

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

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS
ELETROFORÉTICOS E CROMATOGRÁFICOS PARA
A DETERMINAÇÃO DE BENZODIAZEPÍNICOS COMO
ADULTERANTES EM FORMULAÇÕES
FITOTERÁPICAS PARA EMAGRECIMENTO**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

ANA PAULA SOARES DE LIMA

Santa Maria, RS, Brasil

2009

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS ELETROFORÉTICOS E
CROMATOGRÁFICOS PARA A DETERMINAÇÃO DE
BENZODIAZEPÍNICOS COMO ADULTERANTES EM
FORMULAÇÕES FITOTERÁPICAS PARA
EMAGRECIMENTO**

por

ANA PAULA SOARES DE LIMA

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de
Pós-Graduação em Química, Área de Concentração em
Química Analítica, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS),
como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Química

Orientador: Prof. Dr. Leandro Machado de Carvalho

Santa Maria, RS, Brasil

2009

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

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

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS ELETROFORÉTICOS E
CROMATOGRÁFICOS PARA A DETERMINAÇÃO DE
BENZODIAZEPÍNICOS COMO ADULTERANTES EM FORMULAÇÕES
FITOTERÁPICAS PARA EMAGRECIMENTO**

elaborada por

Ana Paula Soares de Lima

como requisito parcial para a obtenção do grau de
Mestre em Química

COMISSÃO EXAMINADORA:

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

Prof^a. Dr^a. Simone Gonçalves Cardoso (UFSC)

Prof^a. Dr^a. Clarice Madalena Bueno Rolim (UFSM)

Santa Maria, 03 de julho de 2009.

“Sábio é o ser humano que tem coragem de ir diante do espelho da sua alma para reconhecer seus erros e fracassos e utilizá-los para plantar as mais belas sementes no terreno de sua inteligência”

Augusto Cury

Dedico este trabalho

*Aos meus pais Cláudio e Suzinara,
meus grandes educadores, exemplos de vida
e de admiração;*

À minha irmã Ana Cláudia;

Ao meu noivo Marcelo, meu amor;

*Ao meu avô Darcy, que onde quer que
esteja sei que olha por mim.*

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Leandro Machado de Carvalho, agradeço pela orientação, apoio, sabedoria, amizade, incentivo e compreensão em todos os momentos; que mesmo muito atarefado sempre teve um tempinho e disposição para sanar minhas dúvidas para a realização deste trabalho. Por todas as contribuições para a minha formação pessoal e profissional.

Ao Prof. Dr. Paulo Cícero do Nascimento e à Prof^a. Dr^a. Denise Bohrer do Nascimento pela amizade, apoio e colaboração neste trabalho.

Ao Prof. Dr. Marcelo Barcellos da Rosa, pelo apoio, esclarecimento de dúvidas e pela colaboração neste trabalho, pelas suas muitas idéias e críticas, sempre construtivas. E também pela amizade, apoio, companheirismo e os momentos de descontração.

À Prof^a. Dr^a. Clarice Bueno Rolim, pela sua valiosa participação e sugestões no exame de qualificação e na defesa da dissertação que muito contribuiu para este trabalho.

À Prof^a. Dr^a. Simone Gonçalves Cardoso, pela sua participação na defesa da tese, suas sugestões e questionamentos.

Aos colegas e amigos do LACHEM: Adriana Berggrav, Alexandre Schneider, Alice Raabe, Antonio Boli, Carine Viana, Cibele Canabarro, Cláudia Carvalho, Cristiane Jost, Cristiane Spengler, Daiane Dias, Daniele Correia, Denise Bertagnolli, Fabiane Stringhini, Juliane Fronchetti, Lara Saccol, Larissa Sabo, Lucas Trindade, Luciana Gobo, Luís Ferraz, Marieli Martini, Marlei Veiga, Maurício Hilgemann, Nolberto Adriano, Raquel Stefanello, Sandra Maria Ribeiro, Simone Noremborg e Vanessa Mörschbacher, agradeço pela amizade, ajuda e incentivo e pelos momentos de descontração vividos ao longo deste período em que trabalhamos juntos.

À Adriana Berggrav, pelo carinho e pela amizade, pela ajuda no trabalho, pelo apoio, meu eterno obrigada por nunca medir esforços em me ajudar.

À Daiane Dias, Denise Bertagnolli e Larissa Sabo, pela grande amizade, pelos conselhos e por estarem sempre ao meu lado, tenho um carinho imenso por vocês. Sentirei saudades!

Ao meu noivo e futuro esposo Marcelo Haas Centurião, pelo amor, companheirismo, incentivo, dedicação, carinho e compreensão. Você é o melhor presente que a vida me deu... Te Amo Muito!

À minha irmã Ana Cláudia, pelo amor, incentivo, apoio e dedicação.

Ao meu pai Cláudio e minha mãe Suzinara, os melhores pais do mundo!! Obrigada pelo apoio, carinho, compreensão, força, cobrança e incentivo, só estou aqui por causa de vocês, obrigada por acreditarem em mim. Não tenho palavras pra dizer o quanto amo vocês e o quanto significam para mim!

Ao meu avô Darcy (in memorian), que sinto falta da sua presença todos os dias, mas que sempre vai morar no meu coração. À minha avó Lady, pelo amor e carinho, que conviveu comigo durante toda a minha vida, e sempre me apoiou e me cuidou.

Ao meu avô Dílson (in memorian), apesar de convivermos pouco tempo sempre foi muito especial para mim. À minha avó Joana, pelo carinho, amor e apoio.

À minha tia Silvia e minha prima Daiana, pela amizade, carinho, compreensão e apoio.

À Júlia Munareto, minha grande, eterna e melhor amiga, obrigada por todos os momentos de alegria, companheirismo, atenção, apoio e força.

A toda minha família e amigos maravilhosos pela força e apoio.

A todos os funcionários e professores que colaboraram indiretamente para o desenvolvimento deste trabalho.

À Universidade Federal de Santa Maria, pela oportunidade oferecida de realizar o curso de mestrado.

“A Deus, por ter me dado força e me acompanhado sempre!”

RESUMO

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

DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS ELETROFORÉTICOS E CROMATOGRÁFICOS PARA A DETERMINAÇÃO DE BENZODIAZEPÍNICOS COMO ADULTERANTES EM FORMULAÇÕES FITOTERÁPICAS PARA EMAGRECIMENTO

Autora: Ana Paula Soares de Lima

Orientador: Prof. Dr. Leandro Machado de Carvalho

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 03 de julho de 2009.

A adulteração de formulações fitoterápicas tem aumentado consideravelmente nos últimos anos em alguns países, pelo fato de que ainda não há uma fiscalização eficiente estabelecida para o controle da manipulação e comercialização dos chamados “medicamentos naturais”. Como a possibilidade de adulteração é relativamente ampla em termos de classes de compostos, surge assim, a necessidade de métodos analíticos de boa seletividade e sensibilidade, capazes de identificar e quantificar simultaneamente mais de um fármaco na mesma formulação fitoterápica.

Sabendo-se dos efeitos indesejados que esses adulterantes podem causar, além da necessidade de alertar a sociedade sobre os perigos do uso e abuso desses adulterantes nas formulações para emagrecimento, desenvolveu-se neste trabalho dois métodos de separação, para possibilitar o estudo da presença dos benzodiazepínicos alprazolam, clonazepam, clordiazepóxido, diazepam, flurazepam, lorazepam, medazepam e midazolam como possíveis adulterantes em produtos fitoterápicos: eletroforese capilar de zona (CZE) e cromatografia líquida de alta eficiência por fase reversa (RP-HPLC). Para o método eletroforético as condições otimizadas foram: eletrólito de trabalho tampão fosfato 100 mM, 15% acetonitrila (pH 2,0); capilar de sílica fundida revestido de poliimida de 60 cm de comprimento (com 9,5 cm da janela do detector) com diâmetro interno de 75 μ m, operando a 25°C; voltagem aplicada de 15 kV; detecção UV em 200 nm e injeção hidrodinâmica anódica durante 2 segundos com pressão de 30 mBar. O método cromatográfico foi

otimizado na seguinte condição: eluente acetonitrila:água 40:60 (v/v) (pH 4,0) em fluxo 0,5 mL/min; detecção UV em 230 nm e injeção de 20 µL.

As adulterações nestas formulações fitoterápicas ocorrem, geralmente, com o uso de somente uma classe de fármacos: um benzodiazepínico, um anorexígeno e um antidepressivo. Não se espera encontrar em uma mesma amostra mais de um benzodiazepínico, portanto, os métodos eletroforéticos e cromatográficos propostos não têm como objetivo detectar todos os benzodiazepínicos juntos em uma mesma amostra e sim, promover a identificação individual de todos em uma amostra.

O método de RP-HPLC foi validado para a determinação desses benzodiazepínicos e empregado na análise de formulações fitoterápicas utilizadas no tratamento da obesidade, as quais são comercializadas como medicamentos naturais por farmácias de manipulação brasileiras. Os ensaios de recuperação realizados promoveram recuperações acima de 84,25 % para todas as espécies de adulterantes analisadas.

Os métodos desenvolvidos apresentaram alta sensibilidade, precisão analítica, baixo custo e análises rápidas, comprovando a aplicabilidade dos mesmos como uma alternativa para o controle e fiscalização do uso abusivo destes fármacos presentes em formulações fitoterápicas passíveis de adulteração.

Palavras chave: benzodiazepínicos; cromatografia líquida por fase reversa; eletroforese capilar por zona; adulteração de formulações fitoterápicas; validação analítica.

ABSTRACT

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

DEVELOPMENT OF ELECTROPHORETIC AND CHROMATOGRAPHY METHODS FOR THE DETERMINATION OF BENZODIAZEPINES AS ADULTERANTS IN PHYTOTHERAPIC FORMULATIONS

Author: Ana Paula Soares de Lima

Advisor: Prof. Dr. Leandro Machado de Carvalho

Date and Local of Defense: Santa Maria, July 03th, 2009.

The adulteration of phytotherapeutic formulations has been increasing considerably in the recent years in several countries, by the fact that there is not an established efficient monitoring for the control of the manipulation and commercialization of the so called "natural medicines". As the possibility of adulteration is relatively wide in terms of compound classes, the need of analytical methods with good sensitivity and selectivity, which are able to identify and quantify simultaneously more than one pharmaceutical in the same phytotherapeutic formulation, is very important.

Considering the well known effects of these adulterants and its use and abuse in the formulations for weigh loss, two separations methods were developed in this study to enable the study of benzodiazepines alprazolam, clonazepam, chlordiazepoxide, diazepam, flurazepam, lorazepam, medazepam and midazolam as possible adulterants in phytotherapeutic formulations. For the electrophoretic method the optimized conditions were: buffer phosphate 100 mM, 15% acetonitrile (pH 2,0) as an electrolyte; fused silica capillary coated with a 60 cm layer of polymida (9,5 cm to the detector window) with 75 μm of internal diameter, operating at 25 °C; 15 kV of applied voltage, UV detection at 200 nm and anodic hydrodynamic injection for μ seconds with a pressure of 30 mbar. The chromatographic method was optimized as the following conditions: eluent acetonitrile: water 40:60 (v / v) (pH 4,0) at flow 0,5 mL/min, UV detection at 230 nm and injection of 20 μL .

The adulteration in these phytotherapeutic formulations occurs usually with the use of only one pharmaceutical class: a benzodiazepine, a anorexic and a

antidepressant. It is not expected to find in the same sample more than one benzodiazepine. Therefore, the electroforetic and chromatography proposed methods do not have the objective to detect all of benzodiazepines together in a same sample, but rather to promote the individual identification of all in a sample.

The RP-HPLC method was validated for the determination of these benzodiazepines and applied for the determination of the adulterants in phytotherapeutic formulations used in the treatment of obesity, which have been commercialized as natural medicines by Brazilian pharmacies. The recovery experiments promoted recoveries values higher than 84,25 % for all the analyzed adulterants.

The developed methods introduced high sensitivity, analytical precision, low cost and rapid analysis, confirming the applicability of the methods as an alternative for the control and monitoring of abuse use of these pharmaceuticals in phytotherapeutic formulations possible of adulteration.

Keywords: benzodiazepines; reverse phase high performance liquid chromatography; capillary zone electrophoresis; phytotherapeutic formulations adulteration; analytical validation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	Estrutura principal dos benzodiazepínicos (KOROLKOVAS, A.; BURCKHALTER, J.H., 1988).....	29
Figura 2:	Biotransformação dos benzodiazepínicos (Adaptado de KATZUNG, 2006; SILVA, 2006).....	32
Figura 3:	Representação esquemática de um sistema de CE. F - Fonte de energia; e_1 e e_2 - eletrodos de platina; R_1 e R_2 - reservatórios contendo eletrólito; v - lâmpada de emissão; D – detector; C - computador ou analisador; EF - força eletroforética (Adaptado de QUEIROZ; JARDIM, 2008).....	48
Figura 4:	(a) Dupla camada elétrica criada pela superfície de sílica carregada negativamente e pelos cátions que se encontram próximos. (b) A predominância de cátions na parte difusa da dupla camada produz um EOF resultante na direção do cátodo quando aplicado um campo elétrico externo (HARRIS, 2001).....	50
Figura 5:	Inversão de carga produzida por uma camada dupla de surfactante catiônico revestindo a parede do capilar (HARRIS, 2001).....	51
Figura 6:	Micelas de SDS negativamente carregadas migram contra a corrente do EOF (HARRIS, 2001).....	52
Figura 7:	Representação da migração de solutos neutros por eletrocromatografia em fase micelar aniônica (A) e na presença de uma fase auxiliar (B), mostrando monômeros e micelas de SDS, ciclodextrinas e a interação de diversos solutos neutros com ambas as fases (TAVARES, 1997).....	53
Figura 8:	Resumo do procedimento experimental de extração das formulações fitoterápicas analisadas para a determinação simultânea dos benzodiazepínicos estudados.....	66
Figura 9:	Procedimento experimental utilizado para adição conhecida na amostra 02 (<i>Quitosana</i>) de fitoterápicos com benzodiazepínicos (alprazolam, clonazepam, clordiazepóxido, diazepam, lorazepam, medazepam e midazolam) para ensaios de recuperação.....	68

- Figura 10:** Efeito do solvente metanol nos tempos de migração dos benzodiazepínicos em concentração de 20 mg L⁻¹, para concentrações de solvente de 5,10 e 15%. Condições: eletrólito de trabalho tampão fosfato 100 mM (pH 2,0); capilar de sílica fundida revestido de poliimida de 60 cm de comprimento (com 9,5 cm da janela do detector) e diâmetro interno de 75 µm, operando a 25°C; voltagem aplicada de 15 kV, detecção UV em 200 nm e injeção hidrodinâmica anódica durante 2 segundos, com pressão de 30 mBar..... 71
- Figura 11:** Efeito do solvente acetonitrila nos tempos de migração dos benzodiazepínicos em concentração de 20 mg L⁻¹, para concentrações de solvente de 2, 5, 10 e 15%. Condições: eletrólito de trabalho tampão fosfato 100 mM (pH 2,0); Capilar de sílica fundida revestido de poliimida de 60 cm de comprimento (com 9,5 cm da janela do detector) e diâmetro interno de 75 µm, operando a 25°C; voltagem aplicada de 15 kV, detecção UV em 200 nm e injeção hidrodinâmica anódica durante 2 segundos, com pressão de 30 mBar..... 72
- Figura 12:** Efeito da voltagem aplicada sobre os tempos de migração dos benzodiazepínicos na concentração de 20 mg L⁻¹. Condições: eletrólito de trabalho tampão fosfato 100 mM, 15% acetonitrila (pH 2,0); capilar de sílica fundida revestido de poliimida de 60 cm de comprimento (com 9,5 cm da janela do detector) e diâmetro interno de 75 µm, operando a 25°C, detecção UV em 200 nm e injeção hidrodinâmica durante 2 segundos aplicando-se pressão de 30 mBar..... 73

Figura 13: Eletroferograma da separação dos benzodiazepínicos em concentração de 20 mg L⁻¹: (1) Medazepam, (2) Midazolam, (3) Flurazepam, (4) Diazepam/Clonazepam/Lorazepam e (5) Clordiazepóxido. Condições: eletrólito de trabalho tampão fosfato 100 mM, 15% acetonitrila (pH 2,0); capilar de sílica fundida revestido de poliimida de 60 cm de comprimento (com 9,5 cm da janela do detector) e diâmetro interno de 75 µm, operando a 25°C; voltagem aplicada de 15 kV; detecção UV em 200 nm e injeção hidrodinâmica anódica durante 2 segundos com pressão de 30 mBar..... 75

Figura 14: Eletroferograma da separação dos benzodiazepínicos em concentração de 20 mg L⁻¹: (1) Medazepam, (2) Midazolam, (3) Flurazepam, (4) Lorazepam e (5) Clordiazepóxido. Condições: eletrólito de trabalho tampão fosfato 100 mM, 15% acetonitrila (pH 2,0); capilar de sílica fundida revestido de poliimida de 60 cm de comprimento (com 9,5 cm da janela do detector) e diâmetro interno de 75 µm, operando a 25°C; voltagem aplicada de 15 kV; detecção UV em 200 nm e injeção hidrodinâmica anódica durante 2 segundos com pressão de 30 mBar..... 76

Figura 15: Eletroferograma da separação dos benzodiazepínicos em concentração de 20 mg L⁻¹: (1) Medazepam, (2) Midazolam, (3) Flurazepam, (4) Clonazepam e (5) Clordiazepóxido. Condições: eletrólito de trabalho tampão fosfato 100 mM, 15% acetonitrila (pH 2,0); capilar de sílica fundida revestido de poliimida de 60 cm de comprimento (com 9,5 cm da janela do detector) e diâmetro interno de 75 µm, operando a 25°C; voltagem aplicada de 15 kV; detecção UV em 200 nm e injeção hidrodinâmica anódica durante 2 segundos com pressão de 30 mBar..... 77

