

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE QUÍMICA
GRADUAÇÃO EM QUÍMICA INDUSTRIAL

PABLO ROBERTO LINS DA SILVA

**DESENVOLVIMENTO DE UM MÉTODO SIMPLES, PORTÁTIL E DE BAIXO
CUSTO PARA A DETECÇÃO ELETROQUÍMICA DE EFEDRINA EM
SUPLEMENTOS ALIMENTARES**

UBERLÂNDIA – MG

2020

PABLO ROBERTO LINS DA SILVA

**DESENVOLVIMENTO DE UM MÉTODO SIMPLES, PORTÁTIL E DE BAIXO
CUSTO PARA A DETECÇÃO ELETROQUÍMICA DE EFEDRINA EM
SUPLEMENTOS ALIMENTARES**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia como requisito parcial para a obtenção do título de bacharel em Química Industrial.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Alejandro Abarza Muñoz.

Coorientador: Dr. Jhonys Machado de Freitas.

UBERLÂNDIA – MG

2020

PABLO ROBERTO LINS DA SILVA

**DESENVOLVIMENTO DE UM MÉTODO SIMPLES, PORTÁTIL E DE BAIXO
CUSTO PARA A DETECÇÃO ELETROQUÍMICA DE EFEDRINA EM
SUPLEMENTOS ALIMENTARES**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Instituto de Química da Universidade Federal de
Uberlândia como requisito parcial para a obtenção
do título de bacharel em Química Industrial.

Uberlândia, 03 de agosto de 2020

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Rodrigo Alejandro Abarza Muñoz.
(Orientador)

Prof. Dr. Alex Domingues Batista.
(Examinador)

MSc. Sílvia Vaz Fernandes de Castro.
(Examinadora)

AGRADECIMENTOS

- ♣ Primeiramente ao superior de todo o universo que nos oferece oportunidades de sempre evoluirmos;
- ♣ À minha família, meu pai Jefferson Roberto, minha mãe Marcia Vieira, minhas irmãs Nubia Roberta e Thayla Roberta por sempre estarem me apoiando e oferecendo todo conforto durante minha estadia neste mundo;
- ♣ Ao meu companheiro Jhonys Machado pela paciência, dedicação e ensinamentos;
- ♣ Aos professores Rodrigo Muñoz e Eduardo Richter pela confiança, orientação e paciência;
- ♣ Aos meus amigos da graduação, em especial a Ana Luiza, Júlia Queiroz e Paula Nunes, que tornaram essa fase mais legal o possível;
- ♣ Aos amigos de longa data, Carla Adriana, Erica Barbosa, Leiliane Barbosa e Marco Aurélio, por sempre estarem comigo quando preciso;
- ♣ Aos companheiros do Nupe pela amizade, ajuda, ensinamentos e por sempre serem alegres;
- ♣ Aos membros da banca por aceitarem o convite e contribuírem para o aprimoramento do trabalho;
- ♣ À Universidade Federal de Uberlândia e ao Instituto de Química pelo espaço físico;
- ♣ Ao CNPq pelo apoio financeiro;
- ♣ A todos que de alguma maneira me ajudaram durante a jornada.

RESUMO

Problemas relacionados às adulterações de medicamentos naturais para aumentar sua eficácia são bastante comuns atualmente. A efedrina está entre as substâncias frequentemente adicionadas em suplementos alimentares com o objetivo de melhorar ou potencializar efeitos farmacológicos relacionados ao emagrecimento. No entanto, vários estudos mostraram diversos efeitos colaterais após o consumo da substância. Em 2004, nos Estados Unidos, foi proibida a comercialização de suplementos contendo efedrina e considerado como adulterado qualquer suplemento no qual fosse constatada sua presença. Neste trabalho foi investigada a potencialidade do sistema de Análise por Injeção em Batelada (BIA) acoplada a voltametria de onda quadrada (SWV) usando diamante dopado com boro (BDD) como eletrodo de trabalho para análise de adulterações. O método foi empregado para o desenvolvimento de um procedimento de análise simples, de baixo custo e com características portáteis para a triagem rápida ou “*screening*” de efedrina em amostras de suplementos alimentares e fitoterápicos (chá verde, garcínia, garcínia composta, Lipo Diet Emagry[®], spirulina, Thermodrol[®]). Para isso, as amostras necessitam somente de uma etapa de dissolução no eletrólito suporte antes da análise. Utilizando as condições experimentais otimizadas, foi obtida uma faixa linear 5,0 a 40,0 mg L⁻¹ para a efedrina com um limite de detecção de 0,13 mg L⁻¹ em meio de tampão ácido acético/acetato 0,1 mol L⁻¹, pH = 4,75. O método proposto neste trabalho se mostrou ser uma ferramenta promissora para a aplicação em análises de adulterações em amostras reais.

Palavras-chaves: Análise por injeção em batelada. Diamante dopado com Boro. Fitoterápicos. Química Forense. Suplementos alimentares. Triagem. Voltametria de onda quadrada. Efedrina.

ABSTRACT

Problems related to the tampering of natural medicines to increase their effectiveness are quite common nowadays. Ephedrine is among the substances often added in dietary supplements to improve or potentiate pharmacological effects related to weight loss. However, several studies have shown various side effects after the consumption of the substance. In 2004, in the United States, the sale of supplements containing ephedrine was banned and considered as adulterated any supplement in which it was found. This work investigated the potential of the Batch Injection Analysis (BIA) coupled to square wave voltammetry (SWV) using boron-doped diamond (BDD) as the working electrode for the analysis of adulterations. The method was used for the development of a simple, low cost and portable analysis procedure for rapid screening of ephedrine in samples of food supplements and herbal supplements (green tea, garcinia, compound garcinia, Lipo Diet Emagry[®], spirulina, Thermodrol[®]). For this purpose, the samples require only one preparation step, consisting of dissolution in the electrolyte support before the analysis. Using optimized experimental conditions, a linear range of 5.0 to 40.0 mg L⁻¹ for ephedrine with a detection limit of 0.13 mg L⁻¹ was obtained in acetic acid/acetate buffer 0.1 mol L⁻¹, pH = 4.75. The method proposed in this work was shown to be a promising tool for the application in adulteration analyzes in real samples.

Keywords: Batch injection analysis. Boron-Doped Diamond. Phytotherapics. Forensic chemistry. Food supplements Screening. Square wave voltammetry. Ephedrine.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura molecular da efedrina.	15
Figura 2. (A) Voltamograma cíclico obtido e (B) perfil de varredura de potencial usado em CV. Ambos adaptados.	16
Figura 3. Forma de aplicação do potencial na SWV.	17
Figura 4. Voltamogramas esquemáticos de onda quadrada. Sendo (A) componentes de corrente de processo reversível e (B) de um processo irreversível.	18
Figura 5. Esquema de uma célula BIA com configuração <i>wall-jet</i> , adaptada ao uso do eletrodo de BDD.	20
Figura 6. (A) Esquema de posicionamento do eletrodo de BDD com o anel de borracha. (B) Vista frontal da célula estacionária. (C) Vista superior da célula estacionária, mostrando o orifício e eletrodo de trabalho no fundo da célula.	29
Figura 7. (A) Imagem da célula frontal BIA utilizada. (B) Imagem superior da tampa da célula BIA.	30
Figura 8. (A) Sistema BIA montado com a pipeta eletrônica. (B) Sistema de agitação utilizado no sistema BIA.	31
Figura 9. Esquema mostrando o procedimento de análise com o sistema BIA com as seguintes etapas da injeção: (A) instante antes da injeção sob agitação, (B) durante a injeção e a análise e (C) após a dispersão da alíquota injetada. Sendo: (a) o eletrodo de referência, (b) o contra-eletrodo, (c) a ponteira da micropipeta e (d) o micromotor DC.	32
Figura 10. Foto do sistema BIA portátil. (A) Computador para adquirir e tratar os dados. (B) Mini-potenciostato portátil conectado via Bluetooth. (C) Sistema BIA.	32
Figura 11. (A) Voltamogramas cíclicos obtidos em solução tampão BR (pH 2,0 – 7,0) com 100,0 mg L ⁻¹ de efedrina (linhas coloridas) e sem (linha preta). (B) Efeito de pH (pH 2,0 -7,0) em relação ao potencial de pico (E_p) e corrente de pico (I_p) com 100,0 mg L ⁻¹ de efedrina em 0,04 mol L ⁻¹ de solução tampão BR. Parâmetros CV: velocidade de varredura: 50,0 mV s ⁻¹ ; Step: 5,0 mV.	33

Figura 12. (A) Voltamogramas cíclicos obtidos com 100,0 mg L ⁻¹ de efedrina em solução tampão ácido acético/acetato 0,1 mol L ⁻¹ (pH 4,7) em relação a variação da velocidade de varredura. (B) Variação do potencial de pico em relação a velocidade de varredura.	34
Figura 13. Relação entre a corrente de pico e velocidade de varredura.	35
Figura 14. Relação entre o logaritmo da corrente de pico ($\log(I_p)$) e o logaritmo da velocidade de varredura ($\log(v)$).	36
Figura 15. Relação entre o potencial de pico (E_p) e $\log(v)$	37
Figura 16. Relação entre a corrente de pico e a variação (A) da frequência, (B) da amplitude e (C) do incremento de potencial. Concentração de efedrina: 30,0 mg L ⁻¹ em eletrólito tampão ácido acético/acetato 0,1 mol L ⁻¹ de pH = 4,7.	38
Figura 17. Variação da corrente de oxidação para 30,0 mg L ⁻¹ de efedrina em relação a variação do volume injetado com a velocidade igual a 78,1 $\mu\text{L s}^{-1}$	40
Figura 18. Variação da corrente de oxidação para 30,0 mg L ⁻¹ de efedrina em relação a variação da velocidade de injeção com o volume fixado a 120 μL	41
Figura 19. Curva obtida para soluções de 5,0 a 60,0 mg L ⁻¹ de efedrina. Estando nas condições experimentais: eletrólito suporte sendo uma solução tampão ácido acético/acetato 0,1 mol L ⁻¹ de pH = 4,7, $a = 70 \text{ mV}$, $f = 40 \text{ s}^{-1}$ e $\Delta E_s = 6 \text{ mV}$	42
Figura 20. Voltamogramas de onda quadrada sobrepostos para (A) 40,0 mg L ⁻¹ e (B) 5,0 mg L ⁻¹ de efedrina em 15 injeções consecutivas. Resultados de corrente de pico (I_p) obtidos por BIA-SWV para 15 injeções sucessivas de soluções contendo (C) 40,0 mg L ⁻¹ (●) e 5,0 mg L ⁻¹ (■). Demais condições: Fig. 19.	43
Figura 21. Voltamogramas de onda quadrada obtidos para uma solução de chá verde em solução tampão ácido acético/acetato 0,1 mol L ⁻¹ antes (—) e depois (—) da dopagem. Concentração final de efedrina: 10,0 mg L ⁻¹ . Demais condições: Fig. 19.	44
Figura 22. Voltamogramas de onda quadrada obtidos para uma solução de (A) garcínia composta e (B) garcínia pura, ambas em solução tampão ácido acético/acetato 0,1 mol L ⁻¹ antes (—) e depois da dopagem. Concentração final de efedrina: 10,0 mg L ⁻¹ . Demais condições: Fig. 19.	45

Figura 23. Voltamogramas de onda quadrada obtidos para uma solução de Lipo Diet Emagry® em tampão ácido acético/acetato 0,1 mol L ⁻¹ antes (—) e depois (—) da dopagem. Concentração final de efedrina: 10,0 mg L ⁻¹ . Demais condições: Fig. 19.	46
Figura 24. Voltamogramas de onda quadrada obtidos para uma solução de spirulina em solução tampão ácido acético/acetato 0,1 mol L ⁻¹ antes (—) e depois (—) da dopagem. Concentração final de efedrina: 10,0 mg L ⁻¹ . Demais condições: Fig. 19.	47
Figura 25. Voltamogramas de onda quadrada obtidos para uma solução de Thermodrol® em solução tampão acetato 0,1 mol L ⁻¹ antes (—) e depois (—) da dopagem. Concentração final de efedrina: 10,0 mg L ⁻¹ . Demais condições: Fig. 19.	48
Figura 26. Voltamogramas de onda quadrada obtidos para seis soluções de amostras dopadas com 10,0 mg L ⁻¹ de efedrina antes e depois de cinco adições sucessivas de 5,0 mg L ⁻¹ de efedrina para (A) spirulina e (B) Thermodrol®. Demais condições: Fig. 19.	49
Figura 27. Voltamogramas de onda quadrada obtidos para seis soluções de amostras dopadas com 5,0 mg L ⁻¹ de efedrina antes e depois de cinco adições sucessivas de 5,0 mg L ⁻¹ de efedrina para (A) chá verde; (B) garcínica; (C) garcínica composta e (D) Lipo Diet Emagry®. Demais condições: Fig. 19.	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Lista de reagentes usados no estudo e suas respectivas especificações.	26
Tabela 2. Características e composições declaradas das amostras utilizadas para identificação de adulterações por efedrina.	27

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SIMBOLOS

a – Amplitude de aplicação do pulso de potencial

BDD – Diamante dopado com boro, do inglês “*Boron-Doped Diamond*”

BIA – Análise por injeção em batelada, do inglês “*Batch Injection Analysis*”

BIA-SWV – Análise por injeção em batelada com detecção por voltametria de onda quadrada

BR – Britton-Robbinson

CV – Voltametria cíclica, do inglês “*Cyclic Voltammetry*”

CVD – Deposição química em fase de vapor, do inglês “*Chemical Vapor Deposition*”

DPR – Desvio padrão relativo

E – Potencial

EFD – Efedrina

E_p – Potencial de pico

E_{pa} – Potencial de pico anódico

E_{pc} – Potencial de pico catódico

E° – Potencial formal

F – Constante de Faraday

f – Frequência

FDA – *Food and Drug Administration*

I – Corrente

I_d – Corrente direta

I_p – Corrente de pico

I_r – Corrente reversa

k° - Constante de velocidade heterogênea

LD – Limite de Detecção

LQ – Limite de Quantificação

n – Número de elétrons transferidos durante a oxidação

R – Constante universal dos gases

R^2 – Coeficiente de determinação

rpm – Rotação por minuto

S – Coeficiente angular da curva de calibração

s_B – Desvio padrão do branco

SWV – Voltametria de onda quadrada, do inglês “Square Wave Voltammetry”

t – Largura do pulso

T – Temperatura termodinâmica

α – Coeficiente de transferência de carga

τ – Período

ν – Velocidade de varredura

ΔE_s – Incremento de potencial

ΔI – Corrente resultante

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	14
1.1	Considerações Gerais.....	14
1.2	Efedrina.....	14
1.3	Técnicas eletroquímicas.....	16
1.3.1	Voltametria cíclica.....	16
1.3.2	Voltametria de onda quadrada.....	17
1.4	Eletrodo de diamante dopado com boro (BDD).....	18
1.5	Análise por injeção em batelada (BIA).....	20
1.6	Parâmetros analíticos utilizados nos métodos propostos.....	21
1.6.1	Especificidade e seletividade.....	21
1.6.2	Sensibilidade.....	22
1.6.3	Linearidade.....	22
1.6.4	Limite de detecção.....	22
1.6.5	Limite de quantificação.....	23
1.6.6	Repetibilidade.....	23
1.6.7	Recuperação.....	24
2	OBJETIVOS.....	25
2.1	Objetivos gerais.....	25
2.2	Objetivos específicos.....	25
3	PARTE EXPERIMENTAL.....	26
3.1	Reagentes e soluções.....	26
3.2	Amostras de fitoterápicos.....	27
3.3	Instrumentação.....	28
3.3.1	Medidas eletroquímicas.....	28
3.3.2	Eletrodos.....	28

3.3.3	Célula eletroquímica para medidas estacionárias e sistema BIA	29
4	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	33
4.1	Comportamento eletroquímico da efedrina	33
4.2	Estudo e otimização dos parâmetros de SWV	37
4.3	Aplicação do método SWV estudado ao sistema BIA	39
4.4	Faixa Linear	41
4.5	Repetibilidade	42
4.6	Aplicação do método desenvolvido para triagem (“ <i>screening</i> ”) de efedrina em amostras reais.....	43
4.6.1	Chá verde	44
4.6.2	Garcínia composta e Garcínia	45
4.6.3	Lipo Diet Emagry®	46
4.6.4	Spirulina	47
4.6.5	Thermodrol®	48
4.7	Aplicando o método BIA-SWV para a quantificação da efedrina em amostra de suplementos alimentares.....	49
5	CONCLUSÕES	53
	REFERÊNCIAS	54

1 INTRODUÇÃO

1.1 Considerações Gerais

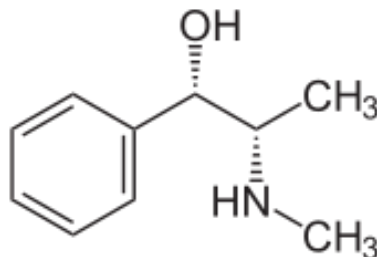
A obesidade tem sido considerada a mais importante desordem nutricional em vários países (PINHEIRO; FREITAS; CORSO, 2004). Para alcançar o propósito de uma melhor qualidade de vida e obter uma melhor estética corporal, as pessoas recorrem a suplementos naturais e/ou fitoterápicos que contenham substâncias estimulantes (efedrina, cafeína etc.). Tais substâncias colaboram com a perda de peso, e são utilizadas como meios alternativos ao uso de medicamento sintético com a concepção errada de que não oferecem riscos à saúde ou que não possuem efeitos colaterais, por serem de fontes naturais.

