



Juliana Machado de Carvalho

**Desenvolvimento de metodologias
eletroanalíticas para a determinação de
sibutramina em fármacos e em alimentos
protéicos**

Dissertação de Mestrado

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Química da PUC-Rio como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Química.

Orientadores: Prof. Ricardo Queiroz Aucélio
Co-orientadora: Dra. Katia Christina Leandro

Rio de Janeiro
março de 2009



Juliana Machado de Carvalho

**Desenvolvimento de metodologias
eletroanalíticas para a determinação de
sibutramina em fármacos e em alimentos
protéicos**

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Química da PUC-Rio. Aprovada pela Comissão Examinadora abaixo assinada.

Prof. Ricardo Queiroz Aucélio

Orientador
Departamento de Química – PUC-Rio

Profa. Katia Christina Leandro

Co-Orientadora
Departamento de Química - Fiocruz

Dr. Josino Costa Moreira

CESTEH - FIOCRUZ

Prof. Pércio Augusto Mardini Farias

Departamento de Química – PUC-Rio

Profa. Fátima Ventura Pereira Meirelles

Departamento de Química – PUC-Rio

Prof. José Eugenio Leal

Coordenado Setorial do Centro Técnico Científico - PUC-Rio

Rio de Janeiro, 20 de março de 2009

Todos os direitos reservados. É proibida a reprodução total ou parcial do trabalho sem autorização da universidade, da autora e do orientador.

Juliana Machado de Carvalho

Graduou-se em Química Industrial pela Universidade Federal Fluminense (2005). Estagiou no Cenpes-Petrobras. Foi bolsista Tec Tec no Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fiocruz, onde trabalhou com Desenvolvimento de Metodologias Eletroanalíticas para determinação de princípios ativos em medicamentos e de íons metálicos em alimentos e água mineral.

Ficha Catalográfica

Carvalho, Juliana Machado de

Desenvolvimento de metodologias eletroanalíticas para a determinação de sibutramina em fármacos e em alimentos protéicos / Juliana Machado de Carvalho ; orientadores: Kátia Christina Leandro, Ricardo Queiroz Aucélio. – 2009.

117 f. ; 30 cm

Dissertação (Mestrado em Química)–Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009.

Inclui bibliografia

1. Química – Teses. 2. Sibutramina. 3. Voltametria de pulso diferencial. 4. Voltametria de onda quadrada. 5. Mecanismo redox. 6. Medicamentos. 7. Alimentos protéicos. I. Leandro, Katia Christina. II. Aucélio, Ricardo Queiroz. III. Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro. Departamento de Química. IV. Título.

CDD: 540

Aos meus pais, Júlio e Tereza
Ao meu marido, Sandro
A minha irmã Luciana
A minha orientadora Katia Christina

Agradecimentos

Aos meus pais pelo amor, dedicação e apoio que me proporcionam.

Ao meu marido Sandro pelo amor, paciência e companheirismo.

Ao CNPq, FINEP e PUC-Rio, pelos auxílios recebidos, sem os quais este trabalho não poderia ter sido realizado..

Ao Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde - Fiocruz, e em particular, ao Departamento de Química pela grande ajuda e amizade oferecida.

Ao Professor Dr. Ricardo Aucélio pela orientação e dedicação neste trabalho.

À Professora Katia Christina pela orientação, apoio, dedicação e amizade concedida.

À Dra. Silvana do Couto Jacob pela amizade e apoio.

A todos os professores que participaram da Comissão Examinadora.

A todos os amigos e familiares que de uma forma ou de outra me estimularam ou me ajudaram.

Resumo

Carvalho, Juliana Machado; Aucélio, Ricardo Queiroz. **Desenvolvimento de metodologias eletroanalíticas para a determinação de sibutramina em fármacos e em alimentos protéicos.** Rio de Janeiro, 2009. 117p. Dissertação de Mestrado - Departamento de Química, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro.