- Figura 16:** Eletroferograma otimizado na separação dos benzodiazepínicos em concentração de 20 mg L⁻¹: (1) Medazepam, (2) Midazolam, (3) Flurazepam, (4) Diazepam e (5) Clordiazepóxido. Condições: eletrólito de trabalho tampão fosfato 100 mM, 15% acetonitrila (pH 2,0); capilar de sílica fundida revestido de poliimida de 60 cm de comprimento (com 9,5 cm da janela do detector) e diâmetro interno de 75 µm, operando a 25°C; voltagem aplicada de 15 kV; detecção UV em 200 nm e injeção hidrodinâmica anódica durante 2 segundos com pressão de 30 mBar..... 78
- Figura 17:** Espectros de absorção molecular dos sete benzodiazepínicos em concentração de 10 mg L⁻¹ 80
- Figura 18:** Tempo de retenção dos benzodiazepínicos na concentração de 20 mg L⁻¹ em função do pH de eluente. Condições: eluente acetonitrila:água 40:60 (v/v), pH 3,5 e 4,0 em fluxo 0,5 ml/min; detecção UV em 230 nm e injeção de 20 µL..... 81
- Figura 19:** Tempo de retenção dos benzodiazepínicos na concentração de 20 mg L⁻¹ em função do pH de eluente. Condições: eluente acetonitrila:água 40:60 (v/v), pH 3,5 e 4,0 em fluxo 0,5 ml/min; detecção UV em 230 nm e injeção de 20 µL..... 83
- Figura 20:** Efeito do fluxo (0,5; 0,7 e 1,0 mL/min) de eluente nos tempos de retenção dos benzodiazepínicos na concentração de 20 mg L⁻¹. Condições: eluente acetonitrila:água 40:60 (v/v) (pH 4,0); detecção UV em 230 nm e injeção de 20 µL..... 84
- Figura 21:** Cromatograma da separação de sete benzodiazepínicos na concentração de 20 mg L⁻¹: (1) Clordiazepóxido, (2) Alprazolam, (3) Lorazepam, (4) Flurazepam, (5) Clonazepam, (6) Medazepam, (7) Diazepam. Condições: eluente acetonitrila:água 40:60 (v/v) (pH 4,0) em fluxo 0,5 mL/min; detecção UV em 230 nm e injeção de 20 µL..... 85

- Figura 22:** Cromatograma otimizado da separação de sete benzodiazepínicos na concentração de 20 mg L⁻¹: (1) Clordiazepóxido, (2) Alprazolam, (3) Lorazepam, (4) Midazolam, (5) Clonazepam, (6) Medazepam, (7) Diazepam. Condições: eluente acetonitrila:água 40:60 (v/v) (pH 4,0) em fluxo 0,5 mL/min; detecção UV em 230 nm e injeção de 20 µL..... 86
- Figura 23:** Cromatograma otimizado da separação de sete benzodiazepínicos (20 mg L⁻¹) com a mistura dos interferentes anfepramona, femproporex e siburamina (anorexígenos) e fluoxetina (antidepressivo) (20 mg L⁻¹): (1) Clordiazepóxido, (2) Alprazolam, (3) Lorazepam, (4) Midazolam, (5) Clonazepam, (6) Medazepam, (7) Diazepam. Condições: eluente acetonitrila:água 40:60 (v/v) (pH 4,0) em fluxo 0,5 mL/min; detecção UV em 230 nm e injeção de 20 µL..... 88
- Figura 24:** Cromatogramas de determinação simultânea dos benzodiazepínicos (20 mg L⁻¹) adicionados nas amostras de formulações fitoterápicas de emagrecimento: (1) Clordiazepóxido, (2) Alprazolam, (3) Lorazepam, (4) Midazolam, (5) Clonazepam, (6) Medazepam, (7) Diazepam. (A) amostra 01, (B) amostra 02, (C) amostra 03, (D) amostra 04, (E) amostra 05, (F) amostra 06, (G) amostra 07, (H) amostra 08, (I) amostra 09, (J) amostra 010, (L) amostra 011, (M) amostra 012, (N) amostra 013. No detalhe de cada cromatograma é mostrado o perfil de cada amostra fitoterápica sem a adição dos fármacos. Condições: eluente acetonitrila:água 40:60 (v/v) (pH4,0) em fluxo 0,5 mL/min; detecção UV em 230 nm e injeção de 20 µL..... 98

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Principais produtos fitoterápicos consumidos no Brasil.....	27
Tabela 2 - Principais adulterantes ilegais encontrados em fármacos tradicionais chineses.....	44
Tabela 3 - Reagentes utilizados no desenvolvimento do trabalho.....	59
Tabela 4 - Fármacos utilizados como substâncias químicas de referência.....	60
Tabela 5 - Composição das amostras fitoterápicas para emagrecimento estudadas neste trabalho.....	65
Tabela 6 - Valores de mobilidade eletroforética aparente (μ_i) calculados para os benzodiazepínicos.....	74
Tabela 7 - Condições cromatográficas otimizadas para a separação dos benzodiazepínicos.....	89
Tabela 8 - Resultados obtidos para calibração dos benzodiazepínicos.....	91
Tabela 9 - Valores de DPR obtidos para os benzodiazepínicos em estudo durante os ensaios de precisão.....	93
Tabela 10 - Resultados obtidos para LD e LQ dos benzodiazepínicos.....	95
Tabela 11 - Resultados obtidos nos testes de recuperação dos benzodiazepínicos em estudo.....	96
Tabela 12 - Resultado dos ensaios de recuperação na amostra 02 (<i>Quitosana</i>) adicionada de 1,0 mg dos benzodiazepínicos empregando RP-HPLC.....	105
Tabela 13 - Resultado dos ensaios de recuperação na amostra 02 (<i>Quitosana</i>) adicionada de 10,0 mg dos benzodiazepínicos empregando RP-HPLC.....	106

LISTA DE SIGLAS E ABREVIações

λ	Comprimento de onda
kV	Kilo Volts
μ A	Micro Ampère
μ_i	Mobilidade Eletroforética
ABESO	Associação Brasileira para Estudos da Obesidade
ACN	Acetonitrila
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CCDC	Cromatografia em Camada Delgada Comparativa
CE	Eletroforese Capilar
CV%	Coefficiente de Variação
CZE	Eletroforese Capilar por Zona
DPR	Desvio Padrão Relativo
EOF	Fluxo Eletrosmótico
GABA	Ácido Gama-Aminobutírico
GC	Cromatografia Gasosa
GC-MS	Cromatografia Gasosa por detecção de Massas
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
HPLC-MS	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência por detecção de Massas
HSA	Ácido 1-Heptanosulfônico de Sódio
ICH	Conferência Internacional sobre Harmonização
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
MEKC	Cromatografia Eletrocínética Micelar
RP-HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência por Fase Reversa
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
SNC	Sistema Nervoso Central
THF	Tetrahidrofurano
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	21
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	23
2.1 Obesidade	23
2.2 Formulações Fitoterápicas	25
2.3 Adulterantes em formulações fitoterápicas.....	28
2.3.1 Benzodiazepínicos	28
2.3.2 Casos de adulterantes em formulações fitoterápicas no Brasil e no mundo	41
2.4 Eletroforese Capilar.....	46
2.4.1 Eletroforese Capilar de Zona (CZE)	48
2.4.2 Cromatografia Eletrocínética Micelar (MEKC).....	50
2.4.3. Determinação de Adulterantes empregando Eletroforese Capilar.....	54
2.5 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC).....	55
2.5.1 Cromatografia de Fase Reversa (RP- HPLC)	55
2.5.2 Determinação de Adulterantes empregando Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.....	56
3. MATERIAIS E MÉTODOS	58
3.1 Instrumentação.....	58
3.2 Reagentes e Soluções	59
3.2.1 Eletrólito utilizado em CE	60
3.2.2 Eluentes utilizados em HPLC	61
3.2.3 Soluções dos Fármacos	61
3.3 Procedimentos Analíticos	62
3.3.1 Determinações por Eletroforese Capilar.....	62
3.3.1.2 Estudos de Otimização das medidas eletroforéticas por CZE	62
3.3.2 Determinações por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência	63
3.3.2.1 Estudos de Otimização das medidas cromatográficas	63
3.3.2.2 Estudo dos interferentes na determinação dos benzodiazepínicos.....	64
3.3.2.3 Amostras reais de formulações fitoterápicas.....	64
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	69
4.1 Separação de benzodiazepínicos como adulterantes empregando eletroforese capilar de zona (CZE)	69

4.2 Separação de Adulterantes empregando Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Fase Reversa (RP-HPLC).....	79
4.3 Estudo dos interferentes na determinação dos benzodiazepínicos	87
4.4 Validação do Método Cromatográfico	88
4.4.1 Processo de Validação	89
4.4.1.1 Linearidade	90
4.4.1.2 Precisão	92
4.4.1.3 Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ)	93
4.4.1.4 Exatidão	95
4.5 Aplicação analítica do método desenvolvido e validado	97
4.5.1 Determinação de benzodiazepínicos em amostras de formulações fitoterápicas para emagrecimento por RP-HPLC	105
5. CONCLUSÕES	107
6. REFERÊNCIAS.....	109

1. INTRODUÇÃO

A obesidade emergiu como epidemia no final do século XX, nos países desenvolvidos, e atualmente atinge qualquer nível socioeconômico sem distinção de região, país ou grupo étnico. A obesidade consiste no aumento das reservas lipídicas armazenadas sob a forma de triglicerídeos no tecido adiposo. Estima-se que 40 milhões de brasileiros são obesos, o que constitui um problema de saúde pública. Além disto, há uma cobrança social por uma silhueta perfeita, que deixa o indivíduo obeso com disposição a fazer de tudo para perder peso. Dentre os vários tratamentos disponíveis, está o uso de fármacos sintéticos e produtos naturais (BERNARDI; CICHELERO; VITOLO, 2005).

A automedicação com produtos naturais emagrecedores tem aumentado consideravelmente nos últimos anos, devido à crença da população em que estes medicamentos não trarão danos a saúde, muitas vezes reforçada pelas indústrias farmacêuticas de que estes medicamentos não trazem danos aos usuários (YANO *et al.*, 2008). Conforme demonstrado por pesquisas recentes, muitos produtos vendidos como naturais mostram a adição, não declarada nas formulações, de substâncias anorexígenas, ansiolíticas e antidepressivas (ZUCCOLOTTO *et al.*, 1999; CHOI *et al.*, 2002; ERNST, 2002a; ERNST, 2002b; YEE *et al.*, 2005; YANO *et al.*, 2008).

Dentre os grupos de fármacos antiobesidade comercializados no Brasil, os anorexígenos são os fármacos de escolha mais freqüentemente usados e, além de serem responsáveis pelos efeitos anorexígenos das formulações para emagrecer, possuem restrições e contra-indicações de uso, podendo levar à tolerância, dependência química e síndrome de abstinência (ALMEIDA; RIBEIRO, 1998). O uso em abundância destes fármacos antiobesidade, causa a preocupação e a desconfiança de que substâncias anorexígenas e benzodiazepínicas possam ser utilizadas de maneira indiscriminada e por isso perigosa, uma vez que ambas são substâncias de uso controlado e com notificação especial e retenção de receitas, como recomendado pelo SVS/MS N° 344/98 (BRASIL, 1998).

Há várias técnicas analíticas para identificação de fármacos, as quais são escolhidas avaliando desde fatores referentes à substância (propriedades químicas, físicas e biológicas) como também do método (disponibilidade, simplicidade, viabilidade financeira, adequação técnica, entre outros). A associação dos fármacos

traz vantagens terapêuticas, mas gera novos desafios para a indústria farmacêutica, como a estabilidade dos fármacos na associação e a dificuldade analítica para sua quantificação. Surge assim a necessidade de métodos capazes de identificar e quantificar simultaneamente mais de um fármaco na mesma formulação fitoterápica (associações) (AZEREDO *et al.*, 2004). Segundo o Artigo 47 da Portaria SVS/MS N°344/98 (BRASIL, 1998), a RES. CFM N° 1.477/97 (BRASIL, 1997) e a RES. CFF N° 273/95 (BRASIL, 1995), é proibida a associação de drogas em medicamentos e preparações magistrais que contenham anorexígenos associados entre si, ou com substâncias ansiolíticas, diuréticas, hormonais, extratos hormonais, laxantes, bem como qualquer outra substância medicamentosa.

Sabendo dos efeitos indesejados citados que esses adulterantes podem causar (KATZUNG, 2006; KOROLKOVAS, 1998; SILVA, 2006), além da necessidade de alertar a sociedade sobre os perigos do uso e abuso desses adulterantes nas formulações para emagrecimento, este trabalho propõe o desenvolvimento de métodos de separações comparativas, empregando eletroforese capilar (CE) e cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), para isto, utilizando as técnicas de eletroforese capilar de zona (CZE) e cromatografia líquida de alta eficiência por fase reversa (RP-HPLC), para possibilitar o estudo da presença de benzodiazepínicos (alprazolam, clonazepam, clordiazepóxido, diazepam, flurazepam, lorazepam, medazepam e midazolam) como possíveis adulterantes em produtos fitoterápicos emagrecedores comercializados no Brasil.

Sabe-se que as adulterações nestas formulações fitoterápicas ocorrem, geralmente com o uso de somente uma classe de fármacos: um benzodiazepínico, um anorexígeno e um antidepressivo. Não se espera encontrar em uma mesma amostra mais de um benzodiazepínico, portanto, os métodos eletroforéticos e cromatográficos propostos não têm como objetivo detectar todos os benzodiazepínicos juntos em uma mesma amostra e sim, promover a identificação individual de todos em uma amostra possivelmente adulterada por um destes fármacos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Obesidade

Nas últimas décadas a obesidade tem alcançado proporções epidêmicas, na maioria dos países industrializados, em função do estilo de vida moderno que expõe os indivíduos a alimentos altamente calóricos, além do comportamento sedentário decorrente das comodidades criadas pelos avanços tecnológicos, diminuindo, assim, a atividade física. Também é possível que a moda e a opinião pública influenciem numa parcela pequena da população; portanto, a obesidade é resultante de uma complexa interação de fatores culturais, genéticos, fisiológicos e psicológicos (BERNARDI; CICHELERO; VITOLO, 2005).

A obesidade é uma condição do organismo caracterizado pelo depósito excessivo de gordura no tecido adiposo, podendo ser leve (excesso de peso) ou grave (obesidade). Enquanto que o sobrepeso não está diretamente ligado ao excesso de gordura e, sim ao aumento excessivo do peso corporal total, podendo resultar de alterações em apenas um dos seus constituintes: gordura, músculo, osso e água (ANDREOLLI; CASTRO; MENDES, 2000).

A situação da obesidade no Brasil é vista de forma cada vez mais evidente e eminente, segundo a Associação Brasileira para Estudos da Obesidade e da Síndrome Metabólica (ABESO), chegando a ser considerada uma epidemia nacional.

Dados fornecidos pela ABESO, relativos a 2008, indicaram que 43,3% da população brasileira têm excesso de peso (sobrepeso), e 13% do total é obesa. Do total, 47,3% dos homens e 39,5% das mulheres têm excesso de peso (ABESO, 2009).

O tratamento ideal da obesidade é a diminuição da ingestão calórica e aumento da atividade física, induzido por alterações comportamentais (COSTA *et al.*, 2005). Porém existem pessoas que não conseguem atingir um peso adequado utilizando apenas esses dois recursos e, acabam utilizando medicamentos que auxiliam no controle da obesidade, muitas vezes sem prescrição ou orientação médica, representando, dessa forma, um grande problema de Saúde Pública devido aos riscos diretos e indiretos envolvidos (ABESO, 2000).

O uso de fármacos para combater a obesidade e/ou sobrepeso deve ser revisto cuidadosamente, uma vez que para alguns obesos a terapia farmacológica é essencial para que seu objetivo de perder peso seja alcançado e mantido, visto que o sobrepeso e a obesidade não são causados somente pela má conduta pessoal, excesso de alimento e inatividade física, podendo ser um caso patológico, havendo necessidade de tratamento clínico com o uso de fármacos (ANDREOLLI; CASTRO; MENDES, 2000).

Num programa de perda de peso o médico pode indicar dieta equilibrada e exercícios, mas normalmente não serão prescritos fármacos para perder peso, pois estes podem produzir a dependência e efeitos colaterais perigosos. A indicação de qualquer fármaco ao paciente obeso deve obedecer critérios clínicos objetivos e antes da prescrição, deve-se avaliar se a relação risco/benefício é favorável, uma vez que o uso indiscriminado desses fármacos pode ser um fator inibidor às condutas preventivas, sabendo que a mídia informa que a pessoa pode comer, o que e quanto quiser, se fizer uso de determinado medicamento (ABESO, 2000).

Os fármacos mais usados atualmente no tratamento da obesidade são chamados de anorexígenos ou supressores do apetite e podem agir de três diferentes formas: *provocando a redução ou perda do apetite; estimulando a saciedade*, o que ocasiona a diminuição da ingestão de alimentos e, *reduzindo a absorção intestinal de gorduras*, o que aumenta o gasto energético e diminui o peso corporal. Apesar da conduta médica clássica de administrar moderadores de apetite, ainda não se sabe até que ponto eles podem reduzir ou minimizar o quadro da obesidade por gerar vários efeitos colaterais (ALMEIDA; RIBEIRO, 1998).

O Brasil, segundo a Organização Mundial da Saúde, consome 23,6 toneladas de anorexígenos por ano. Os anorexígenos são na maioria derivados da anfetamina, sendo a amfepramona, o femproporex e o mazindol os mais utilizados no Brasil (ALMEIDA et al., 1997).