Assim, os suplementos naturais ou fitoterápicos vêm se tornando um complemento alimentar mais popular na dieta para obter uma vida mais saudável, uma vez que a maioria destes são à base de ervas (CALAHAN et al., 2016). Entretanto, diversos estudos mostraram um número crescente de relatos sobre adulteração de suplementos naturais usando substâncias não adequadas como agentes de perda de peso (LIU; LU, 2017). Essa adulteração é feita para desenvolver uma ação farmacológica imediata ou intensificar os efeitos dos suplementos dietéticos (CALAHAN et al., 2016). Além disso, os suplementos dietéticos adulterados com fármacos aumentam os riscos à saúde, pois podem conter substâncias não declaradas no rótulo (HANEED et al., 2013). De acordo com a literatura, a efedrina é uma das substâncias frequentemente usadas na adulteração de fitoterápicos (LV et al., 2015).

1.2 Efedrina

A efedrina é um alcaloide e pode ser obtida por extração de várias plantas do gênero *Ephedra* ou por vias sintéticas. Seu uso é liberado pela Anvisa desde que seja acompanhada de receita médica (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2016). É uma droga usada em doses terapêuticas em níveis de 15,0 a 60,0 mg para produzir a contração das fibras dos musculares dos vasos sanguíneos. Inclusive, tem como finalidade regular a temperatura corporal, elevar a pressão arterial, prevenir a hipotensão, tratar de estados alérgicos e doenças neuromusculares (CHICHARRO et al., 1993). A Figura 1 apresenta a estrutura molecular da efedrina.

Figura 1. Estrutura molecular da efedrina.



Fonte: O próprio autor.

Suplementos dietéticos contendo alcalóides da *Ephedra* (também conhecidos como *ma huang*) são consumidos para fins de redução de peso e aumento de energia (HALLER; BENOWITZ, 2002). Porém, o uso da efedrina tem sido associado a diversos eventos cardiovasculares como infarto agudo do miocárdio, hipertensão grave, miocardite, arritmias cardíacas letais e podem predispor os pacientes ao AVC hemorrágico e isquêmico (HALLER; BENOWITZ, 2002).

O comitê de substâncias proibidas da Agência Mundial Antidoping estabeleceu uma concentração máxima de 10,0 mg L⁻¹ de efedrina na urina (WORLD ANTI-DOPING AGENCY, 2017) sendo que cerca de 60% de efedrina inalterada é excretada na urina (CHICHARRO et al., 1993). Além disso, em 2004 a FDA proibiu a comercialização de suplementos alimentares contendo efedrina, estabelecendo que qualquer suplemento onde fosse constatada sua presença seria considerado como adulterado (FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, HHS, 2004).

Nesse contexto, vários estudos usando diferentes técnicas foram relatados na literatura para a detecção de efedrina, como cromatografia líquida com detecção por espectrometria de massa (DECONINCK et al., 2016; GIRISH et al., 2020; KIM et al., 2014, 2016; SHI et al., 2011; TAGHVIMI; HAMIDI; NEMATI, 2019), cromatografia gasosa (VAYSSE et al., 2010), cromatografia em camada fina (LV et al., 2015), espectroscopia ordenada por difusão e ressonância magnética nuclear de ¹H (VAYSSE et al., 2010), eletroforese capilar (CIANCHINO et al., 2008; PHINNEY; IHARA; SANDER, 2005) e métodos espectrofotométricos (DECONINCK et al., 2016). Métodos que empregam técnicas eletroquímicas para determinar a efedrina (BAGHERI et al., 2016; HASSAN; KAMEL; EL-NABY, 2013; MAZZOTTA et al., 2008) também foram relatados, no entanto nenhum desses métodos foi aplicado a amostras de suplementos ou fitoterápicos. Assim, neste trabalho foram

empregadas algumas técnicas eletroquímicas para o estudo do comportamento da efedrina e sua detecção em suplementos alimentares.

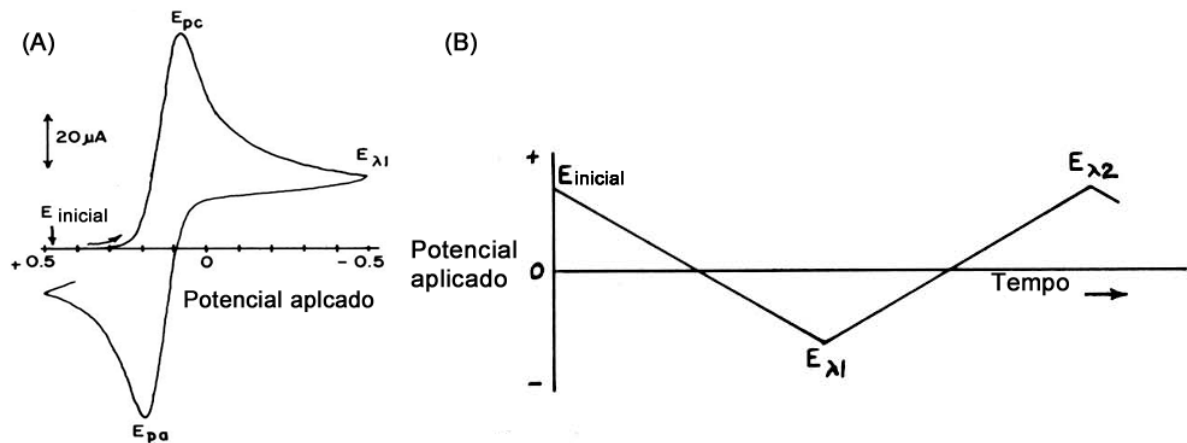
1.3 Técnicas eletroquímicas

1.3.1 Voltametria cíclica

A voltametria cíclica (CV, do inglês *Cyclic Voltammetry*) é talvez a técnica eletroanalítica mais versátil para o estudo da eletroatividade das espécies (MARKEN; NEUDECK; BOND, 2010). Sendo, também, a mais utilizada para obter informações qualitativas a respeito das reações eletroquímicas (DIAMOND, 2003). Devido a essas características, frequentemente a CV é o primeiro experimento a ser feito para estudar o comportamento eletroquímico de uma espécie eletroativa, como os potenciais onde as reações redox ocorrem, avaliar a superfície do eletrodo e estudar o efeito do eletrólito e do meio utilizado ao longo de um intervalo de potencial.

No experimento com a voltametria cíclica, a polarização do eletrodo de trabalho é realizada de forma linear a partir de um potencial inicial até um potencial limite determinado, onde a varredura é invertida até atingir o potencial de partida novamente. Como resultado, é obtido um voltamograma relacionando o potencial aplicado com a corrente resultante. Este gráfico é denominado voltamograma (MABBOTT, 1983) A Figura 2A apresenta o voltamograma cíclico obtido para um perfil predominantemente faradaico com os respectivos potenciais de pico anódico (E_{pa}) e catódico (E_{pc}) de uma espécie eletroativa e a programação de potencial aplicado (Figura 2B).

Figura 2. (A) Voltamograma cíclico obtido e (B) perfil de varredura de potencial usado em CV.



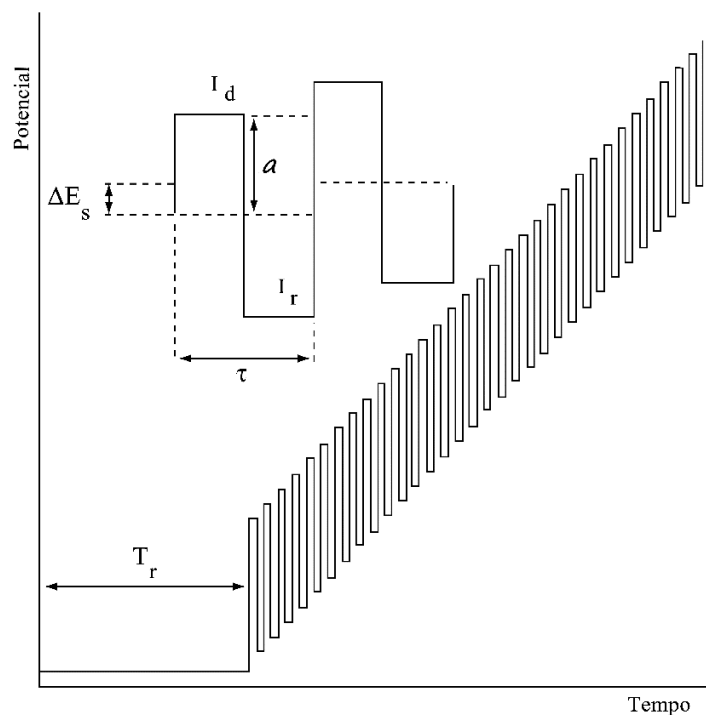
Fonte: Ambas adaptadas de (MABBOTT, 1983).

O estudo do voltamograma cíclico indica o potencial onde ocorre a reação de oxidação e/ou redução da espécie eletroativa. Informações sobre os mecanismos de reações, como a quantidade de elétrons e prótons envolvidos, uma possível formação de espécies intermediárias, se o processo eletroquímico se trata de um sistema reversível, irreversível ou quase reversível podem ser obtidos (MARKEN; NEUDECK; BOND, 2010).

1.3.2 Voltametria de onda quadrada

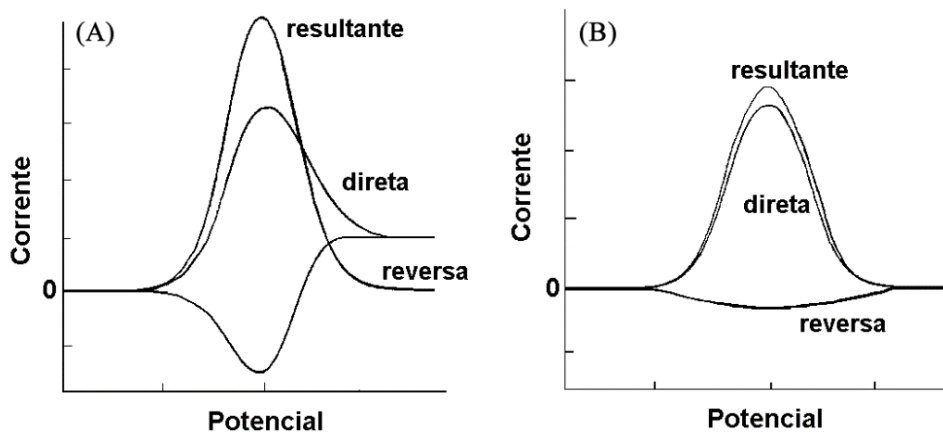
Na voltametria de onda quadrada (SWV, do inglês *Square Wave Voltammetry*) a curva de corrente-potencial provém da aplicação de pulsos de potenciais de amplitude a (amplitude do pulso de potencial), que variam de acordo com uma escada de potencial com altura ΔE_s (incremento de potencial) e uma duração τ (período) como é mostrado na Figura 3. A largura do pulso ($\tau/2$) é chamada de t e a frequência de aplicação dos pulsos é denominada f e é dada por $1/t$. Além disso, as correntes elétricas são medidas ao final de cada pulso direto (I_d) e reverso (I_r) e o sinal é obtido como uma corrente resultante (ΔI), que é a diferença entre as correntes direta e reversa ($\Delta I = I_d - I_r$) (SOUZA; MACHADO; AVACA, 2003), como é mostrado na Figura 4. O método apresenta alta sensibilidade com a corrente capacitiva sendo minimizada devido a forma de aquisição do sinal, obtendo-se respostas com perfil puramente faradaico.

Figura 3. Forma de aplicação do potencial na SWV.



Fonte: (WANG, 2006).

Figura 4. Voltamogramas esquemáticos de onda quadrada. Sendo (A) componentes de corrente de processo reversível e (B) de um processo irreversível.



Fonte: (SOUZA; MACHADO; AVACA, 2003).

A SWV apresenta grandes vantagens devido à ausência da interferência da corrente capacitiva, uma vez que as medidas de corrente são realizadas ao final de cada degrau de potencial onde a corrente capacitiva tem uma contribuição mínima, pois o decaimento da corrente capacitiva é mais rápido que o decaimento da corrente faradaica (SOUZA et al., 2004). Assim como na CV, a análise de componentes de corrente direta e reversa possibilita a obtenção de dados das reações eletroquímicas. No entanto, em SWV pode-se utilizar altas velocidades de varredura sem a perda da resolução.

Ambas as técnicas discutidas, CV e SWV, foram empregadas utilizando o eletrodo de diamante dopado com boro como eletrodo de trabalho. A CV foi empregada para estudar tanto o meio como eletrólito suporte e o melhor pH quanto para estudar o comportamento eletroquímico da efedrina. A SWV foi empregada para detecção e quantificação da efedrina em amostras utilizadas neste trabalho.

1.4 Eletrodo de diamante dopado com boro (BDD)

O eletrodo de diamante dopado com boro (BDD, do inglês *Boron-Doped Diamond*) é um material a base de carbono que vem sendo usado com sucesso no desenvolvimento de métodos eletroanalíticos para diferentes aplicações (DUO et al., 2002; INIESTA et al., 2001; SALAZAR-BANDA et al., 2006).

O filme de diamante pode ser sintetizado através da deposição química em fase de vapor (CVD, do inglês, *Chemical Vapor Deposition*), por plasma de micro-ondas, filamento quente ou assistida por chama, para formar um filme fino sobre um substrato. A deposição pode ser feita em diferentes substratos condutores como silício, tungstênio, titânio e molibdênio (CÁSSIA et al., 2005). Os reagentes empregados são metano ou outras substâncias orgânicas como fonte de carbono (etanol ou acetona) diluídos em hidrogênio. Para aumentar a qualidade final dos filmes, também podem ser usados compostos halogenados ou pequenas frações de oxigênio. O diamante, tem uma resistividade alta na ordem de $10^{16} \Omega \text{ cm}$, e é considerado um material isolante. Assim, a dopagem do filme de diamante faz com que o material adquira boa condutividade para ser empregado como eletrodo (HARAM, 2007).

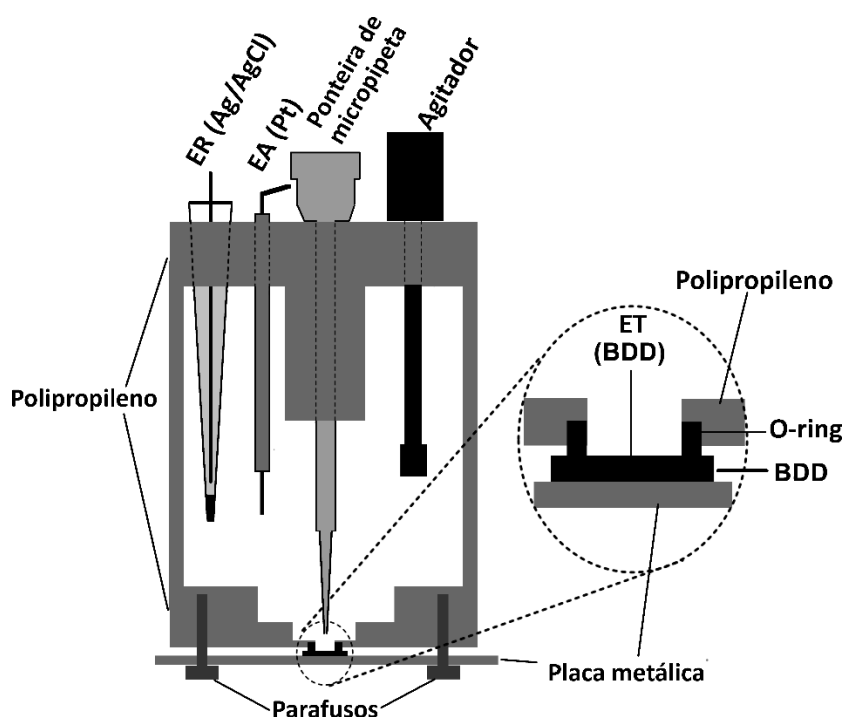
Os dopantes mais comuns são boro, nitrogênio, fósforo, enxofre e, algumas vezes, codopantes com boro-enxofre e nitrogênio-boro. O boro é o dopante mais utilizado durante a produção de eletrodos de diamantes condutores, pois possui menor energia de ativação como transportador de carga (0,37 eV). A dopagem de boro ocorre durante o crescimento do filme de diamante, ao se adicionar substâncias contendo boro como diborano, trimetilborato ou óxido de boro à mistura de gás empregados para a deposição no substrato (KRAFT, 2007). Além disso, a dopagem com o boro leva a um semicondutor do tipo p e a resistividade do filme de diamante depende da concentração de boro no filme, sendo inversamente proporcional. Ou seja, as propriedades do filme podem ser desde um material dielétrico, semicondutor, semicondutor degenerado a um semimetal, à medida que a concentração do dopante aumenta (PLESKOV, 2000).

As vantagens do BDD, quando comparado a outras formas de carbono, estão relacionadas principalmente à reprodutibilidade do estado de sua superfície, à ampla janela de potencial com baixa corrente de fundo juntamente com as correntes capacitivas quase desprezíveis (CODOGNOTO et al., 2004). Além disso, possui cinética relativamente rápida de transferência de elétrons, baixa adsorção molecular, além de estabilidade mecânica e química (FUJISHIMA et al., 2005). Com isso, o uso do BDD como eletrodo de trabalho tem sido bastante relatado na literatura em diferentes sistemas de análise (ALPAR et al., 2017; OLIVEIRA et al., 2018; TORMIN et al., 2012; WONG; SANTOS; FATIBELLO-FILHO, 2018). Portanto, neste trabalho o BDD foi escolhido para o estudo eletroquímico e desenvolvimento de um novo método de detecção para efedrina.

1.5 Análise por injeção em batelada (BIA)

Análise por injeção em batelada (BIA, do inglês, *Batch Injection Analysis*), apresentado pela primeira vez em 1991 por Wang e Taha, é uma técnica na qual consiste em injetar uma pequena quantidade de amostra, com auxílio de uma micropipeta (normalmente eletrônica) posicionada opostamente ao eletrodo de trabalho (arranjo *wall-jet*), na superfície do detector (eletrodo de trabalho) imerso em um grande volume de solução inerte (WANG; TAHA, 1991). A Figura 5 apresenta o esquema da célula BIA com detecção eletroquímica, adaptada para o uso do eletrodo de BDD.