O cloridrato de sibutramina está entre os sacietógenos mais prescritos para o controle da obesidade e tem sido adicionado, de forma não declarada, a alimentos protéicos para esportistas. Nenhuma metodologia analítica é descrita em compêndios oficiais para a determinação de sibutramina. O presente trabalho objetiva o desenvolvimento e a validação de métodos analíticos baseados na voltametria de pulso diferencial (DPV) e na voltametria de onda quadrada (SWV) para quantificação do cloridrato de sibutramina em fármacos e em alimentos protéicos. A influência dos parâmetros eletroquímicos foi estudada para selecionar as melhores condições de trabalho como: eletrólito suporte (tampão McIlvaine) pH (4,0), velocidade de varredura (40 mV s^{-1} para DPV e 240 mV s^{-1} para SWV) e amplitude de pulso (50 mV). Não foi possível pré-concentrar a sibutramina no eletrodo de trabalho (gota de mercúrio). O comportamento eletroquímico desta substância no eletrodo de mercúrio também foi investigado a partir de estudos com voltametria cíclica. A redução da sibutramina é aparentemente reversível envolvendo a participação de 1 próton e 1 elétron. O potencial de pico da sibutramina é cerca de -100 mV (Ag/AgCl 3 mol L^{-1}). No processo de validação foram avaliadas as faixas de resposta linear (do limite de quantificação até $33,3 \text{ mg L}^{-1}$ em ambos os métodos), o limite de detecção ($0,4$ para DPV e $0,3 \text{ mg L}^{-1}$ para SWV), e o limite de quantificação ($1,4$ para DPV e $1,1 \text{ mg L}^{-1}$ para SWV). A precisão do método foi satisfatória. Testes de recuperação indicaram $90,4 \%$ em ambos os métodos. O desempenho das técnicas voltamétricas foi comparado estatisticamente com a técnica CLAE e não houve diferença significativa entre os resultados obtidos.

Palavras-chave

Sibutramina, Voltametria de pulso diferencial, Voltametria de onda quadrada, Mecanismo redox, Medicamentos, Alimentos protéicos.

Abstract

Carvalho, Juliana Machado; Aucélio, Ricardo Queiroz (Advisor). **Development of electroanalytical methods for the determination of sibutramine in pharmaceutical formulations and in protein-rich food complements.** Rio de Janeiro, 2009. 117p. MSc. Dissertation - Departamento de Química, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro.

Sibutramine hydrochloride is among the most prescribed satiety inducer for obesity control and it has also been added, in a fraudulent way, in protein-rich food complement for athletes. There is no analytical method for sibutramine described in the official literature. The goal of this work is to develop and validate electroanalytical methods for the determination of sibutramine in pharmaceuticals and in protein-rich food complements. Differential pulse voltammetry (DPV) and square wave voltammetry (SWV) were the techniques employed. The influence of electrochemical parameters was studied in order to select the best working conditions such as supporting electrolyte (McIlvaine buffer), pH (4.0), scan rate (40 mV s^{-1} for DPV and 240 mV s^{-1} for SWV) and pulse amplitude (50 mV). The pre-concentration of sibutramine in the working electrode (mercury drop) was not possible. The electrochemical behavior in the mercury electrode was also investigated using cyclic voltammetry. The reduction of sibutramine is probably reversible and involves of 1 proton and 1 electron. The peak potential of sibutramine is about -100 mV ($\text{Ag}/\text{AgCl}_3 \text{ mol L}^{-1}$). In the validation process, the linear range of the analytical response (from the limit of quantification to 33.3 mg L^{-1} , in both methods), the limit of detection (0.6 for DPV and 0.4 mg L^{-1} for SWV) and the limit of quantification (1.8 for DPV and 1.1 mg L^{-1} for SWV) were evaluated. Satisfactory precision was achieved. Recovery tests produced results of 90.4% for both methods. These results were compared with the ones achieved by HPLC and no significant statistical difference was found between them.