Alguns estudos mostram a eficiência do uso de fármacos no emagrecimento. Porém são relatados efeitos pouco duradouros e reversíveis assim que é suspensa a administração do fármaco, gerando o retorno ao peso inicial, pelo fato de que os inibidores do apetite reduzem a ingestão dos alimentos como um todo, podendo alterar a degradação de proteínas estruturais, comprometendo, assim, o bom funcionamento do organismo, não modificando o desequilíbrio nutricional e não enfatizando a prática da atividade física (ALMEIDA; RIBEIRO, 1998). Desta forma, o

fármaco deve ser usado apenas quando o quadro clínico for de obesidade mórbida, por período de tempo limitado e após os demais recursos terem sido esgotados. Portanto, qualquer que seja o mecanismo de ação dos medicamentos para emagrecer, já está comprovado que os resultados do tratamento são mais eficazes quando se dá a devida ênfase à prática de atividades físicas e à melhoria no hábito alimentar (ANDREOLLI; CASTRO; MENDES, 2000).

2.2 Formulações Fitoterápicas

Como a obesidade tem sido alvo da difusão de crenças, condutas, dietas e remédios “milagrosos”, ineficazes e até mesmo perigosos, considera-se, como método alternativo, aquele que não está diretamente atribuído à prevenção e tratamento do excesso de peso. Neste caso, podemos citar a fitoterapia, uma das maneiras “milagrosas” de se atingir este objetivo, que está se tornando cada vez mais popular em países desenvolvidos e subdesenvolvidos (EISENBERG *et al.*, 1998).

A origem da palavra fitoterapia vem do grego “*phyton*”, que significa planta, e “*therapeuein*”, cuidar, curar alguém. Desta forma temos fitoterapia como o tratamento feito com produtos vegetais. A palavra fitoterapia foi criada para designar tradições populares de tratamento, nas quais as plantas medicinais são usadas como medicamento. Atualmente, os conhecimentos sobre as plantas e suas propriedades curativas continuam sendo usados pela população (TESKE; TRENTINI, 1995; BOOHREM, 1997).

As plantas medicinais podem ser vistas como precursoras da farmacologia convencional. O tratamento fitoterápico trata o sintoma, com efeitos orgânicos mais lentos, pois são menos concentrados do que os convencionais, principalmente em doenças crônicas. No passado, eram o único recurso terapêutico conhecido, sendo que, a partir de plantas descritas e usadas pelo conhecimento popular, descobriram-se diversos medicamentos usados até hoje (BOOHREM, 1997).

O interesse pelas plantas medicinais foi aumentando gradualmente, principalmente nos últimos 20 anos, à medida que as pessoas questionaram o uso de medicamentos sintéticos e de seus efeitos colaterais no organismo (AZEREDO *et al.*, 2004).

A fitoterapia questiona a pesquisa dos componentes ativos das plantas para elaboração de medicamentos, uma vez que a planta toda oferece um tratamento mais seguro e eficaz do que os ingredientes isolados misturados com outros produtos (BOOHREM, 1997).

O objetivo da fitoterapia vai além de curar uma doença específica, ela busca desenvolver a saúde e vitalidade das pessoas; e se interessa pela importância da prevenção da doença. O tratamento pode ser feito com bebidas como: chá, tinturas, infusão e decocção; curativos em compressas e cataplasmas e óleos na forma de pomadas e óleos (BOOHREM, 1997).

A perda de peso, visando reduzir problemas decorrentes da obesidade ou, simplesmente, para "manter a forma" é um objetivo estético extremamente desejado mundialmente. Por isto, pessoas obesas ou com leve excesso de peso, buscam cada vez mais, métodos miraculosos e rápidos de emagrecimento, através do uso de produtos fitoterápicos, por serem de fácil aquisição e, pela crença popular de que estes produtos não têm contra-indicação, por serem naturais e, acabam abusando do uso de fitoterápicos. Deve-se enfatizar que, apesar de serem produtos naturais, não significa que eles não causem efeitos colaterais, os quais podem ser causados, principalmente devido à adulteração, contaminação, rotulagem e/ou anúncio inadequado (EISENBERG *et al.*, 1998). Os fitoterápicos podem interagir com outras substâncias, aumentando ou diminuindo seus efeitos ou até mesmo provocando reações tóxicas ao organismo (TESKE; TRENTINI, 1995).

No tratamento da obesidade, os seguintes produtos fitoterápicos têm sido empregados consideravelmente, conforme apresentado na Tabela 1.

Tabela 1 – Principais produtos fitoterápicos consumidos no Brasil.

Alcachofra	Fybersan Plus
Affinato	Fybersense
Algas Regi	Hoodia Gordonii
Bio-Redux	Imagressim
Bioslim Quitosana	Laranja amarga
Caralluma Fimbriata	Leptix
Cáscara sagrada	Lipofim
Centella asiática	Lipoline
Chá branco	Phynus
Chá verde	Porangaba
Chitosan Plus	Quitoplex Plus
Chitosana 600	Quitosana Plus
Chlorella	Quitosana
Easy Form	Redufim Quitosana
Garcínia Cambuja	Redumix
Faseolamina	Redux Way
Fat Block	Slim Max
Fat Blocker	Slim Prime Plus
Fibrithin	Spirulina
Fina Forma	Tak 500
Fybersan Gold	

Adaptado de: <http://www.corpperfeito.com.br/subcategoria/fitoterápicos>

2.3 Adulterantes em Formulações Fitoterápicas para Emagrecimento

Tendo em vista o uso generalizado de benzodiazepínicos, o uso indiscriminado voluntário desses fármacos vendidos sob prescrição médica tornou-se relativamente raro (GOODMAN; GILMANN, 2006). Assim, os benzodiazepínicos são muito usados como adulterantes em formulações fitoterápicas para emagrecimento, com o principal objetivo de reduzir os efeitos dos anorexígenos, como estados de excitabilidade, insônia e nervosismo.

2.3.1 Benzodiazepínicos

O primeiro fármaco da classe dos benzodiazepínicos, o clordiazepóxido, foi descoberto como um produto inesperado da síntese planejada por Sternbach, e 1961. Testes preliminares em animais mostraram efeitos miorelaxantes e calmantes, em doses baixas. Esses resultados incentivaram estudos clínicos feitos em voluntários humanos para comprovar os efeitos tranqüilizantes. Atualmente mais de dois mil derivados benzodiazepínicos já foram sintetizados (SILVA, 2006).

Os benzodiazepínicos são os fármacos hipnóticos mais importantes e de maior uso, devido às suas atividades fundamentais de atuarem no Sistema Nervoso Central (SNC) como ansiolíticos, hipnóticos, anticonvulsivante e relaxante muscular (KOROLKOVAS; BURCKHALTER, 1988; GOODMAN; GILMANN, 2006). Ansiolíticos, conhecidos como tranqüilizantes, são drogas sintéticas usadas com a finalidade de diminuir a ansiedade e a tensão. Em pequenas doses recomendadas por médicos não causam danos físicos ou mentais. Estes fármacos afetam áreas do cérebro que controlam a ansiedade e o estado de alerta, ocasionando um relaxamento muscular. Os ansiolíticos foram descobertos em 1950 e tiveram um crescimento entre 1960 e 1980. Nesse período, mais de 10% da população consumia ansiolíticos de maneira regular ou esporádica (SILVA, 2006).

A facilidade com que é possível conseguir estes medicamentos em farmácias faz com que o uso dos benzodiazepínicos seja muito comum.

Para uma maior atividade ansiolítica, os benzodiazepínicos devem ter as seguintes características estruturais, conforme a figura 1:

- (a) grupo metila ligado ao átomo de nitrogênio na posição 1;
- (b) grupo retirador de elétrons, como Cl, NO ou CF, na posição 7;

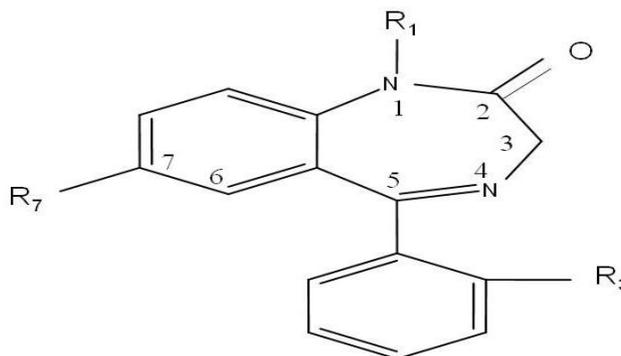


Figura 1: Estrutura principal dos benzodiazepínicos (KOROLKOVAS; BURCKHALTER, 1988).

- Usos Terapêuticos:

Os benzodiazepínicos são considerados fármacos versáteis de primeira escolha, e muito prescritos no tratamento da ansiedade, bem como hipnóticos e sedativos. São relativamente seguros e mais eficazes do que outros fármacos disponíveis (SILVA, 2006).

São usados como sedativos-hipnóticos, o que requer uma meia-vida de eliminação curta para exercer efeitos calmantes, com redução concomitante da ansiedade em doses relativamente baixas. Em doses suficientemente altas induzem ao sono. Também são usados como anestésicos, quando administrados em altas doses, como o diazepam, o midazolam e o lorazepam, que são utilizados por via intravenosa na anestesia em associação com outros fármacos; assim como são usados como relaxantes musculares e anticonvulsivantes, inibindo o desenvolvimento e a propagação da atividade epileptiforme no SNC, como o lorazepam, clonazepam e diazepam (GOODMAN; GILMANN, 2006; SILVA, 2006).

Ultimamente, devido à sua alta eficácia e à segurança de seu índice terapêutico, efeitos colaterais adversos mínimos e baixo potencial de dependência física como ansiolíticos, ganharam uma grande popularidade entre os médicos por serem capazes de substituir os barbitúricos em vários tratamentos neurológicos e psiquiátricos, devido a isto, vem aumentando o número de casos relacionados com o seu uso abusivo, com sua conseqüente dependência e os problemas relacionados (KATZUNG, 2006).

- Efeitos Adversos:

O uso de benzodiazepínicos pode causar dependência física e psicológica. O risco de dependência aumenta com doses mais altas e com o uso por períodos prolongados, e aumenta ainda mais em pacientes com histórico de alcoolismo ou abuso de drogas/medicamentos ou em pacientes com transtornos de personalidade significantes. Quando administrados sozinhos, mesmo em doses elevadas, não causam depressão grave e prolongada no SNC (SILVA, 2006).

O efeito adverso mais comum, que pode ocorrer no dia seguinte ou até algumas horas após administração, é a sedação, que varia conforme o paciente, idade e condições gerais, sendo mais comuns em pacientes idosos e debilitados. Também pode ocorrer lassidão, incoordenação motora, diminuição da velocidade de raciocínio, ataxia, redução das funções físicas e mentais, confusão, disartria, boca seca e gosto amargo. A atividade mental é menos afetada do que a atividade física. Pode ocorrer aumento de peso corporal, devido ao aumento do apetite. Por isto as associações medicamentosas empregadas para o emagrecimento, que os contêm em sua formulação com a finalidade de reduzirem os efeitos dos estimulantes anfetamínicos também presentes na formulação, são consideradas irracionais (SILVA, 2006).

Outros efeitos mais raros são fraqueza, cefaléia, visão turva, náuseas e vômitos, desconforto epigástrico e diarreia. Também pode ocorrer ainda dores nas articulações e tórax, e euforia e alucinação (GOODMAN; GILMANN, 2006).z Alguns pacientes podem apresentar comportamento bizarros, hostilidade e agressividade. Casos mais raros são paranóia, depressão e tendência o suicídio, motivos pelo qual o fármaco triazolam teve seu uso proibido em 1922 no Brasil pelo Ministério da Saúde. O mesmo fenômeno ocorreu na maioria dos países europeus e nos Estados Unidos (SILVA, 2006).

- Precauções:

A interação com álcool deve ser levada em consideração, podendo ser extremamente grave.

Como alguns benzodiazepínicos atravessam a barreira placentária, deve-se evitar o seu uso em gestantes durante a fase embrionária (até o quarto mês de

gestação), e recém nascidos de mães dependentes dos mesmos podem desenvolver crises de abstinência. Assim, mães que precisam utilizar algum destes fármacos durante a amamentação, devem ter seus filhos observados quanto a possíveis efeitos relacionados aos fármacos. Pacientes epiléticos, devem ser avaliados rigorosamente e continuamente, principalmente se empregarem outros fármacos depressores ao mesmo tempo (GOODMAN; GILMANN, 2006; SILVA, 2006).

- *Toxicidade:*

Atualmente, os benzodiazepínicos são considerados como fármacos com boa margem de segurança. Mesmo em doses maciças, raramente se tornam fatais, com exceção de serem administrados com outros depressores do SNC. Embora não causem problemas circulatórios ou respiratórios profundos, mesmo em doses tóxicas, doses terapêuticas podem comprometer a respiração de pacientes com doença respiratória obstrutiva. Neste caso, usa-se um antagonista seletivo contra os benzodiazepínicos, o flumazenil, que é eficaz no tratamento de intoxicações causadas pelos benzodiazepínicos. (GOODMAN; GILMANN, 2006; SILVA, 2006).

- *Farmacocinética:*

Após a ingestão, os benzodiazepínicos são absorvidos, metabolizados e excretados pela urina a diferentes velocidades e com uma variedade de metabólitos estruturalmente relacionados.

As taxas de absorção e distribuição oral dos benzodiazepínicos diferem, dependendo de vários fatores, como a sua lipofilicidade, que desempenha um importante papel na determinação com que o fármaco sedativo-hipnótico específico penetra no SNC. Por exemplo, o diazepam é mais lipossolúvel do que o clordiazepóxido e o lorazepam, portanto, sua ação sobre o SNC inicia-se mais rapidamente (KATZUNG, 2006).

A biotransformação dos benzodiazepínicos (figura 2) em metabólitos ativos ocorre no fígado, através de enzimas microssômicas (SILVA, 2006), e pode ser decisivo na escolha do fármaco empregado. Os padrões e as taxas de metabolismo dependem de cada fármaco em particular. A maioria dos benzodiazepínicos sofrem

oxidação microsômica (reações de fase I), incluindo *N*-desalquilações e hidroxilações alifáticas, sendo completamente absorvidos sem antes sofrerem biotransformação. Subsequentemente, os metabólitos são conjugados (reações de fase II) formando glicuronídeos, que são excretados pela urina, não exercendo efeito pronunciado sobre a eliminação dos fármacos originais, na maioria dos casos de alterações na função renal. Porém, muitos metabólitos de fase I são farmacologicamente ativos, com meias-vidas prolongadas (GOODMAN; GILMANN, 2006; KATZUNG, 2006).

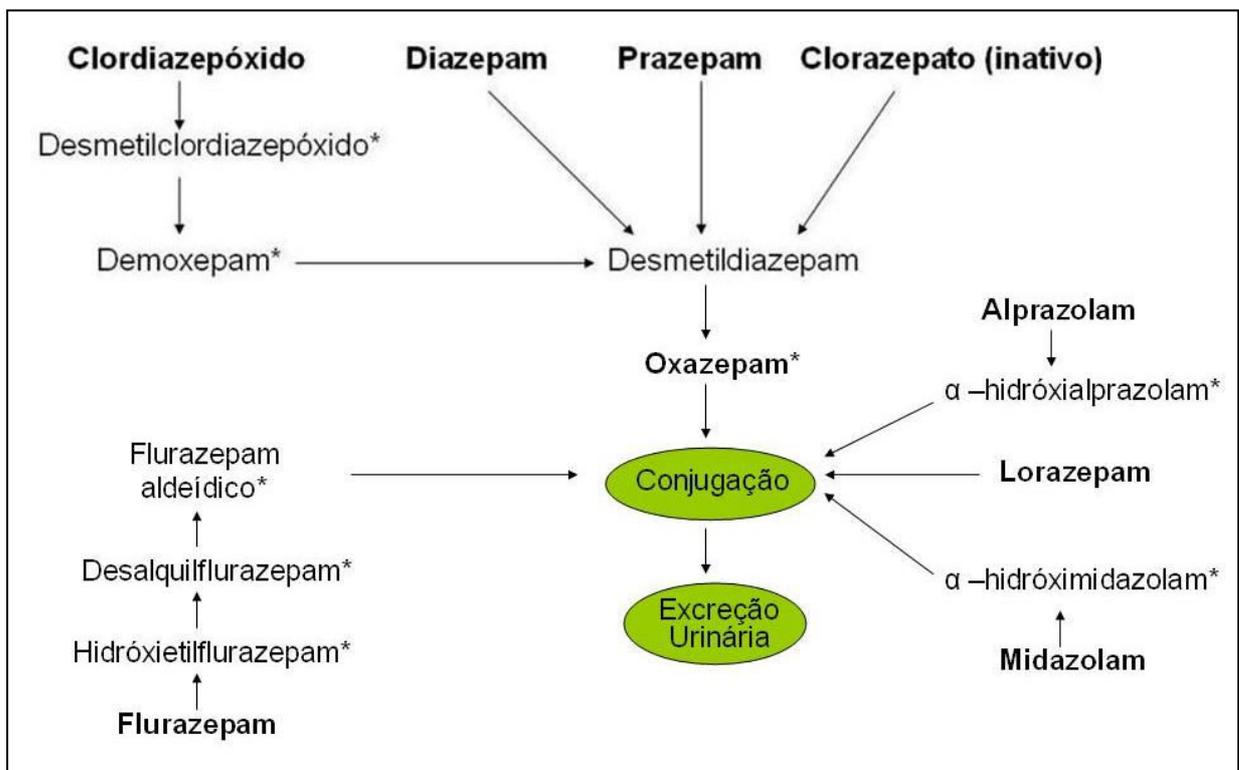


Figura 2: Biotransformação dos benzodiazepínicos. (Em negrito, fármacos disponíveis para uso clínico; *, metabólito ativo) (Adaptado de KATZUNG, 2006; SILVA, 2006).

Como mostrado na figura 2, o desmetildiazepam, com meia-vida de eliminação longa, de mais de 40 horas, é um metabólito ativo do clordiazepóxido, diazepam, prazepam e clorazepato. Conseqüente, o desmetildiazepam é

biotransformado no composto ativo oxazepam. Outros metabólitos ativos do clordizepóxido são o desmetilclordiazepóxido e demozepam; o diazepam é metabolizado principalmente a desmetildiazepam e, em parte a oxazepam. O flurazepam é oxidado por enzimas hepáticas a três metabólitos ativos – desalquilflurazepam, hidroxietilflurazepam e flurazepam aldeídico, cujas meias-vidas de eliminação variam de 30 a 100 horas. O alprazolam e o midazolam sofrem α -hidroxilação e os metabólitos resultantes exercem efeitos farmacológicos de curta duração. A meia-vida de eliminação dos benzodiazepínicos é prolongada principalmente em idosos e pacientes com doença hepática (KATZUNG, 2006).