Figura 5. Esquema de uma célula BIA com configuração *wall-jet*, adaptada ao uso do eletrodo de BDD.



Fonte: Adaptada de (TORMIN et al., 2011).

O sistema BIA tem como característica rapidez, boa repetibilidade, reprodutibilidade, simplicidade e capacidade de trabalhar com pequenas quantidades de reagentes e amostras. Para isso, o uso de uma micropipeta eletrônica programável é necessário para garantir uma alta reprodutibilidade (GIMENES et al., 2012). Além disso, outra característica do sistema BIA é a menor possibilidade de contaminação da superfície do eletrodo de trabalho uma vez que o analito passa um menor tempo em contato com o eletrodo durante a análise (QUINTINO; ANGNES, 2004) permitindo ainda análises sequenciais sem a necessidade de troca do sistema eletroquímico.

A portabilidade do sistema BIA é garantida devido a célula ter uma base adequada para sustentá-la. Além disso, por utilizar uma tampa para colocar os eletrodos sem necessidade de suportes para mantê-los, juntamente com a utilização de potenciostato portátil alimentado por bateria e micropipeta eletrônica. O sistema BIA com detecção eletroquímica vem se tornando um método bastante promissor devido a portabilidade, simplicidade e a capacidade de realizarem análises rápidas e de baixo custo. Assim, vários métodos foram apresentados nos últimos anos envolvendo detecção por SWV (FREITAS et al., 2017; OLIVEIRA et al., 2016; SILVA et al., 2017).

1.6 Parâmetros analíticos utilizados nos métodos propostos

Os parâmetros para validação de métodos analíticos envolvem: seletividade; linearidade e faixa de aplicação; precisão; exatidão; limite de detecção; limite de quantificação, robustez, dentre outros. Estes termos são conhecidos como parâmetros de desempenho analítico ou como figuras analíticas de mérito (RIBANI et al., 2004; RIBEIRO et al., 2008). A seguir, uma breve descrição dos parâmetros utilizados no presente trabalho.

1.6.1 Especificidade e seletividade

A especificidade e seletividade são relacionadas a detecção analítica de uma espécie de interesse. Isto é, um método instrumental que produz resposta para uma única substância de interesse, na presença de outras, pode ser chamado de específico. Um método que produz resposta para vários compostos com uma característica em comum, mas que se pode distinguir a resposta de um analito dos outros, pode ser chamado de seletivo (VAN STADEN et al., 2007). Portanto, ao desenvolver um método, é necessário garantir a detecção das substâncias químicas de interesse na presença de componentes que podem interferir na detecção, seja em uma amostra complexa, ingrediente ativo, impurezas ou outra espécie com propriedades semelhantes (RIBANI et al., 2004).

1.6.2 Sensibilidade

A sensibilidade da curva de calibração é a variação do sinal analítico obtido em relação a variação da concentração da espécie eletroativa de interesse. Isto é, a inclinação da curva de calibração. Se a relação entre os parâmetros é linear, a sensibilidade será constante e independente da concentração. Se a curva não for linear, a sensibilidade variará com a concentração e não terá um valor único (RIBANI et al., 2004).

1.6.3 Linearidade

A linearidade de um método corresponde a capacidade de expressar uma faixa a qual o sinal analítico é linearmente dependente e proporcional a concentração, a equação matemática pode ser expressa como uma equação de reta conhecida como curva analítica ou curva de calibração (RIBEIRO et al., 2008).

A curva de calibração proporciona a equação da reta que relaciona dois coeficientes de regressão:

$$y = bx + a$$

Onde: y é a resposta ou sinal analítico, x é a concentração, b é a inclinação da curva de calibração (sensibilidade) e a é interseção com o eixo y , quando x é igual a zero.

Na prática, as linhas devem ser definidas por no mínimo cinco pontos que não incluam o ponto zero na curva, devido aos possíveis erros associados. Além disso, deve ser feito no mínimo três vezes cada análise, com estimativa do desvio padrão relativo (DPR) inferior a 5% (RIBANI et al., 2004). A relação linear, equação $y = bx + a$, só é válida em um determinado intervalo de concentração da espécie medida. Este intervalo de concentrações, no qual se pode construir uma curva analítica linear, é a faixa linear dinâmica.

1.6.4 Limite de detecção

O limite de detecção (LD) representa a menor concentração da espécie de interesse que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada. Para determinar LD, o método de estimativa do limite de detecção baseando-se em parâmetros da curva analítica, frequentemente, é o mais empregado (RIBANI et al., 2004). Pode ser expresso como:

$$LD = 3 \times s_B / S$$

Onde: s_B é o desvio padrão do branco e S é o coeficiente angular da curva de calibração ou sensibilidade da calibração.

1.6.5 Limite de quantificação

O limite de quantificação (LQ) é determinado pela análise de amostras com concentrações conhecidas da espécie de interesse, e corresponde à menor concentração que pode ser quantificada dentro dos limites de exatidão (proximidade dos resultados obtidos pelo método em um estudo em relação ao valor verdadeiro) e precisão (concordância entre vários resultados obtidos da mesma forma) do método (RIBEIRO et al., 2008). O LQ pode ser expresso como:

$$LQ = 3,33 \times LD$$

1.6.6 Repetibilidade

É o grau de concordância entre os resultados de medições sucessivas efetuadas sob as mesmas condições de medição, chamadas de condições de repetitividade (mesmo procedimento de medição; mesmo observador; mesmo instrumento usado sob mesmas condições; mesmo local, e repetições em curto espaço de tempo) (RIBANI et al., 2004).

A repetibilidade do método é verificada contemplando uma faixa de concentração dentro do intervalo linear do método e pode ser expressa quantitativamente como o desvio padrão ou desvio padrão relativo de uma série de medidas (FREITAS, 2015). O desvio padrão relativo (DPR) é calculado da seguinte forma:

$$DPR (\%) = \frac{DP_x}{\bar{x}} \times 100$$

Onde: DP_x é o desvio padrão da concentração encontrada e \bar{x} é a concentração média encontrada.

1.6.7 Recuperação

A recuperação (ou fator de recuperação) é definida como a proporção da quantidade da substância de interesse, presente ou adicionada (“*spiked*”) na porção analítica do material teste, que é extraída e passível de ser quantificada (RIBANI et al., 2004). A recuperação é calculada a partir da equação:

$$\text{Recuperação (\%)} = \left(\frac{C_1 - C_2}{C_3} \right) \times 100$$

Onde: C_1 a concentração do analito na amostra fortificada, C_2 a concentração do analito na amostra não fortificada e C_3 a concentração do analito adicionada à amostra fortificada.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

O objetivo deste trabalho é o desenvolvimento de um método eletroquímico simples, de baixo custo e portátil para uma análise em campo (“*in loco*”) com a finalidade de uma triagem rápida para detectar adulterações com efedrina em suplementos alimentares ou fitoterápicos usados para intensificar e acelerar o processo de emagrecimento, empregando a análise por injeção em batelada com detecção por voltametria de onda quadrada (BIA-SWV) utilizando o eletrodo de diamante dopado com boro.

2.2 Objetivos específicos

Os objetivos específicos do trabalho:

- ❖ Estudo do meio para obter o melhor sinal utilizando BDD como eletrodo de trabalho;
- ❖ Estudo do comportamento eletroquímico da efedrina e o número de elétrons envolvidos na reação redox;
- ❖ Desenvolvimento de um método simples e rápido (BIA-SWV) para a detecção de efedrina em amostras de suplementos alimentares e fitoterápicos;
- ❖ Quantificação da efedrina em amostras reais.

3 PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Reagentes e soluções

Todas soluções foram preparadas com água deionizada de alta pureza (resistividade superior a 18 M Ω cm) obtida de sistema de purificação de água Milli Q (Millipore, Bedford, MA, USA). O padrão de efedrina utilizado foi obtido de Fagron (Índia). Todos reagentes utilizados neste trabalho apresentam pureza analítica e foram utilizados sem purificação prévia. As especificações dos reagentes utilizados são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Lista de reagentes usados no estudo e suas respectivas especificações.

Reagente	Empresa	Origem	Teor (%)
Ácido sulfúrico	Vetec	Rio de Janeiro – Brasil	95 – 99
Ácido acético	Vetec	Rio de Janeiro – Brasil	99,7
Ácido fosfórico	Synth	Diadema – Brasil	85,0
Ácido bórico	Panreac	Barcelona – Espanha	99,5
Hidróxido de sódio	Panreac	Barcelona – Espanha	98,0

Fonte: O próprio autor.

Para o estudo do comportamento eletroquímico da efedrina em função do pH, foi preparada uma solução tampão Britton-Robbinson (BR) composta por 0,04 mol L⁻¹ de ácido bórico (pKa = 9,2) (YIN; LIN, 1996), 0,04 mol L⁻¹ de ácido fosfórico (pKa = 2,15; 7,1 e 12,4) (OLOFSSON; SPARR, 2013) e 0,04 mol L⁻¹ ácido acético (pKa = 4,76) (WARING, 2002). Soluções tampão BR de diferentes pHs (2,0 a 7,0) foram preparados com o auxílio de um pHmetro e de uma solução de hidróxido de sódio 5,0 mol L⁻¹.

Após otimizado o pH correspondente ao melhor sinal eletroquímico, foi definido o eletrólito suporte como sendo o tampão ácido acético/acetato 0,1 mol L⁻¹ a pH igual 4,7. No preparo desse eletrólito de suporte, 5,74 mL de ácido acético comercial foram diluídos em água deionizada em um balão volumétrico de 1,0 L. Todas as amostras utilizadas neste trabalho foram preparadas por diluição diretamente no eletrólito enquanto as soluções de estoque de efedrina (10 mL) foram preparadas na concentração de 1000,0 mg L⁻¹ em água deionizada.

3.2 Amostras de fitoterápicos

Nos estudos de adulteração de suplementos alimentares e/ou fitoterápicos com efedrina, seis amostras foram adquiridas em diferentes lojas locais, sendo cinco formulações para emagrecimento contendo somente produtos de fontes naturais e um suplemento à base de cafeína. Informações como o nome comercial, forma física e composição declarada são apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2. Características e composições declaradas das amostras utilizadas para identificação de adulterações por efedrina.

Amostra	Nome comercial	Forma física	Composição declarada
1	Chá verde	Cápsula	<i>Camellia sinensis</i>
2	Garcínia	Cápsula	<i>Garcinia cambogia</i>
3	Garcínia composta	Cápsula	<i>Garcinia camboria e centella asiática</i>
4	Lipo Diet Emagry®	Cápsula	(a)
5	Spirulina	Cápsula	<i>Arthrospira plantensis e Arthrospira máxima</i>
6	Thermodrol®	Cápsula	<i>Caféina</i>

(a) alcachofra, berinjela, beterraba, chia, gengibre, laranja amarga, linhaça, maracujá, maca peruana (*Lepidium meyenii*) e psyllium (*plantago ovata*).

Fonte: O próprio autor.

No preparo das amostras de suplementos alimentares, 10 cápsulas do mesmo produto foram abertas e os conteúdos misturados e homogeneizados. Em seguida, um grama de cada amostra pura foi pesado e transferido para um tubo de centrífuga de 15 mL. Para as amostras dopadas, adicionou-se 1% (m/m) do padrão de efedrina, misturando-se 0,99 g das amostras com 0,01 g do padrão e transferidos para os tubos de centrífuga de 15 mL. Posteriormente, 10 mL de eletrólito suporte foram então adicionados nos tubos e agitados manualmente, em seguida os tubos foram deixados em repouso por 10 minutos para decantação de sólidos insolúveis. Após o preparo, todas amostras foram adequadamente diluídas até o intervalo de concentrações linear para cada método proposto. A proporção de dopante nas

amostras foi definida levando em conta a posologia indicada do suplemento e a quantidade da substância adulterante possivelmente contida em uma amostra real.

3.3 Instrumentação

3.3.1 Medidas eletroquímicas

Todas as medidas eletroquímicas foram realizadas empregando um potenciostato μ AUTOLAB tipo III (Eco Chemie, Utrecht, The Netherlands – Metrohm[®]) conectado a um computador e controlado por meio do software NOVA 2.1. Nos voltamogramas de onda quadrada mostrados neste trabalho foi realizado a correção da linha-base por meio do software NOVA 2.1 e todos os dados foram tratados utilizando softwares Microsoft Office Excel 365 e Origin Pro 7.

3.3.2 Eletrodos

Neste trabalho foi utilizado como eletrodo de trabalho o diamante dopado com boro (BDD; área geométrica igual a $22,9 \text{ mm}^2$) adquirido da empresa Adamant Technologies SA, La Chaux-de-Fonds, Suíça (atualmente chamada NeoCoat AS – La Chaux-de-Fonds, Suíça). Trata-se de uma base de silício ($0,7 \times 0,7 \text{ cm}$) com espessura de aproximadamente $1,2 \text{ mm}$ coberto por um filme de diamante ($\sim 1,2 \mu\text{m}$) com nível de dopagem de boro de 7000 a 8000 ppm.

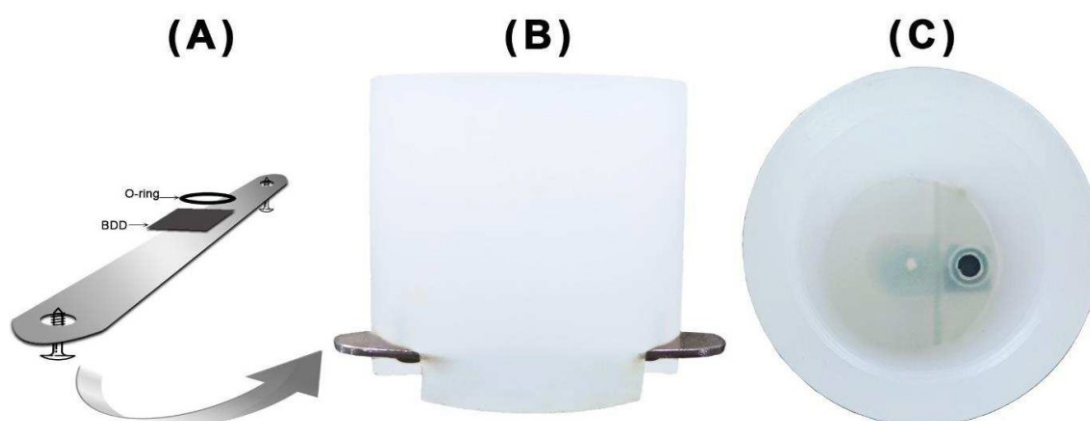
Antes do início das medidas eletroquímicas, o eletrodo BDD foi submetido a um processo de ativação/limpeza. Neste trabalho dois modos de limpeza eletroquímica foram empregados: i) a ativação anódica (aplicando uma corrente de $+0,01 \text{ A}$) em uma solução tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ de cada ácido constituinte ($\text{pH} = 1,8$) (TERASHIMA et al., 2003) antes do primeiro uso do eletrodo ou quando o voltamograma apresentasse muito ruído e ii) a ativação catódica (aplicando uma corrente de $-0,01 \text{ A}$) em meio de H_2SO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (SALAZAR-BANDA et al., 2006). O tempo de ativação era de 15 minutos quando utilizado somente a ativação catódica e de 30 minutos ($15 + 15$) quando realizado tanto a ativação anódica quanto a catódica. Quando efetuado a anódica, sempre foi necessário efetuar a ativação catódica depois. Além disso, a ativação catódica foi realizada diariamente antecipadamente ao uso, para gerar uma superfície com mais terminações em hidrogênio tornando a transferência eletrônica facilitada e a superfície mais condutiva.

Em todos experimentos foi utilizado como eletrodo de referência um mini eletrodo de referência Ag/AgCl (KCl_{sat}) (PEDROTTI; ANGNES; GUTZ, 1996) preparado no próprio laboratório pela eletrodeposição de AgCl sobre um fio de Ag através da aplicação de +0,3 V em meio de uma solução de HCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ durante 1 hora. Como eletrodo auxiliar ou contra-eletrodo, foi utilizado um fio de platina.

3.3.3 Célula eletroquímica para medidas estacionárias e sistema BIA

Nas medidas voltamétricas estacionárias com eletrodo BDD, foi utilizado uma célula de polipropileno ($\sim 10 \text{ mL}$) como mostrado na Figura 6. Os eletrodos de referência e contra-eletrodo foram situados na célula com auxílio de uma garra de fixação. A célula possui um orifício no fundo no qual permite o contato do eletrodo de trabalho BDD com a solução dentro da célula. Com o auxílio de um anel (“o-ring”) de borracha, o eletrodo BDD é mantido e pressionado contra uma placa metálica que é fixada com auxílio de parafusos no fundo da parte externa da célula. A placa metálica serve como contato elétrico entre o eletrodo de trabalho e os cabos do potenciostato. A agitação foi realizada com a ajuda de uma barra metálica cabível na célula a qual não entrava em contato com o eletrodo de trabalho. Todos os experimentos foram realizados sem a remoção de O_2 dissolvido e sem um banho termostático (temperatura ambiente).

Figura 6. (A) Esquema de posicionamento do eletrodo de BDD com o anel de borracha. (B) Vista frontal da célula estacionária. (C) Vista superior da célula estacionária, mostrando o orifício e eletrodo de trabalho no fundo da célula.