Keywords

Sibutramine, differential pulse voltammetry, square wave voltammetry, redox mechanism, medicines, protein-rich food complement.

Sumário

1 Introdução	20
1.1. Voltametria	20
1.2. Métodos voltamétricos de análises	26
1.2.1. Voltametria cíclica	26
1.2.2. Voltametria de pulso diferencial (DPV)	28
1.2.3. Voltametria de onda quadrada (SWV)	30
1.2.4. Aplicações da voltametria	31
1.3. Fármacos no combate à obesidade	33
1.3.1. Cloridrato de sibutramina	34
1.4. Alimentos protéicos	36
2 Parte experimental	38
2.1. Equipamentos	38
2.2. Soluções e reagentes	38
2.3. Preparo das soluções tampão	39
2.4. Preparo das soluções padrão	39
2.5. Preparo e análise das amostras de medicamentos e de alimentos protéicos	39
2.6. Preparo das curvas analíticas de sibutramina	40
3 Resultado e discussão	42
3.1. Otimização das condições experimentais	42
3.1.1. Estudo do eletrólito suporte e do pH	42
3.1.2. Estudo da pré-concentração de sibutramina na gota de mercúrio	44
3.1.3. Otimização da velocidade de varredura para DPV	44
3.1.4. Estudo da amplitude	45
3.1.5. Estudo da frequência na aplicação do modo SWV	46
3.2. Validação das metodologias eletroanalíticas desenvolvidas por DPV e SWV	48

3.2.1. Validação para a técnica DPV	48
3.2.1.1. Limite de detecção e limite de quantificação	48
3.2.1.2. Faixa de resposta linear e sensibilidade da resposta analítica da sibutramina por voltametria de pulso diferencial	49
3.2.1.3. Exatidão	56
3.2.1.4. Seletividade/Especificidade	56
3.2.1.5. Precisão	58
3.2.1.5.1. Repetitividade	59
3.2.1.5.1.1. Teste de Homo/Heterocedasticidade	59
3.2.1.5.1.2. Repetitividade avaliada pela variância	59
3.2.1.5.2. Precisão intermediária	60
3.2.2. Validação para a técnica SWV	61
3.2.2.1. Limite de detecção e limite de quantificação	61
3.2.2.2. Faixa de resposta linear e sensibilidade da resposta analítica da sibutramina por voltametria de onda quadrada	62
3.2.2.3. Exatidão	68
3.2.2.4. Seletividade/Especificidade	68
3.2.2.5.1.1. Teste de Homo/Heterocedasticidade	69
3.2.2.5.1.2. Repetitividade avaliada pela variância	69
3.2.2.5.2. Precisão Intermediária	70
3.3. Voltametria cíclica	70
4 Avaliação de desempenho dos métodos voltamétricos e análise dos medicamentos e do alimento protéico	72
4.1. Comparação do método voltamétrico com cromatografia líquida	72
4.1.1. Análise do medicamento Biomag [®] por CLAE e por voltametria de pulso diferencial	73
4.1.1.1. CLAE	73
4.1.1.2. Voltametria de pulso diferencial	74
4.1.1.3. Comparação entre os resultados das análises de sibutramina do medicamento Biomag [®]	75
4.1.2. Análise do alimento protéico GF-1 [®] por CLAE e DPV	76

4.1.2.1. CLAE	76
4.1.2.2. DPV	77
4.1.2.3. Comparação dos resultados das análises do GF-1 [®]	77
4.2. Análise dos medicamentos e do alimento protéico GF-1 [®] por DPV	78
4.2.1. Análise dos medicamentos por DPV	78
4.3. Comparação entre as técnicas DPV e SWV	80
5 Conclusões	82
6 Referências bibliográficas	84
7 Anexos	90

