo, e permitirem uma detecção direta no comprimido, análise externa, a complicada interpretação e tratamento dos sinais e o custo dos equipamentos pode também ser limitante para análises de rotina. O uso da detecção eletroquímica em métodos de diagnóstico é interessante, devido à rápida obtenção dos sinais e ao uso de dispositivos de baixo custo e portáteis, potenciostatos de bolso, notebooks, mini-eletrodos (eletrodos impresso por exemplo). Apesar disso, até o momento não foram publicadas metodologias de triagem com detecção eletroquímica na literatura para a discriminação de medicamentos falsificados.

## 2. OBJETIVOS

Neste trabalho objetivou-se o desenvolvimento de métodos de rápido diagnóstico para discriminação de formulações contendo o fármaco *CS:VI*, genéricos, contrabandeados e adulterados, empregando o sistema portátil *BIA* com detecção eletroquímica e eletrodo de *DDB*. Nesta perspectiva foram propostas duas técnicas eletroquímicas de detecção e distintas estratégias de classificação:

a) Voltametria associada aos algoritmos quimiométricos de *PCA* e *HCA*.

Nesta objetivou-se:

- a.1) Avaliar as velocidades de injeção da micropipeta automática e registro completo dos voltamogramas hidrodinâmicos;
- a.2) Avaliar os sinais obtidos para *CS* no eletrodo de *DDB* em distintas voltametrias (*VC*, *VL*, *VPD* e *VOQ*) para escolher a melhor técnica voltamétrica;
- a.3) Avaliar o pH que fornece a resposta mais sensível para detecção de *CS*;
- a.4) Registrar os voltamogramas das soluções de distintas formulações de *CS*;
- a.5) Tratar o voltamograma de cada amostra para posterior classificação em grupos pelos algoritmos quimiométricos de classificação (*PCA* e *HCA*).

b) Detecção *MPA* e classificação não quimiométrica.

Nesta objetivou-se:

- b.1) Avaliar o sinal eletroquímico do *CS* por *MPA* nas condições otimizadas em a.3.
- b.2) Escolher a sequência de pulsos aplicados no eletrodo de *DDB*;
- b.3) Registrar os amperogramas de múltiplos pulsos para a solução de cada formulação;
- b.4) Avaliar distintas estratégias de classificação não-quimiométrica:
  - b.4.1) Através das correntes de pico obtidas em cada pulso aplicado;
  - b.4.2) Realizando razões entre estas correntes de pico independentes.



### 3. EXPERIMENTAL

#### 3.1. Reagentes, soluções e amostras

Todas as soluções foram preparadas com água deionizada, resistividade  $\geq 18 \text{ M } \Omega \text{ cm}$  a  $25^\circ\text{C}$ , obtida do sistema de purificação Osmose Reversa OS10LXE, GEHAKA. Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico (PA).

As soluções de ácido sulfúrico foram preparadas pela diluição de volumes apropriados do ácido concentrado em água deionizada. A solução tampão Britton Robinson (TBR)  $0,04 \text{ mol L}^{-1}$  foi preparada pela mistura equimolar de ácido acético, ácido fosfórico e ácido bórico em balão volumétrico de 500 mL. Posteriormente, seis alíquotas destas soluções tiveram o pH ajustado para 2, 4, 6, 8 e 10 respectivamente adicionando-se solução de hidróxido de sódio  $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ , e pH 1 ajustado com ácido clorídrico  $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ .

As soluções estoque dos padrões de CS foram preparadas diariamente pela dissolução em ácido sulfúrico  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ . Posteriormente, as soluções foram diluídas no mesmo eletrólito suporte de medida, TBR ou ácido sulfúrico  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ .

A formulação farmacêutica autêntica (VI) e seis formulações genéricas ( $G_1 - G_6$ ) foram adquiridas em drogarias locais, Tabela 3. Outras duas contrabandeadas ( $C_1, C_2$ ) no Brasil também foram utilizadas. Quatro comprimidos de cada amostra foram pesados em balança analítica, macerados com auxílio de almofariz e pistilo de porcelana. Posteriormente estes foram armazenados e rotulados em frascos escuros distintos. Com a massa média de cada amostra e a dosagem rotulada de CS, calculou-se a porcentagem (m/m) de CS no comprimido. A dosagem de CS, os teores (% m/m), o custo e outros dados são mostrados na Tabela 3.

**Tabela 3** - Dados comerciais e da bula dos comprimidos de VI e genéricos.

| Amostra        | Empresa    | Lote                  | Custo <sup>1</sup> (R\$) | Dosagem (mg) | % (m/m) <sub>CS</sub> |
|----------------|------------|-----------------------|--------------------------|--------------|-----------------------|
| VI             | Pfizer     | 40483001 <sup>a</sup> | 16,22                    | 50           | 15,9                  |
| G <sub>1</sub> | Sandoz     | EK5235                | 8,43                     | 50           | 16,3                  |
| G <sub>2</sub> | Eurofarma  | 352957                | 5,27                     | 50           | 15,6                  |
| G <sub>3</sub> | EMS        | 595236                | 8,43                     | 50           | 13,9                  |
| G <sub>4</sub> | Althaia    | 14070018              | 4,90                     | 50           | 15,8                  |
| G <sub>5</sub> | NeoQuimica | 14070018              | 13,00                    | 50           | 16,0                  |
| G <sub>6</sub> | Medley     | 14030587              | 7,95                     | 50           | 16,2                  |
| C <sub>1</sub> | Novophar   | 142467                | 1,25                     | 50           | 39,2                  |
| C <sub>2</sub> | Medical    | 06063                 | 1,25                     | 50           | 38,3                  |

<sup>1</sup> Custo de um comprimido / Valores em 10/11/2014.

As amostras adulteradas foram preparadas em laboratório. Para isto, o Viagra finamente dividido (pó) foi misturado homogeneamente com o padrão analítico de outros fármacos: Paracetamol (*PA*), Dipirona (*DI*), Cafeína (*CA*) ou Tadalafila (*TA*). Detalhes sobre as massas de *VI* e de cada adulterante, bem como a proporção molar entre *CS* e adulterante, são apresentados na Tabela 4.

**Tabela 4** - Dados das preparações das amostras adulteradas.

| Amostra          | Massa <sub>VI</sub> (g) | Adulterante (Ad.) | Massa <sub>Ad.</sub> (g) | Proporção*(CS:Ad) |
|------------------|-------------------------|-------------------|--------------------------|-------------------|
| A <sub>PA</sub>  | 0,1007                  | Paracetamol       | 0,0037                   | 1:1               |
| A <sub>DI</sub>  | 0,1004                  | Dipirona          | 0,0087                   | 1:1               |
| A <sub>CA</sub>  | 0,1008                  | Cafeína           | 0,0045                   | 1:1               |
| A <sub>TA1</sub> | 0,1004                  | Tadalafila        | 0,0093                   | 1:1               |
| A <sub>TA2</sub> | 0,1052                  | Tadalafila        | 0,0168                   | 1:2               |

\* Proporção em mol.

Cada solução estoque, autêntico, genéricos, contrabandeados e adulterados, foi preparada pesando-se aproximadamente 0,0100g do pó da respectiva formulação em um balão volumétrico de 10,00 mL, que foi posteriormente completado com a solução do eletrólito (ácido sulfúrico ou *TBR*) e levado ao banho ultrassônico durante 30 minutos. Após a dissolução do sólido, a solução a ser injetada no sistema *BIA* (diluída) foi preparada transferindo-se uma alíquota de 7,31 mL da solução estoque para um balão de 25,00 mL, que foi completado com o respectivo eletrólito.

### 3.2. Instrumentação

Para medidas de *pH* das soluções foi utilizado um pHmetro modelo Microprocessor *pH/mV* meter 1pHB500. Para a obtenção das massas dos comprimidos foi utilizada uma balança analítica com quatro casas decimais (FA2104N, Bioprecisa Eletronic Balance). Para a dissolução das amostras foi utilizado um Banho ultrassônico Ultra Cleaner 800 Unique.

Todas as medidas eletroquímicas foram realizadas no potenciostato/galvanostato  $\mu$ -Autolab III (Metrohm®/Autolab) interfaceado a um computador. Nas medidas voltamétricas (*VL*, *VC*, *VPD* e *VOQ*) foi utilizado o software NOVA 1.1, mais recente do fabricante. Nas medidas por *MPA* foi utilizado o software GPES 4.9.007, pois esta técnica não é disponível no NOVA (por hora). Na ativação do eletrodo de *DDB* foi utilizada a crono-potenciometria com aplicação de corrente e o potenciostato PGSTAT204 (Metrohm®/Autolab).

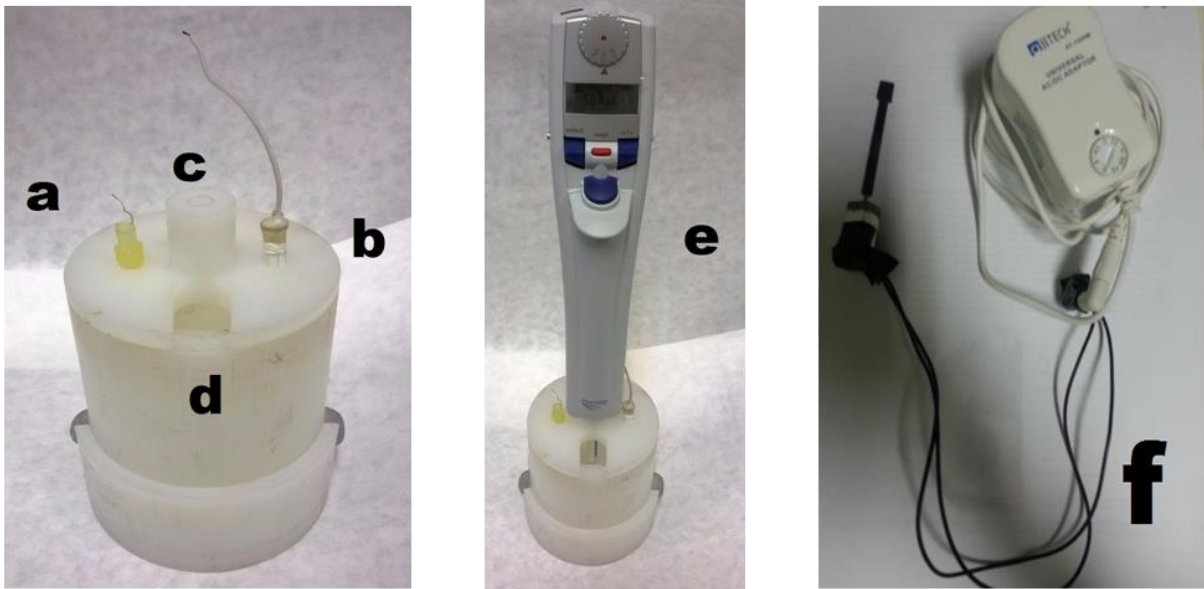
Nas medidas eletroquímicas foi utilizado um mini *ER* de Ag/AgCl/KCl<sub>3mol/L</sub> construído em laboratório [74], um *EA* de fio de Platina e um *ET* de filme de *DDB*. As placas de *DDB* (1

cm x 1 cm) foram adquiridas da empresa Adamant Technologies AS (La-Chaux-de-Fonds, Suíça). De acordo com o fabricante, este material apresenta uma base de silício cristalino com 1 mm de espessura e coberta com uma camada de *DDB* de 1,2  $\mu\text{m}$  de altura e com nível de dopagem com boro de 8000 ppm.

Antes das medidas eletroquímicas o *DDB* foi submetido a um condicionamento. Em meio de solução de ácido sulfúrico 0,5 mol L<sup>-1</sup> foi realizada uma limpeza da superfície aplicando-se uma corrente de + 0,1 A por 75 s no *DDB* e posteriormente foi feita uma ativação catódica aplicando-se -0,1 A durante 300 s. Deste modo a superfície do *DDB* permanece funcionalizada com grupos hidrogênio, conforme descrito na literatura [75]. Para aumentar a estabilidade da superfície, antes das medidas voltamétricas ou amperométricas foram efetuados 30 voltamogramas cíclicos entre + 0,2 V e + 2,2 V vs. Ag/AgCl/KCl<sub>3molL</sub><sup>-1</sup> em meio de ácido sulfúrico 0,1 mol L<sup>-1</sup>.

Todas as medidas eletroquímicas do trabalho foram realizadas na célula *BIA* no modo hidrodinâmico. A célula de *BIA*, construída em tornearia local, é mostrada na Fig. 7.

**Figura 7** - Imagem dos componentes da célula *BIA*: a) *ER*; b) *EA*; c) Orifício para encaixe da pipeta eletrônica; d) Abertura para a inserção de agitador; e) Pipeta eletrônica Multipette Stream; f) Agitador mecânico conectado à fonte universal.



A célula *BIA* possui um volume interno de aproximadamente 120 mL e foi toda confeccionada em polímero resistente a solvente orgânico, Fig. 7. Na tampa estão localizados quatro orifícios, sendo dois destes para fixar o *ER* e *EA*, Fig. 7a e 7b, respectivamente. O terceiro furo, Fig. 7c é localizado numa altura acima do restante da tampa e o seu diâmetro é o mesmo da ponteira de 1,0 mL da micropipeta eletrônica, Fig. 7e.

Esta configuração foi necessária para garantir que todas as injeções fossem realizadas na mesma posição vertical em relação ao *DDB* e que houvesse mínimo deslocamento horizontal. A base da célula contém um único orifício para fixar o *DDB*, que está alinhado verticalmente ao furo central superior, Fig. 7c. A área do eletrodo,  $59,14 \text{ mm}^2$ , foi delimitada por um anel de borracha “*o-ring*”. O contato elétrico da placa de *DDB* é efetuado pressionando o substrato, lado oposto ao lado contendo o filme de *DDB*, contra uma placa condutora de aço ou cobre. O quarto furo da tampa, de maior extensão, Fig. 7d, foi efetuado para inserir um agitador mecânico, Fig. 7f, na célula *BIA*.

Nas medidas por voltametria não é necessário o uso deste agitador durante as medidas. Porém, com a detecção por *MPA* o uso deste é essencial, pois a convecção criada pela agitação acelera a remoção da alíquota solução já detectada das proximidades do *ET*. Na ausência de agitação, os picos transientes demoram muito mais a voltar para linha de base, o que compromete muito a frequência analítica [76]. Outros detalhes da célula *BIA* descritos, mas não observados neste procedimento estão representados no esquema da Fig. 4. Esta célula *BIA* apresenta vantagens em relação a outras da literatura, como a realização de medidas em meios agressivos, solventes orgânicos ou em pHs extremos, e dispensa o uso de suporte, pois a base é facilmente fixada em qualquer bancada.