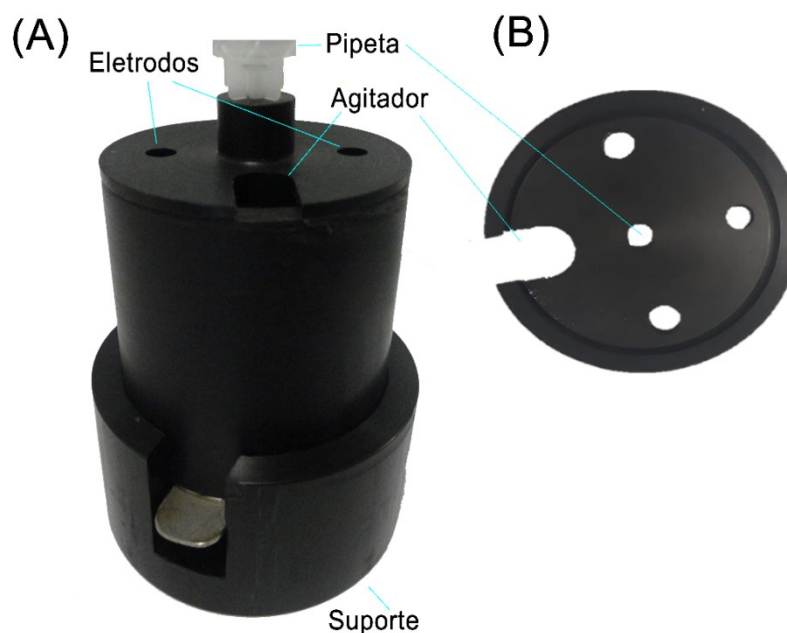


Fonte: (SILVA, 2017).

Nos estudos com o sistema BIA, foi utilizada uma célula construída no próprio laboratório (TORMIN et al., 2011) e aprimorada com o auxílio da oficina da Faculdade de Mecânica – UFU. A Figura 7 apresenta a respectiva célula constituída a partir de um tarugo de polipropileno com as dimensões: $\varnothing_{\text{externo}} = 7,5$ cm; comprimento = 6 cm; $\varnothing_{\text{interno}} = 6$ cm; profundidade de 5 cm; volume total igual a, aproximadamente, 150 mL. No furo efetuado no centro da base foi posicionado o eletrodo de BDD com auxílio de um anel de borracha (o-ring) de forma similar a célula estacionária. A área útil do eletrodo de BDD é definida pelo diâmetro interno deste anel (5 mm; área = 22,9 mm²). O eletrodo BDD é mantido e pressionado contra uma placa metálica que é fixada com auxílio de parafusos no fundo da parte externa da célula. A placa metálica além de fixar o eletrodo de trabalho, é útil para manter o contato elétrico.

Uma tampa de polipropileno foi fixada no lado aberto do tarugo. Figura 7B apresenta quatro orifícios da tampa, sendo o furo central (na mesma direção do eletrodo de trabalho na base da célula) para o encaixe da ponteira da pipeta eletrônica. Os outros três furos próximos a periferia da tampa são para a fixação dos eletrodos de referência e contra-eletrodo na ordem que desejar. A abertura na tampa é para a inserção do agitador mecânico. Na Figura 7A é apresentado uma imagem da célula pela vista frontal, mostrando também os orifícios para posicionamento dos eletrodos e do micromotor DC que foi usado para agitar a solução entre as injeções aplicadas utilizando BIA-SWV.

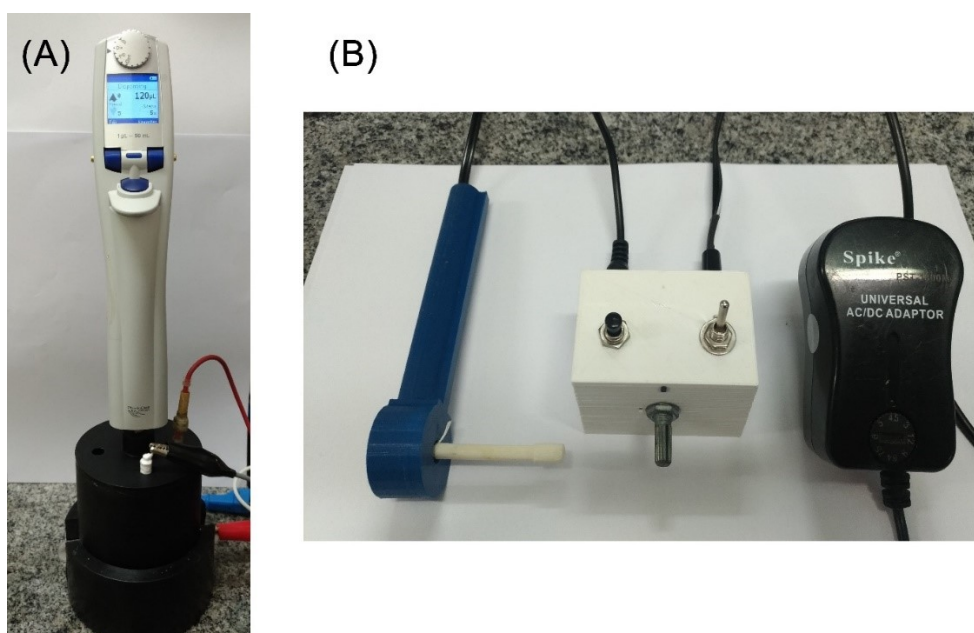
Figura 7. (A) Imagem da célula frontal BIA utilizada. (B) Imagem superior da tampa da célula BIA.



Fonte: Adaptada de (FREITAS, 2019).

O sistema de agitação é composto por um micro-motor DC 12 V usado originalmente em secadores de cabelos e brinquedos elétricos. Ao eixo deste micromotor foi adaptada uma haste de teflon (PEREIRA et al., 2012) e a velocidade de agitação é controlada com uma fonte universal de potencial variável (3 a 12 V – 700 a 4000 rpm). Quanto maior o potencial selecionado, maior é a rotação do motor (Figura 8B). Para a injeção neste sistema foi utilizado uma pipeta eletrônica motorizada (Eppendorf® Multipette stream) que permite injeções de 10 a 1000 μL (usando uma ponteira combitip® de 1 mL) com velocidade de injeção de 28 a 250 $\mu\text{L s}^{-1}$ (Figura 8A).

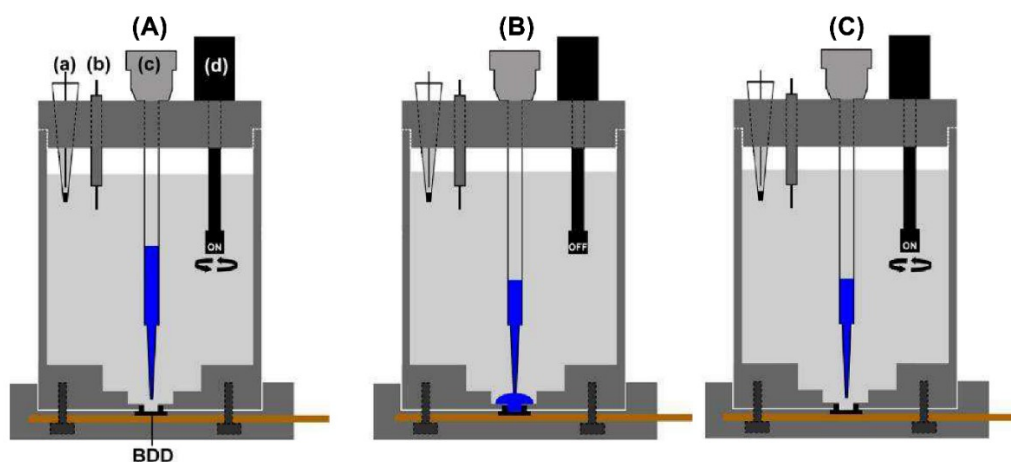
Figura 8. (A) Sistema BIA montado com a pipeta eletrônica. (B) Sistema de agitação utilizado no sistema BIA.



Fonte: O próprio autor.

A célula foi construída de forma que durante a injeção, a ponteira da pipeta eletrônica fique posicionada a aproximadamente 2 mm do eletrodo de BDD com o objetivo de obter resultados reprodutíveis durante a análises (QUINTINO; ANGNES, 2004). A Figura 9 apresenta as etapas de injeção, iniciando com a agitação do eletrólito suporte (Figura 9A). A injeção é realizada sem agitação de forma que a alíquota injetada permaneça próximo a superfície do eletrodo durante toda a varredura (Figura 9B). Para a dispersão, é ativada a agitação no sistema (Figura 9C).

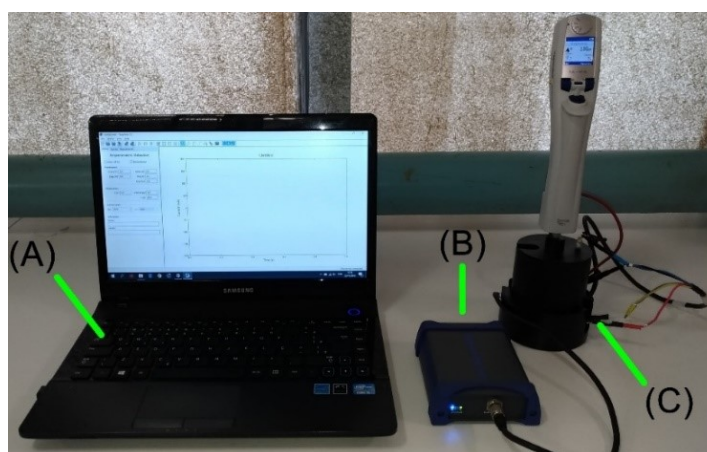
Figura 9. Esquema mostrando o procedimento de análise com o sistema BIA com as seguintes etapas da injeção: **(A)** instante antes da injeção sob agitação, **(B)** durante a injeção e a análise e **(C)** após a dispersão da alíquota injetada. Sendo: (a) o eletrodo de referência, (b) o contra-eleto, (c) a ponteira da micropipeta e (d) o micromotor DC.



Fonte: Adaptada de (OLIVEIRA et al., 2016).

O sistema de análise utilizado neste trabalho poderia ser facilmente adaptado um método portátil para análises fora do laboratório, para isso pode-se utilizar um mini-potenciostato funcionado por bateria e um computador para o tratamento dos dados. O mini-potenciostato pode ser conectado ao computador por meio de um cabo USB (do inglês, *Universal Serial Bus*) ou por conexão Bluetooth. Além disso, o sistema exibido pode ser utilizado para todos os métodos empregados neste trabalho. Na Figura 10 é apresentado uma foto de um sistema de análise eletroquímica portátil utilizando o mini-potenciostato com conexão Bluetooth.

Figura 10. Foto do sistema BIA portátil. **(A)** Computador para adquirir e tratar os dados. **(B)** Mini-potenciostato portátil conectado via Bluetooth. **(C)** Sistema BIA.



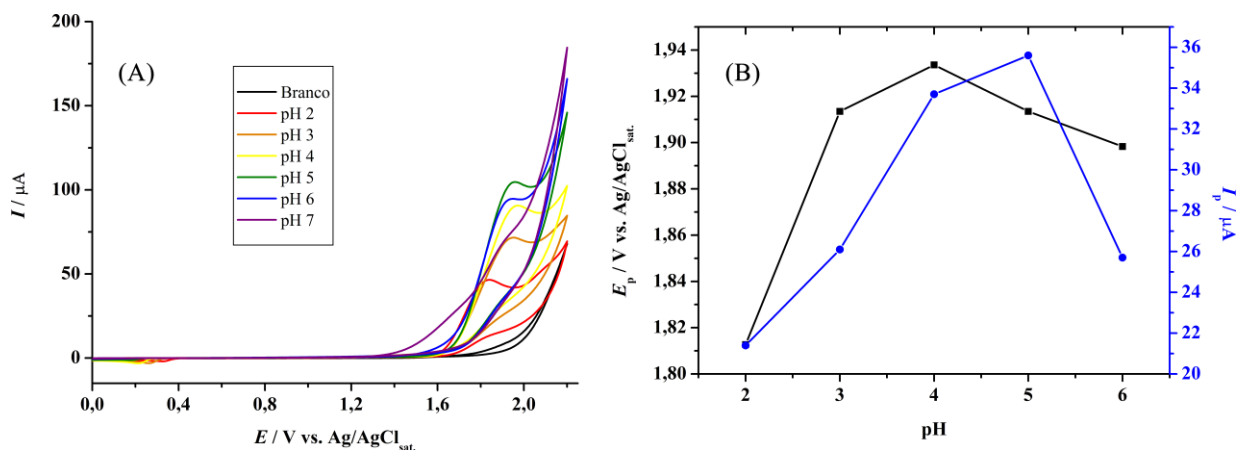
Fonte: O próprio autor.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Comportamento eletroquímico da efedrina

Primeiramente, foi testado o comportamento eletroquímico da efedrina empregando CV em tampão BR em uma faixa de pH de 2,0 a 7,0. Devido a solubilidade da efedrina ($pK_a = 9.58$) (LI; DING; CAO, 2008), o estudo em valores de pHs maiores que 7,0 não foram feitos uma vez que precisaria de solventes orgânicos para garantir a solubilidade. Logo, por este trabalho tratar-se de um método simples e de baixo custo, optou-se por estudar o comportamento eletroquímico da efedrina somente em meio ácido. O trabalho foi realizado utilizando o BDD como eletrodo de trabalho em uma faixa de 0,0 a +2,2 V vs. Ag/AgCl (com KCl_{sat}). A Figura 11 apresenta o resultado da influência do pH no processo de oxidação da efedrina em tampão BR.

Figura 11. (A) Voltamogramas cíclicos obtidos em solução tampão BR (pH 2,0 – 7,0) com $100,0 \text{ mg L}^{-1}$ de efedrina (linhas coloridas) e sem (linha preta). (B) Efeito de pH (pH 2,0 -7,0) em relação ao potencial de pico (E_p) e corrente de pico (I_p) com $100,0 \text{ mg L}^{-1}$ de efedrina em $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ de solução tampão BR. Parâmetros CV: velocidade de varredura: 50 mV s^{-1} ; Step: 5 mV.



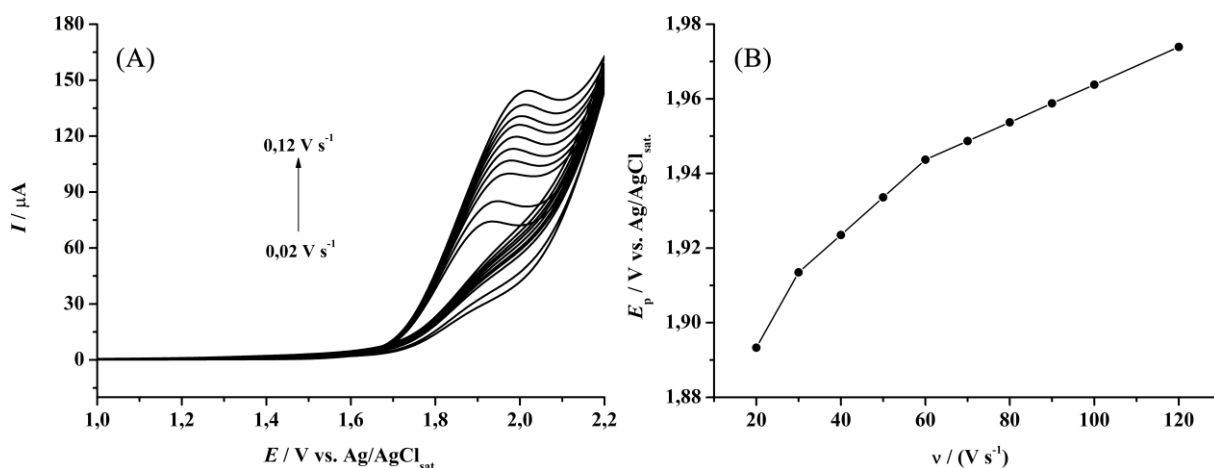
Fonte: O próprio autor.

A Figura 11A mostra os voltamogramas na faixa de pH estudada entre 2,0 e 7,0; porém em pH igual a 7,0 não foi observado a definição de um pico de oxidação. Além disso, nota-se que em pH igual a 5,0 a efedrina possui maior sinal de corrente de pico. O maior potencial de pico, aproximadamente +1,93 V, foi observado em solução tampão BR de pH igual a 4 (Figura 11B).

Com isso, partindo da solução tampão BR, foi percebido que o pH estimado para melhorar a sensibilidade da detecção da efedrina condiz com a região tamponante do ácido acético. Sendo assim, o tampão ácido acético/acetato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 4,7) foi escolhido como o melhor eletrólito suporte para a detecção de efedrina uma vez que era mais simples e necessitava de uma menor quantidade de reagentes.

Definido o eletrólito suporte e o pH de trabalho, foram feitos estudos para a determinação das informações necessárias para o mecanismo de oxidação da efedrina. Para isso, foi analisado o comportamento frente a variações de velocidade de varredura (v) utilizando a CV. A Figura 12A mostra os voltamogramas obtidos com $100,0 \text{ mg L}^{-1}$ de efedrina em base a variação da velocidade de varredura de $0,02 \text{ V s}^{-1}$ a $0,12 \text{ V s}^{-1}$.

Figura 12. (A) Voltamogramas cíclicos obtidos com $100,0 \text{ mg L}^{-1}$ de efedrina em solução tampão ácido acético/acetato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 4,7) em relação a variação da velocidade de varredura. (B) Variação do potencial de pico em relação a velocidade de varredura.