Lista de figuras

Figura 1 - Célula eletroquímica	22
Figura 2 - Representação da dupla camada elétrica (Fonte: Harris, 2005)	25
Figura 3 - Esquema de aplicação do potencial em voltametria de pulso diferencial (Fonte: Wang, 2006)	29
Figura 4 – Representação da variação da corrente faradáica e capacitiva com o tempo (Harris, 2005)	29
Figura 5 - Esquema de aplicação do potencial em voltametria de onda quadrada (Fonte: Harris, 2005)	31
Figura 6 - Representação da estrutura química do cloridrato de sibutramina.	35
Figura 7 - Voltamogramas obtidos para padrão de sibutramina 20,9 mg L ⁻¹ usando como eletrólito suporte: (A) tampão McIlvaine pH 4,0, (B) tampão BR pH 4,0, (C) tampão ftalato ácido de potássio e (D) tampão acetato pH 4,0	43
Figura 8 - Valores dos brancos obtidos usando como eletrólito suporte: (A) tampão McIlvaine pH 4,0, (B) tampão BR pH 4,0, (C) tampão ftalato ácido de potássio e (D) tampão acetato pH 4,0	44
Figura 9 - Voltamogramas obtidos para valores crescentes de amplitude (10 a 100 mV) de baixo para cima do gráfico. Condições experimentais: DPV, padrão de sibutramina 20,9 mg L ⁻¹ , tampão McIlvaine pH 4,0 e velocidade de varredura 40 mV s ⁻¹	46
Figura 10 - Voltamogramas obtidos da sibutramina usando frequência de 10; 20; 30; 50 e 100 Hz com incremento de potencial de 8 mV.	47
Figura 11 - Influência do incremento de potencial nos voltamogramas. Variações de 2; 4; 6 e 8 mV	47
Figura 12 - Exemplo de voltamogramas utilizados no preparo da	

- curva analítica (7,3; 14,3; 20,9; 27,3 e 33,3 mg L⁻¹) da sibutramina por voltametria de pulso diferencial nas condições descritas na Tabela 3 53
- Figura 13 - Curva analítica da sibutramina (7,3; 14,3; 20,9; 27,3 e 33,3 mg L⁻¹) por voltametria de pulso diferencial realizada de acordo com as condições experimentais descritas na Tabela 3 53
- Figura 14 - Voltamograma obtido para o preparo da curva analítica (7,3; 14,3; 20,9; 27,3 e 33,3 mg L⁻¹) da sibutramina pela técnica de onda quadrada nas condições descritas na Tabela 4 65
- Figura 15 - Curva analítica da sibutramina (7,3 a 33,3 mg L⁻¹) por voltametria de onda quadrada realizada de acordo com as condições experimentais descritas na Tabela 4 65
- Figura 16 - Voltamograma cíclico aparentemente reversível da sibutramina 14,3 mg L⁻¹; tampão McIlvaine pH 4,0; velocidade de varredura 50 mV s⁻¹ e 3 mV voltag step 71
- Figura 17 - Curva analítica da sibutramina por CLAE. Condições experimentais: coluna cromatográfica C8 de 250 x 4 mm (tamanho de partícula médio de 5 µm), fase móvel: solução 0,05% v/v ácido trifluoracético e acetronitrila 70:30, volume injetado: 15 µL de sibutramina da Biomag[®] e detetor UV (comprimento de onda 230 nm) 73
- Figura 18 - Cromatograma do padrão de sibutramina 300 mg L⁻¹. Condições experimentais: coluna cromatográfica C8 de 250 x 4 mm (tamanho de partícula médio de 5 µm), fase móvel: solução 0,05% v/v ácido trifluoracético e acetronitrila 70:30, volume injetado: 15 µL de sibutramina do medicamento Biomag[®] e detetor UV (comprimento de onda 230 nm) 74
- Figura 19 - Curva analítica da sibutramina por DPV para análises das amostras de sibutramina do medicamento Biomag[®] 75
- Figura 20 - Cromatograma da solução 2 da amostra do alimento protéico GF-1[®] lote 16174 por CLAE. Condições experimentais: coluna cromatográfica C8 de 250 x 4 mm