- Mecanismo de Ação:

O efeito hipnótico sedativo dos benzodiazepínicos é devido ao seu efeito depressivo na atividade elétrica na formação reticular, o que também diminui o nível de alerta cortical. De modo mais eficaz, essas substâncias deprimem o sistema límbico, notadamente o núcleo amigdalóide, o que explica o efeito ansiolítico e a ação antagonista dessas drogas para convulsões produzidas pelos anestésicos locais, uma vez que se sabe que essas convulsões são determinadas por ativação da amígdala e do hipocampo (SILVA, 2006).

O que ocorre em nível celular é que os benzodiazepínicos atuam fazendo parte de um complexo existente nas membranas celulares, dos neurônios, envolvendo o receptor dos benzodiazepínicos, o receptor ácido gama-aminobutírico (GABA), alguns peptídios com função moduladora e o canal de cloro, dessa forma, facilitam a transmissão inibitória do SNC. Os benzodiazepínicos não substituem o GABA, mas sim, potencializam seus efeitos, sem ativar diretamente os receptores de GABA ou abrir os canais de cloreto associados. O aumento da condutância dos íons de cloreto, induzido pela interação dos benzodiazepínicos com o GABA, assume a forma de um aumento na frequência de eventos de abertura de canais (SILVA, 2006).

Várias hipóteses já foram propostas para explicar a facilitação inibitória pelo GABA induzida pelos benzodiazepínicos e, concluiu-se que não se tratava de interferência sobre o metabolismo do GABA nem de uma simples ligação droga/receptor, mas de um mecanismo mais complexo (SILVA, 2006), caracterizado a seguir:

(a) os benzodiazepínicos se ligam a receptores existentes ao nível dos neurônios, receptores esses que, à semelhança daqueles existentes para hipnoanalgésicos, deveriam existir no organismo, não para se ligarem aos benzodiazepínicos, que são substâncias exógenas, mas sim, a substâncias endógenas com propriedades semelhantes às dos benzodiazepínicos. Algumas dessas substâncias são conhecidas, como os derivados das purinas (iosina e hipoxantina) e ainda tromboxano;

(b) esse receptor do benzodiazepínico determina modificações na configuração do receptor do GABA, e essa mudança na configuração faz com que haja um aumento ou uma diminuição da afinidade do GABA com o seu receptor. A afinidade aumenta quando o benzodiazepínico se liga ao seu receptor, fazendo com que uma pequena molécula protéica chamada GABAmódulina, seja deslocada do seu local, que é diferente daquele dos benzodiazepínicos, ocasionando uma mudança na conformação do receptor do GABA e, conseqüentemente, uma maior afinidade entre ambos (GABA+receptor). Essa maior afinidade é que determina abertura dos canais de cloro ao nível do terminal excitatório, aumentando a condutância ao cloro, produzindo hiperpolarização da membrana e determinando um efeito inibitório.

- Abuso e Dependência:

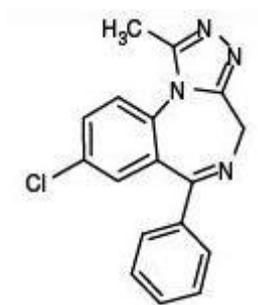
A dependência física e psíquica com o uso dos benzodiazepínicos, apesar de não ser tão frequente como se observa com os barbitúricos e morfínicos, pode desenvolver-se muito lentamente, principalmente quando o uso é feito em associação com outros fármacos de forma regular e por tempo prolongado (SILVA, 2006). As propriedades desejáveis como alívio da ansiedade, euforia, desinibição e promoção do sono, levaram ao uso compulsivo incorreto e sem uma prescrição correta de praticamente todos os benzodiazepínicos (GOODMAN; GILMANN, 2006). Assim, para fins de prescrição, os benzodiazepínicos foram classificados como fármacos de notificação de receita B1 e B2 (psicotrópicos) (BRASIL, 2003a). As conseqüências do abuso desses fármacos podem ser definidas em termos psicológicos e fisiológicos. O componente psicológico pode, inicialmente, equivaler a padrões simples de comportamento neurótico, difíceis de diferenciar daqueles

observados no consumidor de café ou no fumante. Quando o padrão de uso dos benzodiazepínicos torna-se compulsivo, surgem complicações mais graves, incluindo dependência fisiológica e tolerância. A dependência fisiológica pode ser descrita como um estado fisiológico que exige a administração contínua do fármaco para impedir o aparecimento de uma síndrome de abstinência, que se caracteriza por estados de grande ansiedade, insônia e excitabilidade do SNC, que pode progredir até para convulsões (KATZUNG, 2006).

Quando utilizados de modo crônico, os benzodiazepínicos são capazes de produzir dependência fisiológica, porém, a gravidade dos sintomas de abstinência difere para cada fármaco e também depende da magnitude da dose administrada imediatamente antes da interrupção do uso. Quando utilizadas doses mais elevadas, a interrupção abrupta do fármaco resulta em sinais de abstinência mais graves. As diferenças na gravidade dos sintomas de abstinência estão relacionadas, em parte, à meia-vida, visto que fármacos com meias-vidas longas são eliminados mais lentamente, o que pode levar a uma abstinência gradual, com poucos sintomas físicos. O uso de fármacos com meias-vidas muito curtas pode levar a sinais de abstinência, e até mesmo entre as doses. Assim, por exemplo, foi relatado que o triazolam, com meia-vida de cerca de 4 horas, provoca ansiedade diurna quando usado no tratamento de distúrbios do sono, causando graves efeitos nocivos à saúde (KATZUNG, 2006).

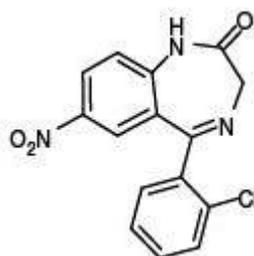
Neste estudo verificou-se os seguintes benzodiazepínicos como possíveis adulterantes: alprazolam, clordiazepóxido, clonazepam, diazepam, flurazepam, lorazepam, medazepam e midazolam, para os quais apresenta-se a seguir, algumas informações de cada fármaco.

2.3.1.1 Alprazolam



O alprazolam, de fórmula molecular $C_{17}H_{13}ClN_4$, peso molecular 308,76 g/mol, nomenclatura oficial 8-cloro-1metil-6 fenil-4*H* [1,2,4] Triazolo [4,3-*a*] [1,4] benzodiazepínico e valor de pKa 2,40 é comercializado mundialmente como Xanax e no Brasil especialmente como Frontal. É um sólido branco opaco cristalino, solúvel em álcool e insolúvel em água. Indicado em perturbações da ansiedade e ataques do pânico (FDA, 2009). Em alguns casos o alprazolam é responsável por efeitos antidepressivos. Sua dose diária usual é de 0,75 a 1,5 mg com meia vida de eliminação de cerca de 12 a 15 horas (GOODMAN; GILMANN, 2006; KATZUNG, 2006).

2.3.1.2 Clonazepam

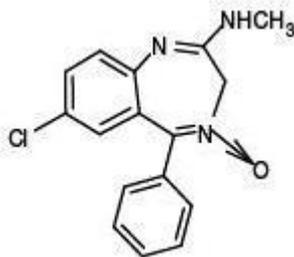


O clonazepam, de fórmula molecular $C_{15}H_{10}N_3ClO_3$, peso molecular 315,71 g/mol, de nomenclatura oficial 5-(2-clorofenil)-1,3-diidro-7-nitro-2*H*-1,4-benzodiazepina-2-ona e valor de pKa 1,50 é comercializado no Brasil com o nome de Rivotril, é um pó cristalino branco, insolúvel em água (KOROLKOVAS; BURCKHALTER, 1988). É um benzodiazepínico derivado do nitrazepam, pois através do processo de halogenação desse fármaco é possível obter-se além do próprio clonazepam, o flunitrazepam. O clonazepam é considerado um "benzodiazepínico clássico", pois além de apresentar uma estrutura molecular mais simples, também foi um dos

primeiros a serem sintetizados em laboratório, juntamente com o clordiazepóxido, diazepam, lorazepam, oxazepam, nitrazepam, flurazepam, bromazepam e clorazepato. Sua dose diária usual é de 1,5 a 10 mg (GOODMAN; GILMANN, 2006).

O clonazepam é normalmente indicado como ansiolítico geral e também para síndrome do pânico, distúrbio bipolar, agorafobia, depressão (como coadjuvante de antidepressivos, pois estes geralmente causam insônia), crises epiléticas (como coadjuvante, pois impede o surgimento da crise epilética, mas não é uma droga anti-epilética) (SILVA, 2006).

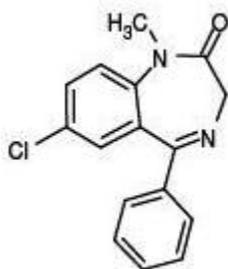
2.3.1.3 Clordiazepóxido



O clordiazepóxido, de fórmula molecular $C_{16}H_{14}ClN_3O$, peso molecular 299,75 g/mol, de nome oficial 4-óxido -7-cloro-2-(metilamino)-5-fenil-3H-1,4-benzodiazepina, com valor de pKa 4,60, comercializado no Brasil como Librium e Psicosedin, foi o primeiro benzodiazepínico a ser sintetizado em 1959 (GOODMAN; GILMANN, 2006; KOROLKOVAS; BURCKHALTER, 1988). É um pó cristalino branco ou quase branco, inodoro, fotossensível, higroscópico e altamente hidrossolúvel. Devido ao seu efeito ansiolítico, é indicado no tratamento da ansiedade, tratamento do alcoolismo agudo e como pré-medicação anestésica. Sua dose diária usual recomendada é de 15 a 40 mg (GOODMAN; GILMANN, 2006). Pode causar reações adversas como: sonolência, confusão contínua, agitação, bradicardia, tonturas e debilidade (SILVA, 2006).

O clordiazepóxido pode causar dependência, por isso deve ser retirado aos poucos, para não causar síndrome de abstinência, principalmente em pacientes com histórico de dependência química. Com outros depressores do SNC, tem-se um aumento de seu efeito, o uso de antiácidos pode retardar, porém não diminuir seu efeito (KATZUNG, 2006).

2.3.1.4 Diazepam



O diazepam, de fórmula molecular $C_{16}H_{13}N_2ClO$, peso molecular de 284, 74 g/mol, nomenclatura oficial 7-cloro-1,3-diidro-1-metil-5-fenil-2*H*-1,4-benzodiazepina-2-ona, valor de pka 3,30 e, comercializado no Brasil, principalmente como Valium, é um pó cristalino esbranquiçado a amarelo, quase inodoro, pouco solúvel em água (KOROLKOVAS; BURCKHALTER, 1988; SILVA, 2006). Atualmente é o mais conhecido e, provavelmente, o benzodiazepínico mais usado mundialmente. Sua comercialização iniciou em 1963, após 8 anos de pesquisas.

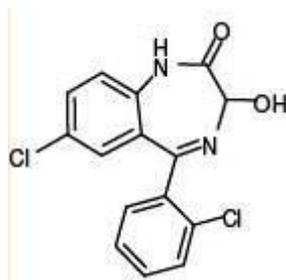
É absorvido rapidamente por via oral, irregularmente por via intramuscular e o seu uso intravenoso pode produzir muita dor, flebite e até trombose, principalmente quando administrado em veias de pequeno calibre. Em comparação ao clordiazepóxido, o diazepam é duas vezes mais potente e tem uma meia-vida de eliminação mais longa, de 20 a 80 horas, devido ao seu principal metabólito, N-desmetil-diazepam, que têm propriedades depressoras do SNC, semelhantes às do diazepam, por isto, permite que seus efeitos terapêuticos sejam alcançados com doses menores. Sua dose diária usual é de 4 a 40 mg (GOODMAN; GILMANN, 2006; SILVA, 2006). É usado principalmente como ansiolítico, anticonvulsivante, relaxante muscular e hipnótico (KOROLKOVAS; BURCKHALTER, 1988). Também é indicado no tratamento da abstinência alcoólica e para reduzir náuseas e vômitos antecipados ou causados por ansiedade associados com a quimioterapia (GOODMAN; GILMANN, 2006; KATZUNG, 2006).

2.3.1.5 Flurazepam



O flurazepam de fórmula molecular $C_{21}H_{23}ClFN_3O$ peso molecular 387, 87 g/mol, nomenclatura oficial 7-cloro-1-[2-(dietilamino)etil]-5-(o-fluorfenil)-1,3-diidro-2H-1,4-benzodiazepin-2-ona, e valor de pKa 2,41 é comercializado no Brasil como Insonium, Lunipax, Dalmadorm ou Dalmane (KOROLKOVAS; BURCKHALTER, 1988; SILVA, 2006). Sólido amarelo cristalino, solúvel em álcool e água (FDA, 2009). É um fármaco hipnótico, usado principalmente em tratamentos a curto prazo contra a insônia e, empregado também como anticonvulsivante. Os efeitos hipnóticos têm início, em média, 15 a 20 minutos após administração oral, e se mantêm por 7 a 8 horas, devido a sua longa meia-vida de eliminação de 40 a 100 horas e também por possuir metabólitos ativos com meias-vidas longas. Ocasionalmente pode causar ansiedade, irritabilidade, taquicardia e sudorese (SILVA, 2006).

2.3.1.6 Lorazepam

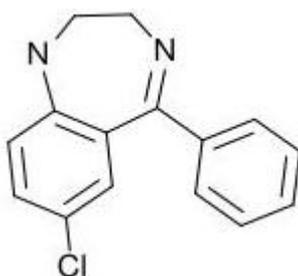


O lorazepam, de fórmula molecular $C_{15}H_{10}N_2Cl_2O_2$, peso molecular 321, 15 g/mol, nomenclatura oficial 7-cloro-5-(o-clorofenil)-1,3-diidro-3-hidroxi-2H-1,4-benzodiazepin-2-ona, valor de pKa 1,30 e, comercializado no Brasil, principalmente como Lorax ou Ativan (KOROLKOVAS; BURCKHALTER, 1988). É um pó branco, pouco solúvel em água (FDA, 2009). É eficaz como ansiolítico e hipnótico, podendo ainda produzir amnésia quando usado parentalmente, por isto é utilizado também

como medicação pré-anestésica ou para manter pacientes em coma induzido (GOODMAN; GILMANN, 2006; SILVA, 2006). Também é utilizado como coadjuvante em tratamentos quimioterápicos devido a suas propriedades antieméticas (KATZUNG, 2006). Sua dose diária usual é de 2 a 6 mg (GOODMAN; GILMANN, 2006). Em estudos recentes, foi comprovado que o lorazepam possui maior potencial de dependência em relação a outros benzodiazepínicos, devido a sua meia-vida de 10 a 20 horas, por não produzir metabólitos ativos. Porém, seu índice de dependência é relativamente menor em comparação à outros benzodiazepínicos hipnóticos, tais como: temazepam, triazolam, flunitrazepam, pivoxazepam, entre outros. Seu uso para o tratamento da síndrome do pânico, em geral, não é recomendado.

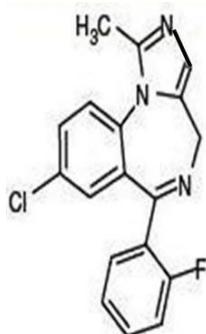
O lorazepam, também é amplamente indicado para o tratamento de: distúrbio bipolar, agorafobia, claustrofobia, depressão (como coadjuvante de antidepressivos, pois estes, geralmente causam insônia), tratamento de epilepsia. Seus principais efeitos colaterais são vertigens, fraqueza e sonolência após uso prolongado ou quando usado via parenteral (SILVA, 2006).

2.3.1.7 Medazepam



O medazepam, de fórmula química $C_{16}H_{15}N_2Cl$, peso molecular de 270, 75 g/mol, nomenclatura química 7-cloro-2,3-diidro-1-metil-5-fenil-1H-1,4-benzodiazepina, com valor de pKa 6,20, é comercializado no Brasil como Serenium, sendo utilizado, principalmente, no tratamento da ansiedade. Atua como sedativo, relaxante muscular e anticonvulsivante. Um dos seus metabólitos é o diazepam, e um dos seus produtos de excreção é o oxazepam (FDA, 2009; SILVA, 2006).

2.3.1.8 Midazolam



O midazolam, de fórmula química C₁₈H₁₃ClFN₃, peso molecular de 325, 76 g/mol, nome oficial 8-cloro-6-(2-fluorefenol)-1-metil-4H imidazol(1,5-a)(1,4)benzodiazepam, e valor de pKa 1,70 é comercializado como Versed e Dormonid. É um pó branco a amarelo, cristalino, insolúvel e água (FDA, 2009; GOODMAN; GILMANN, 2006)

Seu principal mecanismo de ação é nos receptores gabarérgicos aumentando a permeabilidade neuronal aos íons cloretos, colocando a célula em um estado de hiperpolarização. Seus principais efeitos são como ansiolíticos, relaxantes muscular, amnésicos e em altas doses pode causar hipnose. Também pode ser administrado em combinação com outros antieméticos, a fim de reduzir náuseas e vômitos causados pelo tratamento quimioterápico. As principais vias de administração são a oral, intramuscular e endovenosa. É muito utilizado como pré-anestésico, agindo como um agente hipnótico em anestesia geral (GOODMAN; GILMANN, 2006; SILVA, 2006).