As injeções das soluções padrões e amostras na célula *BIA* foram realizadas empregando uma micropipeta eletrônica Eppendorf® Multipette Stream [77], Fig.7e. Esta pipeta oferece dez vazões distintas e volumes injetados de  $10 \mu\text{L}$  a  $1000 \mu\text{L}$  ( $\pm 1 \mu\text{L}$ ) na ponteira de  $1,0 \text{ mL}$ . O agitador mecânico foi construído em laboratório, adaptando uma hélice de teflon em um micromotor de corrente contínua (DC) em desuso. O motor foi eletricamente conectado a uma fonte universal AC / DC (AT-1300W, IITech) que permite escolher oito tensões de saída (3,0 V, 4,5 V, 5,0 V, 6,0 V, 7,5 V, 8,4 V, 9,0 V ou 12,0 V). Quanto maior a voltagem, mais intensa é a agitação da solução. O conjunto é mostrado na Fig. 7f.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 4.1. Detecção de CS por voltametria hidrodinâmica e classificação por métodos quimiométricos (PCA E HCA)

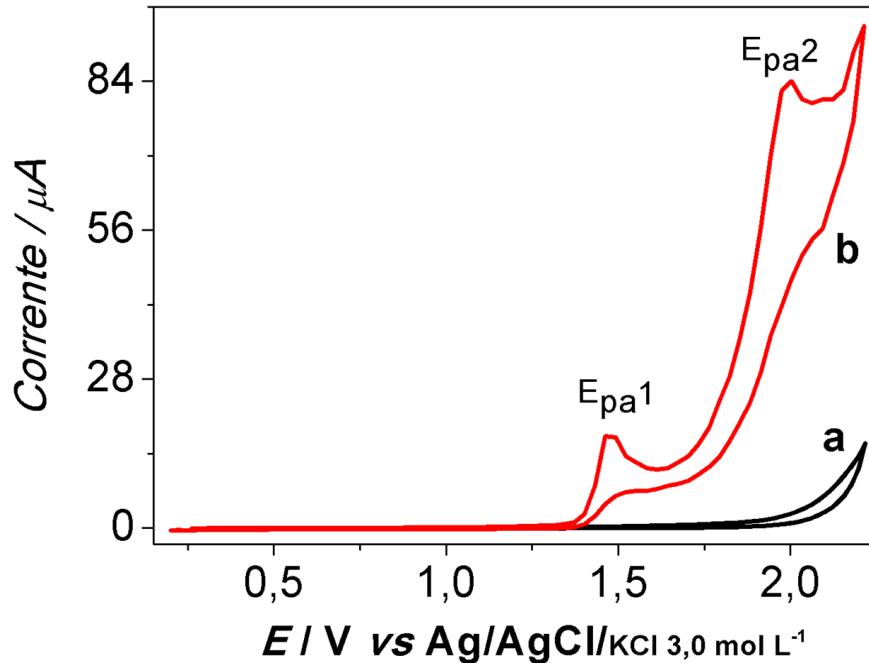
Nesta etapa as amostras de VI, genéricos, contrabandeados e adulterados foram detectadas por um método voltamétrico hidrodinâmico e posteriormente estes registros foram tratados pelos algoritmos quimiométricos da PCA e HCA. Primeiramente foi investigado o comportamento eletroquímico do CS em eletrodo de DDB pré-tratado catodicamente empregando VC e outras técnicas eletroquímicas de detecção VL, VPD, VOQ. Além disso, utilizando a melhor técnica voltamétrica, foi realizado um estudo do pH para verificar a melhor detectabilidade de CS em DDB. Neste texto, os estudos supracitados serão apresentados e discutidos nesta sequência.

#### 4.1.1. Desempenho eletroquímico de CS no DDB em condições hidrodinâmicas

Inicialmente foi avaliado o comportamento eletroquímico do CS em eletrodo de DDB pré-tratado catodicamente em meio de ácido sulfúrico 0,1 mol L<sup>-1</sup>. Conforme a Fig. 8, observam-se dois picos de oxidação, sendo  $E_{pa_1}$  em +1,4 V e o  $E_{pa_2}$  em +1,9 V. No sentido da varredura reversa, não foi encontrado nenhum pico, indicativo de um processo irreversível. Este resultado obtido para CS no DDB em meio de ácido sulfúrico 0,1 mol L<sup>-1</sup> corrobora com outros trabalhos da literatura [55, 58].

O mecanismo de oxidação de CS na superfície de eletrodos de carbono não é muito bem definido na literatura. No entanto, Oskan *et al.* [52] sugeriram que o primeiro processo anódico corresponde a oxidação da forma protonada do anel piperazínico da molécula de CS. O segundo processo anódico corresponde à adsorção-dessorção do produto gerado do primeiro processo na superfície do eletrodo de DDB, ou uma possível reação de hidroxilação do anel aromático no grupo p-alcoixibenzenosulfonamida presente na molécula de CS [52].

**Figura 8** - Voltamograma cíclico hidrodinâmico obtido na ausência (a) e na presença de CS  $75 \mu\text{mol L}^{-1}$  (b). Eletrólito Suporte:  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ; Volume injetado:  $1,0 \text{ mL}$ ; Velocidade de Injeção:  $24 \mu\text{L s}^{-1}$ ; Velocidade de varredura:  $100 \text{ mV s}^{-1}$ .



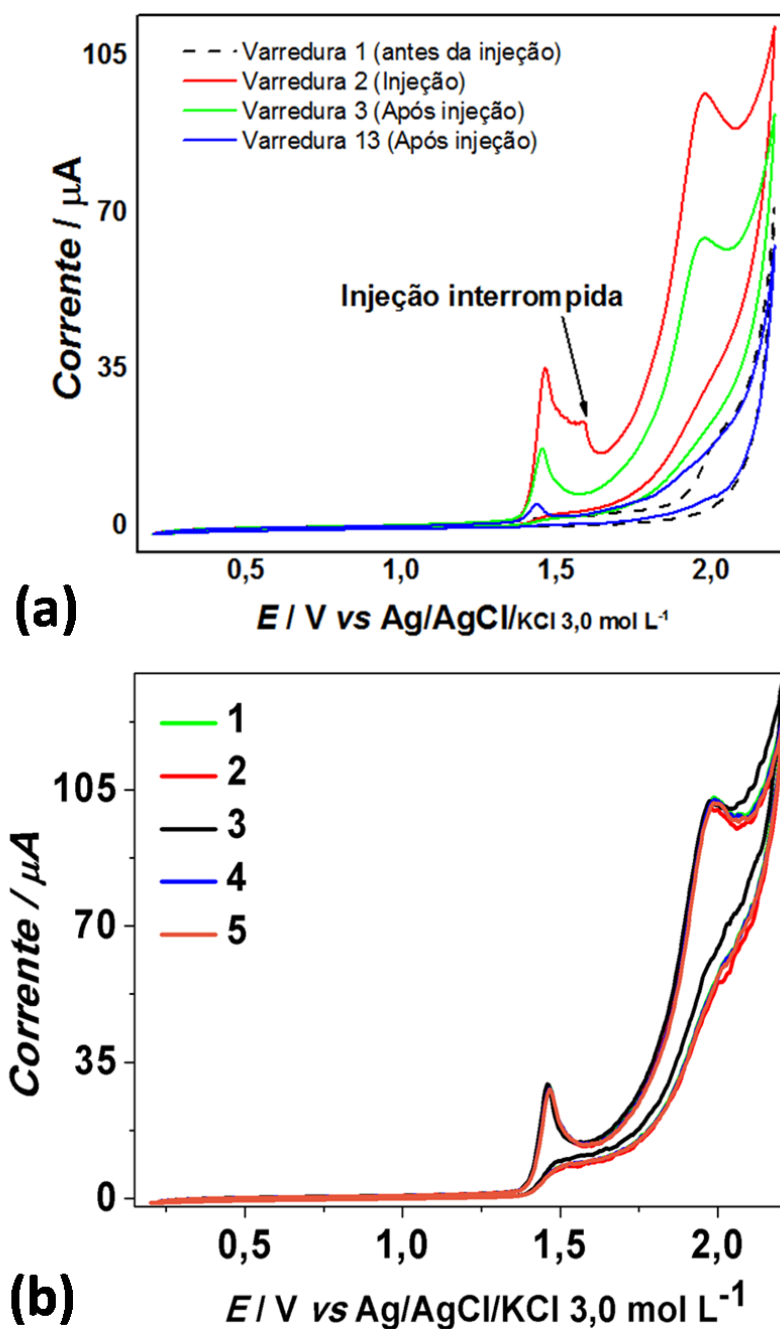
Os voltamogramas apresentados na Fig. 8 são hidrodinâmicos, ou seja, a injeção da solução é realizada enquanto o *DDB* é submetido à variação de potencial da respectiva técnica voltamétrica. Nesta dissertação todas as medidas foram realizadas neste modo hidrodinâmico, pois, como as dimensões da célula de *BIA* são relativamente altas (volume  $\approx 120 \text{ mL}$ ), as medidas estacionárias careceriam de um grande volume da solução padrão de CS e, portanto do dispendioso padrão de CS. O registro de um voltamograma deve ser feito concomitante à injeção mecânica da pipeta eletrônica [17].

Para ilustrar isto, na Fig. 9a é apresentado um voltamograma hidrodinâmico não ideal, no qual a injeção foi mais rápida do que o registro completo do voltamograma. Como visto na Tabela 5, a injeção de  $1,0 \text{ mL}$  na vazão de  $143 \mu\text{L s}^{-1}$  necessita de apenas 7 segundos. No entanto, o registro de um voltamograma cíclico no intervalo de potencial de  $+0,2 \text{ V}$  a  $+2,2 \text{ V}$  a  $200 \text{ mV s}^{-1}$  requer 20 segundos, Tabela 6.

Nestas condições, a injeção foi interrompida em  $E \approx 1,6 \text{ V}$ , um pouco a frente do primeiro pico anódico, Fig. 9a. Deste modo, até os 7 segundos iniciais prevalece o transporte de massa hidrodinâmico das moléculas de CS no sentido do *DDB*. Após os 7 segundos, as moléculas previamente injetadas de CS difundem espontaneamente para o seio da solução do eletrólito, devido à menor concentração neste meio. A difusão ocorre devido à grande diluição que o pacote de amostra é submetido na célula *BIA* (diluição ao redor de 100 vezes). Este efeito de diluição é visualizado empiricamente pelo decaimento

gradativo das correntes a cada varredura consecutiva, como apresentado na Fig. 9a (Varredura 2 após 7 s até a varredura 13).

**Figura 9** - Voltamogramas cíclicos para (a) injeção incompleta de solução de CS  $75 \mu\text{mol L}^{-1}$  e (Varredura 2) e posteriores à injeção (após 7s da varredura 2 até a 13) e (b) cinco injeções hidrodinâmicas completas e sequenciais (repetibilidade) (b). Eletrólito Suporte:  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ; Volume injetado:  $1,0 \text{ mL}$ ; Velocidade de Injeção:  $143 \mu\text{L s}^{-1}$  (em a) e  $48 \mu\text{L s}^{-1}$  (em b); Velocidade de varredura:  $200 \text{ mV s}^{-1}$ .



**Tabela 5** - Vazão e tempos de injeção obtidos com a micropipeta eletrônica.

|  |     |     |     |     |      |     |     |     |     |     |
|--|-----|-----|-----|-----|------|-----|-----|-----|-----|-----|
| Níveis de dispensa                             | 1   | 2   | 3   | 4   | 5    | 6   | 7   | 8   | 9   | 10  |
| Velocidade de injeção ( $\mu\text{L s}^{-1}$ ) | 24  | 36  | 48  | 67  | 87   | 100 | 143 | 182 | 222 | 303 |
| Volume injetado (mL)                           | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0  | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 |
| Tempo de injeção (s)                           | 42  | 28  | 21  | 15  | 11,5 | 10  | 7   | 5,5 | 4,5 | 3,3 |

**Tabela 6** - Velocidades de varredura em experimentos por voltametria cíclica\*.

|  |     |     |     |     |     |     |      |
|--|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|
| Velocidade de varredura ( $\text{mV s}^{-1}$ ) | 10  | 20  | 30  | 50  | 100 | 200 | 300  |
| Intervalo de uma varredura (V)*                | 4,0 | 4,0 | 4,0 | 4,0 | 4,0 | 4,0 | 4,0  |
| Tempo total de varredura (s)                   | 400 | 200 | 134 | 80  | 40  | 20  | 13,3 |

\*Varreduras entre 0,2 e 2,2 V (janela de 2,0 V), logo uma varredura cíclica apresenta um intervalo de 4,0 V.

O tempo ideal para realizar um voltamograma cíclico completo a  $200 \text{ mV s}^{-1}$  na faixa de trabalho escolhida 0,2 a 2,2 V é de 20 segundos. Injetando-se 1,0 mL a uma vazão de  $48 \mu\text{L s}^{-1}$  é possível realizar a varredura hidrodinâmica completa, pois nesta condição a injeção é realizada em 21 segundos injetando 1,0 mL de amostra.

É importante salientar que voltamogramas concomitantes com a injeção podem também ser obtidos em vazões inferiores a esta. Experimentalmente foi observado que estes voltamogramas eram mais ruidosos, resultados não apresentados. A vazão de  $48 \mu\text{L s}^{-1}$  e volume injetado de 1,0 mL foram utilizados nos experimentos voltamétricos subsequentes. Como apresentado na Fig. 9b, os voltamogramas nesta condição são reprodutíveis.

#### 4.1.2. Detectabilidade de CS em DDB em distintas técnicas voltamétricas

Com o objetivo de obter sinais com maior detectabilidade para CS e assim discriminar mais facilmente as formulações, medidas hidrodinâmicas foram realizadas empregando detecções voltamétricas lineares (VL e VC) e de pulso (VPD e VOQ). Nestas, foi injetado 1,0 mL de solução de CS  $75 \mu\text{mol L}^{-1}$  na célula BIA para cada técnica e condição de detecção, enquanto o potenciostato variava o potencial na faixa de trabalho útil do eletrodo de DDB em meio de ácido sulfúrico  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , +0,2 V a +2,2 V. Os intervalos dos parâmetros avaliados, bem como as melhores detectabilidades são apresentadas na Tabela 7.

Os voltamogramas obtidos nos parâmetros instrumentais otimizados de cada técnica, são apresentados na Fig. 10. Em todas as técnicas foram observados os dois picos de oxidação irreversíveis:  $E_{pa1} \approx +1,4 \text{ V}$  e  $E_{pa2} \approx +1,9 \text{ V}$ . No entanto, a VOQ forneceu as maiores correntes de pico,  $i_{pa1}$  e  $i_{pa2}$ , Fig. 10. Além disso, um voltamograma de onda quadrada completo foi realizado em apenas 11 s, sendo a varredura mais rápida dentre todas as



técnicas: VL: 12 s, VC: 40 s, VPD: 14 s. Estes resultados são condizentes com a teoria, que destaca esta capacidade única da VOQ de obter elevadas correntes faradáicas em experimentos executados sob velocidades bem superiores à outras técnicas eletroquímicas, alcançando até  $2000 \text{ mV s}^{-1}$  [7]. Esta vantagem exclusiva da VOQ foi explorada por Brett *et al.* para executar voltamogramas hidrodinâmicos injetando apenas  $100 \mu\text{L}$  de solução padrão [17]. Devido a estas vantagens a VOQ foi utilizada nos experimentos subsequentes.