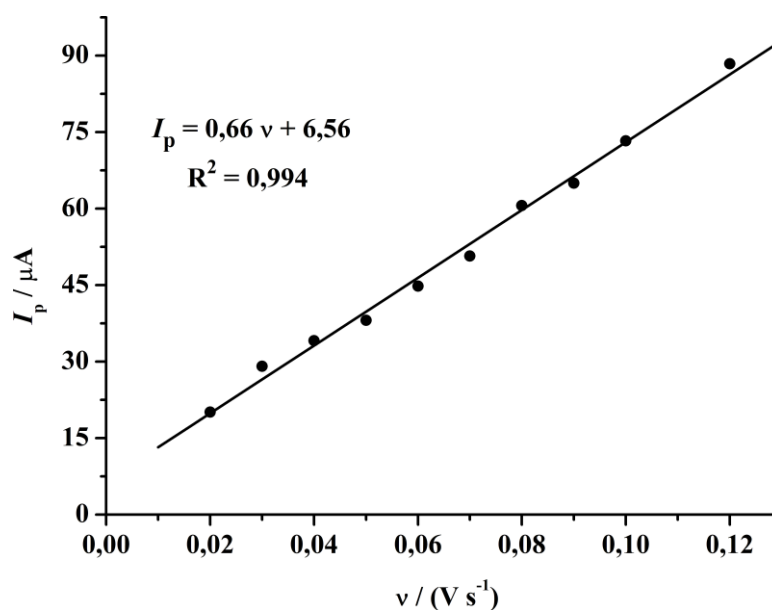


Fonte: O próprio autor.

Como pode ser observado na Figura 12A, não há a presença do pico de redução durante a varredura na janela de potencial analisada. Além disso, à medida que aumenta a velocidade de varredura o potencial de pico é deslocado a valores mais positivos como mostrado na Figura 12B, tal atributo é uma das características de um processo irreversível (KLINGLER; KOCHI, 1981).

Para obter mais informações, pode-se relacionar a corrente de pico (I_p) com a velocidade de varredura para descobrir se o transporte de massa é governado pela difusão ou adsorção das espécies eletroativas na interface-solução. Na Figura 13 é mostrada a variação da corrente de pico em relação a velocidade de varredura.

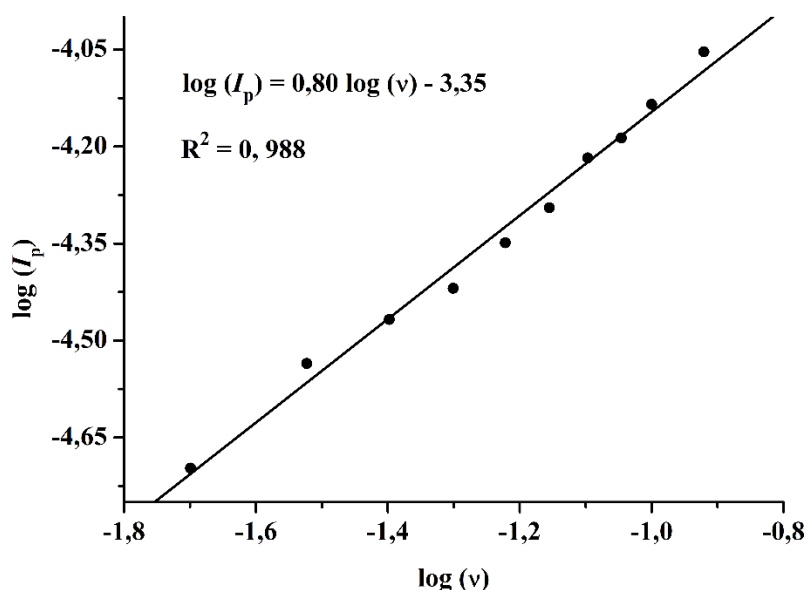
Figura 13. Relação entre a corrente de pico e velocidade de varredura.



Fonte: O próprio autor.

Como foi mostrado na Figura 13, foi possível observar que a efedrina tem um comportamento linear ao relacionar I_p x v . Com essa informação, pode-se concluir primeiramente que o comportamento é mais uma característica de um processo irreversível e que o transporte de massa na oxidação de efedrina é controlado preferencialmente por adsorção (GOSSER, 1993). Ou seja, as moléculas de efedrina precisam entrar em contato com a superfície do eletrodo de trabalho e permanecem adsorvidas brevemente para ocorrer a oxidação da espécie. Para confirmar essa conclusão, foi estudado a relação entre o $\log(I_p)$ vs. $\log(v)$ como é mostrado na Figura 14.

Figura 14. Relação entre o logaritmo da corrente de pico ($\log(I_p)$) e o logaritmo da velocidade de varredura ($\log(v)$).



Fonte: O próprio autor.

A literatura (AIKENS, 2009) traz que coeficiente angular próximo a 0,50 corresponde a um transporte de massa governado pela difusão enquanto valores próximos de 1,00 corresponde a processos de adsorção. Assim, como pode ser visto na Figura 14, a relação de logaritmo entre a corrente de pico e a velocidade de varredura apresenta boa linearidade ($R^2 = 0,99$) e seu coeficiente angular igual a 0,80 é um valor próximo de 1,00; confirmando, segundo a literatura, que se trata de um sistema preferencialmente controlado por adsorção.

Confirmado que a oxidação é um processo irreversível com transporte de massa governado por adsorção, o número de elétrons pode ser calculado por meio da equação de Laviron. Para processos redox irreversíveis a relação entre o potencial de pico e o logaritmo da velocidade de varredura é dado pela equação a seguir (LAVIRON, 1979):

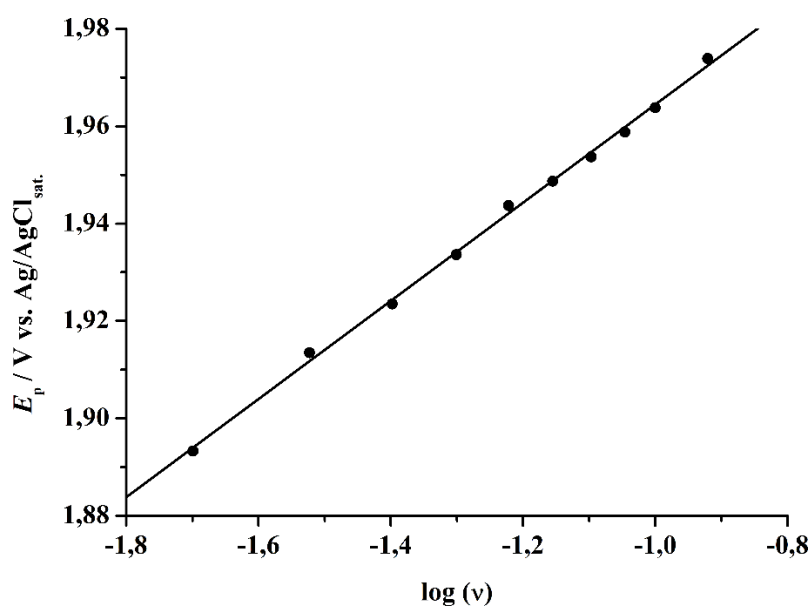
$$E_p = E^{\circ'} + \left(\frac{2,303RT}{\alpha nF} \right) \log \left(\frac{RTk^{\circ}}{\alpha nF} \right) - \left(\frac{2,303RT}{\alpha nF} \right) \log(v)$$

Onde: F é a constante de Faraday (96485 C mol^{-1}), R é a constante universal dos gases ($8,3145 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$), T é a temperatura termodinâmica ($298,15 \text{ K}$), n é o número de elétrons transferidos durante a oxidação, α é o coeficiente de transferência de carga, $E^{\circ'}$ é o potencial formal e k° é a constante de velocidade heterogênea.

A dependência entre o potencial de pico (E_p) e logaritmo da velocidade de varredura ($\log(v)$) é apresentado na Figura 15. Observou-se uma relação linear com um coeficiente de correlação igual a 0,99 com a equação da reta igual a:

$$E_p = 0,1008 (\log(v)) + 2,0652$$

Figura 15. Relação entre o potencial de pico (E_p) e $\log(v)$.



Fonte: O próprio autor.

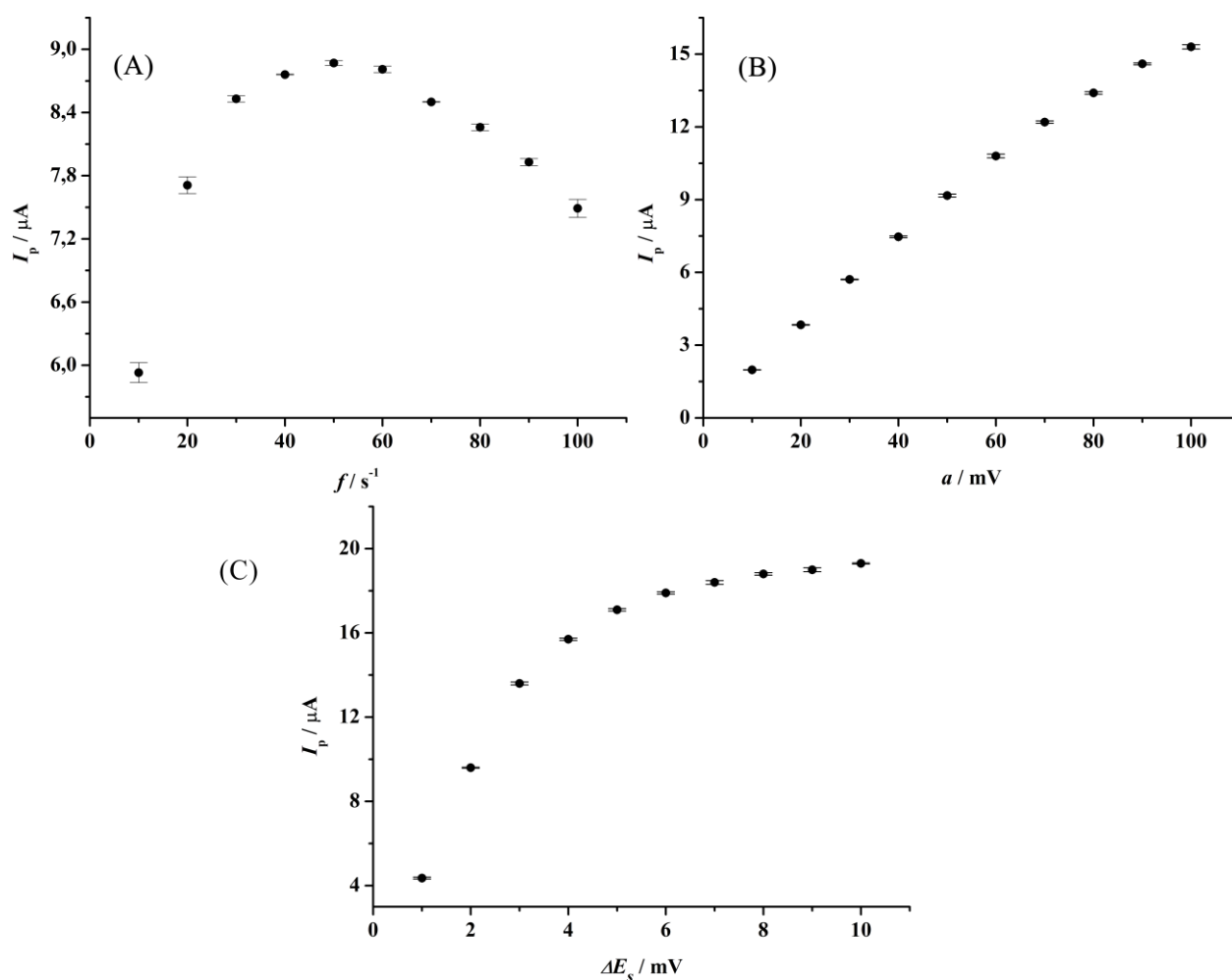
Aplicando a inclinação da equação 2 na equação 1, foi possível calcular o valor de $n\alpha = 0,59$. Segundo a literatura, para moléculas orgânicas considerar-se que $\alpha = 0,50$ (BARD; FAULKNER, 2001), assim pode-se determinar o número de elétrons envolvidos na oxidação da efedrina nas condições otimizadas como sendo de $n = 1$ elétron.

4.2 Estudo e otimização dos parâmetros de SWV

O objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento de um método de análise empregando a SWV. Assim, os seguintes parâmetros instrumentais necessitam ser otimizados para obtenção de uma melhor resposta: amplitude de pulsos de potencial (a) frequência de aplicação dos pulsos de potenciais (f) e incremento de varredura de potencial (ΔE_s).

No processo de oxidação da efedrina, a influência dos parâmetros de SWV foram analisados utilizando $30,0 \text{ mg L}^{-1}$ de efedrina, uma solução tampão ácido acético/acetato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ como eletrólito suporte e BDD como eletrodo de trabalho. A frequência de aplicação dos pulsos de potencial foi avaliada no intervalo de 10 s^{-1} a 100 s^{-1} mantendo-se a amplitude e o incremento de potencial fixos em 50 mV e 2 mV , respectivamente. A amplitude foi analisada em um intervalo de 10 mV a 100 mV mantendo-se os outros parâmetros fixos ($f = 50 \text{ s}^{-1}$; $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$). Depois, para a avaliação do incremento de potencial em um intervalo de 1 mV a 10 mV , foi mantido a frequência fixa em 50 s^{-1} e a amplitude fixa em 50 mV . A Figura 16 mostra os resultados obtidos da variação de cada parâmetro analisado para a otimização da voltametria de onda quadrada.

Figura 16. Relação entre a corrente de pico e a variação (A) da frequência, (B) da amplitude e (C) do incremento de potencial. Concentração de efedrina: $30,0 \text{ mg L}^{-1}$ em eletrólito tampão ácido acético/acetato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de pH = 4,7.



Fonte: O próprio autor.

Analisando a Figura 16A, observa-se um aumento de corrente até o valor de 50 s^{-1} , a partir deste valor houve um decréscimo na corrente de pico. Além disso, o maior valor de corrente é referente a frequência igual 50 s^{-1} , mas o menor desvio sendo para 40 s^{-1} . Deste modo, o valor de 40 s^{-1} foi escolhido. Para o estudo da amplitude (Figura 16B), a corrente de oxidação da efedrina aumenta com a amplitude em todo intervalo estudado, porém, altos valores de amplitude e de incremento promove menos pontos de medidas presentes no voltamograma. Dessa forma, o valor de 70 mV para a amplitude foi escolhido. Para o incremento de potencial (Figura 16C), o aumento provocado na corrente pelo aumento do incremento, se torna menos significativo a partir de 6 mV , sendo este valor selecionado para as medidas subsequentes realizadas por SWV.

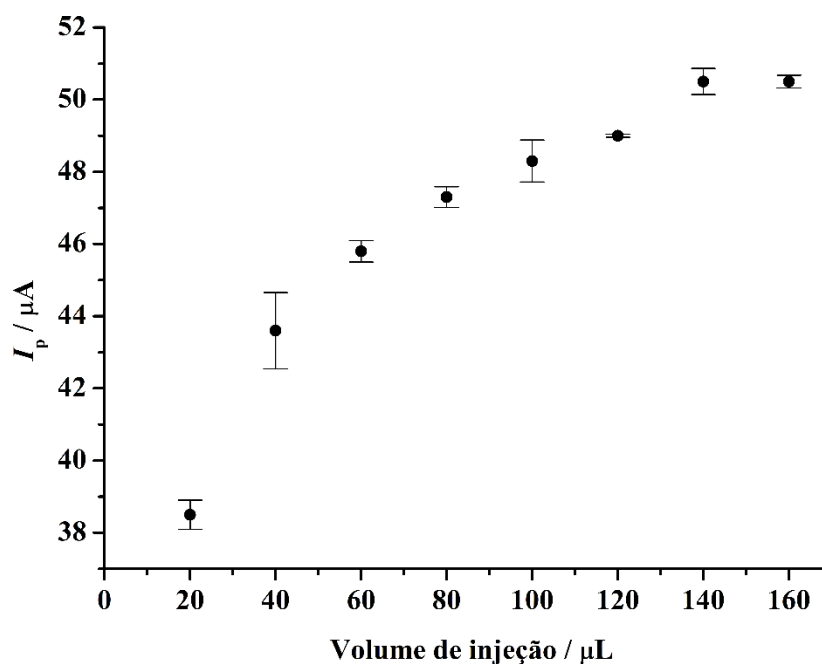
4.3 Aplicação do método SWV estudado ao sistema BIA

Feito a definição dos parâmetros SWV e das melhores condições para análise em sistema estacionário (célula de polipropileno com capacidade de aproximadamente 15 mL), o método foi adaptado para o sistema portátil BIA uma vez que a célula estacionária é um sistema complicado e difícil para análises fora do laboratório.

As injeções no sistema BIA foram realizadas a, aproximadamente, 1 segundo antes do início da varredura. Isto é, quando o eletrólito contido dentro da célula já estava sem agitação para permitir que a efedrina chegasse à superfície do eletrodo somente pelo fluxo criado pela injeção e permanecesse próxima à superfície do eletrodo.

Portanto, foram realizadas as otimizações para determinar o volume de injeção e a velocidade de escoamento da pipeta eletrônica. O volume de injeção foi estudado em uma faixa entre 20 a $160 \mu\text{L}$ fixando a velocidade em $78,1 \mu\text{L s}^{-1}$ e utilizando $30,0 \text{ mg L}^{-1}$ de efedrina. A Figura 17 apresenta, em triplicata, a variação da corrente de pico da efedrina em relação a variação do volume de injeção.

Figura 17. Variação da corrente de oxidação para 30,0 mg L⁻¹ de efedrina em relação a variação do volume injetado com a velocidade igual a 78,1 $\mu\text{L s}^{-1}$.