2.3.2 Adultrações em Formulações Fitoterápicas no Brasil e no Mundo

Embora cada país possua um conjunto de parâmetros específicos para a produção e comercialização de fitoterápicos (CALIXTO, 2000), a fraude e a má qualidade têm preocupado profissionais da área de saúde, e a comunidade científica. A ausência de qualidade, a adultração e a incorreta utilização, interferem na eficácia e até mesmo na segurança do produto, somando-se a isto um serviço de fiscalização não muito eficiente. Conseqüentemente, diversos trabalhos têm sido realizados para alertar sobre a situação atual em que se encontram os fitoterápicos

no mundo (ZUCCOLOTTO *et al.*, 1999; ELVIN-LEWIS, 2001; CHOI *et al.*, 2002; ERNST, 2002a; ERNST, 2002b; STEINHOFF, 2002; YEE *et al.*, 2005; YANO *et al.*, 2008).

No Brasil, a regulamentação para a comercialização de fitoterápicos é regida por legislação específica, como as portarias da Vigilância Sanitária (BRASIL, 2000).

A adição ilegal de fármacos sintéticos em formulações fitoterápicas para emagrecimento caracteriza-se como um problema sério de adulteração e de saúde pública na sociedade moderna atual, devido ao crescimento abusivo de fármacos anorexígenos, benzodiazepínicos, antidepressivos, entre outros, utilizados no tratamento da obesidade. As formulações fitoterápicas apresentam, com frequência, adulterantes como benzodiazepínicos, antidepressivos e hipoglicêmicos (ALMEIDA *et al.*, 2000).

Em 2006, relatou-se que o Brasil, juntamente com Argentina e Estados Unidos, caracterizaram-se como os maiores consumidores mundiais de fármacos anorexígenos (UNODC, 2008). Relatou-se que, cerca de 60% da produção mundial do fármaco anorexígeno femproporex é utilizada por laboratórios farmacêuticos e farmácias de manipulação no Brasil na produção de medicamentos (ALMEIDA *et al.*, 2000).

A adulteração, que se refere à presença não declarada de fármacos sintéticos em formulações fitoterápicas, é relatada mundialmente pelo uso de anorexígenos (anfepramona, femproporex, mazindol e sibutramina), benzodiazepínicos (alprazolam, clonazepam, clordiazepóxido, diazepam, flurazepam, lorazepam, medazepam e midazolam), antidepressivos (fluoxetina), hipoglicêmicos (acetohexamida, clorpropamida, fenformina, glibenclamida, metformina e tolbutamida) e a cafeína como estimulante (PARODI *et al.*, 1993; GERTNER *et al.*, 1995; HUANG *et al.*, 1997; ALMEIDA *et al.*, 1999; KU *et al.*, 1999; ALMEIDA *et al.*, 2000; CHEN *et al.*, 2000; ERNEST, 2002; KU *et al.*, 2003; LAU *et al.*, 2003; LIANG, 2005; MIKAMI *et al.*, 2005; SOMBRA *et al.*, 2005; YEE *et al.*, 2005).

Foi relatado no Brasil um estudo de análise e avaliação de fármacos anorexígenos sintéticos (dietilpropiona, fluoxetina, benzocaína) como adulterantes em produtos fitoterápicos (CUNHA *et al.*, 2002).

A Tabela 2 mostra os principais adulterantes utilizados em formulações fitoterápicas que podem ser encontrados em fármacos chineses tradicionais (ERNEST, 2002; LIANG *et al.*, 2005).

A presença de adulterantes em formulações fitoterápicas deve ser amplamente investigada, pelo fato de que as possibilidades de adulterações são muitas. Incluindo várias associações entre compostos anorexígenos, benzodiazepínicos, antidepressivos e hipoglicêmicos. Diversos laboratórios farmacêuticos e farmácias de manipulação comercializam estes fitoterápicos indicando que estes contêm somente componentes de plantas medicinais e omitindo que, essas formulações contêm adulterantes, os quais são os verdadeiros responsáveis pelo efeito emagrecedor destas formulações (ALMEIDA *et al.*, 2000).

Portanto, os métodos analíticos adquirem um papel cada vez mais importante na avaliação destes adulterantes e devem ser capazes de determinar, de maneira seletiva e quantitativa, a sua presença nas formulações fitoterápicas, assim como a presença de interferentes, os quais pertencem normalmente à outra classe de medicamento combinada na formulação; como por exemplo, a associação entre anorexígeno e benzodiazepínico. Porém, pela Resolução RDC nº 58, de 05 de setembro de 2003 (BRASIL, 2003b), foi expressamente vedada à associação de substâncias ansiolíticas, antidepressivas, diuréticas e anorexígenas utilizadas na mesma formulação para emagrecimento. Esta resolução também dispõe sobre o aperfeiçoamento do controle e fiscalização de substâncias psicotrópicas anorexígenas e dá outras providências.

Tabela 2 - Principais adulterantes ilegais encontrados em produtos naturais chineses.

Acetaminofeno (Paracetamol)	Fenilbutazona
Ácido Mefenamico	Fenitoína
Aminopirina	Glibenclamida
Amoxicilina	Hidroclorotiazida
Cafeína	Hidrocortisona
Captopril	Ibuprofeno
Carbamazepina	Indometacina
Clorzoxazona	Metilsalicilato
Dexametasona	Nifedipina
Diazepam	Prometazina
Diclofenaco	Propionato de Clobetasol
Etóxibenzamida	Sildenafil (viagra)
Famotidina	Valproato
Fenacetina	

Fonte: ERNST, 2002b; LIANG *et al.*, 2005.

Há alguns métodos de análises de adulterantes ilegais descritos na literatura em diversas matrizes biológicas (cabelo, plasma, fluído oral e urina), como a cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-MS) (CIRIMELE *et al.*, 1997; LIU *et al.*, 2001; CORDERO *et al.*, 2007; KUMAZAWA *et al.*, 2007), cromatografia líquida de alta eficiência com espectrometria de massas (HPLC-MS) (KLEINSCHNITZ *et al.*, 1996; Mc CLEAN *et al.*, 1999; Mc CLEAN *et al.*, 2000; SMINK *et al.*, 2004; KINTZ *et al.*, 2005; QUINTELA *et al.*, 2005; LEE *et al.*, 2006; de CASTRO *et al.*, 2008; MARCHI *et al.*, 2008), cromatografia líquida de alta eficiência com detecção UV (HPLC-UV) (ABU-QARE *et al.*, 2001; BORGES *et al.*, 2009) e eletroforese capilar (CE) (TOMITA *et al.*, 1996; McClean *et al.*, 1999; VANHOENACKER *et al.*, 2004). Há também estudos desses adulterantes em comprimidos comerciais, através das técnicas de CE (ALTRIA, 1996; ALTRIA, 1998; McClean *et al.*, 2000; HANSEN *et al.*, 2005; PRADO *et al.*, 2005; HANCU *et al.*, 2006) e HPLC-UV (ALMEIDA *et al.*, 1999; LIU *et al.*, 2000; PRADO *et al.*, 2005).

Atualmente a CE (KU *et al.*, 1999; CHEN *et al.*, 2000; CHENG *et al.*, 2001; KU *et al.*, 2003; SOMBRA *et al.*, 2005), a HPLC (PARODI *et al.*, 1993; ALMEIDA *et al.*, 2000; LIU *et al.*, 2000; LIU *et al.*, 2001; MIKAMI *et al.*, 2005; SOMBRA *et al.*, 2005) e a HPLC-MS (LIU *et al.*, 2000; LAU *et al.*, 2003; LIANG *et al.*, 2005; BOGUSZ *et al.*, 2006; SMYTH *et al.*, 2006) constituem os métodos de separação mais utilizados na determinação de possíveis adulterantes em formulações fitoterápicas. CUNHA e colaboradores (2002) analisaram pela técnica de cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC) a presença de fármacos anorexígenos sintéticos, dietilpropiona, femproporex, fluoxetina e benzocaína, como adulterantes em formulações fitoterápicas comercializadas na cidade de Goiânia-GO-Brasil (CUNHA *et al.*, 2002). Também por CCDC, YANO e colaboradores (2008) analisaram a presença de anorexígenos e benzodiazepínicos (clordiazepóxido, clonazepam, diazepam, bromazepam e lorazepam) como adulterantes em 22 amostras fitoterápicas, no período de junho de 2004 a março de 2007.

Entre os métodos eletroforéticos publicados recentemente, a eletroforese capilar de zona (CZE) e a cromatografia eletrocinética micelar (MEKC) são de especial interesse, juntamente com os métodos de separação cromatográficos (RP-HPLC), devido à alta eficiência obtida na separação simultânea de misturas complexas de possíveis adulterantes em formulações fitoterápicas. Porém, ainda não foi descrito na literatura a separação de misturas complexas com anorexígenos e benzodiazepínicos como adulterantes, empregando métodos eletroforéticos (CZE) e cromatográficos (RP-HPLC).

2.4 Eletroforese Capilar (CE)

O processo de eletroforese, que se refere ao transporte de espécies eletricamente carregadas quando dissolvidas ou suspensas em um eletrólito através da influência de um campo elétrico, tem sido muito utilizado, desde a década de 30 (TAVARES, 1996). Sua modernização através do uso de capilares, de diâmetro interno de 25 a 75 μm e comprimento de 50 a 100 cm, como canais de migração em eletroforese, preenchidos com solução tampão, introduziu inúmeras vantagens no que diz respeito à injeção e detecção em linha, melhoria na resolução e eficiência, aumentando, assim, o desempenho da separação eletroforética, se comparada à cromatografia líquida (TAVARES, 1997). Este método analítico de separação de misturas é conhecido como eletroforese capilar. Por ser ecologicamente mais correta e mais econômica, é a técnica de separação de mais rápida expansão em análises farmacêuticas, devido a simplificação da aparelhagem utilizada e disponibilidade de meios de suporte altamente purificados, o que diminui muito o tempo de separação das análises (VEUTHEY, 2005). Sendo assim, a CE se estabelece como uma técnica alternativa e de suporte para a HPLC, pois já é utilizada na rotina em análises farmacêuticas, forenses, clínicas e ambientais (ALTRIA, 2004).

Os primeiros trabalhos publicados sobre CE iniciaram-se em 1967 com a publicação de um artigo sobre separação de cátions em CE por Hjertén (HJERTÉN, 1967). Porém, a primeira análise desenvolvida com sucesso foi publicada por Mikkers e seus colaboradores em 1979 (MIKKERS *et al.*; 1979), seguido por Jorgenson e Lukacs em 1981 (JORGENSON; LUKACS, 1981).

A partir de então, vem sendo utilizada por um número cada vez maior de pesquisadores na área da química, bioquímica, ciência forense, laboratórios clínicos, indústrias farmacêuticas, etc. (TAVARES, 1996), devido às suas principais vantagens como: baixo custo dos capilares, facilidade operacional, análise de amostras aquosas e não aquosas, separações de alta eficiência, de alta sensibilidade, tempos de análise apreciavelmente curtos e gasto mínimo de solvente e amostra (VEUTHEY, 2005).

Nas últimas décadas a eletroforese capilar surgiu como uma técnica analítica de separação alternativa para a análise de fármacos e uma série de outros compostos, principalmente em associações de fármacos. A associação dos fármacos traz vantagens terapêuticas, mas gera novos desafios para a indústria

farmacêutica, como avaliar a estabilidade dos fármacos na associação e a dificuldade analítica para sua quantificação. Surge assim a necessidade de métodos capazes de quantificar os fármacos, em formas farmacêuticas compostas (associação de dois ou mais fármacos). Alguns autores, ao comparar métodos analíticos, apontam à CE, como uma alternativa viável para a substituição da HPLC, pois quando comparadas, apresenta vantagens como diminuição no consumo de solventes, no pré-tratamento da amostra e no tempo de análise, apresentando ainda maior simetria de picos, eficiência e seletividade, mantendo a precisão e a exatidão (ALTRIA, 2004).

Uma das maiores vantagens da CE consiste na simplicidade de sua instrumentação, mostrada na figura 3. O sistema, totalmente isolado, devido às altas tensões aplicadas, consiste, basicamente, de uma fonte de alta tensão, um capilar (geralmente de sílica fundida), dois eletrodos de platina e um detector.

A fonte de alta tensão é a responsável por criar o campo elétrico necessário ao longo do capilar, com uma voltagem em torno de 0 a 50 kV e uma corrente de 0 a 200 μA e, essa fonte é conectada a dois reservatórios (*vial*) preenchidos com a solução de trabalho, através dos eletrodos de platina. Os capilares são imersos na solução tampão e, assim ficam preenchidos com esta solução, o que completa, então, o contato elétrico no sistema (TAVARES, 1996).

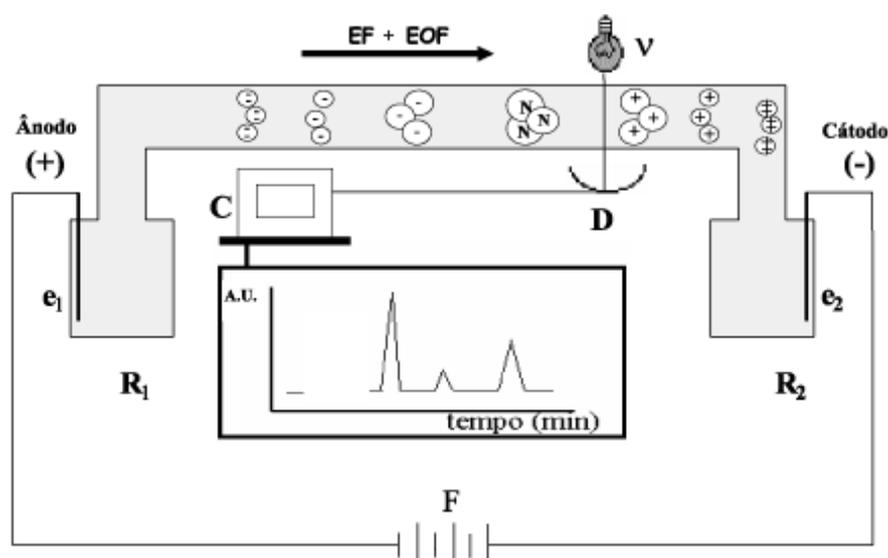


Figura 3: Representação esquemática de um sistema de CE. F - Fonte de energia; e_1 e e_2 - eletrodos de platina; R_1 e R_2 - reservatórios contendo eletrólito; v - lâmpada de emissão; D – detector; C - computador ou analisador; EF - força eletroforética (Adaptado de QUEIROZ; JARDIM, 2008).

Existem cinco formas de operação de CE: Eletroforese capilar de zona (CZE) também chamada de CE em solução livre, eletroforese capilar em gel (CGE), eletrocromatografia capilar micelar (MEKC), eletroforese capilar com focalização isoelétrica (IEF) e isotacoforese capilar (CITP). As separações por CZE e MEKC, são as mais utilizadas nas análises de adulterantes, especialmente em formulações fitoterápicas, e serão a seguir abordadas.

2.4.1 Eletroforese Capilar de Zona (CZE)

A eletroforese capilar de zona (CZE) é uma das técnicas de separação em eletroforese mais usada na prática, provavelmente em razão da facilidade de sua implementação e otimização das condições experimentais (TAVARES, 1997).

A CZE, em princípio, é também uma técnica de fronteira móvel, onde a amostra é introduzida através de um capilar, que é preenchido com um eletrólito,

geralmente um tampão e, quando o potencial é aplicado, os componentes dessa amostra separam-se em zonas, que vão se deslocando separadamente pelo eletrólito, do mesmo tipo de carga, presente na solução, com velocidades de migração diferentes, porém constantes, característica essa de sua própria mobilidade (TAVARES, 1996).

A separação se fundamenta na mobilidade eletroforética (μ_i), conforme equação (1) (TAVARES, 1996). Se a parede do capilar é negativa, o fluxo eletroosmótico (EOF) é na direção do cátodo, como mostrado na figura 4, e a ordem de eluição é: cátions (primeiro o que tiver maior mobilidade), todas as espécies neutras (que não se separam) e ânions (por último o que tiver maior mobilidade) (HARRIS, 2001).

$$\mu_i = \frac{V_i}{E} = \frac{Z_i \cdot e_0}{6 \pi \eta r_i} \quad (1)$$

Onde V_i é a velocidade de migração, E é o campo elétrico (V/cm), Z_i é a carga da partícula, e_0 é a carga elementar ($1,602 \times 10^{-19}$ C), η é a viscosidade e r_i o raio iônico.

A eficiência da separação é, porém, contrariada pelos efeitos da convecção, os quais podem ser minimizados recorrendo ao efeito anticonvectivo de “parede” ou a um meio-suporte sólido.

O “efeito de parede” é aproveitado diminuindo a razão entre a seção reta da câmara de separação e a sua área superficial, o que pode ser realizável pelo uso de tubos capilares, feitos de material química e eletricamente inerte. O uso de capilares já tem sido muito aplicado, principalmente em isotacoforese e também em eletroforese de fronteira móvel e, mais recentemente, em eletroforese de zona (TAVARES, 1997).

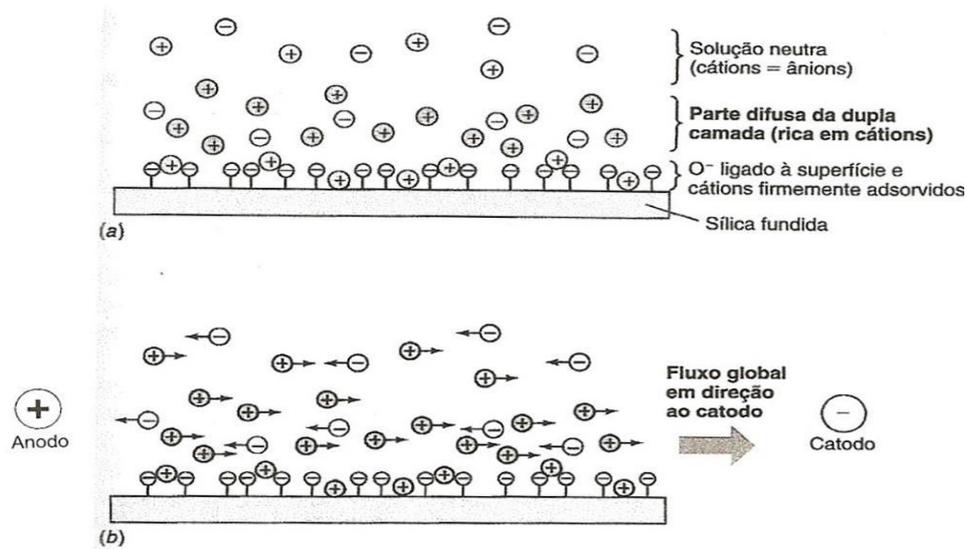


Figura 4: (a) Dupla camada elétrica criada pela superfície de sílica carregada negativamente e pelos cátions que se encontram próximos. (b) A predominância de cátions na parte difusa da dupla camada produz um EOF resultante na direção do cátodo quando aplicado um campo elétrico externo (HARRIS, 2001).