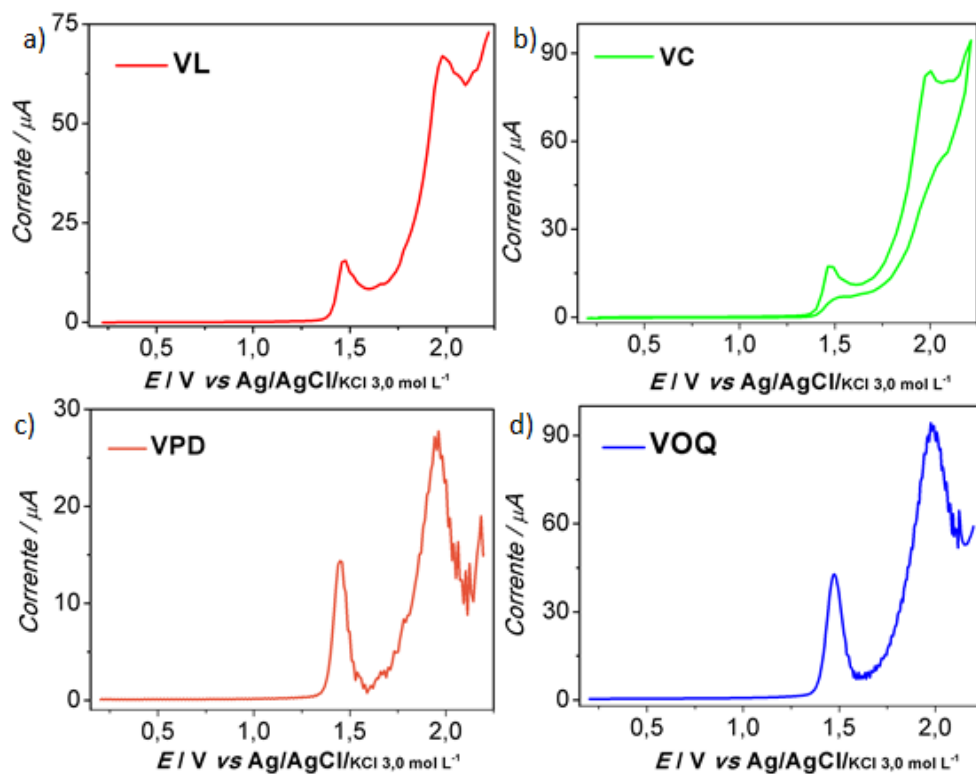
**Tabela 7** - Técnicas eletroquímicas e respectivos parâmetros instrumentais avaliados.

| Parâmetros Avaliados                           | VC (A/M)*            | VL (A/M)*             | VPD (A/M)*          | VOQ (A/M)*          |
|--|----------------------|-----------------------|---------------------|---------------------|
| Velocidade de varredura ( $\text{mV s}^{-1}$ ) | 10 -300 / <u>300</u> | 10 - 200 / <u>200</u> | 200                 | 900                 |
| Incremento de Potencial (mV)                   | 1 - 30 / <u>30</u>   | 1 - 20 / <u>20</u>    | 5 - 10 / <u>10</u>  | 5 - 50 / <u>5</u>   |
| Amplitude (mV)                                 | -                    | -                     | 25 - 50 / <u>25</u> | 5 - 100 / <u>30</u> |
| Frequência (Hz)                                | -                    | -                     | -                   | 5 - 30 / <u>30</u>  |

\* Intervalo avaliado (A) e melhor detectabilidade encontrada (M).

Condições de injeção: Vazão:  $48 \mu\text{L s}^{-1}$ ; Volume injetado: 1,0 mL.

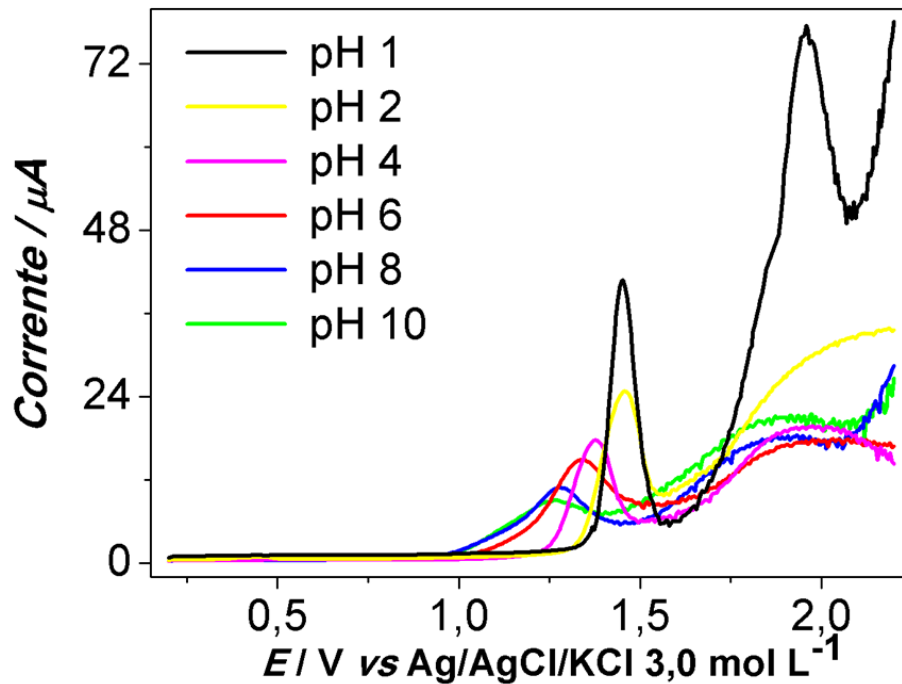
**Figura 10** - Voltamogramas hidrodinâmicos obtidos após injeções de solução de CS  $75 \mu\text{mol L}^{-1}$  e detecção por distintas técnicas voltamétricas (VC, VL, DPV e VOQ); Condições: Eletrólito:  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ; Vazão:  $48 \mu\text{L s}^{-1}$ ; Volume injetado: 1,0 mL.



#### 4.1.3. Comportamento eletroquímico de CS em distintos eletrólitos suportes

As medidas eletroquímicas iniciais para detecção de CS em *DDB* ocorreram em meio de ácido sulfúrico  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , tal como realizado em outros trabalhos [55, 58]. Para explorar esta detectabilidade em outros meios, os voltamogramas de onda quadrada hidrodinâmicos foram realizados em meios de soluções *TBR*  $0,04 \text{ mol L}^{-1}$  preparadas com distintos pHs: 1,0; 2,0; 4,0; 6,0; 8,0 e 10,0. Na Fig. 11 os VOQ nos distintos pHs são apresentados e a Tabela 8 detalha os potenciais e correntes obtidos.

**Figura 11** - VOQ hidrodinâmicos nas condições otimizadas\* para injeções de CS  $75 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$  em *TBR* em distintos pHs (1, 2, 4, 6, 8 e 10). \* Vazão:  $48 \text{ } \mu\text{L s}^{-1}$ , Volume injetado: 1,0 mL. Frequência: 30 Hz, Amplitude: 30 mV, Incremento de potencial: 5 mV.



**Tabela 8** - Potenciais e correntes de pico obtidos dos voltamogramas da Fig. 11.

| pH | Ep <sub>1</sub> | Ep <sub>2</sub> | ipa <sub>1</sub> (µA) | ipa <sub>2</sub> (µA) |
|----|-----------------|-----------------|-----------------------|-----------------------|
| 1  | 1,46            | 1,96            | 36,5                  | 39,0                  |
| 2  | 1,45            | -               | 18,5                  | -                     |
| 4  | 1,40            | -               | 12,9                  | -                     |
| 6  | 1,33            | -               | 9,0                   | -                     |
| 8  | 1,28            | -               | 5,9                   | -                     |
| 10 | 1,24            | -               | 3,9                   | -                     |

Em pH 1 o CS exibe dois picos anódicos  $i_{pa_1}$  e  $i_{pa_2}$  bem intensos. Em pHs superiores a 2 o CS apresenta apenas o primeiro pico, sendo que estas correntes de pico  $i_{pa_1}$  diminuem gradativamente com o incremento de pH. Provavelmente, em pHs superiores a 2 o segundo pico anódico, em 1,9 V não apareceu pois este processo depende da primeira oxidação em 1,4 V [52].

Quanto menos intensas forem as correntes do primeiro pico, menores ainda serão as intensidades do segundo pico. Incrementos de pH causaram um deslocamento dos potenciais de pico no sentido catódico. Devido à presença de dois picos anódicos característicos de CS bem definidos em TBR (pH 1), esta concentração hidrogeniônica apresentou melhor resposta no eletrodo de DDB. Em virtude à facilidade de preparo da solução de ácido sulfúrico 0,1 mol L<sup>-1</sup> em relação à de TBR pH 1, bem como as idênticas respostas voltamétricas apresentadas nos dois meios, não apresentadas, a solução de ácido sulfúrico 0,1 mol L<sup>-1</sup> foi utilizada como eletrólito suporte nos estudos posteriores.

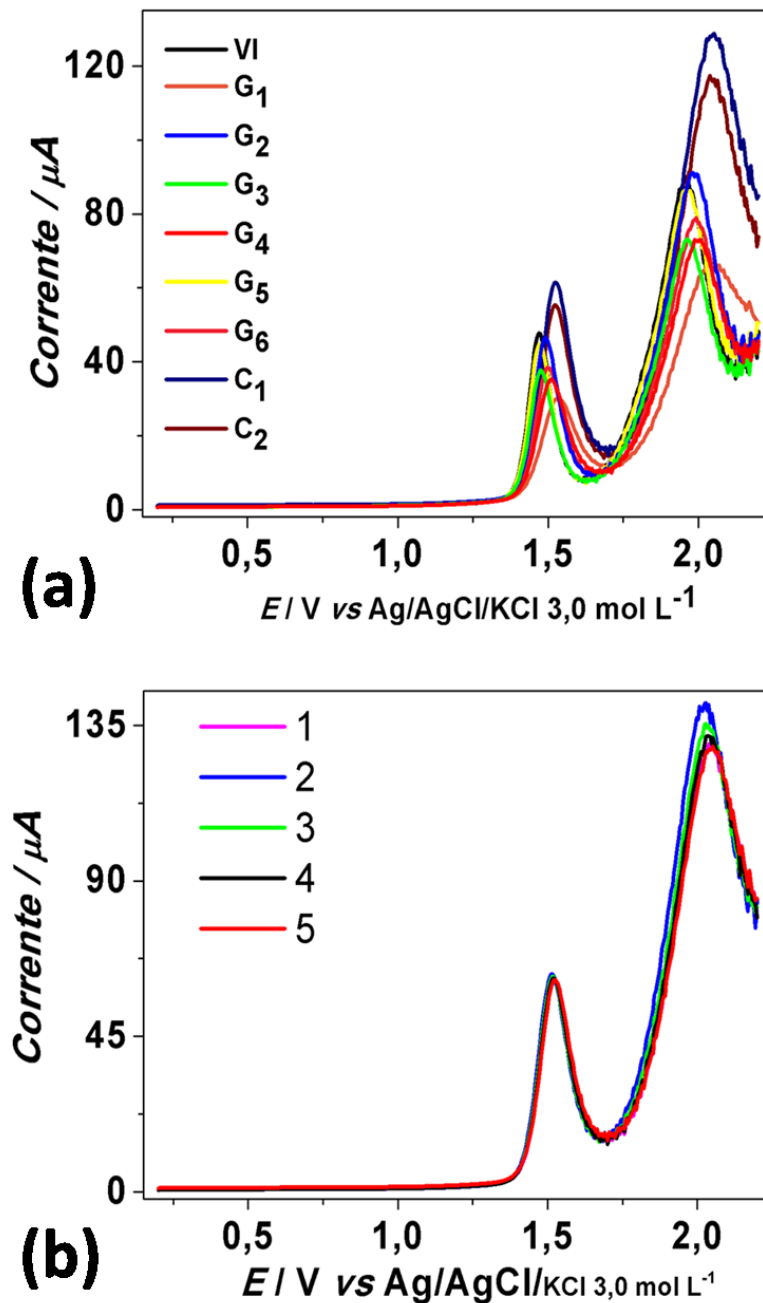
#### 4.1.4. Medidas eletroquímicas das soluções dos medicamentos por VOQ

Na Fig. 12a são apresentados os voltamogramas de onda quadrada hidrodinâmicos após uma injeção individual de solução de VI, de cada formulação genérica ( $G_1 - G_6$ ) ou de cada formulações contrabandeada ( $C_1 - C_2$ ). É possível observar um perfil voltamétrico semelhante em todas as amostras ( $E_{p1} \approx +1,4$  V e  $E_{p2} \approx +1,9$  V), o que indica a presença apenas de CS tal como especificado nos rótulos. As duas correntes de pico anódicas  $i_{pa_1}$  e  $i_{pa_2}$  nas duas amostras contrabandeadas foram mais intensas em relação às demais. Este comportamento sugere um maior teor de CS nestes comprimidos, visto que todas as amostras foram submetidas à mesma diluição.

Na Fig. 12a é apresentado apenas um voltamograma de cada amostra. Para garantir uma reprodutibilidade das medidas e conseqüentemente confiabilidade nas classificações, neste trabalho foram realizadas cinco varreduras de cada solução amostra. Para exemplificar, na Fig. 12b são apresentados os VOQ para cinco injeções distintas da solução de  $C_2$ . O primeiro pico anódico  $i_{pa_1}$  foi bem reprodutível e o segundo pico anódico  $i_{pa_2}$  apresentou um pequeno decaimento para injeções sucessivas, provavelmente devido a uma pequena adsorção do produto gerado no primeiro processo. A menor variação em  $i_{pa_2}$  observada foi na formulação genérica  $G_6$  ( $DPR = 1,6\%$ ;  $n = 5$ ) e a maior variação para a amostra contrabandeada  $C_1$  ( $DPR = 3,6\%$ ;  $n = 5$ ). Vale ressaltar que esta pequena variação foi observada mantendo o mesmo eletrólito em todas as medidas, que foram realizadas em seqüência com intervalos de 5 minutos entre cada injeção.

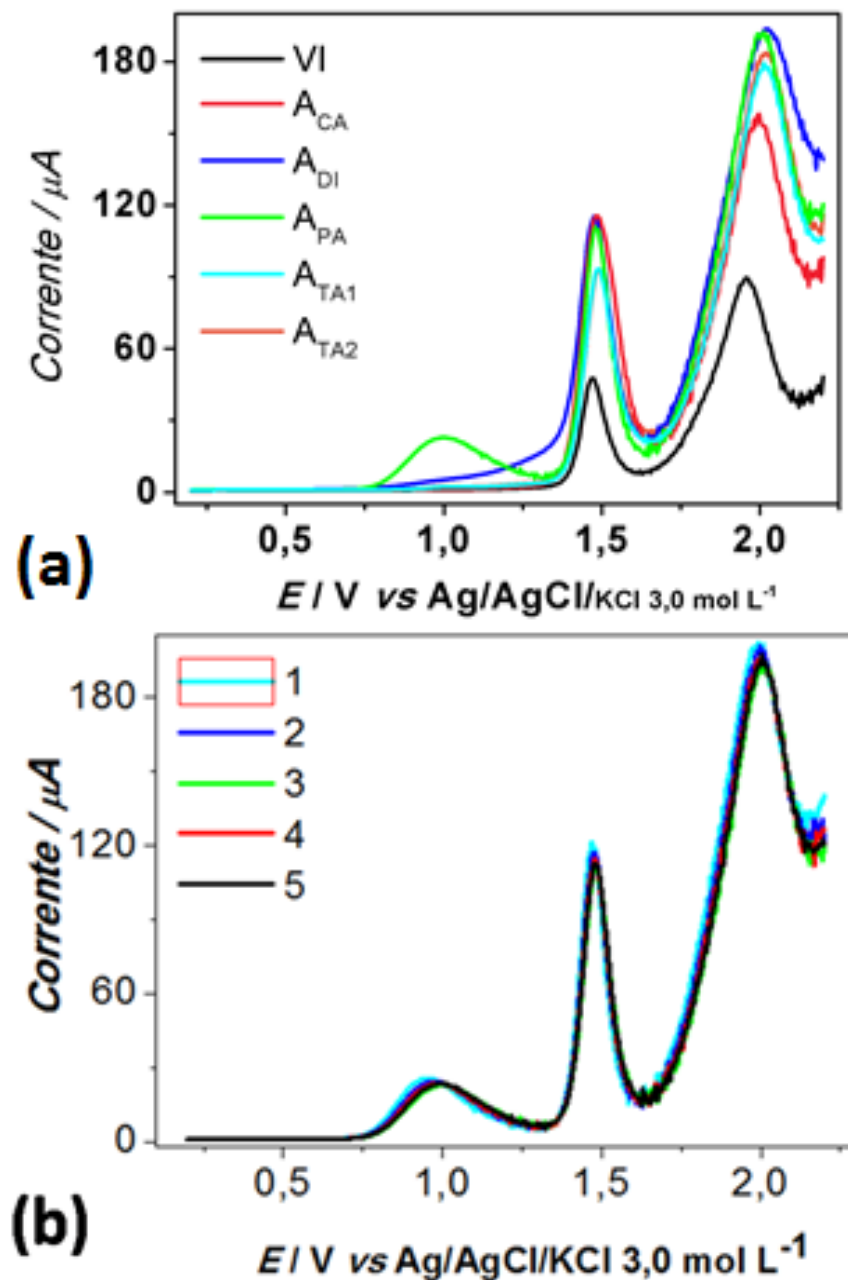
Nas medidas iniciais as soluções eram injetadas em sequência sem períodos de repouso, o que melhoraria a frequência analítica do sistema. No entanto, neste caso a reprodutibilidade não foi satisfatória. Outra estratégia mais trabalhosa, ativando o eletrodo entre medidas, também foi realizada sem sucesso, pois os voltamogramas apresentaram pior reprodutibilidade nas correntes de pico ( $DPR = 8,5\%$ ;  $n = 5$ ) e deslocamentos dos potenciais de pico.