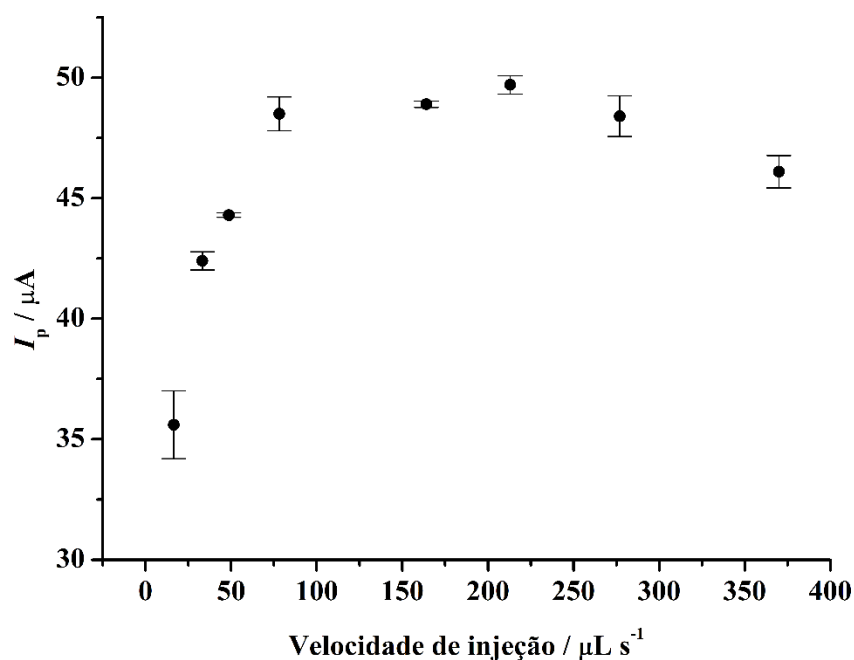


Fonte: O próprio autor.

Na Figura 17 pode-se observar que os volumes de 140 e 160 μL apresentaram maiores sinais de corrente de pico e que seus valores são bem próximos. Com isso, é possível afirmar que: se houvesse mais adições de volumes maiores, o valor da corrente de pico permaneceria próxima aos valores encontrada em 140 e 160 μL . Além disso, pode-se observar que o desvio padrão para o volume de 120 μL foi o menor, sendo este escolhido para os próximos estudos. Além disso, com base na Figura 17, pode-se perceber um ganho de corrente quando é acoplado o sistema BIA com detecção por SWV tornando o método mais sensível.

Para a otimização da velocidade de injeção, foram feitas injeções com o volume fixo em 120 μL e variando a velocidade entre 16,5 a 370 $\mu\text{L s}^{-1}$. A Figura 18 apresenta os resultados adquiridos, em triplicata, da variação da corrente de pico da efedrina em função da velocidade.

Figura 18. Variação da corrente de oxidação para $30,0 \text{ mg L}^{-1}$ de efedrina em relação a variação da velocidade de injeção com o volume fixado a $120 \text{ }\mu\text{L}$.



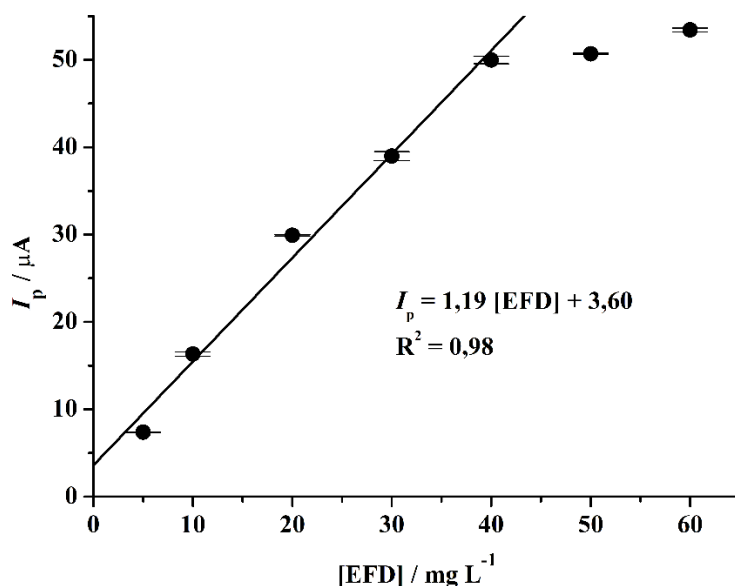
Fonte: O próprio autor.

Pela Figura 18, pode-se observar que para velocidades aplicadas acima de $213 \text{ }\mu\text{L s}^{-1}$ a resposta da corrente de pico da efedrina começa a diminuir. O comportamento observado pode ter ocorrido devido à altas velocidades programadas pela pipeta eletrônica que criam um fluxo de injeção mais forte. Com isso, algumas moléculas são retiradas e/ou espalhadas da proximidade da superfície do eletrodo pela turbulência do fluxo causando uma queda da corrente. No entanto, é possível observar que o aumento da corrente ocorre com o aumento da velocidade entre $16,5$ e $213 \text{ }\mu\text{L s}^{-1}$. Assim, o valor selecionado para os próximos testes foi de $164 \text{ }\mu\text{L s}^{-1}$ devido apresentar o maior sinal e possuir menor desvio padrão.

4.4 Faixa Linear

Feito as otimizações dos parâmetros do sistema BIA-SWV, foi feito o estudo para determinar a faixa linear de trabalho da efedrina. A Figura 19 apresenta a faixa linear e a variação da corrente de pico à medida que a concentração de efedrina aumenta ($5,0 \text{ mg L}^{-1}$ a $60,0 \text{ mg L}^{-1}$).

Figura 19. Curva obtida para soluções de 5,0 a 60,0 mg L⁻¹ de efedrina. Estando nas condições experimentais: eletrólito suporte sendo uma solução tampão ácido acético/acetato 0,1 mol L⁻¹ de pH = 4,7, $\alpha = 70$ mV, $f = 40$ s⁻¹ e $\Delta E_s = 6$ mV.



Fonte: O próprio autor.

Com base na Figura 19, pode ser observado que a linearidade entre a corrente de pico e a concentração de efedrina está na faixa entre 5,0 a 40,0 mg L⁻¹. Acima dessa concentração, as respostas deixam de serem lineares. A equação para a curva de calibração de efedrina usando os parâmetros otimizados é representado por:

$$I_p / \mu\text{A} = 1,19 \pm 0,07 \{[\text{EFD}] / (\text{mg L}^{-1})\} + 3,60 \pm 0,18$$

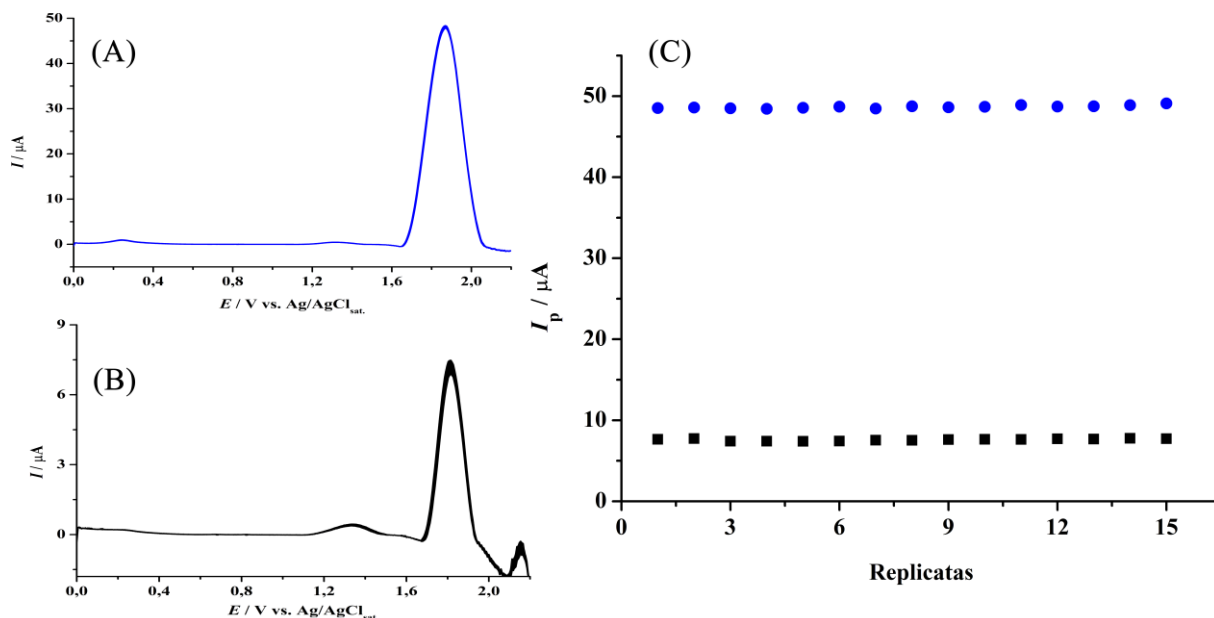
O LD calculado para a curva de calibração da efedrina foi de 0,13 mg L⁻¹ ($3x S_B/S$, sendo S_B o desvio padrão e S a inclinação da curva de calibração) e o LQ foi de 0,43 mg L⁻¹ ($LQ = 3,33xLD$).

4.5 Repetibilidade

Após a definição das melhores condições de trabalho, um estudo para avaliação da repetibilidade do método BIA-SWV foi realizado. A Figura 20 apresenta os voltamogramas de onda quadrada feitos no teste de repetibilidade para (A) 40,0 mg L⁻¹ e (B) 5,0 mg L⁻¹ de efedrina. Na Figura 20C são apresentados os resultados obtidos para 15 injeções sucessivas de soluções

contendo efedrina em duas concentrações diferentes: 40,0 (●) e 5,0 mg L⁻¹ (■), usando a menor e a maior concentração da faixa linear de trabalho.

Figura 20. Voltamogramas de onda quadrada sobrepostos para (A) 40,0 mg L⁻¹ e (B) 5,0 mg L⁻¹ de efedrina em 15 injeções consecutivas. Resultados de corrente de pico (I_p) obtidos por BIA-SWV para 15 injeções sucessivas de soluções contendo (C) 40,0 mg L⁻¹ (●) e 5,0 mg L⁻¹ (■). Demais condições: Fig. 19.



Fonte: O próprio autor.

Os resultados apresentados na Figura 20 mostram que existe pouca variação nas correntes de pico registradas ao longo das medidas. Também pode ser visto nos voltamogramas (A) e (B) que seus perfis sempre permanecem inalterados. Com isso, é possível perceber a ausência de contaminação na superfície do eletrodo (sem efeitos de memória), uma vez que não há decaimento constantes das correntes de pico (tendência). O desvio padrão relativo foi calculado e determinado como sendo 1,7% e 0,4% ($n = 15$) para 5,0 mg L⁻¹ e 40,0 mg L⁻¹, respectivamente.

4.6 Aplicação do método desenvolvido para triagem (“screening”) de efedrina em amostras reais

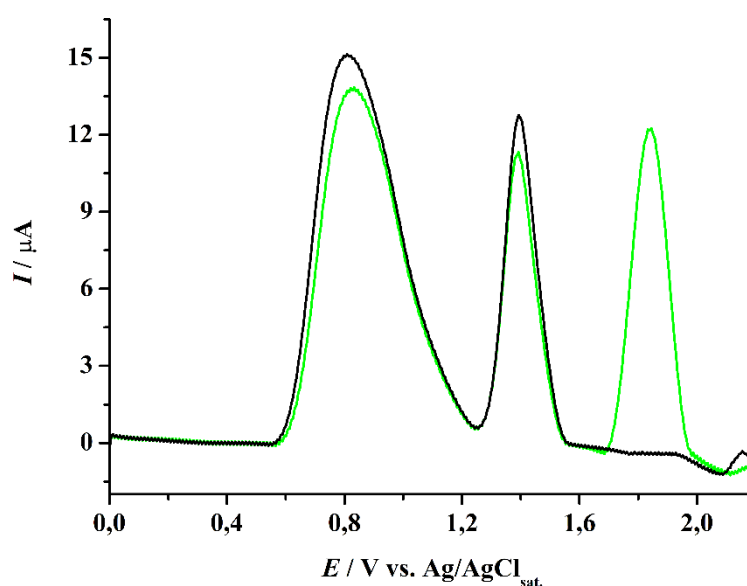
O desempenho do método BIA-SWV estudado até aqui foi avaliado na triagem ou screening para identificação da efedrina em amostras de suplementos alimentares e medicamentos naturais/fitoterápicos como: chá verde, garcínia composta, garcínia, Lipo Diet Emagy[®], spirulina e Thermodrol[®]. Para cada amostra foi feita a dopagem com 1% (m/m) de

efedrina. Após a dopagem, cada amostra foi diluída de forma que a concentração final de efedrina em todas as amostras fosse de $10,0 \text{ mg L}^{-1}$. Para comparação, um voltamograma de cada amostra pura (ausência de efedrina) também foi feito.

4.6.1 Chá verde

Segundo a literatura, (FREITAS; NAVARRO, 2007) o chá verde, obtido por meio da erva *Camellia sinensis*, tem uma alta quantidade de catequinas o qual é capaz de promover emagrecimento corporal e auxilia na prevenção e tratamento da obesidade. A Figura 21 apresenta os voltamogramas de onda quadrada no sistema BIA para amostra de chá verde que foi diluída no eletrólito suporte utilizado antes e depois da dopagem.

Figura 21. Voltamogramas de onda quadrada obtidos para uma solução de chá verde em solução tampão ácido acético/acetato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ antes (—) e depois (—) da dopagem. Concentração final de efedrina: $10,0 \text{ mg L}^{-1}$. Demais condições: Fig. 19.



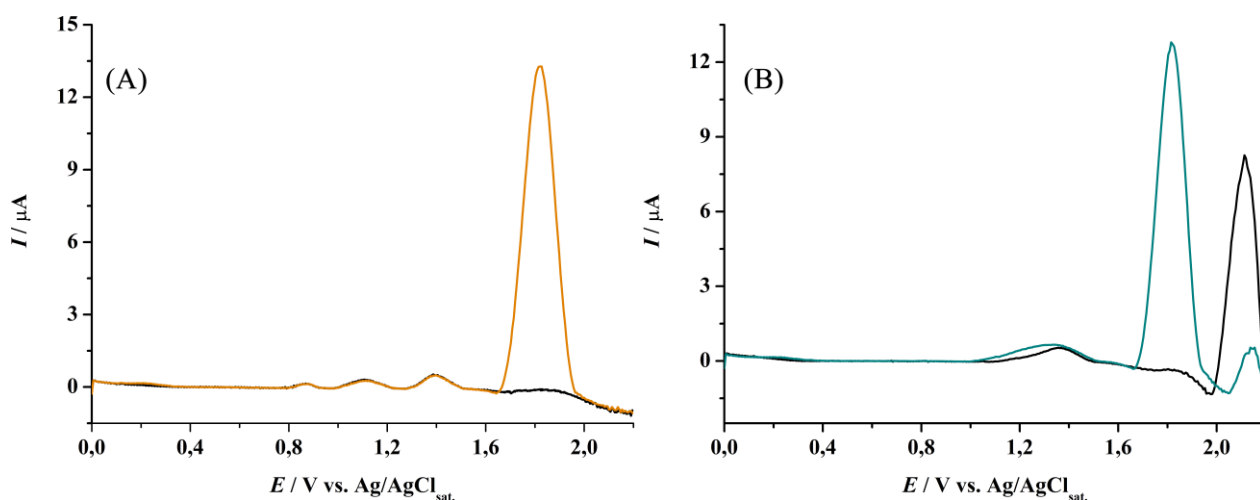
Fonte: O próprio autor.

Na figura 21 pode-se observar picos em, aproximadamente, $+0,8 \text{ V}$ e $+1,4 \text{ V}$ que estão presentes em ambos voltamogramas. Porém, pode-se notar mais um pico em $+1,9 \text{ V}$ que está presente somente no voltamograma referente a dopagem e diluição de 1% de efedrina (—). Portanto, conclui-se que os dois primeiros picos são provenientes da solução de chá verde e que a detecção seletiva da efedrina na amostra de chá verde é possível.

4.6.2 Garcínia composta e Garcínia

A garcína é utilizada em suplementos fitoterápicos para o combate da obesidade em humanos (DAMIAN et al., 2005). A Figura 22 apresenta os voltamogramas de onda quadrada no sistema BIA para as amostras (A) de garcína composta e (B) garcína pura, ambas diluídas no eletrólito suporte utilizado (solução tampão ácido acético/acetato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$).

Figura 22. Voltamogramas de onda quadrada obtidos para uma solução de (A) garcína composta e (B) garcína pura, ambas em solução tampão ácido acético/acetato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ antes (—) e depois, (—) para garcína composta e (—) para garcínica pura, da dopagem. Concentração final de efedrina: $10,0 \text{ mg L}^{-1}$. Demais condições: Fig. 19.



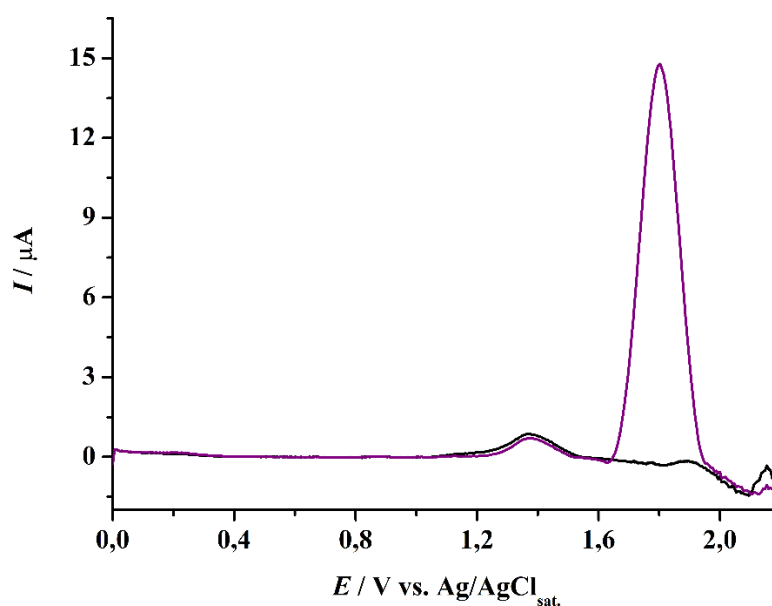
Fonte: O próprio autor.