2.4.2 Cromatografia Eletrocínética Micelar (MEKC)

A principal limitação dos métodos eletroforéticos de separação por zona é a impossibilidade de separar compostos neutros, a menos que existam diferenças significativas de massa molecular. Em geral, compostos neutros migram no capilar por ação exclusiva do fluxo eletrosmótico, não havendo discriminação espacial e/ou temporal dos solutos na chegada ao detector (TAVARES, 1997).

Em 1984, Terabe e colaboradores (TERABE *et al.*; 1984) introduziram uma versão modificada da CE, a Cromatografia Eletrocínética Micelar (MEKC), que separa moléculas neutras e íons. Se a carga da parede do capilar for invertida pelo revestimento com um surfactante catiônico, como na figura 5, e a polaridade do instrumento for invertida, a ordem de eluição é contrária à separação por zona: ânions, espécies neutras e cátions. A parte difusa da camada dupla contém excesso de ânions e, o EOF é na direção oposta à da figura 4, mostrada anteriormente. O surfactante é o íon cetiltrimetilamônio, $n\text{-C}_{16}\text{H}_{33}\text{N}(\text{CH}_3)_3^+$, representado por , na ilustração (TAVARES, 1997).

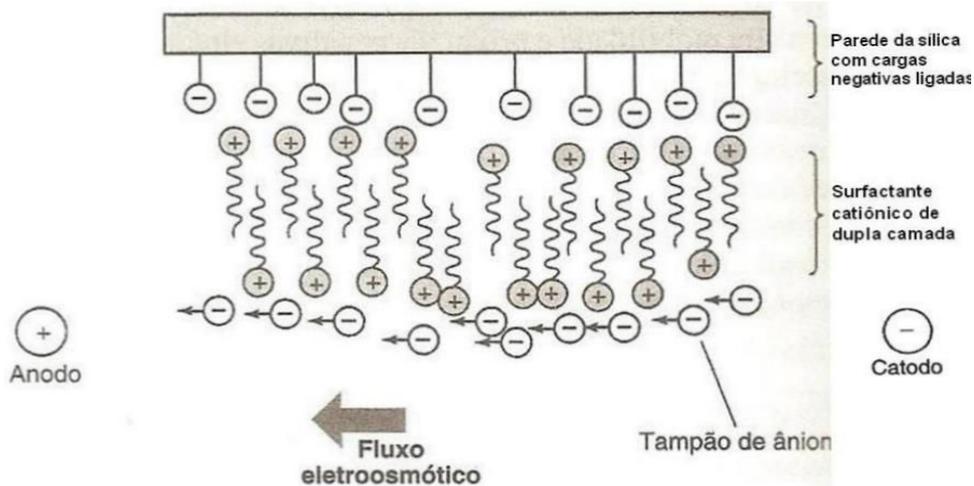


Figura 5: Inversão de carga produzida por uma camada dupla de surfactante catiônico revestindo a parede do capilar. (HARRIS, 2001).

Neste tipo de separação, agentes tensoativos iônicos em condições apropriadas à formação de micelas são adicionados ao eletrólito de corrida, formando, assim, um sistema cromatográfico de duas fases. A MEKC é uma forma de cromatografia porque as micelas se comportam como uma fase pseudo-estacionária. A separação das moléculas neutras se fundamenta na partição entre a solução e a “fase estacionária”. O eletrólito representa a fase primária, a qual é transportada eletroosmoticamente sob ação do campo elétrico, enquanto que as micelas representam a fase secundária, ou pseudo-estacionária, a qual é transportada por uma combinação de eletroforese e eletroosmose. A partição diferenciada de solutos neutros entre estas duas fases é responsável pela seletividade da separação (TAVARES, 1997).

Na figura 6 o EOF é para a direita. A migração eletroforética das micelas de dodecil sulfato de sódio (SDS) carregadas negativamente é para a esquerda, mas o movimento resultante é para a direita, pois o EOF é dominante. As moléculas neutras (escuras) estão em equilíbrio dinâmico entre a solução livre e o interior da micela. Quanto maior for o tempo que uma molécula neutra permanece na micela, maior dificuldade ela terá em acompanhar o EOF (HARRIS, 2001).

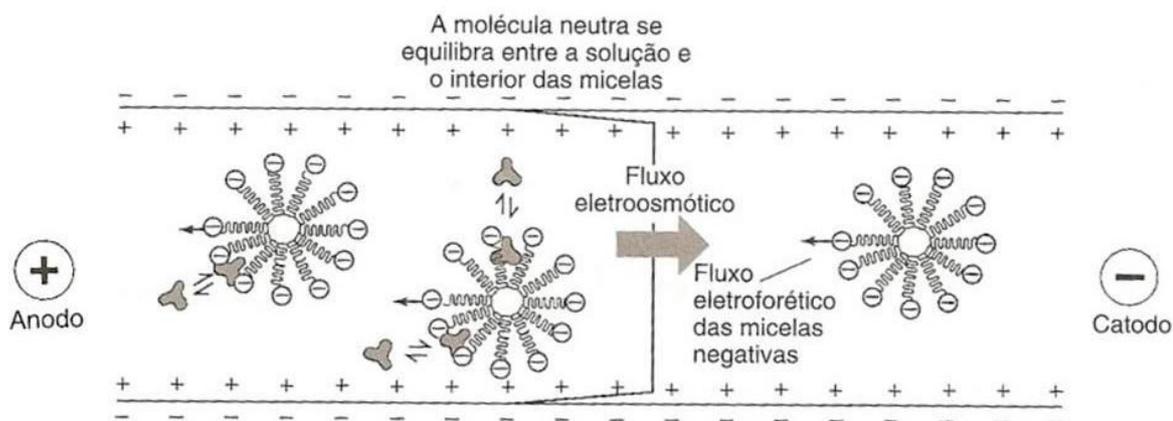


Figura 6: Micelas de SDS negativamente carregadas migram contra a corrente do EOF (HARRIS, 2001).

Na ausência de micelas, todas as moléculas neutras alcançam o detector no tempo t_0 . As micelas injetadas com a amostra alcançam o detector no tempo t_{mc} , o qual é maior do que o tempo t_0 , pois elas migram contra a corrente. Se uma molécula neutra está em equilíbrio entre a solução livre e o interior das micelas, seu tempo de migração aumenta, pois parte do tempo ela migra com a velocidade mais lenta da micela. A molécula neutra atinge o detector em um tempo entre t_0 e t_{mc} . Quanto maior for o tempo que uma molécula neutra permanece no interior de uma micela, maior será o seu tempo de migração. Os tempos de migração dos cátions e dos ânions também são afetados pelas micelas, pois os ânions se distribuem entre a solução e as micelas e interagem eletrostaticamente com as micelas (HARRIS, 2001).

Problemas de co-eluição em MEKC podem ser solucionados pela adição de uma fase complexante auxiliar. Toda uma classe de separações que faz uso de ciclodextrinas de diferentes tamanhos pertence a esta categoria, e vem sendo referida como MEKC-CD. Como as ciclodextrinas são neutras, elas migram com a velocidade eletroosmótica. A partição diferenciada de solutos entre a micela e a cavidade da ciclodextrina produz a seletividade extra requerida. A figura 7 esquematiza os principais mecanismos de transporte da MEKC na presença de ciclodextrinas. Muito embora a MEKC tenha sido idealizada para separar solutos

neutros, ela pode também auxiliar a separação de compostos iônicos, e tem sido amplamente empregada como tal (TAVARES, 1997).

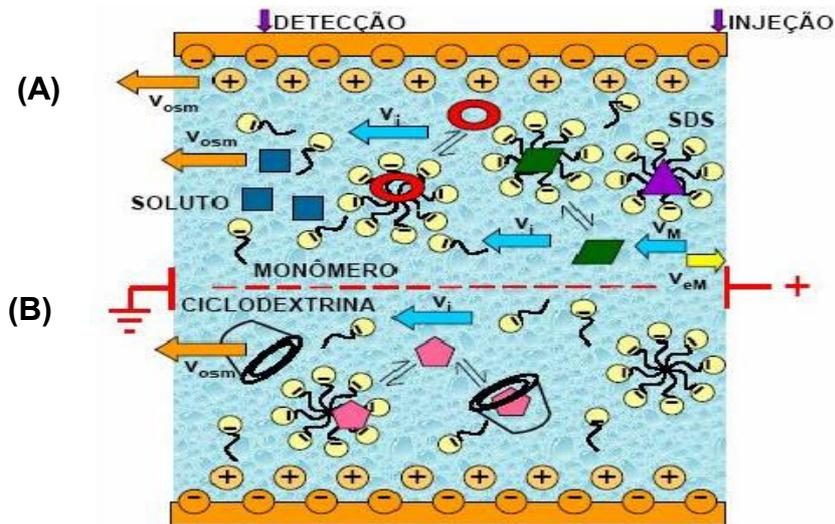


Figura 7: Representação da migração de solutos neutros por eletrocromatografia em fase micelar aniônica (A) na presença de uma fase auxiliar (B), mostrando monômeros e micelas de SDS, ciclodextrinas e a interação de diversos solutos neutros com ambas as fases (TAVARES, 1997).

2.4.3 Determinação de Adulterantes empregando Eletroforese Capilar (CE)

São descritos na literatura casos de adulterações com determinação por eletroforese capilar (CE) em formulações fitoterápicas, porém ainda não foram publicados métodos de determinação simultânea de benzodiazepínicos em formulações fitoterápicas. Medicamentos tradicionais chineses foram analisados por CZE, confirmando a presença de anorexígenos sintéticos como clobenzorex, dietilpropiona, fenfluramina, metamfetamina, fenilpropanolamina e fentermina, utilizando tampão fosfato 120 mM (pH 2,00) e 15% de acetonitrila. A voltagem aplicada foi 16 kV, com detecção UV em 200 nm (KU *et al.*, 1999).

CHEN e colaboradores (2000) analisaram por CZE-UV, os fármacos hipoglicêmicos coptisina, berberina e palmatina em formulações fitoterápicas, utilizando tampão acetato de amônio 50 mM em pH 3,8, voltagem aplicada de 20 kV e detecção em 230 nm, e compararam o resultado da análise com a técnica de CE-MS. Outros fármacos hipoglicêmicos (acetoexamida, clorpropamida, glibenclamida e tolbutamida) foram avaliados por CZE em tampão fosfato 100 mM (pH 7,5) como eletrólito de trabalho, voltagem aplicada de 15 kV e detecção UV em 200 nm (KU *et al.*, 2003).

Sombra e colaboradores (2005) fizeram um estudo comparativo entre as técnicas de CZE e RP-HPLC na análise de sementes de guaraná utilizadas em produtos fitoterápicos e comprimidos comerciais. Para o sistema de CZE utilizaram tampão tetraborato de sódio 20 mM (pH 9,2), voltagem aplicada de 25 kV e detecção UV em 212 nm.

2.5 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)

A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) é uma técnica de separação que, em menos de trinta anos, passou a ser um dos métodos analíticos mais utilizados para fins qualitativos e quantitativos. As razões para este crescimento estão relacionadas à sua adaptabilidade para determinações quantitativas com boa sensibilidade, a possibilidade de separar espécies não voláteis e termicamente instáveis, com destaque para a indústria farmacêutica, bem como as suas aplicações em determinações ambientais e em muitos outros campos da ciência, como o da medicina (TONHI, 2002).

A HPLC é um método físico-químico de separação de misturas e identificação de seus componentes. Esta separação depende da diferença entre o comportamento dos analitos entre duas fases imiscíveis, a fase móvel e a fase estacionária. A grande variedade de combinações entre fases móveis e estacionárias a torna uma técnica extremamente versátil e de grande aplicação (COLLINS; GUIMARÃES, 1988).

A cromatografia pode ser utilizada para a identificação de substâncias em análises quantitativas de uma grande quantidade de compostos presentes em vários tipos de amostras, em escalas de tempo de pouco minutos, com alta resolução, eficiência e sensibilidade, por comparação com padrões previamente existentes. É utilizada também para a purificação de compostos, separando-se as substâncias indesejáveis e para a separação dos componentes de uma mistura.

A cromatografia líquida apresenta uma importante subdivisão: a cromatografia líquida clássica (CLC), na qual a fase móvel é arrastada através da coluna apenas pela força da gravidade, e a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), na qual se utilizam fases estacionárias de partículas menores, sendo necessário o uso de uma bomba de alta pressão para a eluição da fase móvel. A HPLC foi inicialmente denominada cromatografia líquida de alta pressão, mas sua atual designação mostra-se mais adequada (HARRIS, 2001).

2.5.1 Cromatografia de Fase Reversa (RP-HPLC)

Os sistemas por cromatografia de fase reversa (RP-HPLC) são constituídos por uma fase estacionária de menor polaridade e uma fase móvel de maior

polaridade, enquanto a fase normal estas polaridades são invertidas, por isso sua maior aplicação se dá na separação de solutos com polaridades, massas molares e funcionalidades químicas diferentes (TONHI, 2002).

As fases utilizadas em RP-HPLC apresentam inúmeras vantagens, como: diferentes tipos de fases estacionárias estáveis que podem ser empregadas; uso de fases móveis menos tóxicas e menor custo, como metanol e água; rápido equilíbrio da coluna após mudança de fase móvel; facilidade de empregar eluição por gradiente; menor tempo de análises e boa reprodutibilidade dos tempos de retenção (TONHI, 2002).

A separação se dá de acordo com a polaridade do analito: analitos mais polares interagem mais com a fase móvel e são eluídos mais rapidamente; já analitos menos polares interagem mais com a fase estacionária e demoram mais tempo para serem arrastados pela fase móvel. A eluição isocrática é feita mantendo-se constante a composição da fase móvel do início ao fim da análise (TONHI, 2002).

2.5.2 Determinação de adulterantes empregando cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

A análise por HPLC de formulações fitoterápicas adulteradas tem sido descrita na literatura. PARODI e colaboradores (1993) determinaram a adição ilegal de clobenzorex, dietilpropiona, fenfluramina, fluoxetina, flurazepam, metformina e fenformina em formulações fitoterápicas pelo método de RP-HPLC, utilizando como fase móvel, acetonitrila e água (70:30, v/v) (pH 7,00), em eluição isocrática, fluxo de 1,0 mL/min e detecção UV em 246 nm.

Anfepramona, femproporex e diazepam foram determinados por RP-HPLC em fármacos fitoterápicos utilizados no tratamento da obesidade comercializados no Brasil (ALMEIDA *et al.*, 2000). A fase móvel utilizada foi constituída de acetonitrila, metanol, água e 0,1% de carbonato de amônio (50:10:40, v/v) em eluição isocrática e fluxo de 1,0 mL/min e detecção UV em 230 nm.

A análise simultânea dos benzodiazepínicos clotiazepam, diazepam, oxazolam, nitrazepam, oxazepam, tofisopam e triazolam em suplementos alimentares foi realizada pelo método de HPLC (MIKAMI *et al.*, 2004). A fase móvel consistiu de 1-heptanosulfoato de sódio (HSA) 5 mM dissolvido em 1000 mL de

água, acetonitrila (30:70, v/v) (pH 2,4), em eluição isocrática, com fluxo de 1,0 mL/min e detecção UV em 220-340 nm.

SOMBRA e colaboradores (2005) fizeram um estudo comparativo de análise de sementes de guaraná utilizadas em fármacos fitoterápicos e em comprimidos comerciais, pelas técnicas de CZE e RP-HPLC. A fase móvel utilizada foi metanol, água (70:30, v/v) pH 3,5 com eluição isocrática, fluxo de 0,9 mL/min e detecção UV em 254 nm.

LIU e colaboradores (2000) fizeram um estudo comparativo dos métodos de HPLC-UV e HPLC-MS na análise de codeína em fármacos fitoterápicos chineses. Utilizaram eluição por gradiente, com acetonitrila e tampão fosfato (solvente A: tampão fosfato 25 mM pH 3,0; solvente B: acetonitrila, fase gradiente de 5 a 30 % de B por 45 minutos e então de 50% de B por 5 minutos e mantido por mais 5 minutos). O fluxo aplicado foi de 1,0 mL/min e detecção UV em 200-400 nm. Fármacos fitoterápicos chineses também foram analisados por LIU e colaboradores (2001) para determinação de diversas substâncias terapêuticas não-declaradas nas formulações pelas técnicas de RP-HPLC e GC-MS. No sistema de RP-HPLC utilizaram eluição por gradiente de acetonitrila, tampão fosfato (solvente A: tampão fosfato 25 mM pH 3,2; solvente B: acetonitrila, fase gradiente de 10 a 30 % de B por 10 minutos, depois de 50% de B por mais 10 minutos e então de 70% de B por mais 10 minutos e mantido por mais 5 minutos). O fluxo aplicado foi de 1,0 mL/min e a detecção UV em 220, 254 e 280 nm.

BOGUSZ e colaboradores (2006) publicaram a detecção de vários fármacos sintéticos usados como adulterantes em formulações fitoterápicos, através da técnica de HPLC-MS, com eluição por gradiente e fase móvel constituída de tampão fosfato 10 mM pH 3,0 (solvente A) e acetonitrila (solvente B).