**Figura 12** - Voltamogramas hidrodinâmicos de onda quadrada para (a) uma injeção de cada solução de formulação comercial (VI e G) e contrabandeada (C) e (b) para cinco injeções sequenciais da solução de  $C_2$ . Condições voltamétricas e de injeção iguais à Fig. 11.



Na Fig. 13a são apresentados os VOQ hidrodinâmicos obtidos após uma injeção individual de solução de VI, ou da solução preparada a partir de VI adulterado com Dipirona ( $A_{DI}$ ), Paracetamol ( $A_{PA}$ ), Cafeína ( $A_{CA}$ ) ou Tadalafila ( $A_{TA1}$  e  $A_{TA2}$ ). As quantidades destes adulterantes em relação ao VI foram detalhadas na Tabela 4 (seção 3.1). A Fig. 13b ilustra os VOQ hidrodinâmicos de cinco injeções da solução da formulação adulterada  $A_P$ .

**Figura 13** -VOQ hidrodinâmicos uma injeção de cada solução de (a) VI e VI adulterados ( $A_{PA}$ ,  $A_{DI}$ ,  $A_{CA}$ ,  $A_{TA1}$  ou  $A_{TA2}$ ) e (b) cinco injeções em seqüência de uma solução de  $A_P$ . Condições voltamétricas e de injeção iguais à Fig. 11;  $[CS]_{amostras} = 0,31 \text{ g L}^{-1}$ .



Como ilustrado na Fig. 13a, a solução de *VI* apresenta menores correntes de pico do que as formulações adulteradas. Este comportamento ocorre devido à oxidação aditiva do *CS* e dos adulterantes na superfície do *DDB* em potenciais acima de +1,3 V.

Conforme reportado [21], os fármacos dipirona, paracetamol e cafeína em meio ácido são oxidados na superfície do *DDB* em potenciais acima de +0,9 V, +0,8 V e +1,4 V, respectivamente. Estes intervalos de oxidação relatados correspondem com os obtidos na Fig. 13a. Na Fig. 13b é possível notar a boa precisão das injeções da formulação  $A_{PA}$  ( $DPR = 0,72\%$ ,  $n = 5$ ). Este comportamento também foi observado também nas outras formulações adulteradas, sendo o maior desvio calculado para a amostra combinada com dipirona ( $DPR \approx 3,7\%$ ;  $n = 5$ ).

#### 4.1.5. Classificação das formulações por métodos quimiométricos (*PCA* e *HCA*)

As ferramentas quimiométricas de classificação ou reconhecimento de padrões têm sido cada vez mais exploradas em diversos ramos da Química Analítica. O algoritmo da *PCA* tem como objetivo reduzir a dimensionalidade diante do conjunto de informações originais, como meio para preservar a maior quantidade de informação (variância) que se possa obter.

A redução deve ser obtida pelo estabelecimento de novas variáveis que sejam ortogonais entre si, e que recebem a denominação de componentes principais (*PC's*). Quando essas são organizadas em ordem decrescente de importância, as *PC's* são combinações lineares das variáveis originais [78]. Uma grande vantagem do método da *PCA* e de outros métodos não supervisionados, como a *HCA*, é a possibilidade de classificar as amostras sem a necessidade de conhecer informações com relação à identidade da amostra [78]. Além disso, a interpretação do comportamento das amostras é facilmente realizada, pois a representação de cada amostra é feita pontualmente em gráficos bi ou tridimensionais. Neste trabalho os algoritmos da *PCA* e *HCA* foram usados para simplificar a interpretação do grande número de sinais e, assim, discriminar facilmente as formulações.

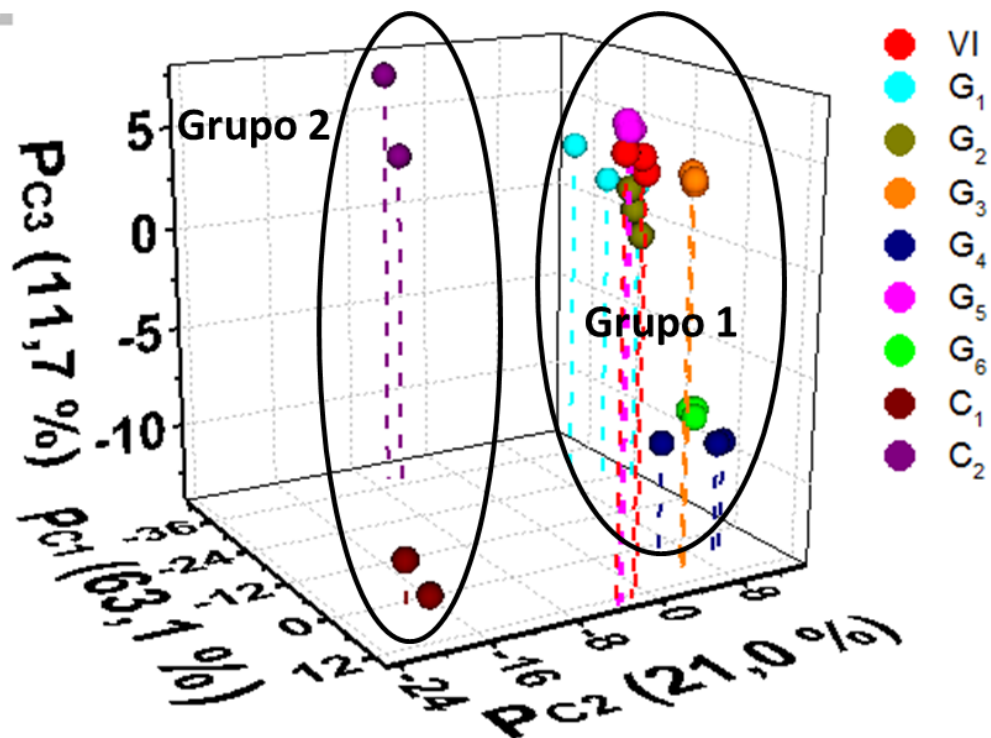
No caso de um sinal voltamétrico, cada ponto potencial/corrente é uma variável original. Devido aos inúmeros pontos que constituem um voltamograma, este sinal carrega uma grande quantidade de informação a respeito de cada amostra, o que serve como uma "impressão digital". Representar cada amostra por meio de voltamograma não é simples. Por isso os *PC's* tem a função de diminuir o número de variáveis, porém carregando as informações mais relevantes para fins de discriminação.

Basicamente, um software quimiométrico converte o conjunto de várias variáveis originais em um conjunto reduzido de novas variáveis, os *PC's*. Posteriormente, os *PC's*

gerados que possuem maior informação são projetados em um sistema cartesiano, sendo cada eixo um  $PC$ . Em alguns casos representar as amostras em um gráfico 2D (ex:  $PC_1$  x  $PC_2$ ) é suficiente para discriminá-las, e em outros um gráfico 3D (ex:  $PC_1$  x  $PC_2$  x  $PC_3$ ).

A Fig. 14 apresenta em um gráfico 3D dos três  $PC$ 's, ( $PC_1$ ,  $PC_2$  e  $PC_3$ ), gerados a partir de três voltamogramas de cada formulação de  $VI$ , genéricos e contrabandeados, Fig. 12a. Conforme representado, é possível classificar os medicamentos em dois grupos:  $VI$  e seis genéricos no Grupo 1 e dois contrabandeados no Grupo 2. Devido à semelhança entre os  $PC$ 's da maioria das amostras do Grupo 1 ( $VI$ ,  $G_1$ ,  $G_2$ ,  $G_3$  e  $G_5$ ), não foi possível discriminar estas amostras. Este comportamento pode se explicado por semelhança química entre o  $VI$  e os genéricos, exceto  $G_4$  e  $G_6$ . As amostras contrabandeadas (Grupo 2) são facilmente discriminadas das demais, porém é também possível discriminar as duas amostras deste grupo. Os três  $PC$ 's oriundos das replicatas de cada amostra foram próximos. Este resultado foi possível devido à reprodutibilidade dos voltamogramas.

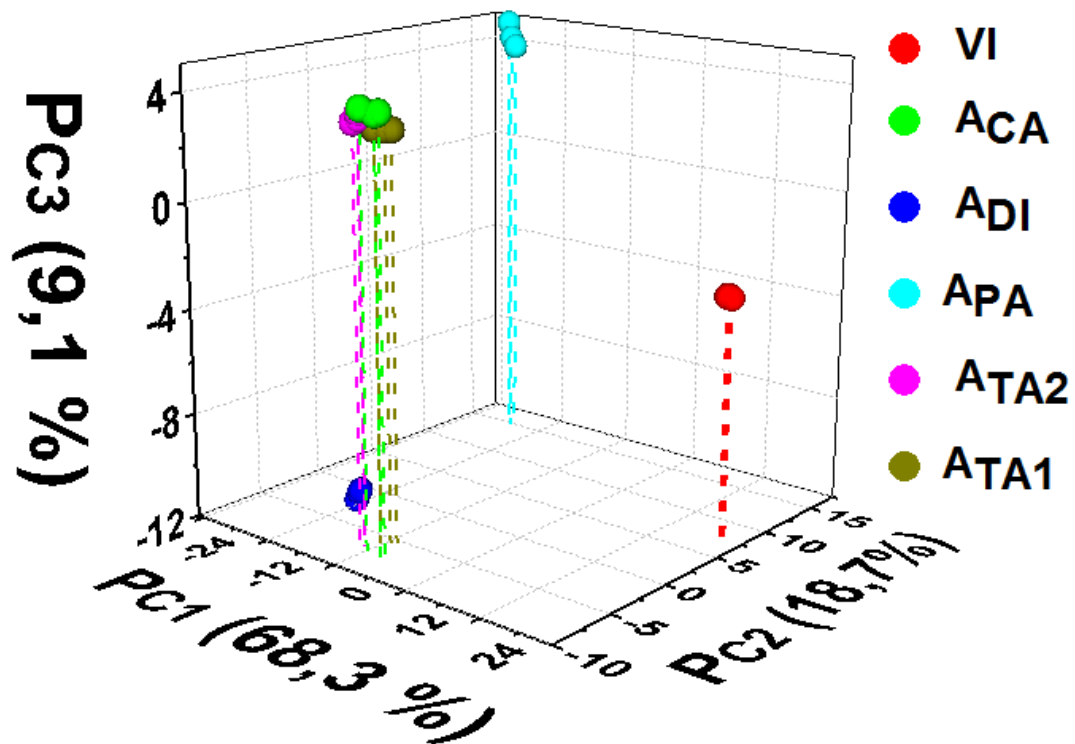
**Figura 14** -Gráfico de escores da  $PC_1$  x  $PC_2$  x  $PC_3$  referente às sete amostras comerciais  $VI$  e genéricos ( $G_1 - G_6$ ), e a duas amostras contrabandeados ( $C_1$  e  $C_2$ ).



Na Fig. 15 é apresentado o gráfico contendo as novas variáveis  $PC_1$ ,  $PC_2$  e  $PC_3$ , geradas a partir dos voltamogramas da solução de  $VI$  e adulterados  $A_{PA}$ ,  $A_{DI}$ ,  $A_{CA}$ ,  $A_{TA1}$  ou  $A_{TA2}$ , Fig. 13. Observando os  $PC$ 's característicos, é possível classificar as amostras no

grupo 1 com a formulação original VI e Grupo 2 com as cinco formulações adulteradas. Adicionalmente, as triplicatas de cada amostra ficaram próximas, devido à reprodutibilidade dos voltamogramas. As seguintes observações foram possíveis: (a) Discriminar entre si medicamentos com adulterantes diferentes; (b) Discriminar medicamentos com o mesmo adulterante, porém em concentrações distintas, exemplificado pelo adulterante Tadalafila, adicionado em proporções distintas no VI:  $A_{TA1}$  e  $A_{TA2}$ . Estas discriminações foram possíveis devido ao comportamento distinto de cada amostra no eletrodo de DDB, seja pela presença de picos em potenciais não característicos ao CS como pelo aumento da intensidade de corrente em potenciais comuns à oxidação de CS ( $E > +1,4$  V).

**Figura 15** -Gráfico de escores da  $PC_1$  x  $PC_2$  x  $PC_3$  referente a amostra de VI e cinco amostras adulteradas ( $A_{PA}$ ,  $A_{DI}$ ,  $A_{CA}$ ,  $A_{TA1}$  ou  $A_{TA2}$ ).



As classificações das formulações também foram realizadas através da técnica quimiométrica da HCA. De modo distinto da PCA, a HCA busca agrupar as amostras em classes baseando-se na similaridade ou dissimilaridade entre as amostras. O critério de agrupamento é baseado nas características peculiares de cada membro, sendo aqui o conjunto de sinais que compõem um voltamograma.

O agrupamento pode ser realizado a partir da matriz de dissemelhança, gerada a partir da matriz de dados, pontos potencial x corrente, neste caso. Os valores que compõem a matriz de dissemelhança são as distâncias entre os vizinhos mais próximos, mais distantes

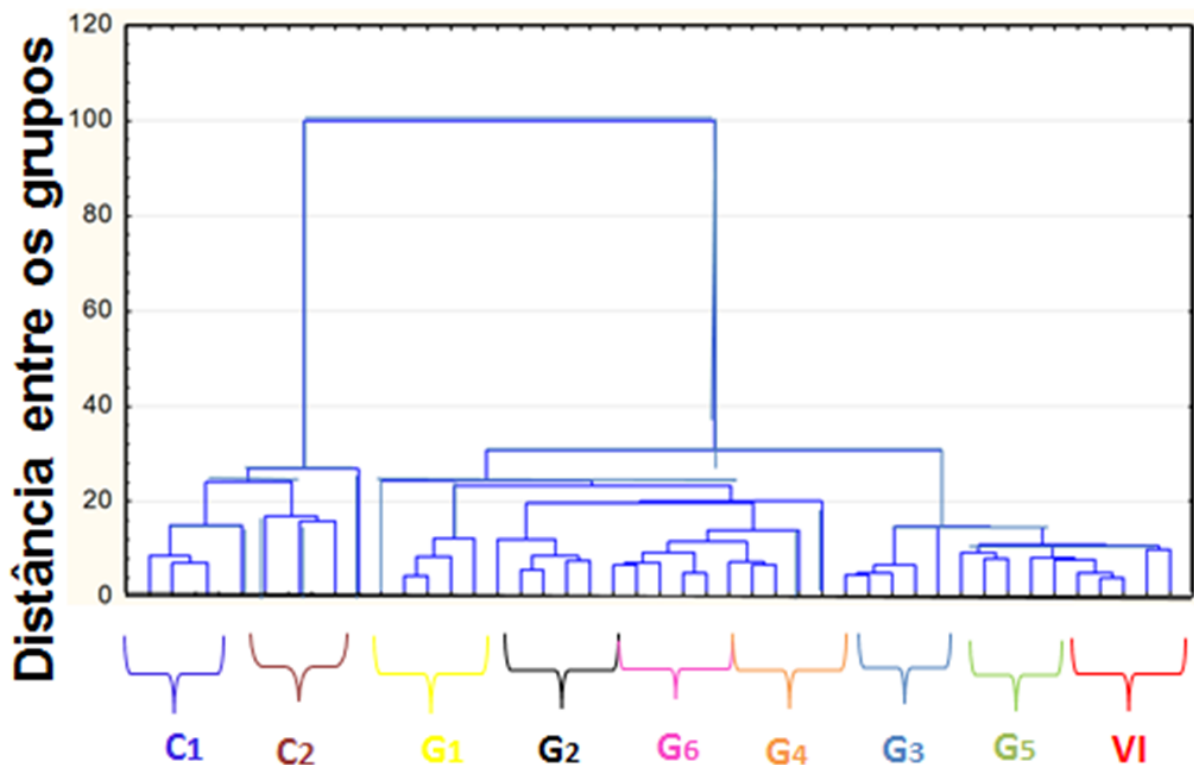


ou média, comparando os pontos da matriz de dados. Posteriormente estas distâncias são agrupadas de modo hierárquico, da mais distante ou diferente até a mais próxima, semelhante.