(tamanho de partícula médio de 5 μm), fase móvel: solução 0,05% v/v ácido trifluoracético e acetronitrila 70:30, volume injetado: 15 μL de sibutramina do medicamento Biomag[®] e detector UV (comprimento de onda 230 nm) 76

Figura 21 - Curva Analítica para análise dos medicamentos por voltametria de pulso diferencial 78

Figura 22 - Curva Analítica para análise dos medicamentos por voltametria de onda quadrada 81

Lista de tabelas

Tabela 1 - Características da resposta analítica da sibutramina (4,4 mg L ⁻¹) em tampão BR	43
Tabela 2 - Resultados obtidos para E _p , i _L , e b _{1/2} para diferente velocidades de varredura usando padrão de sibutramina 20,9 mg L ⁻¹	45
Tabela 3 - Condições operacionais utilizadas para o preparo da curva analítica de sibutramina por voltametria de pulso diferencial	52
Tabela 4 - Condições escolhidas para a sibutramina na técnica de voltametria de onda quadrada	54

Lista de planilhas

Planilha 1 - Teste de Jack-knife para avaliação da linearidade de 1,4 (LQ) a 33,3 mg L ⁻¹	51
Planilha 2 - Teste de Jack-knife para a curva analítica da sibutramina (7,3 a 33,3 mg L ⁻¹) por pulso diferencial	55
Planilha 3 - Teste de Jack-knife para avaliação da linearidade de 1,1 (LQ) a 33, mg L ⁻¹	63
Planilha 4 - Teste de Jack-knife para avaliação da linearidade da curva analítica da sibutramina pela técnica de onda quadrada	67

Lista de anexos

Anexo 1 - Tabela de Cochran: Valores de G, segundo o número de determinações (k), o grau de liberdade (v) e $\alpha = 5\%$	91
Anexo 2 - Valores de F para $\alpha = 5\%$, segundo o número de graus de liberdade do numerador e denominador	92
Anexo 3 - Valores de t, segundo os graus de liberdade e os valores de α	93
Anexo 4 – Valores das concentrações obtidas no limite de quantificação teórico de $1,8 \text{ mg L}^{-1}$	94
Anexo 5 - Resultados obtidos das sete amostras analisadas para avaliação da repetitividade da sibutramina para o primeiro ponto da curva (adição de $250 \mu\text{l}$ do padrão 300 mg L^{-1})	95
Anexo 6 - Resultados obtidos das sete amostras analisadas para avaliação da repetitividade da sibutramina para o ponto central da curva (adição de $750 \mu\text{l}$ do padrão 300 mg L^{-1})	96
Anexo 7 - Resultados obtidos das sete amostras analisadas para avaliação da repetitividade da sibutramina para o último ponto da curva (adição de $1250 \mu\text{l}$ do padrão 300 mg L^{-1})	97
Anexo 8 - Resultados obtidos do primeiro dia de análise para sete soluções de sibutramina (300 mg L^{-1}) utilizando-se a curva analítica da sibutramina (Figura 13)	98
Anexo 9 - Resultados obtidos do segundo dia de análise para sete soluções de sibutramina (300 mg L^{-1}) utilizando-se a curva analítica da sibutramina (Figura 13)	99
Anexo 10 - Valores da concentração obtidas no limite de quantificação teórico de $1,1 \text{ mg L}^{-1}$ para a técnica de voltametria de onda quadrada	100
Anexo 11 - Resultados obtidos das sete amostras analisadas para avaliação da repetitividade da sibutramina para o primeiro ponto da curva (adição de $250 \mu\text{l}$ do padrão 300 mg L^{-1})	