Outros fármacos menos comuns, como a cafeína, a fenilbutazona e oxifenbutazona têm sido determinadas por HPLC-MS como adulterantes em formulações fitoterápicas comercializadas na Indonésia (LAU *et al.*, 2003). Citrato de sildenafil, famotidina, nifedipina, captopril, diazepam, ibuprofeno e amoxicilina foram analisados também em fármacos fitoterápicos e suplementos alimentares chineses por HPLC-MS (LIANG *et al.*, 2006).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Instrumentação

As análises por CE foram realizadas em um equipamento Knauer Capline system 2010 com detecção por UV/VIS.

As análises por HPLC foram realizadas em um Cromatógrafo a Líquido Dionex P 680 com sistema de separação isocrática, acoplado com detector UV/VIS UVD-780 (Dionex).

Todos os reagentes sólidos utilizados foram pesados em balança analítica Sartorius (Goettingen, Alemanha) com quatro casas de precisão.

Medidas de pH foram realizadas em um pHmetro digital Digimed DM 20 (São Paulo, Brasil) que utiliza eletrodo de vidro combinado.

As soluções foram preparadas com água ultra-pura, a qual é primeiramente destilada e deionizada, para posterior purificação em um sistema de água Milli - Q Millipore (Bedford, USA), com resistividade de 18,2 M Ω . Após a devida preparação das soluções tampão utilizadas em CE, dos eluentes utilizados em RP-HPLC e da preparação das amostras, realizou-se o processo de filtração em um sistema de filtração a vácuo Sartorius (Alemanha) utilizando acetato de celulose de membrana 0,45 μ m e sonicadas em lavadora ultrasônica Ultrasonic Cleaner Unique USC2800 (São Paulo, Brasil).

Utilizou-se também água destilada, obtida pelo processo de osmose reversa RO/0320 Permuton.

As medidas de absorção molecular foram realizadas em Espectrofotômetro UV-Visível com arranjo de diodos HP 8453 (Hewlett Packard), utilizando cubeta de quartzo.

3.2 Reagentes e Soluções

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

Os fármacos utilizados como substâncias químicas de referência foram obtidos de farmácias de manipulação da cidade de Santa Maria-RS, conforme apresentados na Tabela 4.

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

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

Tabela 3 - Reagentes utilizados no desenvolvimento do trabalho.

<i>Reagentes</i>	<i>Fabricantes</i>
Acetonitrila grau HPLC	J. T. Barker
Metanol grau HPLC	Vetec
Fosfato dibásico de sódio	Merck
Ácido Fosfórico 85% (m/v)	Merck
Ácido Clorídrico P.A.	Vetec
Hidróxido de sódio P.A.	Vetec

Tabela 4 - Fármacos utilizados como substâncias químicas de referência.

<i>Fármacos</i>	<i>Fornecedores</i>
Alprazolam	Sul Farma
Anfepramona	Labovid
Clonazepam	Sul Farma
Clordiazepóxido	Sul Farma
Diazepam	Sul Farma
Femproporex	Labovid
Fluoxetina	Sul Farma
Flurazepam	Labovid
Lorazepam	Sul Farma
Medazepam	Pharma Nostra
Midazolam	Pharma Nostra
Sibutramina	Labovid

3.2.1 Eletrólito utilizado em CE

O eletrólito de trabalho utilizado foi Tampão fosfato 100 mmol/L: foram pesados 1,20 g de fosfato dibásico de sódio e dissolvidos em aproximadamente 80 mL de água ultra-pura, este volume foi transferido para um balão volumétrico de 100 mL e o volume aferido com água ultra-pura.

Após o ajuste do pH, todas as soluções tampão foram filtradas com membranas de acetato de celulose de 45 µm e desgaseificadas em ultrassom por 1 hora após preparadas e por 15 minutos antes do começo das medidas do dia.

3.2.2 Eluentes utilizados em HPLC

Foram testados como eluentes, soluções de acetonitrila e água ACN:H₂O (v/v) em valores de pH de 3,0; 3,5; 4,0 e 4,5.

- Eluente ACN:H₂O (v/v) - as concentrações dos eluentes utilizados foram: 30:70 (v/v), 40:60 (v/v), 50:50 (v/v) e 60:40 (v/v). Foram medidos em uma proveta, primeiramente o volume de acetonitrila desejado e após completando-se o volume com água ultra-pura e após, realizado o ajuste de pH com solução de ácido fosfórico 0,1 M.

- Eluente ACN:H₂O:THF (40:50:10 v/v): foram medidos em uma proveta, 40 mL de acetonitrila, 50 mL de água ultra-pura e 10 mL de tetrahidrometilfurano (THF), respectivamente e, após realizado o ajuste de pH com solução de ácido fosfórico 0,1 M.

Após o ajuste do pH, todos os eluentes foram filtrados com membranas de acetato de celulose de 45 µm e desgaseificados em ultrasom por 2 horas após prepadados e por 15 minutos antes do começo das medidas do dia.

3.2.3 Soluções dos fármacos

As soluções dos fármacos alprazolam, clonazepam, clordiazepóxido, diazepam, flurazepam, lorazepam, midazolam, medazepam, foram preparadas em metanol para uma concentração final de 100 mg/mL, as quais foram chamadas de soluções estoque. Pesou-se 0,025 g de cada fármaco, transferiu-se para balão volumétrico de 25 mL, dissolveu-se em aproximadamente 15 mL de metanol e, após completa dissolução em ultrasom, confirmada por fundo escuro, foram levados a volume final novamente com metanol. As soluções foram mantidas em refrigerador até o momento de uso, sendo refeitas novamente a cada três meses. As soluções de trabalho foram preparadas a partir destas soluções, à temperatura ambiente.

3.3 Procedimentos Analíticos

3.3.1 Determinações por Eletroforese Capilar

Todas as determinações eletroforéticas foram realizadas em um aparelho de eletroforese Capline system 2010 Knauer com detecção UV, operando em 200 nm e os dados foram registrados através do software Chrom Elite versão 1.3.5.

Utilizou-se capilar de sílica fundida recoberto por poliimida, com 60 cm de comprimento (com 9,5 cm da janela do detector) e diâmetro interno de 75 µm.

As injeções anódicas foram realizadas por pressão, aplicando-se 30 mBar durante 2 segundos.

As análises foram realizadas em uma temperatura de 25 °C, a qual era controlada pelo aparelho, através de um sistema de resfriamento interno que utiliza água.

O valor de pH foi estabelecido em 2,0 devido aos valores de pKa (entre 1,30 e 6,20) de cada fármaco obtidos na literatura.

Para o pH selecionado, utilizou-se o eletrólito tampão fosfato na concentração 100 mM.

Os sete benzodiazepínicos (clonazepam, clordiazepóxido, diazepam, flurazepam, lorazepam, medazepam e midazolam) estudados no presente trabalho foram determinados pelo método de eletroforese capilar de zona (CZE).

3.3.1.2 Estudos de otimização das medidas eletroforéticas por CZE

Os estudos realizados para a otimização do método envolveram o estudo da voltagem, onde avaliou-se o efeito da voltagem aplicada no sinal eletroforético dos benzodiazepínicos. As voltagens escolhidas para estudo foram 15, 16, 18 e 20 kV. A fonte de alta tensão utilizada foi para a detecção de cátions, com injeção anódica e detecção catódica.

A influência de solventes orgânicos foi estudada através do sinal eletroforético de cada benzodiazepínico no eletrólito de trabalho (tampão fosfato) utilizando solventes em diferentes concentrações: Acetonitrila (concentração de 2, 5, 10 e 15%) e Metanol (concentração de 5, 10 e 15%), a fim de se obter uma melhor resolução dos picos e um melhor tempo de migração.

3.3.2 Determinações por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

Todas as determinações cromatográficas foram realizadas em um cromatógrafo líquido Dionex P 680 com sistema de separação isocrática e detector UV/VIS (UVD 170U), operando em 230 nm. Os dados foram registrados através do software Chromeleon versão 6.70. Utilizou-se Coluna analítica de separação C₁₈ de dimensões 4,6 mm x 150 mm x 5 µm (Dionex).

Os sete benzodiazepínicos (alprazolam, clonazepam, clordiazepóxido, diazepam, lorazepam, medazepam e midazolam) estudados no presente trabalho foram determinados pelo método cromatográfico por fase reversa (RP-HPLC), eluição isocrática e com detecção UV.

Diariamente, a coluna cromatográfica (C₁₈) era condicionada com a fase móvel a ser utilizada nos experimentos por aproximadamente 30 minutos, tempo este suficiente para que a oscilação de absorvância da linha base fosse inferior a 3%.

Após esse tempo de condicionamento, os padrões foram injetados de forma manual, utilizando-se alça de injeção de 20 µL.

3.3.2.1 Estudos de otimização das medidas cromatográficas

A solubilidade dos fármacos em sistemas polares de fase orgânica-aquosa definiu a utilização do método cromatográfico de fase reversa, desenvolvido por HPLC, no qual analitos de característica pouco polares são analisados.

A fase móvel foi preparada medindo-se quantidades de volumes nas proporções indicadas de acetonitrila grau HPLC e de água Milli-Q, acidificada com solução aquosa de ácido fosfórico (1:1, v/v) e desaerada em banho de ultra-som durante 2 horas, à temperatura ambiente.

Para a escolha da composição da fase móvel para a separação cromatográfica testaram-se as seguintes composições de acetonitrila:água (v/v): 40:60, 50:50, 60:40 e, também utilizou-se o modificador orgânico THF na condição ACN:H₂O:THF 40:50:10.

A escolha da vazão foi feita após testes em valores de vazão de fase móvel de 0,5; 0,7 e 1,0 mL min⁻¹.

Devido às características polares da maioria dos benzodiazepínicos, foi necessária a acidificação da fase móvel e da amostra, a fim de garantir uma maior interação dos benzodiazepínicos com a fase estacionária. Em RP-HPLC quanto mais hidrofóbico o analito, mais ele é retido. Quando o analito se torna ionizado, fica menos hidrofóbico, e sua retenção diminui. Para esse fim, foi testado o ácido fosfórico, com ajustes de pH em 3,5; 4,0 e 4,5.

3.3.2.2 Estudo dos interferentes na determinação dos benzodiazepínicos

A influência dos interferentes na determinação dos benzodiazepínicos foi avaliada com base na diminuição ou aumento da área de cada pico, nas condições otimizadas.

Os interferentes estudados foram os anorexígenos anfepramona, femproporex e sibutramina, e o anti-depressivo fluoxetina.

Adicionou-se na mistura de benzodiazepínicos 20 mg L^{-1} (alprazolam, clonazepam, clordiazepóxido, clonazepam, diazepam, lorazepam, medazepam e midazolam) os quatro interferentes estudados na mesma concentração dos benzodiazepínicos e injetou-se no sistema cromatográfico, nas condições otimizadas do item 4.2.

3.3.2.3 Amostras reais de formulações fitoterápicas

O método de separação proposto no item 3.3.2 foi aplicado na determinação seqüencial de sete benzodiazepínicos em 13 amostras de formulações fitoterápicas para emagrecimento, adquiridas em diferentes farmácias de manipulação na cidade de Santa Maria – RS.

Para a análise das treze amostras de fitoterápicos, cujas composições estão descritas na Tabela 5, adotou-se o seguinte procedimento experimental: dissolveu-se o conteúdo (pó) de uma cápsula do fitoterápico em metanol em um balão volumétrico de 25 mL (extrato metanólico). Posteriormente, estes extratos metanólicos foram filtrados em algodão e, antes de cada injeção, os extratos foram novamente filtrados em membrana de filtração de acetato de celulose de $45 \mu\text{m}$. O procedimento experimental utilizado neste estudo para a determinação simultânea

dos benzodiazepínicos estudados nas amostras fitoterápicas para emagrecimento, encontra-se na figura 8.

Tabela 5 - Composição das amostras fitoterápicas para emagrecimento, estudadas neste trabalho.

Amostra	Composição	Quantidade de pó/cápsulas (mg)
01	- Carboidratos, proteínas, gorduras, fibra alimentar, sódio; - <i>Quitosana</i>	350
02	- Carboidratos, proteínas, gorduras, fibra alimentar, sódio; - <i>Quitosana</i>	350
03	- Carboidratos, proteínas, gorduras, fibra alimentar, sódio, vitamina C; - <i>Quitosana</i>	500
04	- Fibra alimentar; - <i>Quitosana</i>	50
05	- <i>Garcinia camboja</i>	300
06	- <i>Quitosana</i>	325
07	- <i>Porangaba</i>	250
08	- <i>Caralluma fibrata</i>	500
09	- <i>Hoodia gordonii</i>	500
010	- <i>Chlorella</i>	250
011	- Carboidratos, proteínas, gorduras, fibra alimentar, sódio; - <i>Chá verde</i>	450
012	- Spirulina, Maracujá, Centella Asiática, Cáscara Sagrada, Goma Guar, - <i>Guarcinia</i>	570
013	- <i>Alcachofra</i>	500

Preparação das Amostras

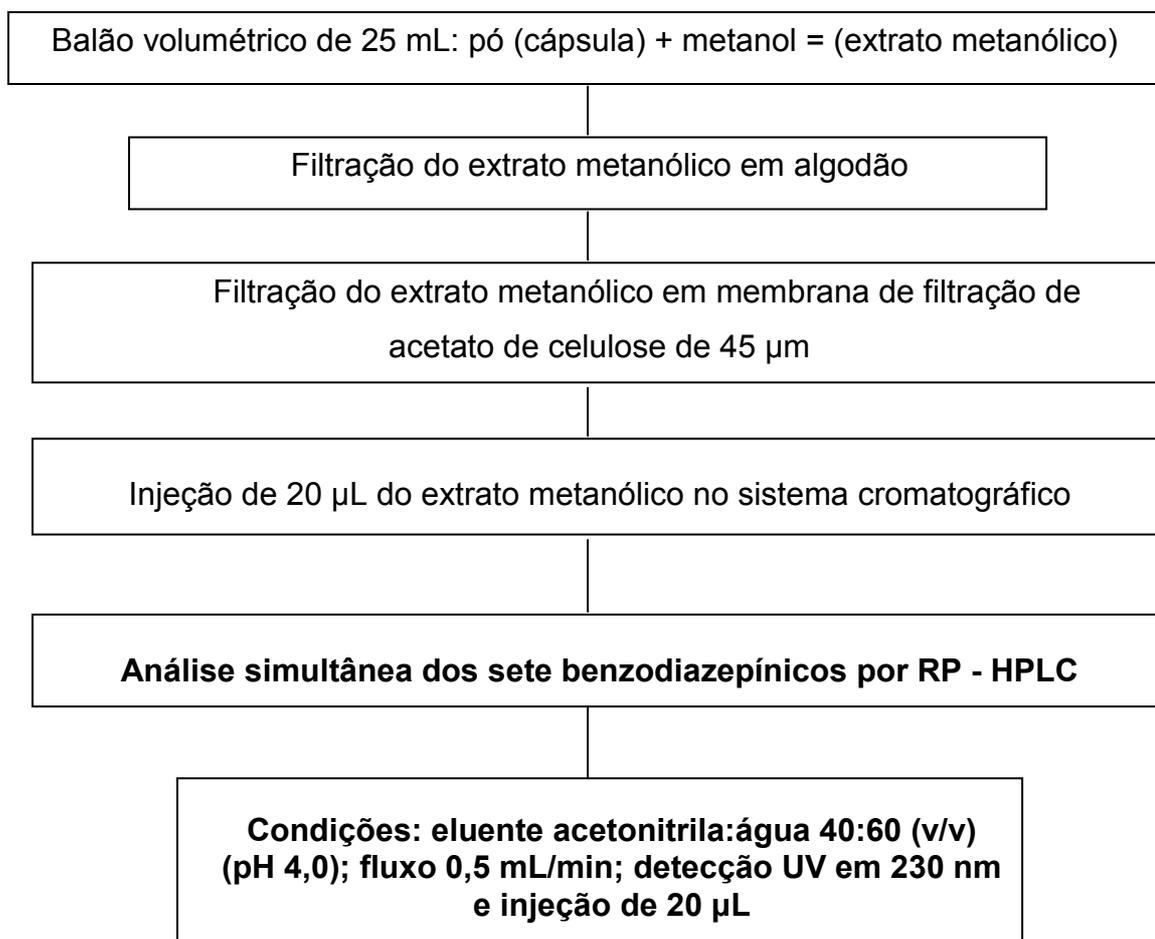


Figura 8: Resumo do procedimento experimental de extração das formulações fitoterápicas analisadas para a determinação simultânea dos benzodiazepínicos estudados.

Com base nos resultados obtidos nas análises das 13 amostras fitoterápicas, conforme a figura 8, ensaios de recuperação para avaliar a eficiência do método nas amostras reais foram realizados na amostra 02 (*Quitosana*), a qual foi escolhida por apresentar uma melhor porcentagem de recuperação entre as treze amostras analisadas. Para este estudo foram adicionadas concentrações conhecidas na amostra 02 (*Quitosana*), conforme procedimento descrito a seguir, com a intenção de simular uma amostra real adulterada contendo cada um dos benzodiazepínicos estudados. A figura 9 apresenta os procedimentos experimentais realizados para a composição da amostra adicionada utilizada nos ensaios de recuperação.

3.3.2.3.1 Amostra a: O conteúdo de cada cápsula da amostra 02 (*Quitosana*) de formulação fitoterápica da foi colocado em cada um dos sete balões volumétricos de 25 mL. Em cada balão foi adicionado 1,0 mg de apenas um único benzodiazepínico, de forma que, cada balão continha um benzodiazepínico diferente. A dissolução dessa mistura foi realizada com metanol. Após dissolução completa, esses extratos metanólicos com a adição de cada um dos benzodiazepínicos, foram filtrados em algodão, e antes de cada injeção, foram novamente filtrados em membrana de filtração de acetato de celulose de 45 µm. Posteriormente, seguiu-se os procedimentos cromatográficos para análise simultânea dos benzodiazepínicos.