A representação dos agrupamentos gerados é visualizada mais facilmente pelo dendograma, um gráfico bidimensional que não depende do número de variáveis do conjunto de dados [78]. Este gráfico é também conhecido como agrupamento em árvore, devido à analogia do seu perfil com uma árvore contendo raiz e folhas. Na raiz, parte mais acima no gráfico, estão as amostras mais distintas e nas folhas (parte mais abaixo) estão as amostras mais próximas.

Na Fig. 16 é apresentado o dendograma gerado para as amostras das sete formulações comerciais *VI* e genéricas ( $G_1$  - $G_6$ ) e das duas formulações contrabandeadas, e na Fig. 17 é mostrado o dendograma obtido para as formulações de *VI* e as adulteradas.

**Figura 16** - Dendograma obtido pela *HCA* para as formulações comerciais de *VI* e genéricas ( $G_1$  - $G_6$ ) e duas formulações contrabandeadas ( $C_1$  e  $C_2$ ).

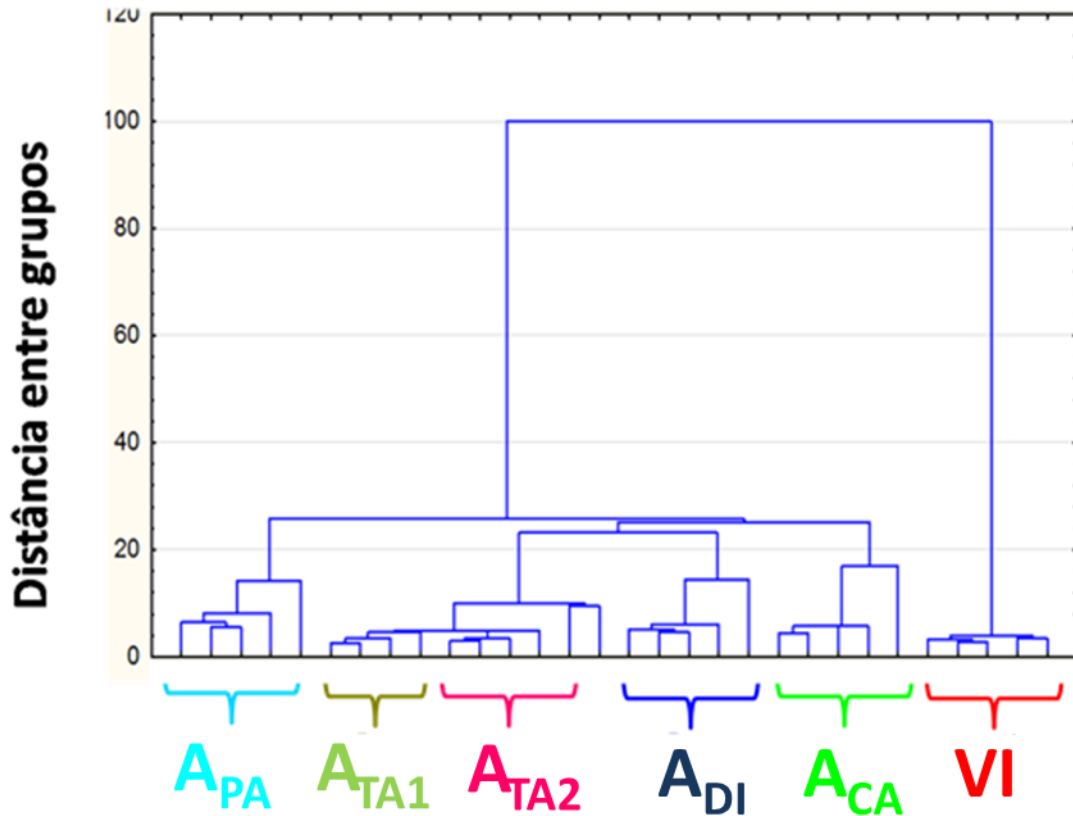


Pelo dendograma apresentado na Fig. 16, as seguintes observações podem ser realizadas, em ordem decrescente de prioridade distância entre classes:

- As formulações de *VI* e genéricas podem ser classificadas em um grupo distinto das formulações contrabandeadas, devido a grande distância no dendograma (eixo  $y = 100$ );

- As amostras genéricas são mais similares à do VI (principalmente G<sub>3</sub> e G<sub>5</sub>).

**Figura 17** - Dendograma obtido pela HCA para a formulação comercial de VI e as formulações adulteradas em laboratório ( $A_{PA}$ ,  $A_{DI}$ ,  $A_{CA}$ ,  $A_{TA1}$  ou  $A_{TA2}$ ).



Pelo dendograma da Fig. 17, as seguintes observações podem ser realizadas, em ordem decrescente de prioridade distância entre classes:

- Notadamente, o VI pode ser classificado em um grupo distinto de todas as formulações adulteradas, devido à enorme distância no dendograma (eixo y = 100);
- No grupo dos adulterados é possível discriminar exatamente o tipo de adulterante, devido à distância obtida no dendograma (eixo y = 25), consequência da reduzida semelhança entre os voltamogramas para distintos adulterantes.
- Além disso, os conjuntos de cada uma das cinco replicatas ficaram bem próximas no dendograma (eixo y = 4). Este resultado foi possível devido à boa precisão das cinco medidas voltamétricas realizadas para cada formulação.
- O dendograma não distinguiu muito bem as amostras adulteradas com diferentes proporções de tadalafila (eixo y = 2), devido à grande semelhança entre os respectivos perfis voltamétricos.

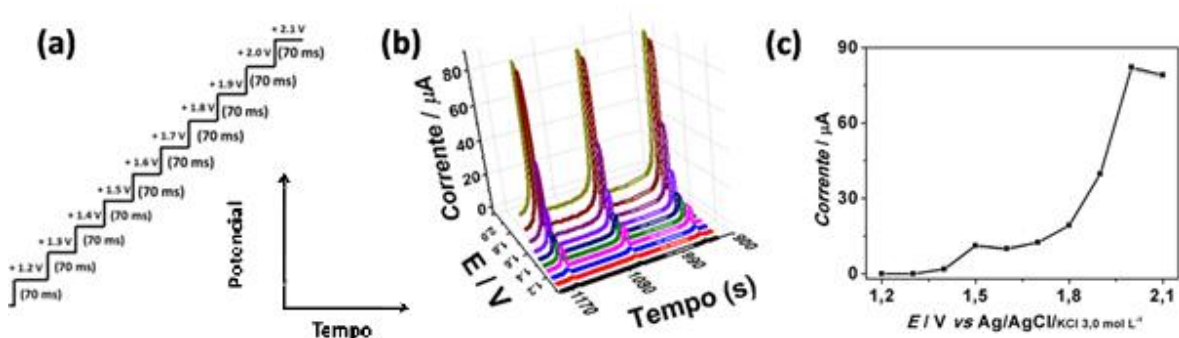
## 4.2. Detecção de CS por Amperometria de Múltiplos Pulsos e classificação não quimiométrica

Nesta segunda etapa, as amostras de VI, genéricos, contrabandeados e adulterados foram detectadas por MPA. As amostras foram classificadas apenas utilizando as correntes de pico, ou seja, sem utilizar nenhum método quimiométrico. Primeiramente foi investigado o comportamento eletroquímico de CS em meio de ácido sulfúrico  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ . Com base neste estudo foi escolhida uma sequência de três pulsos aplicados no DDB para discriminar as formulações. Por último é apresentada a classificação empregando apenas as correntes de pico obtidas nos três pulsos ou razões matemáticas destes sinais. Estes estudos são detalhados nas próximas seções.

### 4.2.1. Comportamento eletroquímico de CS por MPA

O primeiro estudo realizado para a determinação de CS foi direcionado para investigar o comportamento eletroquímico de CS com detecção por MPA. Para isto, dez pulsos de potencial foram aplicados de forma sequencial e ciclicamente em função do tempo no eletrodo de DDB, Fig. 18a, enquanto uma solução de CS  $75 \mu\text{mol L}^{-1}$  foi injetada em triplicata na célula BIA, que continha o eletrólito de ácido sulfúrico  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ . Desta forma, é possível obter dez amperogramas “simultaneamente”, sendo um para cada pulso de potencial aplicado, Fig. 18b. A partir das correntes de pico transientes registradas em cada amperograma, foi gerado o voltamograma hidrodinâmico de CS, apresentado na Fig. 18c.

**Figura 18** - (a) Esquema da sequência de pulsos de potencial aplicados no DDB;; (b) Amperogramas de múltiplos pulsos para injeção em triplicata de solução de CS  $75 \mu\text{mol L}^{-1}$ ; (c) Respectiveos voltamogramas hidrodinâmicos. Volume injetado:  $300 \mu\text{L}$ ; Velocidade de injeção:  $87 \mu\text{L s}^{-1}$ . Tempo de pulso: 70 ms. Eletrólito:  $\text{H}_2\text{SO}_4 0,1 \text{ mol L}^{-1}$ .



O CS exibe pequenas correntes anódicas nos pulsos de +1,2 V até +1,6 V e correntes crescentes a partir de +1,7 V. Este perfil eletroquímico com dois picos anódicos  $i_{pa_1} \approx +1,5$  V e  $i_{pa_2} \approx +2,0$  V, é semelhante ao comportamento observado no voltamograma cíclico da Fig. 8. Porém no voltamograma hidrodinâmico por *MPA* da Fig. 18c houve um pequeno deslocamento nos potenciais de pico, de aproximadamente 100 mV no sentido anódico.

#### 4.2.2. Escolha da sequência de três pulsos aplicados no *DDB*

Após verificar o comportamento eletroquímico do CS em *DDB* e detecção por *MPA*, foi de interesse selecionar alguns pulsos de potencial que fornecessem uma resposta suficiente para classificar as formulações de CS. Ao contrário de uma triagem voltamétrica, as correntes de pico obtidas em poucos pulsos de potencial fornecem bem menos informações em relação ao grande número de pontos de um voltamograma. Neste sentido, a escolha adequada de pulsos deve fornecer as respostas mais relevantes para fins de classificação. Neste trabalho foram selecionados apenas três pulsos de potencial para uma fácil representação das correntes de pico obtidas em cada pulso em um gráfico tridimensional.

Com base no perfil voltamétrico obtido por *MPA*, Fig. 18c, foram escolhidos os pulsos de +1,3 V, +1,6 V e +2,1 V, 50 ms cada. Na Fig. 19a é ilustrada esta sequência de pulsos aplicados no *DDB*, de forma cíclica e sequencial. Deste modo, espera-se que ocorram os seguintes processos na superfície do *DDB* após a injeção de solução de CS:

- (1) +1,3 V: Nenhuma oxidação considerável do CS;
- (2) +1,6 V: Primeiro processo de oxidação do CS;
- (3) +2,1 V: Dois processos de oxidação do CS.

No entanto, vale ressaltar que os processos redox mencionados são observados para formulações contendo apenas CS, e podem ser alterados devido à presença de outros fármacos que estejam presentes em outras formulações. Será realizada justamente essa comparação entre os sinais obtidos nos amperogramas de três pulsos para o medicamento genuíno *VI* frente às outras formulações.

#### 4.2.3. Detecção por *MPA* e classificação das amostras por correntes e razões

Na Fig. 19b são apresentados os três amperogramas “simultâneos” obtidos após injeções em triplicata das soluções de *VI*, genéricos e contrabandeados no sistema *BIA-MPA*. Todas as amostras foram submetidas ao mesmo processo de dissolução e diluição. As correntes de pico obtidas no pulso de + 1,3 V para todas as amostras foram baixas (< 1  $\mu$ A), pois este pulso não é suficiente promover uma oxidação considerável do CS. Nos

pulsos de +1,6 V e +2,1 V as correntes mensuradas para injeções de VI apresentaram intensidade bem maiores  $i_{+1,6V} \approx 15 \mu\text{A}$  e  $i_{+2,1V} \approx 160 \mu\text{A}$ . Este comportamento é um forte indicativo de que estas formulações contem apenas o CS. Outras hipóteses é que nas formulações possam estar presentes (a) análogos do CS, ou seja, moléculas com um comportamento eletroquímico muito próximo ao do CS ou (b) adulterantes não eletroativos na superfície do ET.

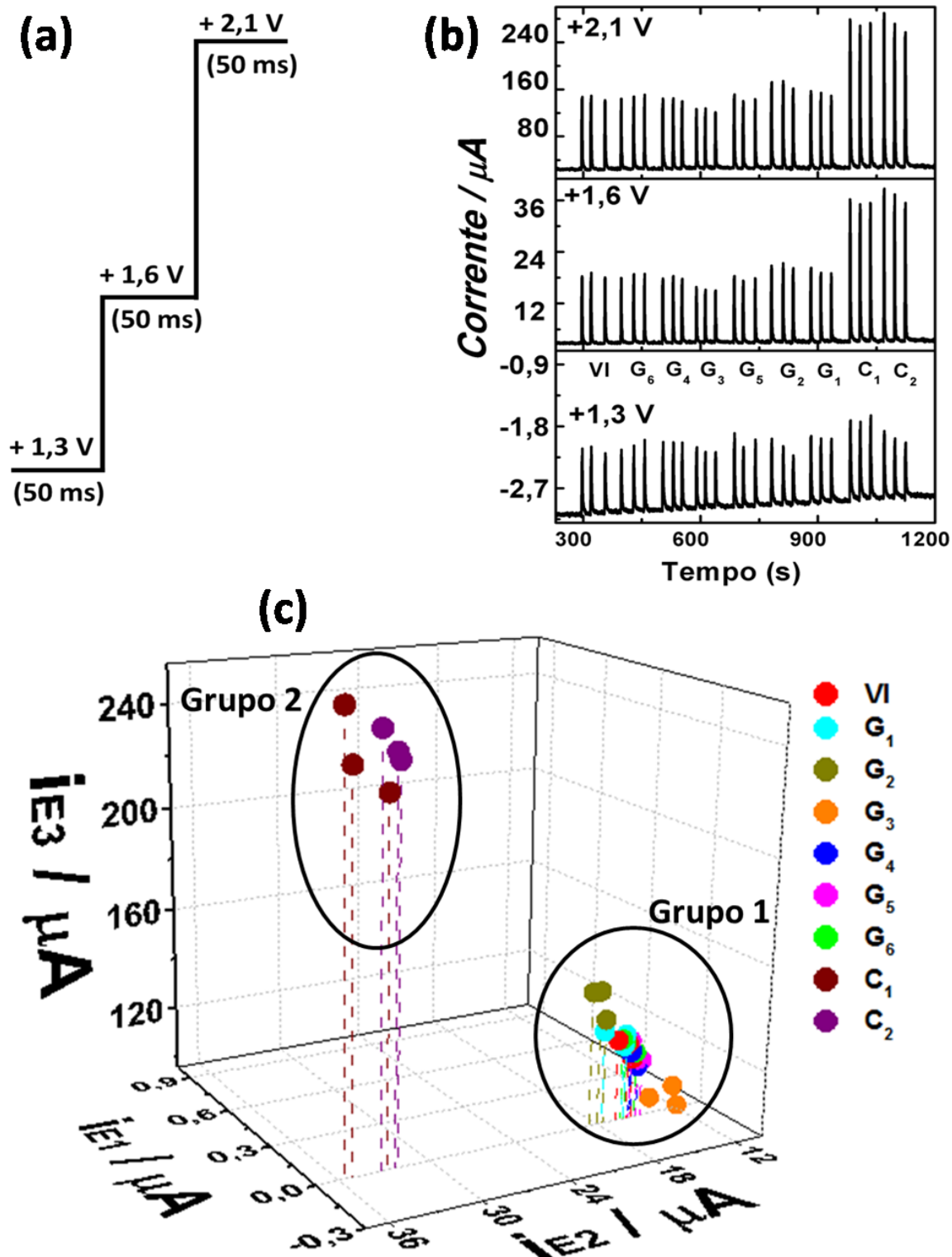
Na Fig. 19b é possível notar que as correntes de pico obtidas para os medicamentos genéricos foram semelhantes aos do VI em todos os três pulsos de potencial, sendo que as amostras contrabandeadas exibiram correntes de pico anódicas mais intensas do que VI nos pulsos de +1,6 V e +2,1 V, devido ao maior teor de CS encontrado nessas formulações em relação ao VI ( $\approx 39\%$  vs.  $\approx 16\%$  do VI, Tabela 3).