	101
Anexo 12 - Resultados obtidos das sete amostras analisadas para avaliação da repetitividade da sibutramina para o terceiro ponto da curva (adição de 750 µl do padrão 300 mg L ⁻¹)	102
Anexo 13 - Resultados obtidos das sete amostras analisadas para avaliação da repetitividade da sibutramina para o último ponto da curva (adição de 1250 µl do padrão 300 mg L ⁻¹)	103
Anexo 14 - Resultados obtidos do primeiro dia da análise para as sete amostras utilizando-se a curva analítica da sibutramina (Figura 15)	104
Anexo 15 - Resultados obtidos do segundo dia da análise para as sete amostras utilizando-se a curva analítica da sibutramina (Figura 15)	105
Anexo 16 - Resultados obtidos das análises das amostras de sibutramina do medicamento Biomag [®] por CLAE	106
Anexo 17 - Resultados obtidos das análises das amostras de sibutramina do medicamento Biomag [®] por DPV	106
Anexo 18 - Resultados obtidos das análises das amostras de GF-1 [®] lote 16174 por CLAE	107
Anexo 19 - Resultados obtidos das análises das amostras de GF-1 [®] lote 16174 por DPV	107
Anexo 20 - Determinação do peso médio do medicamento Vazy [®] 10 mg (Lote 128734)	108
Anexo 21 - Determinação do peso médio das cápsulas do medicamento Sandoz [®] 15 mg (Lote 41748R)	108
Anexo 22 - Determinação do peso médio das cápsulas do medicamento Sandoz [®] 15 mg (Lote 43140)	109
Anexo 23 - Determinação do peso médio das cápsulas do medicamento Biomag [®] 10 mg (Lote 0705169A)	109
Anexo 24- Determinação do peso médio das cápsulas do medicamento Biomag [®] 15mg (Lote 0205844)	110
Anexo 25 - Valores das concentrações (mg L ⁻¹) de sibutramina encontradas para cada amostra analisada pela curva analítica	

da Figura 21 para o medicamento Vazy [®] do laboratório EMS Sigma Pharma cápsulas de 10 mg (lote 128734)	111
Anexo 26 - Valores das concentrações (mg L ⁻¹) de sibutramina encontradas para cada amostra analisada pela curva analítica da Figura 21 para o medicamento Sandoz [®] do laboratório Novartis cápsulas de 15 mg (lote 41748R)	112
Anexo 27 - Valores das concentrações (mg L ⁻¹) de sibutramina encontradas para cada amostra analisada pela curva analítica da Figura 21 para o medicamento Sandoz [®] do laboratório Novartis cápsulas de 15 mg (lote 43140)	113
Anexo 28 - Valores das concentrações (mg L ⁻¹) de sibutramina encontradas para cada amostra analisada pela curva analítica da Figura 21 para o medicamento Biomag [®] do laboratório Aché cápsulas de 10 mg (lote 0705169A)	114
Anexo 29 - Valores das concentrações (mg L ⁻¹) de sibutramina encontradas para cada amostra analisada pela curva analítica da Figura 21 para o medicamento Biomag [®] do laboratório Aché cápsulas de 15 mg (lote 0205844)	115
Anexo 30 - Valores das concentrações (mg L ⁻¹) de sibutramina encontradas para cada amostra do medicamento Vazy [®] do laboratório EMS Sigma Pharma cápsulas de 10 mg (lote 128734) analisadas pela curva analítica da Figura 22	116
Anexo 31 - Valores das concentrações (mg L ⁻¹) de sibutramina encontradas para cada amostra analisada para o medicamento Sandoz [®] do laboratório Novartis cápsulas de 15 mg (lote 41748R) pela curva analítica da Figura 22	117

Lista de Abreviaturas

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

CLAE – Cromatografia Líquida de alta eficiência

COI – Comitê Olímpico Internacional

CV – Voltametria cícica

DPV – Voltametria de pulso diferencial

FDA - Federal Drug & Administration

HMDE – Eletrodo de gota pendente de mercúrio

IMC – Índice de massa corpórea

INCQS – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial

LD – Limite de detecção

LQ – Limite de quantificação

OMS – Organização Mundial da Saúde

OPAS - Organização Pan Americana de saúde

SNC – Sistema nervoso central

SWV – Voltametria de onda quadrada

UV – Ultravioleta