Na figura 22A pode-se observar que os voltamogramas, tanto da amostra da garcína composta sem dopagem quanto da amostra dopada, se sobrepõem quase completamente. Porém, em $+1,8 \text{ V}$ vê-se a presença da oxidação referente a $10,0 \text{ mg L}^{-1}$ de efedrina (—). Na Figura 22B, observa-se também em $+1,8 \text{ V}$ o pico de oxidação da efedrina $10,0 \text{ mg L}^{-1}$ após a dopagem (—). No entanto, antes da dopagem (—) só é mostrado um pico da correção de linha de base em aproximadamente $+2,1 \text{ V}$. Portanto, é possível concluir que a detecção da efedrina na amostra de garcína composta e garcína pura é possível.

4.6.3 Lipo Diet Emagry®

Lipo Diet Emagry® trata-se de um fitoterápico natural, um extrato de ervas, tendo como função principal a moderação do apetite. Sendo um extrato de ervas, o suplemento fitoterápico combate a obesidade, ajuda a manter o peso ideal por meio da eliminação de gorduras localizadas. A Figura 23 apresenta os voltamogramas de onda quadrada obtido para uma solução de Lipo Diet Emagry® em tampão ácido acético/acetato 0,1 mol L⁻¹.

Figura 23. Voltamogramas de onda quadrada obtidos para uma solução de Lipo Diet Emagry® em tampão ácido acético/acetato 0,1 mol L⁻¹ antes (—) e depois (—) da dopagem. Concentração final de efedrina: 10,0 mg L⁻¹. Demais condições: Fig. 19.



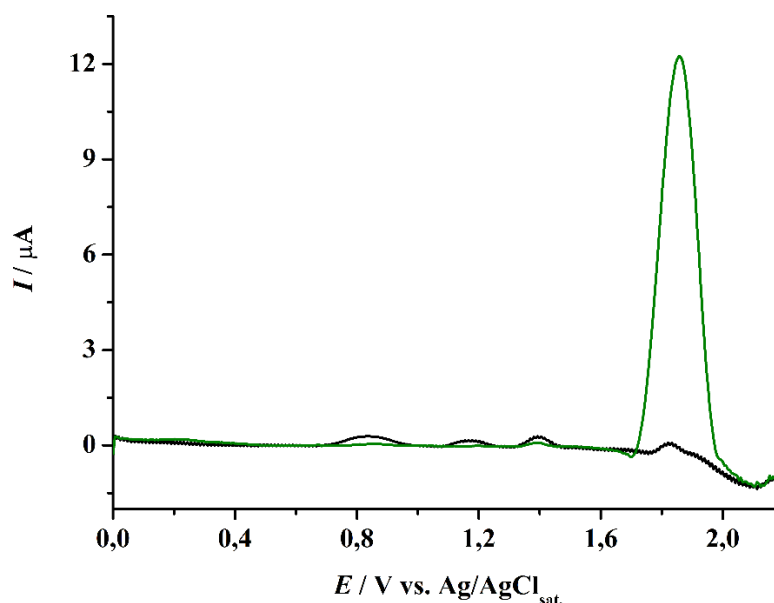
Fonte: O próprio autor.

A figura 23 mostra os perfis voltamétricos da amostra estudada sem apresentar pico de oxidação (—). No entanto, após a dopagem e diluição de 1% de efedrina (—), o voltamograma passou a apresentar um pico de oxidação por volta de +1,8 V. Em aproximadamente +2,1 V, percebe-se uma leve elevação no voltamograma no qual conclui-se como a correção da linha de base. Logo, foi concluído que pode detectar a presença ou ausência da efedrina na amostra de Lipo Diet Emagry®.

4.6.4 Spirulina

A spirulina por apresentar grande potencial como fonte de proteínas e vitaminas, é utilizada em dietas suplementares as quais resultam em uma redução estatisticamente significativa do peso em pacientes obesos (AMBROSI et al., 2008). Por isso, várias empresas produtoras de Spirulina vendem o produto como suplemento alimentar em muitas lojas de alimentos saudáveis em todo o mundo (BELAY et al., 1993). A Figura 24 mostra os voltamogramas de onda quadrada obtido para uma solução de spirulina em tampão ácido acético/acetato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$.

Figura 24. Voltamogramas de onda quadrada obtidos para uma solução de spirulina em solução tampão ácido acético/acetato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ antes (—) e depois (—) da dopagem. Concentração final de efedrina: $10,0 \text{ mg L}^{-1}$. Demais condições: Fig. 19.



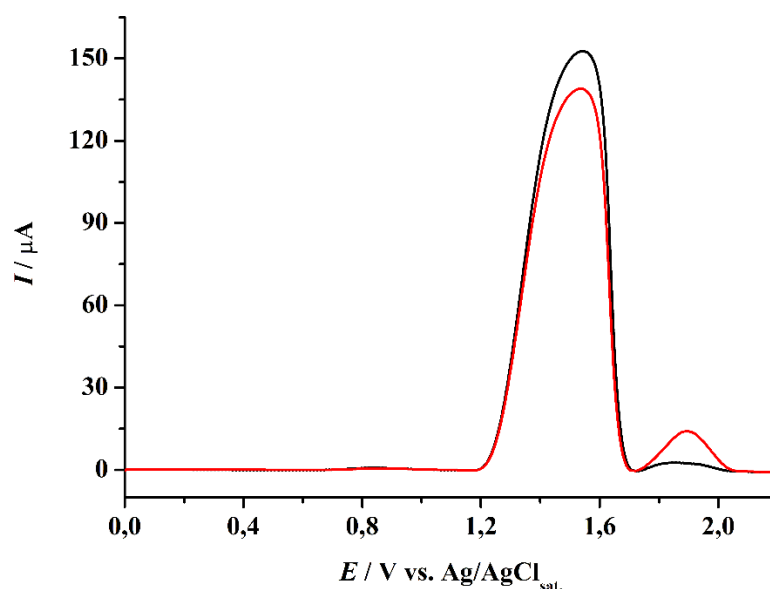
Fonte: O próprio autor.

Na figura 24 pode-se observar um pico de oxidação em $+1,9 \text{ V}$ (—) na amostra estudada após a dopagem e diluição de 1% de efedrina. No entanto, percebe-se que o voltamograma referente a amostra antes da dopagem (—) não apresenta perfil de oxidação presente. Logo, pode-se concluir que o processo de triagem rapidamente pode trazer informações sobre a presença ou ausência da efedrina nesse tipo de amostra analisada.

4.6.5 Thermodrol®

O Thermodrol® é um suplemento alimentar de cafeína e base de guaraná, extrato de noz cola e cafeína anidra sendo duas fontes naturais. O termogênico tem como função estimular o sistema nervoso central para acelerar o metabolismo provocando a produção de energia e a queima de gordura corporal. Além disso, estudos mostraram que o uso de efedrina junto a cafeína aumenta o desempenho aeróbico de atletas melhorando a eficácia e auxiliando no emagrecimento (BELL; JACOBS, 1999; GRAHAM, 2001). A Figura 25 apresenta os voltamogramas de onda quadrada obtidos para uma solução de Thermodrol® em tampão ácido acético/acetato 0,1 mol L⁻¹.

Figura 25. Voltamogramas de onda quadrada obtidos para uma solução de Thermodrol® em solução tampão/acetato 0,1 mol L⁻¹ antes (—) e depois (—) da dopagem. Concentração final de efedrina: 10 mg L⁻¹. Demais condições: Fig. 19.



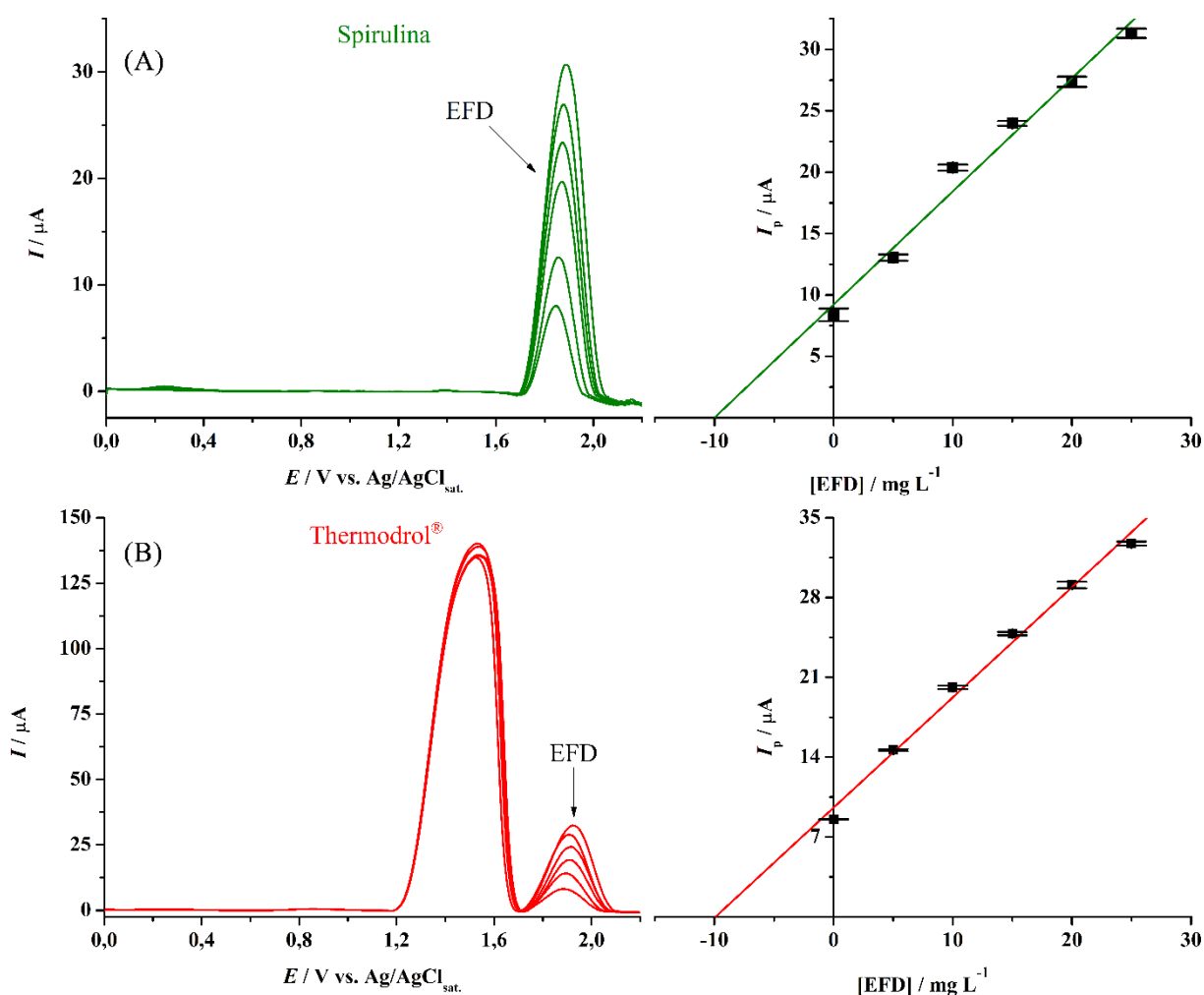
Fonte: O próprio autor.

Na figura 25 pode-se observar um pico aproximadamente em +1,5 V em ambos voltamogramas de onda quadrada da amostra, o qual trata-se da oxidação da cafeína presente no Thermodrol® (suplemento de cafeína). Além disso, a amostra sem a dopagem de efedrina (—) apresenta somente o pico de oxidação da cafeína enquanto após a dopagem e diluição de 1% de efedrina (—), o pico de oxidação em +1,9 V é evidente. Assim, os resultados mostram que a detecção seletiva da efedrina nessa amostra é possível sem que tenha interferência da cafeína.

4.7 Aplicando o método BIA-SWV para a quantificação da efedrina em amostra de suplementos alimentares

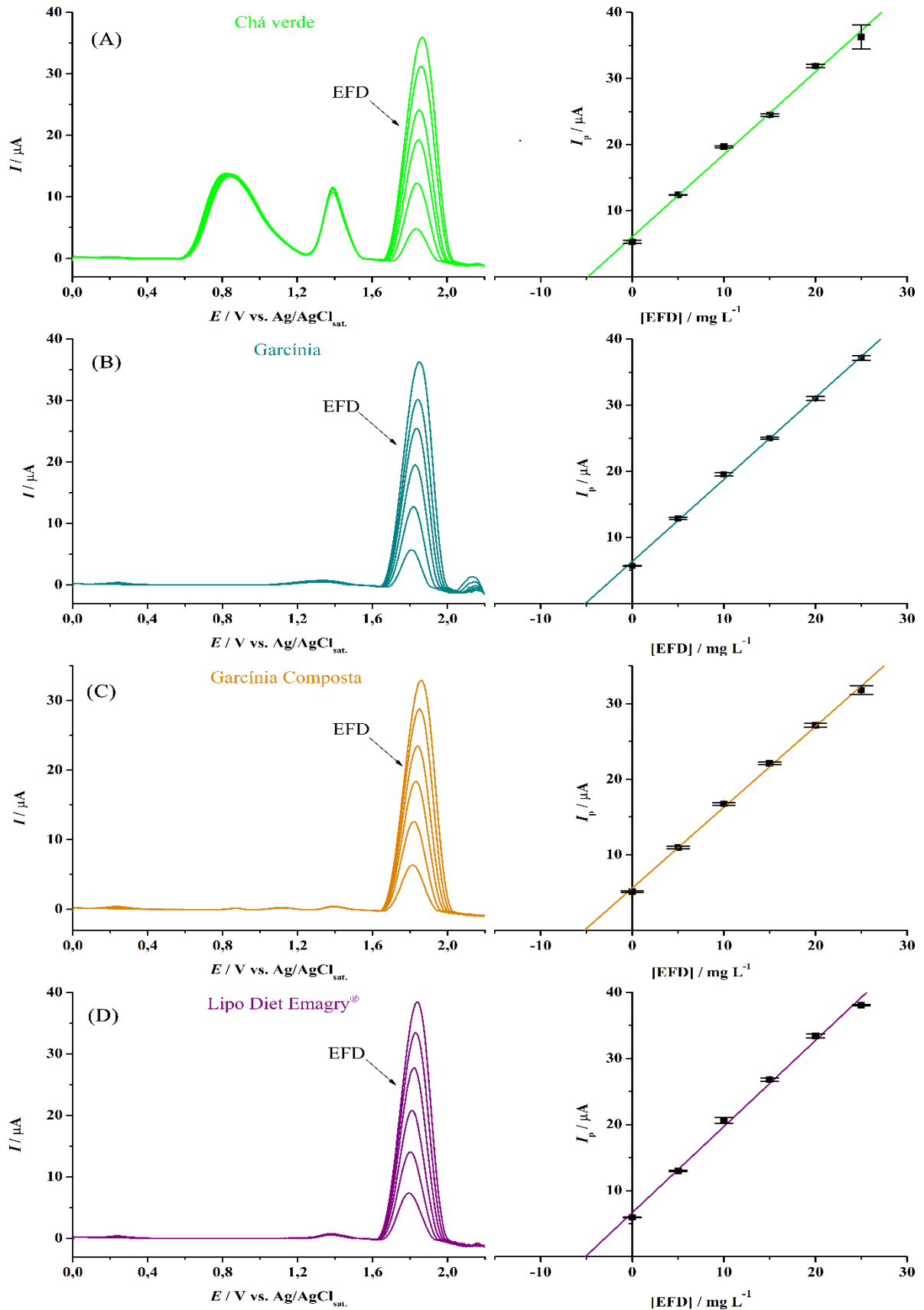
Além dos estudos de triagem ou screening para a identificação da efedrina nas amostras apresentadas anteriormente, o método BIA-SWV foi utilizado para a quantificação de efedrina nestas amostras empregando o método de adição de padrão. Para isso, foi utilizado os parâmetros otimizados até aqui e foi levado em consideração a curva de calibração obtida (5,0 a 40,0 mg L⁻¹). Os voltamogramas de onda quadrada e as respectivas curvas de calibração feitas utilizando o método de adição de padrão para as amostras foram registrados para as amostras dopadas com (Figura 26) 10,0 mg L⁻¹ e (Figura 27) 5,0 mg L⁻¹ de efedrina.

Figura 26. Voltamogramas de onda quadrada obtidos para seis soluções de amostras dopadas com 10,0 mg L⁻¹ de efedrina antes e depois de cinco adições sucessivas de 5,0 mg L⁻¹ de efedrina para (A) spirulina e (B) Thermodrol®. Demais condições: Fig. 19.



Fonte: O próprio autor.

Figura 27. Voltamogramas de onda quadrada obtidos para seis soluções de amostras dopadas com $5,0 \text{ mg L}^{-1}$ de efedrina antes e depois de cinco adições sucessivas de $5,0 \text{ mg L}^{-1}$ de efedrina para (A) chá verde; (B) garcínia; (C) garcínia composta e (D) Lipo Diet Emagry[®]. Demais condições: Fig. 19.