Para uma visualização mais fácil das semelhanças e diferenças entre as amostras, as correntes anódicas obtidas em cada pulso  $i_{+1,3V}$ ,  $i_{+1,6V}$  e  $i_{+2,1V}$  foram plotadas em um sistema cartesianos de três dimensões, Fig. 19c. Neste gráfico, as duas amostras contrabandeadas apresentaram perfis bastante distintos do grupo de VI e genéricos. Além disso, todas as formulações genéricas (exceto G<sub>2</sub> e G<sub>3</sub>) não foram distinguíveis de VI, por apresentar um perfil muito próximo ao do VI. Por fim, as três replicatas de cada amostra foram próximas (DPR  $\approx 2\%$ ), devido à injeção reprodutível da micropipeta eletrônica e a estabilidade da superfície de DDB.

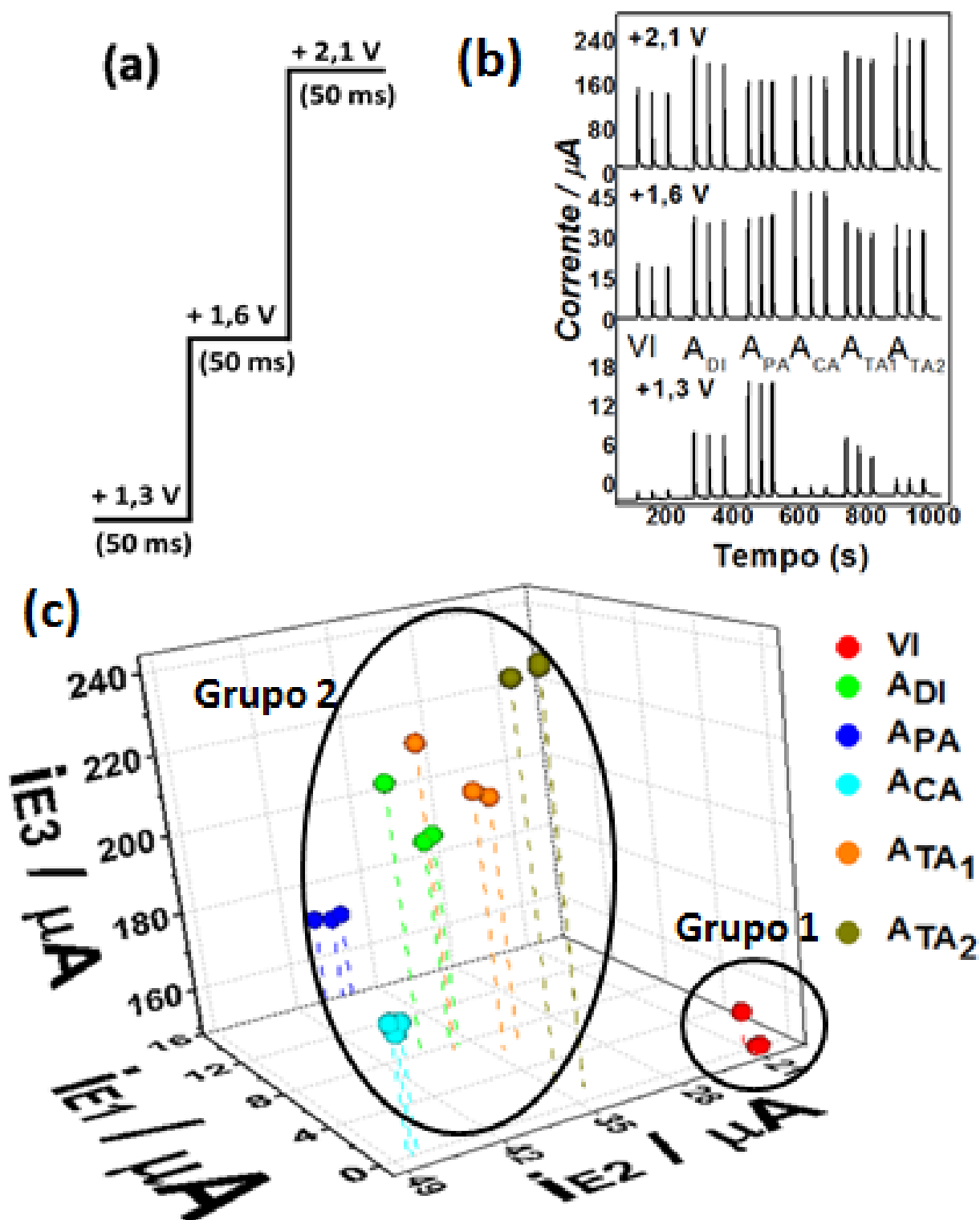
Para a classificação das amostras adulteradas foi mantida a mesma sequência de três pulsos, Fig. 20a. Na Fig. 20b são apresentados os três amperogramas obtidos para injeções em triplicata das soluções de VI e VI adulterados com outros fármacos: paracetamol, dipirona, tadalafila e cafeína. As correntes de pico obtidas em + 1,3 V foram maiores para as amostras contendo adulterantes que tem uma oxidação considerável neste pulso de potencial, paracetamol, dipirona e tadalafila.

Nos pulsos de + 1,6 V e +2,1 V as correntes mensuradas para as amostras contendo os adulterantes foram maiores do que a solução de VI, devido à presença dos adulterantes que oxidam acima destes dois pulsos, ou seja, todos os adulterantes avaliados. Na Fig. 21c é apresentado o gráfico 3D com essas correntes de pico anódicas obtidas na Fig. 21b. De acordo com esta representação, a amostra de VI pode ser claramente separada das amostras contendo adulterantes. As formulações de CS contendo distintas dosagens de Tadalafila ( $A_{TA1}$  e  $A_{TA2}$ ) também foram discriminadas. As triplicatas de todas as amostras também foram precisas (DPR  $\approx 1,8$ ).

**Figura 19** - (a) Esquema da sequência de pulsos aplicados no *DDB*; (b) *MPA* obtidos para injeções em triplicata das soluções de *VI*, genéricos ( $G_1 - G_6$ ) e contrabandeados ( $C_1, C_2$ ) na célula BIA; c) Gráfico 3D das correntes de pico nos três pulsos de potencial (x:  $i_{+1,3V}$ , y:  $i_{+1,6V}$ , z:  $i_{+2,1V}$ ). Velocidade de injeção:  $100 \mu\text{L s}^{-1}$ ; Volume injetado:  $200 \mu\text{L}$ . Eletrólito suporte:  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ . Tempo de pulso:  $50 \text{ ms}$ .



**Figura 20** - (a) Esquema da sequência de pulsos aplicados no *DDB*; (b) *MPA* obtidos para injeções em triplicata das soluções de *VI*, adulterados ( $A_{DI}$ ,  $A_{PA}$ ,  $A_{CA}$ ,  $A_{TA1}$  e  $A_{TA2}$ ); c) Gráfico 3D das correntes de pico nos três pulsos de potencial (x:  $i_{+1,3V}$ , y:  $i_{+1,6V}$ , z =  $i_{+2,1V}$ . Velocidade de injeção:  $100 \mu\text{L s}^{-1}$ ; Volume injetado:  $200 \mu\text{L}$ . Tempo de pulso: 50 ms.



De acordo com os resultados apresentados, o emprego das correntes de pico dos amperogramas de múltiplos pulsos nos níveis escolhidos +1,3 V, +1,6 V e +2,1 V oferece informação suficiente para discriminar o VI de: medicamentos contendo CS contrabandeados ( $C_1$  e  $C_2$ ) e VI com distintos adulterantes ( $A_{PA}$ ,  $A_{DI}$ ,  $A_{CA}$ ,  $A_{TA}$ ). Como o preparo de todas as amostras foi o mesmo, pode-se inferir que as intensidades das correntes de pico nos três pulsos levaram à classificação dos medicamentos devido à:

- Dosagem de CS no VI distinto das formulações teste, o que promove um aumento ou diminuição proporcional das três correntes de pico;
- Presença de adulterantes nas formulações teste, acarretando em aumento ou diminuição não proporcional das correntes de pico, sendo que a intensidade desta diferença em relação ao VI depende do tipo e dosagem do adulterante eletroativo.

No entanto, o emprego das correntes de pico obtidas por MPA pode levar a classificações errôneas em algumas situações, como por exemplo:

- Se a diluição de alguma formulação ocorrer acidentalmente de maneira distinta do VI, a concentração das espécies e as correntes de pico serão discrepantes;
- Caso ocorrer alguma passivação da superfície do DDB após um certo número de injeções sucessivas no sistema BIA-MPA, as correntes diminuem gradativamente (problema frequente na detecção eletroquímica).

Para aumentar a confiabilidade das classificações oferecidas pelo sistema BIA-MPA, é importante realizar uma normalização das correntes de pico para minimizar erros experimentais. Neste sentido, propõe-se utilizar três razões matemáticas (R) entre as correntes de pico nos três pulsos, sendo:  $R_1 = i_{+1,6V}/i_{+1,3V}$ ;  $R_2 = i_{+2,1V}/i_{+1,6V}$  e  $R_3 = i_{+2,1V}/i_{+1,6V}$ . A estratégia de utilizar razões ou fatores entre correntes nos distintos pulsos foi proposta na literatura para minimizar erros associados a sistemas FIA com detecção amperométrica [79].

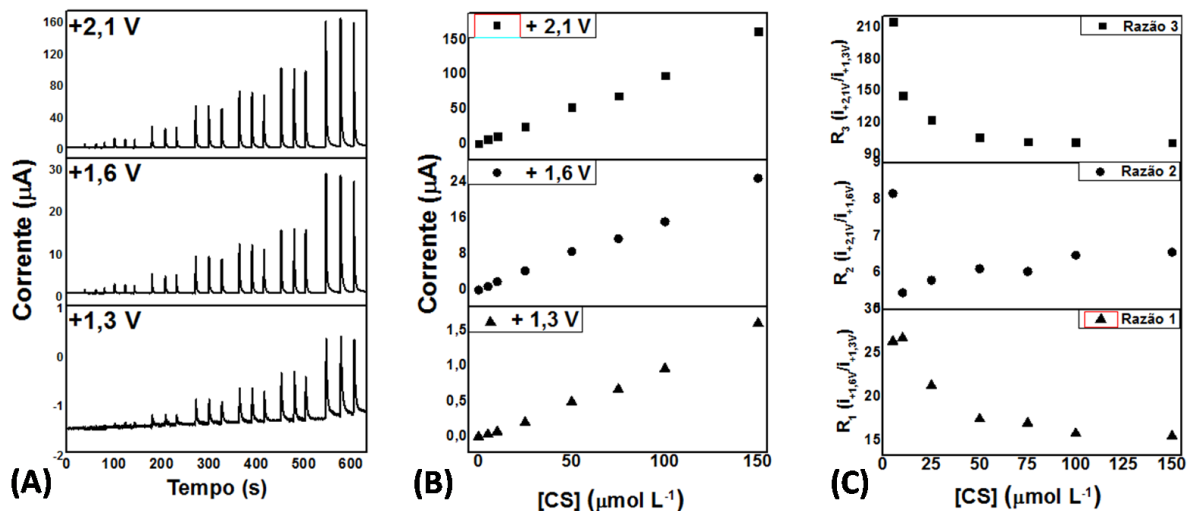
Para verificar o efeito da diluição nas correntes de pico, sete soluções padrão de CS em concentrações crescentes, 5 a 150  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , foram injetadas no sistema BIA-MPA. Os amperogramas de três pulsos deste estudo e as respectivas correntes de pico obtidas são apresentados na Fig. 21a e 21b.

Como apresentado, as correntes de pico apresentam uma dependência direta e linear com a concentração de CS. Dependendo do erro na etapa de diluição, as correntes de pico de uma amostra podem ser bem discrepantes em relação à diluição da amostra de referência (VI), o que reflete na classificação incorreta desta amostra. As três razões entre as correntes de pico nos distintos pulsos ( $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$ ) apresentam valores com tendência constante no intervalo de concentração de 50 a 150  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , Fig. 21c. Uma normalização



efetiva que representa uma maior confiança na classificação ocorre neste intervalo de concentração. Na Tabela 9 são apresentadas as médias e *DPR* das correntes de pico nos três pulsos + 1,3 V, + 1,6 V e + 2,1 V e também das três razões  $R_1$ ,  $R_2$  e  $R_3$ . As razões promovem um efeito de normalização das correntes, pois os desvios foram diminuídos em aproximadamente dez vezes ( $DPR_R \approx 5\%$  VS  $DPR_i \approx 50\%$ ). Para exemplificar esse efeito, caso uma amostra preparada na concentração de CS de  $100 \mu\text{mol L}^{-1}$  fosse diluída erroneamente duas vezes mais (a  $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) a corrente em +2,1 V cairia de  $98 \mu\text{A}$  para  $52 \mu\text{A}$ , redução de 53%. As razões nessas duas concentrações são praticamente constantes (101 para 104 em  $R_3$ ).

**Figura 21**– Amperogramas obtidos nos três pulsos (+1,3 V, +1,6 V e +2,1 V) após injeções de soluções de concentrações crescentes de CS ( $5, 10, 25, 50, 75, 100$  e  $150 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) (A) e respectivas correntes de pico (B) e razões entre as correntes de pico nos três pulsos ( $R_1 = i_{+1,6V}/i_{+1,3V}$ ,  $R_2 = i_{+2,1V}/i_{+1,6V}$ ,  $R_3 = i_{+2,1V}/i_{+1,3V}$ ).



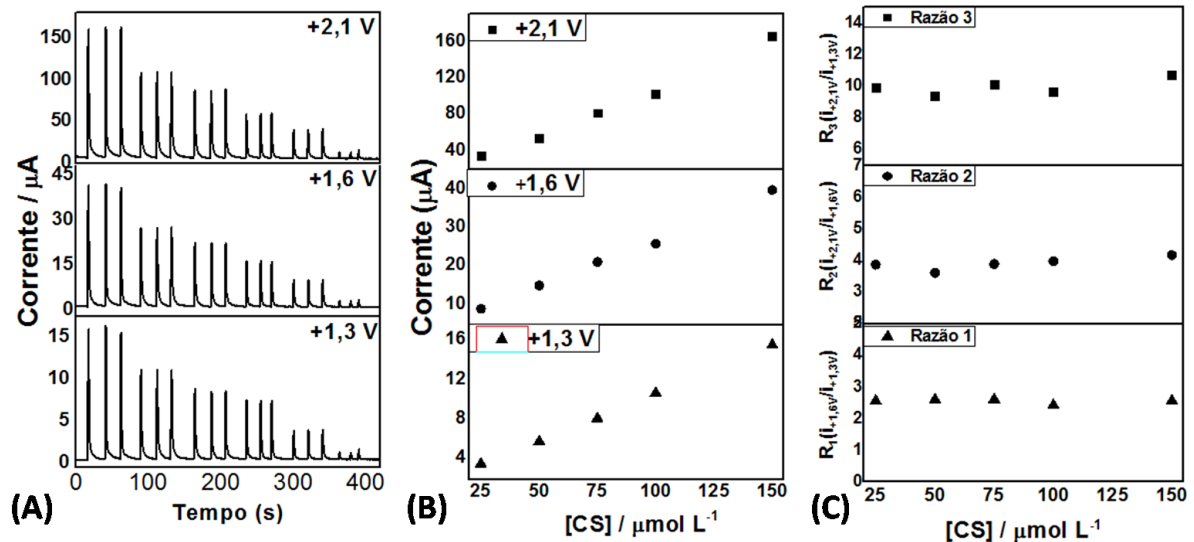
**Tabela 9** – Média e variações para as correntes de pico e respectivas razões.

|                                 | Citrato de sildenafil (CS) <sup>1</sup> |                | Adulterada com PA (A <sub>PA</sub> ) <sup>2</sup> |                |
|---------------------------------|---|----------------|---|----------------|
|                                 | Média                                   | <i>DPR</i> (%) | Média   | <i>DPR</i> (%) |
| $i_{+1,3V}$ (µA)                | 0,9                                     | 52,4           | 8,6   | 54,1           |
| $i_{+1,6V}$ (µA)                | 14,9                                    | 47,3           | 21,9  | 53,9           |
| $i_{+2,1V}$ (µA)                | 95,2                                    | 50,9           | 86,9  | 58,6           |
| $R_1$ ( $i_{+1,6V}/i_{+1,3V}$ ) | 16,4                                    | 5,8            | 2,6   | 3,0            |
| $R_2$ ( $i_{+2,1V}/i_{+1,6V}$ ) | 6,3                                     | 4,1            | 3,9   | 5,2            |
| $R_3$ ( $i_{+2,1V}/i_{+1,3V}$ ) | 103,1                                   | 2,2            | 9,9   | 5,0            |

<sup>1</sup> Valores calculados para concentrações de CS no intervalo de 50 a  $150 \mu\text{mol L}^{-1}$ .

<sup>2</sup> Valores calculados para concentrações de CS no intervalo de 25 a  $150 \mu\text{mol L}^{-1}$ .

**Figura 22** - Amperogramas obtidos nos três pulsos (+1,3 V, +1,6 V e +2,1 V) após injeções de soluções da amostra adulterada com paracetamol ( $A_{PA}$ ) submetidas a distintas diluições (A) e respectivas correntes de pico (B) e razões entre as correntes de pico nos três pulsos ( $R_1 = i_{+1,6V}/i_{+1,3V}$ ,  $R_2 = i_{+2,1V}/i_{+1,6V}$ ,  $R_3 = i_{+2,1V}/i_{+1,3V}$ ).

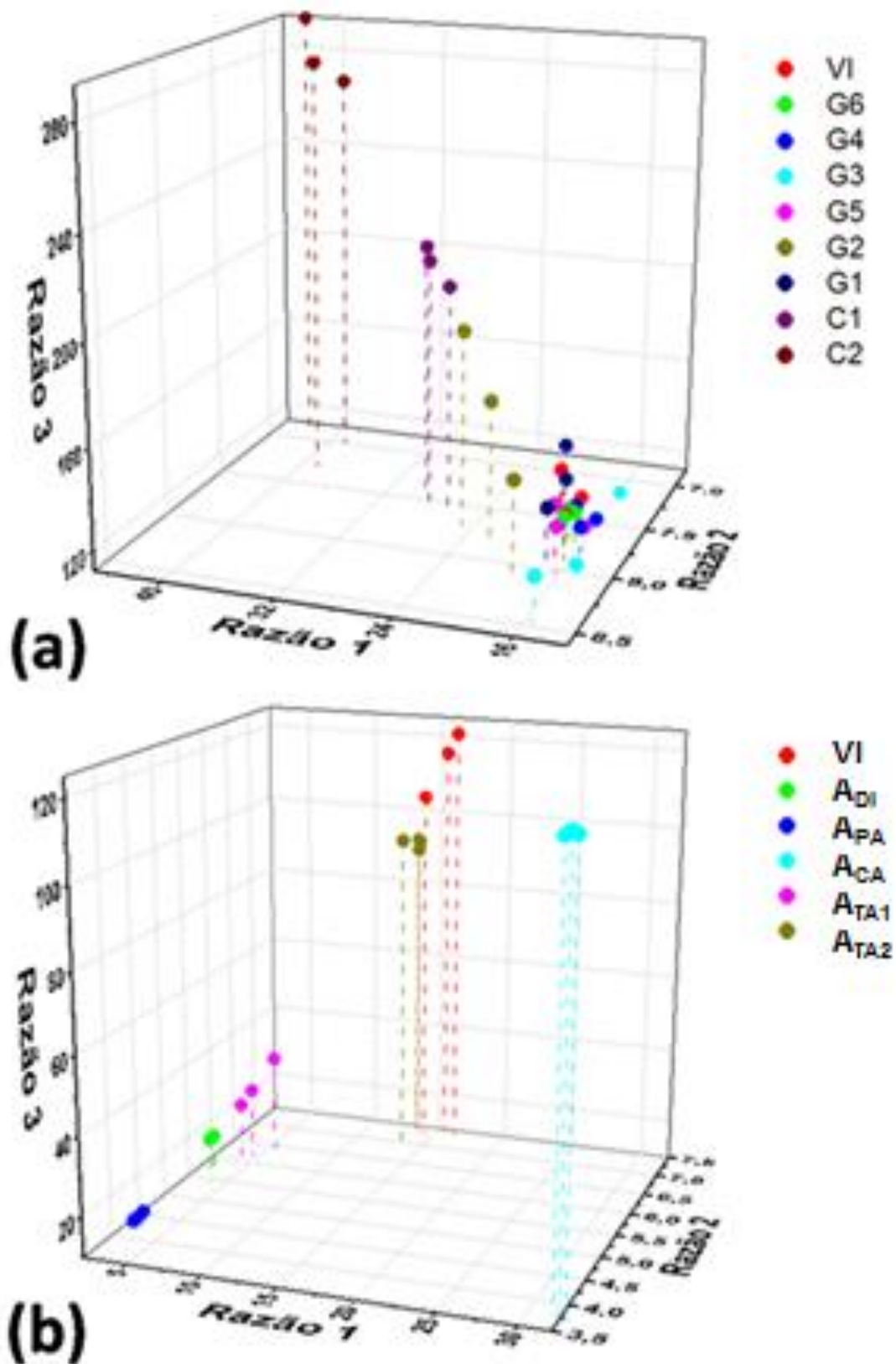


Um estudo para verificar o efeito da diluição sobre as correntes e razões também foi conduzido para uma amostra adulterada. A solução estoque da amostra adulterada com paracetamol ( $A_{PA}$ ) foi submetida a diferentes diluições e injetadas no sistema *BIA-MPA*. Os amperogramas de três pulsos, as respectivas correntes de pico e as três razões obtidas são apresentadas nas Fig. 22a, 22b e 22c, respectivamente.

As correntes de pico apresentam relação direta e linear com a concentração de CS e  $A_{PA}$  da formulação adulterada no intervalo avaliado. Entretanto, o efeito de normalização promovido pelas razões é observado no intervalo de 25 a 150 µmol L<sup>-1</sup>, devido ao ganho na precisão das razões em relação às correntes de pico ( $DPR_R \approx 5\%$  vs.  $DPR_i \approx 55\%$ ). Todas as correntes e razões obtidas neste estudo também se encontram na Tabela 9. Como todas as amostras injetadas no sistema *BIA-MPA* apresentavam uma concentração de CS de 75 µmol L<sup>-1</sup>, é possível obter confiabilidade na classificação por fatores.

Na Fig. 23 se encontram as classificações através das razões representadas um gráfico tridimensional (x:  $R_1$ , y:  $R_2$ , z:  $R_3$ ) para o conjunto de VI, genéricos, contrabandeados e para o conjunto de VI e amostras adulteradas. As correntes de pico utilizadas para o cálculo destas razões foram as utilizadas na classificação por correntes das Fig. 19c e 20c.

**Figura 23** – Gráfico 3D das razões calculadas (x:  $R_1$ , y:  $R_2$  e z:  $R_3^*$ ) a partir das correntes de pico das amostras de VI, genéricos e contrabandeados (A) e VI e adulterados (B).



\*  $R_1 = i_{4,1,6V} / i_{4,1,3V}$ ;  $R_2 = i_{4,2,1V} / i_{4,1,6V}$ ;  $R_3 = i_{4,2,1V} / i_{4,1,3V}$ .

Na Fig. 23a, empregando as três razões foi possível discriminar as duas formulações contrabandeadas das demais. Porém, a amostra C<sub>2</sub> ficou mais próxima das demais do que quando estas foram classificadas pelas correntes de pico, Fig. 19. As razões de todos os genéricos (exceto G<sub>2</sub> e G<sub>3</sub>) ficaram praticamente sobrepostas às razões do VI, não sendo possível discriminá-las. Inicialmente acreditava-se que a classificação através de razões iria normalizar os sinais das amostras que a princípio contém o mesmo princípio ativo (VI, G e C). Na Fig. 23a notadamente verifica-se que as razões também conseguem discriminar amostras com diferentes teores de CS.

No caso das formulações adulteradas, Fig. 23b, a classificação através das razões também foi suficiente para discriminar o VI de todas as amostras adulteradas. As formulações de VI adulteradas com distintas quantidades de Tadalafila A<sub>T1</sub> e A<sub>T2</sub> foram melhor discriminadas do que no caso da classificação por correntes de pico, Fig.20. Além disso, a precisão das replicatas desta classificação foi superior do que a classificação por correntes. Para exemplificar, a razão 2 ( $i_{+2,1V}/i_{+1,6V}$ ) para a triplicata do VI apresentou um *DPR* de 0,8 %, sendo que a triplicata das correntes em +2,1 V e +1,6 V apresentaram respectivamente um *DPR* de 3,5 % e 3,6 %, devido à normalização promovida pelas razões matemáticas entre as correntes de pulso.

De maneira geral as classificações das formulações de CS quimiométricas e não quimométricas propostas nesta dissertação alcançaram às mesmas conclusões, ou seja, discriminar VI de formulações contrabandeadas e adulteradas. No entanto, os esquemas de classificação não quimiométricos empregando *BIA-MPA* é um método de triagem mais aplicável em situações reais, visto a simplicidade e rapidez no experimento e no tratamento de dados.

## 5. CONCLUSÕES

Os resultados apresentados neste trabalho permitiram propor duas metodologias para rápida triagem de formulações contendo CS, VI, genéricas e adulteradas, empregando um sistema *BIA* e eletrodo *DDB*. Na primeira etapa foi sugerida a detecção voltamétrica associada a dois algoritmos quimiométricos (*PCA* e *HCA*) e na segunda foi proposta a detecção por *MPA*, na qual foram utilizadas apenas as correntes de pico obtidas em cada pulso ou razões matemáticas entre estes sinais.

Na detecção voltamétrica, o CS apresentou dois picos anódicos irreversíveis em +1,4 V e +2,0 V em meio de ácido sulfúrico 0,1 mol L<sup>-1</sup>, concordando a literatura. A VOQ hidrodinâmica foi a técnica mais rápida e sensível para a detecção de CS. Os voltamogramas de cada formulação, utilizados como “impressões digitais” características, foram tratados pelos algoritmos da *PCA* e *HCA* para a melhor representar o conjunto de amostras. Com este esquema foi possível discriminar o VI de duas formulações contrabandeadas e VI contendo distintos adulterantes.

Na detecção por *MPA* foram aplicados os pulsos de potencial de +1,3 V, +1,6 V e 2,1 V no *DDB*, escolhidos de acordo com o comportamento eletroquímico do CS. Após as injeções das amostras as correntes de pico obtidas ( $i_{+1,3V}$ ,  $i_{+1,6V}$ ,  $i_{+2,1V}$ ) ou razões matemáticas entre essas correntes ( $R_1: i_{+1,6V} / i_{+1,3V}$ ;  $R_2: i_{+2,1V} / i_{+1,6V}$ ;  $R_3: i_{+2,1V} / i_{+1,3V}$ ) conseguiram discriminar as formulações. No entanto o resultado mais confiável foi obtido para as razões, pois, devido à normalização das correntes, é possível corrigir possíveis erros de diluição ou contaminação do eletrodo de trabalho. Além disso, o emprego de correntes de pico por *MPA* ou razões dispensou o uso de ferramentas quimiométricas e discriminaram as mesmas formulações classificadas pela detecção voltamétrica associada a *PCA* ou *HCA*.

Apesar dos dois métodos discriminarem estas amostras somente pela diferença de sinais entre o VI e as outras formulações, dispensando métodos de quantificação de CS, as discriminações realizadas com a detecção por *MPA* são mais rápidas e simples, devido à pequena duração de uma injeção (menor que 10 segundos) e ao tratamento de dados menos moroso. O sistema de discriminação *BIA-MPA* apresenta baixo custo relativo, além de ser reprodutível, confiável e portátil. Tais características poderiam ser úteis para utilizar este sistema para diagnosticar preliminarmente as amostras suspeitas no próprio local da apreensão. Os métodos apresentados são promissores e apresentam várias características desejáveis para métodos de diagnóstico, porém devem ser avaliados para classificar medicamentos falsificados ou drogas apreendidas pela Polícia Federal.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Ames J, Souza DZ. Falsificação de medicamentos no Brasil. **Revista Saúde Pública**, v. 46, p. 154-159, 2012.
- [2] Disponível em: <https://www.youtube.com/watch?v=d7Fnqye0HbA>. Acessado em 05 de janeiro de 2016.
- [3] Saúde OMD. **Counterfeit drugs: guidelines for the development of measures to combat counterfeit drugs**. Saúde OMD, editor: Geneva Suíça, 2005.
- [4] Brett AM, Brett CMA. **Electroquímica: Princípios, Métodos e Aplicações New York: Oxford University Press**, 1993.
- [5] Souza Dd, Machado SAS, Avaca LA. Voltametria de onda quadrada. Primeira parte: aspectos teóricos. **Química Nova**, v. 26, p. 81-89, 2003.
- [6] Pacheco WF, Semaan FS, Almeida VGK, Ritta AGSL, Aucélio RQ. Voltametrias: Uma Breve Revisão Sobre os Conceitos. **Revista Virtual de Química**, v. 5, p. 516-537, 2013.
- [7] de Souza D, Codognoto L, Malagutti AR, Toledo RA, Pedrosa VA, Oliveira RTS, et al. Square wave voltammetry. Second part: Applications. **Química Nova**, v. 27, p. 790-797, 2004.
- [8] dos Santos WTP, Gimenes DT, Richter EM, Angnes L. Flow Injection Analysis With Multiple Pulse Amperometric Detection: Potentialities and Applications. **Química Nova**, v. 34, p. 1753-1761, 2011.
- [9] Poferl DJ, Gardner NC, Angus JC. Growth of Boron-Doped Diamond Seed Crystals by Vapor-Deposition. **Journal of Applied Physics**, v. 44, p. 1428-1434, 1973.
- [10] Zoski CG. **Handbook of Electrochemistry**. Las Cruces, New Mexico, USA: Elsevier, 2007.
- [11] Suffredini HB, Pedrosa VA, Codognoto L, Machado SAS, Rocha RC, Avaca LA. Enhanced electrochemical response of boron-doped diamond electrodes brought on by a cathodic surface pre-treatment. 2. **Electrochimica Acta**, v. 49, p. 4021-4026, 2004.
- [12] Wang J, Taha Z. Batch Injection-Analysis. **Analytical Chemistry**, v. 63, p. 1053-1056, 1991.
- [13] Tormin TF, Gimenes DT, Richter EM, Munoz RAA. Fast and direct determination of butylated hydroxyanisole in biodiesel by batch injection analysis with amperometric detection. **Talanta**, v. 85, p. 1274-1278, 2011.
- [14] Wang JC, L.; Angnes, L.; Tian, B. M. Computerized pipettes with programmable dispensation for batch injection-analysis. **Analytica Chimica Acta**, v. 267, p. 171-177, 1992.
- [15] Quintino MSM, Angnes L. Batch injection analysis: An almost unexplored powerful tool. **Electroanalysis**, v. 16, p. 513-523, 2004.