As Figuras 26 e 27 apresentam as curvas de calibração feitas em uma faixa de concentração menor (5,0 a 25,0 mg L⁻¹) que a faixa linear de efedrina encontrada utilizando BIA-SWV para garantir a linearidade nas amostras dentro do intervalo estudado. A seguir, estão apresentadas as equações para cada curva de calibração estudada:

❖ Chá verde: $I_p / \mu\text{A} = 1,25 \{[\text{EFD}] / (\text{mg L}^{-1})\} + 6,07;$

$$R^2 = 0,99$$

❖ Garcínia: $I_p / \mu\text{A} = 1,24 \{[\text{EFD}] / (\text{mg L}^{-1})\} + 6,35;$

$$R^2 = 0,99$$

❖ Garcínia composta: $I_p / \mu\text{A} = 1,13 \{[\text{EFD}] / (\text{mg L}^{-1})\} + 5,89;$

$$R^2 = 0,99$$

❖ Lipo Diet Emagry[®]: $I_p / \mu\text{A} = 1,30 \{[\text{EFD}] / (\text{mg L}^{-1})\} + 6,68;$

$$R^2 = 0,99$$

❖ Spirulina: $I_p / \mu\text{A} = 0,92 \{[\text{EFD}] / (\text{mg L}^{-1})\} + 9,22;$

$$R^2 = 0,98$$

❖ Thermodrol[®]: $I_p / \mu\text{A} = 0,97 \{[\text{EFD}] / (\text{mg L}^{-1})\} + 9,57;$

$$R^2 = 0,99$$

A partir das equações de cada curva de calibração obtida, pode-se afirmar que a técnica BIA-SWV proposta provou ser eficiente para quantificar pequenas concentrações de efedrina (5,0 mg L⁻¹ e 10 mg L⁻¹) em amostras complexas. A sensibilidade média para todas as amostras estudadas foi de $1,14 \pm 0,16$ (μA/mg L⁻¹), com a melhor sensibilidade obtida para a amostra Lipo Diet Emagry[®] (1,30 μA/mg L⁻¹) e a menor para Spirulina (0,92 μA/mg L⁻¹), mostrando leve variação, apesar das diferentes complexidades de cada matriz de amostra.

Além disso, o método apresentou bons resultados para as recuperações calculadas nas amostras variando de 97 a 104%. Isso mostra que o método foi eficiente para a quantificação da efedrina mesmo em amostras complexas. Portanto, o método apresentado demonstrou ser bastante eficaz para detecção de efedrina em suplementos alimentares ou fitoterápicos e a

quantificação em matrizes complexas com boa recuperação, além se serem análises rápidas e com baixo gasto de reagentes e amostras.

5 CONCLUSÕES

No presente trabalho foi demonstrado a potencialidade da detecção por SWV acoplada ao sistema BIA (BIA–SWV) no desenvolvimento de um método para a determinação e quantificação da efedrina em amostras de suplementos alimentares e/ou fitoterápicos, apresentando um baixo LD ($0,13 \text{ mg L}^{-1}$).

Como vantagem, os parâmetros de injeção como volume e velocidade de injeção do sistema BIA são controlados automaticamente e fixados pela pipeta eletrônica, tornando o procedimento de injeção muito reprodutível e mostrando que os métodos que empregam o sistema BIA possuem boa repetibilidade. Além disso, este sistema BIA permite a análise rápida e sequencial de muitas amostras sem necessidade de troca de eletrólito suportem e geram uma pequena quantidade de resíduo aquoso. O método desenvolvido requer uma etapa simples de preparo de amostra (apenas diluição em quantidade adequada de eletrólito), emprega pequenos volumes e pode ser aplicado em análises fora do laboratório.

Os métodos apresentam ainda sensibilidade, estabilidade e precisão adequada para a quantificação da efedrina em fitoterápicos e suplementos alimentares usando um eletrodo de trabalho BDD sem qualquer modificação química, somente um pré-tratamento eletroquímico catódico para melhorar o sinal analítico. Além disso, permite a detecção de efedrina em amostras complexas. A seletividade foi suficiente para a detecção de efedrina mesmo em amostras que possuem altas concentrações de outra espécie eletroativa como o suplemento de cafeína Thermodrol[®] que possui uma concentração de cafeína bem maior que a de efedrina.

Portanto, a associação do método SWV com o sistema BIA apresentou grande eficiência para a triagem de amostras com o ganho na portabilidade e na velocidade de análise, podendo ser adequada a utilização do método em laboratórios com infraestrutura limitada e para a realização de análises *in loco*.

REFERÊNCIAS

- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução DC/ANVISA Nº 66 DE 18/03/2016. **Diário Oficial da União**, v. 54, p. 28, 2016.
- ALPAR, N. et al. Voltammetric Method for the Simultaneous Determination of Melatonin and Pyridoxine in Dietary Supplements Using a Cathodically Pretreated Boron-doped Diamond Electrode. **Electroanalysis**, v. 29, n. 7, p. 1691–1699, 2017.
- AMBROSI, M. A. et al. Propriedades de saúde de Spirulina spp. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v.29, n. 2, p 109-117, 2008.
- BAGHERI, H. et al. Fabrication of a novel electrochemical sensing platform based on a core-shell nano-structured/molecularly imprinted polymer for sensitive and selective determination of ephedrine. **RSC Advances**, v. 6, n. 56, p. 51135–51145, 2016.
- BARD, A. J.; FAULKNER, L. R. **Electrochemical methods: fundamentals and applications**. New York: John Wiley & Sons, Inc., 2001.
- BELAY, A. et al. Current knowledge on potential health benefits of Spirulina. **Journal of Applied Phycology**, v. 5, n. 2, p. 235–241, 1993.
- BELL, D. G.; JACOBS, I. Combined caffeine and ephedrine ingestion improves run times of Canadian Forces Warrior Test. **Aviation Space and Environmental Medicine**, v. 70, n. 4, p. 325–329, 1999.
- CALAHAN, J. et al. Chemical Adulterants in Herbal Medicinal Products: A Review. **Planta Medica**, v. 82, n. 6, p. 505–515, 2016.
- CÁSSIA, R. DE et al. Filmes de diamante CVD dopado com boro. Parte I. Histórico, produção e caracterização. **Química Nova**, v. 28, n. 2, p. 317–325, 2005.
- CHICHARRO, M. et al. Determination of ephedrine in human urine using a glassy carbon electrode. **Analytica Chimica Acta**, v. 273, n. 1–2, p. 361–368, 1993.
- CIANCHINO, V. et al. Analysis of potential adulteration in herbal medicines and dietary supplements for the weight control by capillary electrophoresis. **Food Chemistry**, v. 108, n. 3, p. 1075–1081, 2008.
- CODOGNOTO, L. et al. Enhanced electrochemical response of boron-doped diamond

electrodes brought on by a cathodic surface pre-treatment. **Electrochimica Acta**, v. 49, n. 22–23, p. 4021–4026, 2004.

DAMIAN, C. et al. Quitosana: um amino polissacarídeo com características funcionais. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v. 16, n. 2, p. 195–205, 2009.

DECONINCK, E. et al. Comparison of three development approaches for Stationary Phase Optimised Selectivity Liquid Chromatography based screening methods Part I: A heterogeneous group of molecules (slimming agents in food supplements). **Talanta**, v. 148, p. 518–528, 2016.

DIAMOND, D. Analytical electrochemistry. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 15, n. 1, p. X–XI, 2003.

DUO, I. et al. Oxidation of 4-Chlorophenol at Boron-Doped Diamond Electrode for Wastewater Treatment. **Journal of The Electrochemical Society**, v. 148, n. 5, p. D60, 2002.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, HHS. Final rule declaring dietary supplements containing ephedrine alkaloids adulterated because they present an unreasonable risk. Final rule. **Federal register**, v. 69, n. 28, p. 6787–854, 2004.

FREITAS, H. C. P. DE; NAVARRO, F. O chá verde induz o emagrecimento e auxilia no tratamento da obesidade e suas comorbididades. **Revista brasileira de obesidade, nutrição e emagrecimento**, v. 1, n. 2, p. 16–3, 2007.

FREITAS, J. M. **Desenvolvimento de métodos eletroanalíticos simples, portáteis e de baixo custo para aplicações em análises forenses**. 2019. 199 f. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2019.

FREITAS, J. M. **Determinação estequiométrica de dimenidrinato e simultânea de 8-cloroteofilina, difenidramina e piridoxina usando análise por injeção em batelada com detecção amperométrica de múltiplos pulsos**. 2015. 109 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2015.

FREITAS, J. M. et al. A portable electrochemical method for cocaine quantification and rapid screening of common adulterants in seized samples. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 243, p. 557–565, 2017.

FUJISHIMA, A. et al. **Diamond Electrochemistry**. Tokyo: Elsevier, 2005.

GIRISH, P. et al. Screening of weight-loss herbal products for synthetic anti-obesity adulterants: a target-oriented analysis by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Dietary Supplements**, p. 1–13, 2020.

GIMENES, D. T. et al. A Simple Strategy to Improve the Accuracy of the Injection Step in Batch Injection Analysis Systems with Amperometric Detection. **Electroanalysis**, v. 24, n. 9, p. 1805–1810, 2012.

GOSSER, D. K. **Cyclic voltammetry: simulation and analysis of reaction mechanisms**. New York: VCH New York, v. 43, 1993.

GRAHAM, T. E. Caffeine, coffee and ephedrine: impact on exercise performance and metabolism. **Canadian Journal of Applied Physiology**, v. 26, n. S1, p. S186–S191, 2001.

HALLER, C. A.; BENOWITZ, N. L. Adverse cardiovascular and central nervous system events associated with dietary supplements containing ephedra alkaloids. **New England Journal of Medicine**, v. 343, n. 25, p. 1833–1838, 2002.

HANEEF, J. et al. Analytical methods for the detection of undeclared synthetic drugs in traditional herbal medicines as adulterants. **Drug Testing and Analysis**, v. 5, n. 8, p. 607–613, 2013.

HARAM, S. K. **Handbook of Electrochemistry**. [s.l.] Elsevier, 2007.

HASSAN, S. S. M.; KAMEL, A. H.; EL-NABY, H. A. New potentiometric sensors based on selective recognition sites for determination of ephedrine in some pharmaceuticals and biological fluids. **Talanta**, v. 103, p. 330–336, 2013.

INIESTA, J. et al. Electrochemical oxidation of phenol at boron-doped diamond electrode. **Electrochimica Acta**, v. 46, n. 23, p. 3573–3578, 2001.

KIM, H. J. et al. Monitoring of 29 weight loss compounds in foods and dietary supplements by LC-MS/MS. **Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment**, v. 31, n. 5, p. 777–783, 2014.

KIM, J. Y. et al. Development and validation of UPLC and LC-MS/MS methods for the simultaneous determination of anti-obesity drugs in foods and dietary supplements. **Archives of Pharmacal Research**, v. 39, n. 1, p. 103–114, 2016.

KLINGLER, R. J.; KOCHI, J. K. Electron-transfer kinetics from cyclic voltammetry.

Quantitative description of electrochemical reversibility. **Journal of Physical Chemistry**, v. 85, n. 12, p. 1731–1741, 1981.

KRAFT, A. Doped diamond: A compact review on a new, versatile electrode material. **International Journal of Electrochemical Science**, v. 2, p. 355–385, 2007.

LAVIRON, E. General expression of the linear potential sweep voltammogram in the case of diffusionless electrochemical systems. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 101, n. 1, p. 19–28, 1979.

LI, F.; DING, Z.; CAO, Q. E. Separation and determination of ephedrine and pseudoephedrine in Ephedrae Herba by CZE modified with a Cu(II)-L-lysine complex. **Electrophoresis**, v. 29, n. 3, p. 658–664, 2008.

LIU, Y.; LU, F. Adulterated pharmaceutical chemicals in botanical dietary supplements: novel screening approaches. **Reviews in Analytical Chemistry**, v. 36, n. 3, p. 1–14, 2017.

LV, D. et al. Rapid on-site detection of ephedrine and its analogues used as adulterants in slimming dietary supplements by TLC-SERS. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 407, n. 5, p. 1313–1325, 2015.

MABBOTT, G. A. An introduction to cyclic voltammetry. **Journal of Chemical Education**, v. 60, n. 9, p. 697, 1983.

MARKEN, F.; NEUDECK, A.; BOND, A. M. Cyclic voltammetry. **Electroanalytical Methods**. Springer, Berlin, Heidelberg, 2010. v. 60, p. 57–106, 2010.

MAZZOTTA, E. et al. Development of a sensor prepared by entrapment of MIP particles in electrosynthesised polymer films for electrochemical detection of ephedrine. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 23, n. 7, p. 1152–1156, 2008.

OLIVEIRA, T. DA C. et al. A batch injection analysis system with square-wave voltammetric detection for fast and simultaneous determination of naphazoline and zinc. **Talanta**, v. 152, p. 308–313, 2016.

OLIVEIRA, T. DA C. et al. Development of a Novel Versatile Method for Determination of two Antihistamines in Association with Naphazoline Using Cathodically Pretreated Boron-doped Diamond Electrode. **Electroanalysis**, v. 30, n. 5, p. 868–876, 2018.

OLOFSSON, G.; SPARR, E. Ionization Constants pKa of Cardiolipin. **PLoS ONE**, v. 8, n. 9,

p. e73040, 2013.

PEDROTTI, J. J.; ANGNES, L.; GUTZ, I. G. R. Miniaturized Reference Electrodes with Microporous Polymer Junctions. **Electroanalysis**, v. 8, n. 7, p. 673–675, 1996.

PEREIRA, P. F. et al. Fast batch injection analysis system for on-site determination of ethanol in gasohol and fuel ethanol. **Talanta**, v. 90, p. 99–102, 2012.

PHINNEY, K. W.; IHARA, T.; SANDER, L. C. Determination of ephedrine alkaloid stereoisomers in dietary supplements by capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v. 1077, n. 1, p. 90–97, 2005.

PINHEIRO, A. R. O.; FREITAS, S. F. T.; CORSO, A. C. T. Uma abordagem epidemiológica da obesidade. **Revista de Nutrição**, v. 17, n. 4, p. 523–533, 2004.

PLESKOV, Y. V. Synthetic diamond, a new electrode material for electroanalysis. **Journal of Analytical Chemistry**, v. 55, n. 11, p. 1045–1050, 2000.

QUINTINO, M. S. M.; ANGNES, L. Batch Injection Analysis: An Almost Unexplored Powerful Tool. **Electroanalysis**, v. 16, n. 7, p. 513–523, 2004.

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

RIBEIRO, F. A. DE L. et al. Planilha de validação: uma nova ferramenta para estimar figuras de mérito na validação de métodos analíticos univariados. **Química Nova**, v. 31, n. 1, p. 164–171, 2008.

SALAZAR-BANDA, G. R. et al. On the changing electrochemical behaviour of boron-doped diamond surfaces with time after cathodic pre-treatments. **Electrochimica Acta**, v. 51, n. 22, p. 4612–4619, 2006.

SHI, Y. et al. Development of a liquid chromatography tandem mass spectrometry method for simultaneous determination of eight adulterants in slimming functional foods. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, n. 42, p. 7655–7662, 2011.

SILVA, W. P. **Determinação simultânea de propifenazona , paracetamol e cafeína utilizando eletrodo de diamante dopado com boro**. 2017. 95 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2017.

SILVA, W. P. et al. Square-wave Voltammetric Determination of Propyphenazone,

Paracetamol, and Caffeine: Comparative Study Between Batch Injection Analysis and Conventional Electrochemical Systems. **Electroanalysis**, v. 29, n. 8, p. 1860–1866, 2017.

SOUZA, D. et al. Voltametria de onda quadrada. Segunda parte: aplicações. **Quimica Nova**, v. 27, n. 5, p. 790–797, 2004.

SOUZA, D.; MACHADO, S. A. S.; AVACA, L. A. Voltametria de onda quadrada. Primeira parte: aspectos teóricos. **Quimica Nova**, v. 26, n. 1, p. 81–89, 2003.

TAGHVIMI, A.; HAMIDI, S.; NEMATI, M. Magnetic dispersive solid phase microextraction technique coupled with LC–MS/MS for evaluating content versus label claims in ephedrine-free food supplements. **Journal fur Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit**, v. 14, n. 3, p. 275–282, 2019.

TERASHIMA, C. et al. Direct electrochemical oxidation of disulfides at anodically pretreated boron-doped diamond electrodes. **Analytical Chemistry**, v. 75, n. 7, p. 1564–1572, 2003.

TORMIN, T. F. et al. Fast and direct determination of butylated hydroxyanisole in biodiesel by batch injection analysis with amperometric detection. **Talanta**, v. 85, n. 3, p. 1274–1278, 2011.

TORMIN, T. F. et al. Fast simultaneous determination of BHA and TBHQ antioxidants in biodiesel by batch injection analysis using pulsed-amperometric detection. **Talanta**, v. 99, p. 527–531, 2012.

VAN STADEN, J. F. et al. Selectivity in analytical chemistry (IUPAC Recommendations 2001). **Pure and Applied Chemistry**, v. 73, n. 8, p. 1381–1386, 2007.

VAYSSE, J. et al. Analysis of adulterated herbal medicines and dietary supplements marketed for weight loss by DOSY 1H-NMR. **Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment**, v. 27, n. 7, p. 903–916, 2010.

WANG, J. **Analytical electrochemistry**. 3. ed. New York: John Wiley & Sons, Inc., 2006.

WANG, J.; TAHA, Z. Batch injection analysis. **Analytical Chemistry**, v. 63, n. 10, p. 1053–1056, 1991.

WARING, A. J. pKa prediction for organic acids and bases. **Analytica Chimica Acta**, v. 152, p. 308, 2002.

WONG, A.; SANTOS, A. M.; FATIBELLO-FILHO, O. Simultaneous determination of dopamine and cysteamine by flow injection with multiple pulse amperometric detection using

a boron-doped diamond electrode. **Diamond and Related Materials**, v. 85, p. 68–73, 2018.

WORLD ANTI-DOPING AGENCY. Standard Prohibited List, International Standard. n. January, p. 1–9, 2017.

YIN, K. M.; LIN, B. T. Effects of boric acid on the electrodeposition of iron, nickel and iron-nickel. **Surface and Coatings Technology**, v. 78, n. 1–3, p. 205–210, 1996.