- [16] Quintino MDM, Corbo D, Bertotti M, Angnes L. Amperometric determination of acetylsalicylic acid in drugs by batch injection analysis at a copper electrode in alkaline solutions. **Talanta**, v. 58, p. 943-949, 2002.
- [17] Brett CMA, Brett AMO, Mitoseriu LC. Amperometric and Voltammetric Detection in Batch Injection-Analysis. **Analytica Chimica Acta**, v. 66, p. 3145-3150, 1994.
- [18] Ruzicka J, Hansen EH. Flow Injection Analyses 1. New concept of fast continuous-Flow Analysis. **Analytica Chimica Acta**, v. 78, p. 145-157, 1975.
- [19] Quintino MSM, Araki K, Toma HE, Angnes L. Batch injection analysis utilizing modified electrodes with tetra-ruthenated porphyrin films for acetaminophen quantification. **Electroanalysis**, v. 14, p. 1629-1634, 2002.
- [20] Quintino MSM, Angnes L. Fast BIA-amperometric determination of isoniazid in tablets. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 42, p. 400-404, 2006.
- [21] da Silva RAB, Gimenes DT, Tormin TF, Munoz RAA, Richter EM. Batch injection analysis with amperometric detection: application for simultaneous analysis using a single working electrode. **Analytical Methods**, v. 3, p. 2804-2808, 2011.
- [22] Freitas JM, Oliveira TD, Gimenes DT, Munoz RAA, Richter EM. Simultaneous determination of three species with a single-injection step using batch injection analysis with multiple pulse amperometric detection. **Talanta**, v. 146, p. 670-675, 2015.
- [23] Pereira PF, Marra MC, Lima AB, dos Santos WTP, Munoz RAA, Richter EM. Fast and simultaneous determination of nimesulide and paracetamol by batch injection analysis with amperometric detection on bare boron-doped diamond electrode. **Diamond and Related Materials**, v. 39, p. 41-46, 2013.
- [24] Stefano JS, Lima APd, Montes RHO, Richter EM, Munoz RAA. Fast determination of naproxen in pharmaceutical formulations by batch injection analysis with pulsed amperometric detection. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 23, p. 1834-1838, 2012.
- [25] Silva RAG, Silva LAJ, Munoz RAA, Richter EM, Oliveira AC. Fast and direct determination of mancozeb through batch injection analysis with amperometric detection on boron-doped diamond electrodes. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 733, p. 85-90, 2014.
- [26] Terrett NK, Bell AS, Brown D, Ellis P. Sildenafil (VIAGRATM), a potent and selective inhibitor of type 5 cGMP phosphodiesterase with utility for the treatment of male erectile dysfunction. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 6, p. 1819-1824, 1996.
- [27] Disponível em: <http://www.pharmanet.com.br/viagra/tecnicaa.htm>. Acessado em 09 de janeiro de 2016.
- [28] Disponível em: <http://www.bulas.med.br>. Acessado em 09 de janeiro de 2016.
- [29] Disponível em: <http://tatunarede.com.br/not%C3%ADcia/viagra-falsificado-cont%C3%A9m-gesso-tinta-de-parede-e-at%C3%A9-de-impressora>. Acessado em 06 de janeiro de 2016.
- [30] Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/>. <http://www.anvisa.gov.br>. Acessado em 04 de janeiro de 2016.

- [31] Disponível em: <http://g1.globo.com/pop-arte/noticia/2013/09/remedios-falsos-um-mercado-mais-lucrativo-que-o-das-drogas.html>. Acessado em 07 de janeiro de 2016.
- [32] Disponível em: <http://www.who.int/medicines/services/counterfeit/overview/en>. <http://www.who.int/medicines/services/counterfeit/overview/en>. Acessado em 07 de junho de 2015.
- [33] Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/medicamentoverdadeiro/conteudo/>. Acessado em 08 de junho de 2015.
- [34] Araújo JF. **A falsificação de medicamentos e a atuação da vigilância sanitária**. Brasília - DF, 2001.
- [35] Hurtado RL, Lasmar MC. Medicamentos falsificados e contrabandeados no Brasil: panorama geral e perspectivas de combate ao seu consumo. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 30, p. 891-895, 2014.
- [36] Ortiz RSA, M. V.; Linden, R. Determinação de Citrato de Sildenafil e tadalafila por cromatografia líquida de ultraeficiência com detecção por arranjo de diodos (CLUE-DAD). **Química Nova**, v. 33, p. 389-393, 2010.
- [37] Basic tests for drugs: pharmaceutical substances, medicinal plants materials and dosage forms. Geneva, Suíça. **Organização Mundial da Saúde**, 1998.
- [38] Hashem H, Ibrahim AE, Elhenawee M. Chromatographic analysis of some drugs employed in erectile dysfunction therapy: Qualitative and quantitative studies using calixarene stationary phase. **Journal of Separation Science**, v. 37, p. 2814-2824, 2014.
- [39] Nickum EA, Flurer CL. Determination of Phosphodiesterase-5 Inhibitors and Analogs Using High-Performance Liquid Chromatography with Ultraviolet Detection. **Journal of Chromatographic Science**, v. 53, p. 38-46, 2015.
- [40] Satheesh B, Ganesh KKS, Saravanan D. Simultaneous Determination of Tadalafil and its Related Compounds in Pharmaceutical Dosage Forms By UPLC. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 36, p. 1451-1465, 2013.
- [41] Sacre PY, Deconinck E, Chiap P, Crommen J, Mansion F, Rozet E, et al. Development and validation of a ultra-high-performance liquid chromatography-UV method for the detection and quantification of erectile dysfunction drugs and some of their analogues found in counterfeit medicines. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, p. 6439-6447, 2011.
- [42] Dinesh ND, Nagaraja P, Gowda NMM, Rangappa KS. Extractive spectrophotometric methods for the assay of sildenafil citrate (Viagra) in pure form and in pharmaceutical formulations. **Talanta**, v. 57, p. 757-764, 2002.
- [43] Amin AS, El-Beshbeshy AM. Utility of certain sigma and pi-acceptors for the spectrophotometric determination of sildenafil citrate (Viagra). **Mikrochimica Acta**, v. 137, p. 63-69, 2001.
- [44] Altıokka G, Atkosar Z, Sener E, Tunçel M. FIA of sildenafil citrate using UV-detection. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 25, p. 339-342, 2001.
- [45] Weinert PL, Pezza L, Pezza HR. Determinação espectrofotométrica de citrato de sildenafil em formulações farmacêuticas. **Química Nova**, v. 31, p. 1112-1116, 2008.



- [46] Refat MS, Mohamed GG, Fathi A. Spectrophotometric determination of sildenafil citrate drug in tablets. Spectroscopic characterization of the solid charge transfer complexes. **Bulgarian Chemical Communications**, v. 45, p. 250-262, 2013.
- [47] Wang CC, Silva RA, Masibd AN, Fernandez L. Sensitive surfactant-mediated spectrofluorimetric determination of sildenafil. **Analytical Methods**, v. 2, p. 519-524, 2010.
- [48] Wawer W, Pisklak M, Chilmonczyk Z. H-1, C-13, N-15 NMR analysis of sildenafil base and citrate (Viagra) in solution, solid state and pharmaceutical dosage forms. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 38, p. 865-870, 2005.
- [49] Vidal DTR, Augelli MA, do Lago CL. Determination of sildenafil and vardenafil by capillary zone electrophoresis using capacitively coupled contactless conductivity detection. **Analytical Methods**, v. 5, p. 2041-2045, 2013.
- [50] Frag EYZ, Mohamed GG, Alelaiwi HMS. Electroanalytical determination of sildenafil in Viagra tablets using screen-printed and conventional carbon paste electrodes. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 659, p. 121-127, 2011.
- [51] Berzas JJ, Rodriguez J, Castaneda G, Villasenor MJ. 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.
- [52] Ozkan SA, Uslu B, Zuman P. Electrochemical oxidation of sildenafil citrate (Viagra) on carbon electrodes. **Analytica Chimica Acta**, v. 33, p. 227-233, 2004.
- [53] Stefan-van Staden RI, van Staden JF, Aboul-Enein HY. Diamond paste-based electrodes for the determination of sildenafil citrate (Viagra). **Journal of Solid State Electrochemistry**, v. 14, p. 997-1000, 2010.
- [54] Tyszczyk K, Korolczyk M. Voltammetric method for the determination of sildenafil citrate (Viagra) in pure form and in pharmaceutical formulations. **Bioelectrochemistry**, v. 78, p. 113-117, 2010.
- [55] Batista EF, Sartori ER, Medeiros RA, Rocha RC, Fatibello O. Differential Pulse Voltammetric Determination of Sildenafil Citrate (Viagra®) in Pharmaceutical Formulations Using a Boron-Doped Diamond Electrode. **Analytical Letters**, v. 43, p. 1046-1054, 2010.
- [56] Balasoiu SC, Stefan-van Staden RI, van Staden JF, Ion RM, Radu GL, Aboul-Enein HY. Amperometric dot-sensors based on zinc porphyrins for sildenafil citrate determination. **Electrochimica Acta**, v. 58, p. 290-295, 2011.
- [57] Delolo FG, Rodrigues C, da Silva MM, Dinelli LR, Delling FN, Zukerman-Schpector J, et al. A New Electrochemical Sensor Containing a Film of Chitosan-Supported Ruthenium: Detection and Quantification of Sildenafil Citrate and Acetaminophen. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 25, p. 332-550, 2014.
- [58] Lopes Júnior AC, Luz RCS, Damos FS, Santos AS, Franco DL, Santos WTP. Determination of Sildenafil Citrate (Viagra®) in Various Pharmaceutical Formulations by Flow Injection Analysis with Multiple Pulse Amperometric Detection. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 23, p. 1800-1806, 2012.

- [59] Deconinck E, Sacre PY, Courselle P, De Beera JO. Chemometrics and chromatographic fingerprints to discriminate and classify counterfeit medicines containing PDE-5 inhibitors. **Talanta**, v. 100, p. 123-133, 2012.
- [60] Fejos I, Neumajer G, Béni S, Jankovics P. Qualitative and quantitative analysis of PDE-5 inhibitors in counterfeit medicines and dietary supplements by HPLC–UV using sildenafil as a sole reference. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 98, p. 327-333, 2014.
- [61] Ortiz RS, Mariotti KC, Holzschuh MH, Romao W, Limberger RP, Mayorga P. Profiling counterfeit Cialis, Viagra and analogs by UPLC–MS. **Forensic SciInt**, v. 229, p. 13-20, 2013.
- [62] Vredenburg MJ, Blok-Tip L, Hoogerbrugge R, Barends DM, de Kaste D. Screening suspected counterfeit Viagra (R) and imitations of Viagra (R) with near-infrared spectroscopy. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 40, p. 840-849, 2006.
- [63] Sacre PY, Deconinck E, De Beer T, Courselle P, Vancauwenberghe R, Chiap P, et al. Comparison and combination of spectroscopic techniques for the detection of counterfeit medicines. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 53, p. 445-453, 2010.
- [64] Deconinck E, Sacre PY, Coomans D, De Beer J. Classification trees based on infrared spectroscopic data to discriminate between genuine and counterfeit medicines. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 57, p. 68-75, 2012.
- [65] Sabin GP, Lozano VA, Rocha WFC, Romao W, Ortiz RS, Poppi RJ. Characterization of sildenafil citrate tablets of different sources by near infrared chemical imaging and chemometric tools. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 85, p. 207-212, 2014.
- [66] Ortiz RS, Mariotti KD, Fank B, Limberger RP, Anzanello MJ, Mayorga P. Counterfeit Cialis and Viagra fingerprinting by ATR-FTIR spectroscopy with chemometry: Can the same pharmaceutical powder mixture be used to falsify two medicines? **Forensic SciInt**, v. 226, p. 282-289, 2013.
- [67] Pereira TMC, Junior JAQ, Ortiz RS, Rocha WFC, Endringer DC, Filgueiras PR, et al. Viagra (R) and Cialis (R) blister packaging fingerprinting using Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) allied with chemometric methods. **Analytical Methods**, v. 6, p. 2722-2728, 2014.
- [68] de Veij M, Deneckere A, Vandenabeele P, de Kaste D, Moens L. Detection of counterfeit Viagra (R) with Raman spectroscopy. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 46, p. 303-309, 2008.
- [69] Sacre PY, Deconinck E, Saerens L, De Beer T, Courselle P, Vancauwenberghe R, et al. Detection of counterfeit Viagra (R) by Raman microspectroscopy imaging and multivariate analysis. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 56, p. 454-461, 2011.
- [70] Ortiz RS, Mariotti KD, Limberger RP, Mayorga P. Physical profile of counterfeit tablets Viagra (R) and Cialis (R). **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 48, p. 487-495, 2012.
- [71] Ortiz RSM, K. C.; Schwab, N. V.; Sabin, P. G.; Rocha, W. F. C.; de Castro, E. VR.; Limberger, R. P.; Mayorga, P.; e Bueno, M. I. M. S. Fingerprinting of sildenafil citrate and

tadalafil tablets in pharmaceutical formulations via X-ray fluorescence (XRF) spectrometry. **Journal of Pharmaceutical e Biomedical Analysis**, v. 58, p. 7-11, 2012.

[72] Jung CR, Ortiz RS, Limberger R, Mayorga P. A new methodology for detection of counterfeit Viagra (R) and Cialis (R) tablets by image processing and statistical analysis. **Forensic SciInt**, v. 216, p. 92-96, 2012.

[73] Maria J, Noordin MI. Fast detection of sildenafil in adulterated commercial products using differential scanning calorimetry. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 115, p. 1907-1914, 2013.

[74] Pedrotti JJ, Angnes L, Gutz IGR. Miniaturized reference electrodes with microporous polymer junctions. **Electroanalysis**, v. 8, p. 673-675, 1996.

[75] Ribeiro WF. **Determinação voltamétrica de ricina em mamona usando carbono vítreo e diamante dopado com boro**. Química, editor. João Pessoa, 2012.

[76] Munoz RAA. Determinação rápida de hidroquinona usando análise por injeção em batelada (BIA) com detecção amperométrica. Uberlândia - MG. **Química Nova**. v.36 p. 5 2013.

[77] Disponível em: <http://www.ependorf.com>. Acessado em 16 de julho de 2015.

[78] Correia PRM e Ferreira MMC. Reconhecimento de padrões por métodos não supervisionados: explorandoprocedimentos quimiométricos para tratamento de dados analíticos. **Química Nova**, v. 30, p. 481-487, 2007.

[79] Gimenez DT, dos Santos WTP, Munoz RAA, Richter EM. Internal standard in flow injection analysis with amperometric detection. **Electrochemistry Communications**, v. 2, p. 216-128, 2010.