3.3.2.3.2 Amostra b: O conteúdo de cada cápsula da amostra 02 (*Quitosana*) de formulação fitoterápica foi colocado em cada um dos sete balões volumétricos de 25 mL. Em cada balão foi adicionado 10,0 mg de apenas um único benzodiazepínico, de forma que, cada balão continha um benzodiazepínico diferente. A dissolução dessa mistura foi realizada com metanol. Após dissolução completa, esses extratos metanólicos com a adição de cada um dos benzodiazepínicos, foram filtrados em algodão, e antes de cada injeção, foram novamente filtrados em membrana de filtração de acetato de celulose de 45 µm. Posteriormente, seguiu-se os procedimentos cromatográficos para análise simultânea dos benzodiazepínicos.

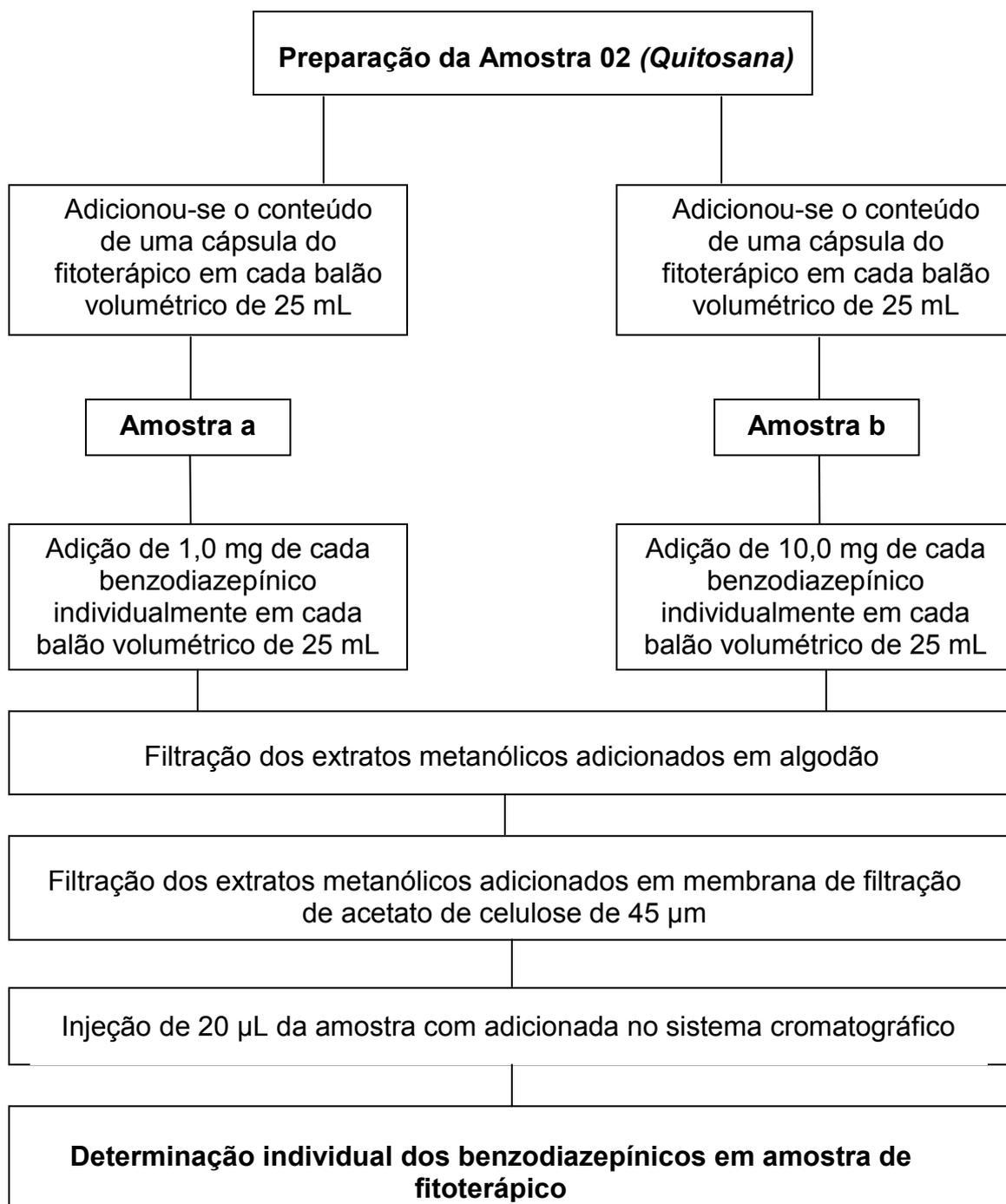


Figura 9: Procedimento experimental utilizado para adição conhecida na amostra 02 (*Quitosana*) de fitoterápicos com benzodiazepínicos (alprazolam, clonazepam, clordiazepóxido, diazepam, lorazepam, medazepam e midazolam) para ensaios de recuperação.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Separação de benzodiazepínicos como adulterantes empregando eletroforese capilar de zona (CZE)

Todos os parâmetros capazes de influenciar a separação eletroforética dos sete benzodiazepínicos (clonazepam, clordiazepóxido, diazepam, flurazepam, lorazepam, medazepam e midazolam) por CZE foram otimizados durante o desenvolvimento do método. Os principais e mais comumente considerados são: seleção do eletrólito de trabalho, determinação da voltagem a ser aplicada, escolha do capilar, temperatura de análise, comprimento de onda ideal, seleção de ciclos de rinsagem e de tempos de injeção (BAKER, 1995). Em todos os estudos realizados procurou-se atingir uma melhor resposta entre os analitos analisados e o equipamento, assim como uma melhor definição na forma do pico.

As dimensões dos capilares mais utilizados atualmente variam entre 25 e 100 cm de comprimento e entre 25 a 100 μm de diâmetro interno. Quanto à composição, os materiais mais comuns são: os de vidro tipo Pirex, os de teflon e os de sílica fundida, cada um com suas vantagens. Os capilares de vidro tipo Pirex são resistentes e não requerem revestimento externo para dissipar o calor, mas não são óticamente transparentes para comprimentos de onda abaixo de 280 nm. Os capilares de teflon são óticamente transparentes e são mais flexíveis, mas possuem uma baixa taxa de dissipação do calor quando submetidos a altas diferenças de potencial (ddp). Os de sílica fundida, em geral mais utilizados, são óticamente transparentes, mas pouco resistentes e para aumentar sua resistência são comumente recobertos por uma fina camada de poliimida (BAKER, 1995).

Ao realizar a escolha do capilar deve se considerar o diâmetro interno do mesmo, pois quanto maior, mais calor será gerado e maior será a diferença de temperatura entre o centro e as paredes do capilar e, portanto, maior o EOF; e quanto maior o comprimento, maior será o tempo de análise (BAKER, 1995). Assim, justifica-se a escolha do uso de capilar de sílica fundida recoberto por poliimida, com 60 cm de comprimento (com 9,5 cm da janela do detector) e diâmetro interno de 75 μm .

A composição, concentração e pH do eletrólito de trabalho são importantes para ajuste dos parâmetros de migração, seletividade e simetria dos picos (BAKER,

1995). A primeira avaliação realizada foi para definir o melhor pH para separação dos fármacos, pois este influencia significativamente o EOF, alterando tempo de migração e seletividade. Teoricamente para a melhor resolução o pH ideal é aquele próximo ao pKa dos analitos em questão, pois as diferenças de ionização são máximas levando a migrações diferenciadas (BAKER, 1995), assim utilizou-se pH 2,0 para o eletrólito de trabalho, conforme os valores de pKa de cada um dos fármacos (entre 1,3 e 6,2).

A composição do tampão pode alterar o tempo de retenção e a seletividade, pois diferentes íons interagem de forma diferente com a parede do capilar e podem alterar o EOF (BAKER, 1995). Para o pH selecionado, utilizou-se o eletrólito tampão fosfato na concentração 100 mM.

A adição de solventes orgânicos altera o EOF, pois altera a viscosidade do eletrólito de trabalho; assim solventes orgânicos são capazes de alterar a viscosidade do eletrólito de trabalho, promovendo alteração no EOF (ALTRIA, 1996).

Nos estudos que envolveram solvente orgânico no eletrólito de trabalho e voltagem aplicada sobre o sistema, observa-se que os fármacos diazepam, clonazepam e lorazepam co-eluem quando analisados em uma mesma mistura.

A influência de solventes orgânicos no eletrólito de trabalho sobre o tempo de migração dos benzodiazepínicos, foi estudada através do uso de metanol e acetonitrila. O metanol (figura 10) foi utilizado em concentrações de 5, 10 e 15%, enquanto a acetonitrila (figura 11) foi utilizada em concentrações de 2, 5, 10 e 15%.

A escolha destes solventes orgânicos foi baseada na solubilidade dos benzodiazepínicos, já que estes são pouco solúveis em água e muito solúvel nos solventes escolhidos.

Através das figuras 10 e 11 verifica-se uma maior eficiência de separação com o uso do solvente acetonitrila, onde em todas as concentrações testadas obteve-se uma separação dos analitos, enquanto que com o solvente metanol houve uma perda da resolução dos picos, o que pode ser explicado pelo aumento da viscosidade e, conseqüente, decréscimo do EOF, o que comprometeu a resolução e separação dos picos, aumentando assim o tempo de migração (ALTRIA, 1996). Assim, otimizou-se a concentração de acetonitrila no eletrólito de trabalho em 15%, a qual proporcionou separação dos analitos com boa resolução dos picos, em um tempo considerável de análise.

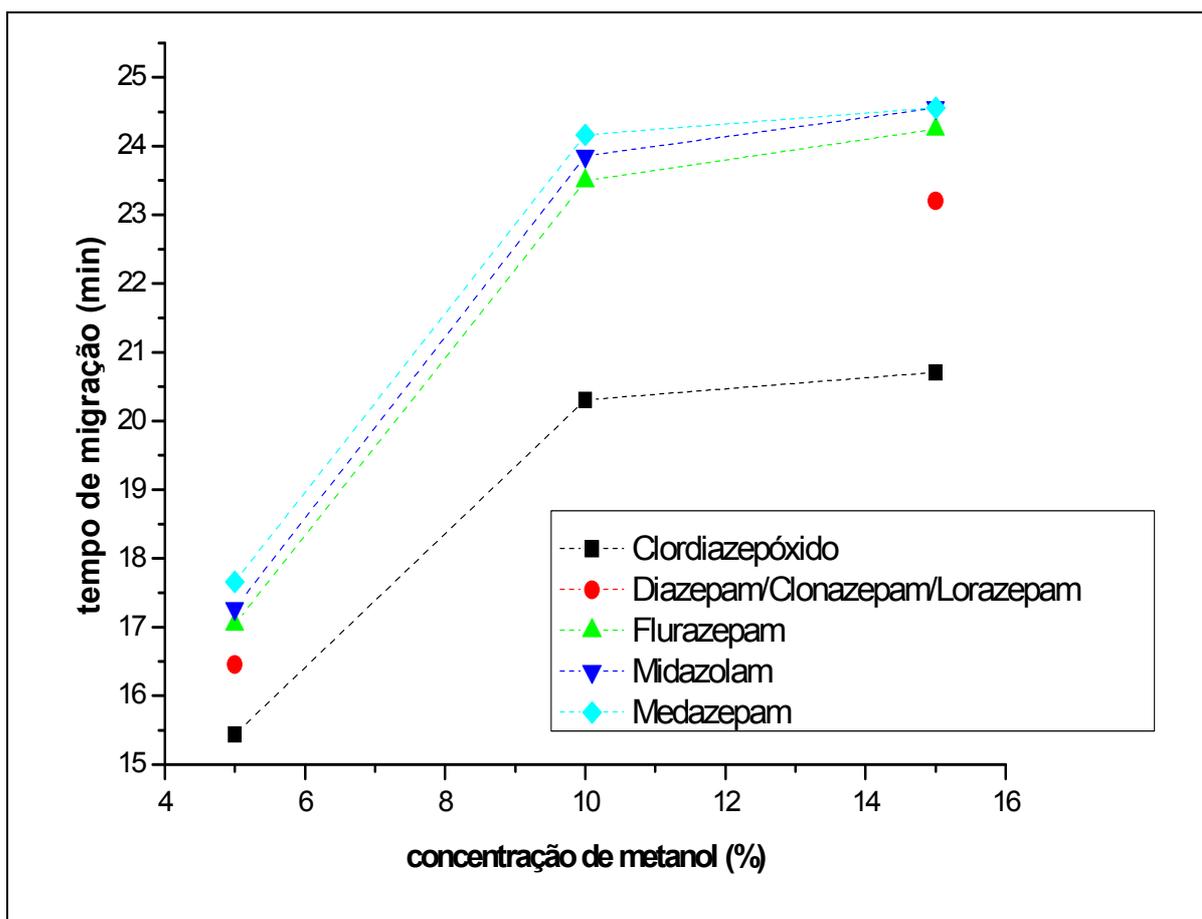


Figura 10: Efeito do solvente metanol nos tempos de migração dos benzodiazepínicos em concentração de 20 mg L^{-1} , para concentrações de solvente de 5, 10 e 15%. Condições: eletrólito de trabalho tampão fosfato 100 mM (pH 2,0); capilar de sílica fundida revestido de poliimida de 60 cm de comprimento (com 9,5 cm da janela do detector) e diâmetro interno de $75 \text{ }\mu\text{m}$, operando a 25°C ; voltagem aplicada de 15 kV, detecção UV em 200 nm e injeção hidrodinâmica anódica durante 2 segundos, com pressão de 30 mBar.

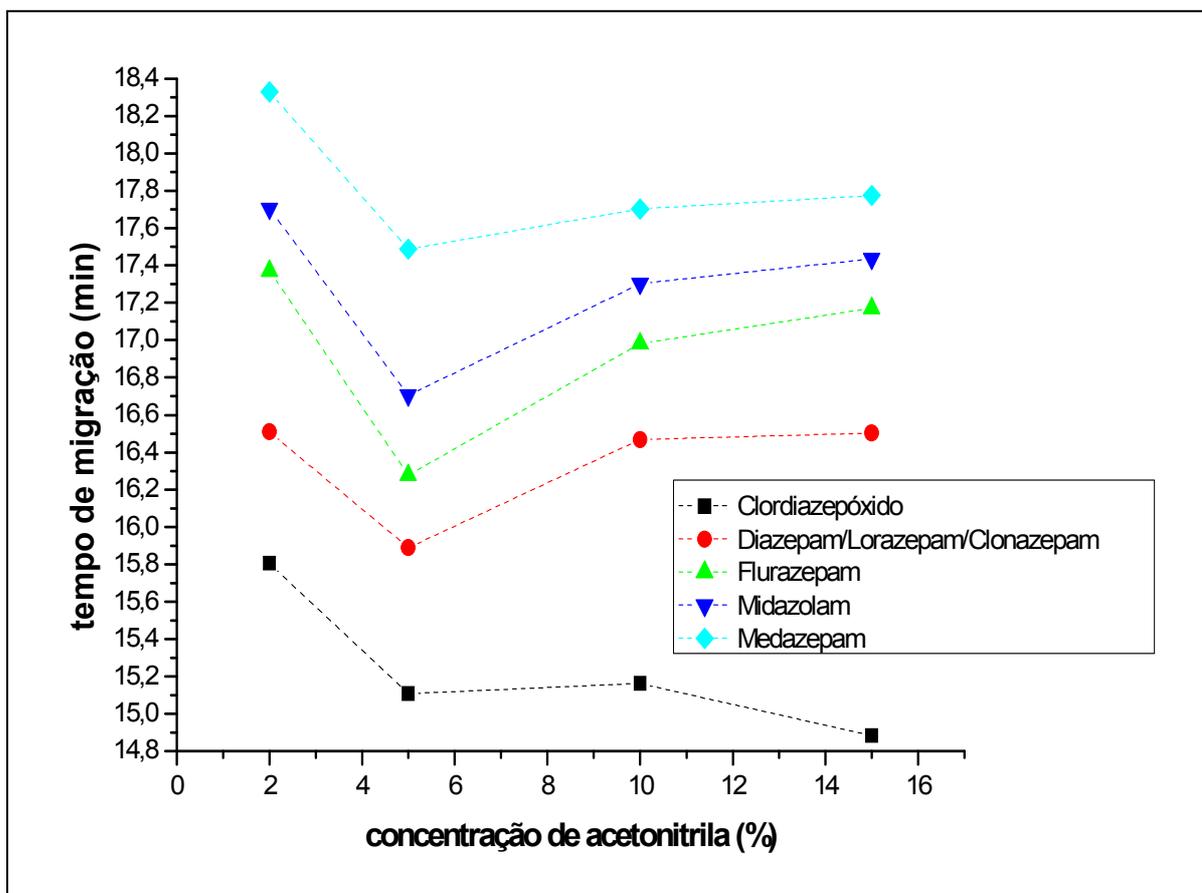


Figura 11: Efeito do solvente acetonitrila nos tempos de migração dos benzodiazepínicos em concentração de 20 mg L^{-1} , para concentrações de solvente de 2, 5, 10 e 15%. Condições: eletrólito de trabalho tampão fosfato 100 mM (pH 2,0); Capilar de sílica fundida revestido de poliimida de 60 cm de comprimento (com 9,5 cm da janela do detector) e diâmetro interno de $75 \mu\text{m}$, operando a 25°C ; voltagem aplicada de 15 kV, detecção UV em 200 nm e injeção hidrodinâmica anódica durante 2 segundos, com pressão de 30 mBar.

A alta voltagem em CE é empregada para movimentar o eletrólito através do capilar pela ação do EOF. O efeito da voltagem aplicada sobre o tempo de migração de cada fármaco foi estudado mediante a aplicação de voltagens em valores de 15, 16, 18 e 20 kV. Em voltagens de 20 kV não foi possível obtermos um eletroferograma, pois a corrente nesta voltagem excedeu o valor limite. Através da figura 12 verifica-se que a separação dos benzodiazepínicos também ocorre em voltagens de 16 e 18 kV, porém obteve-se uma melhor separação dos analitos e resolução dos picos quando as corridas foram conduzidas na voltagem de 15 kV.

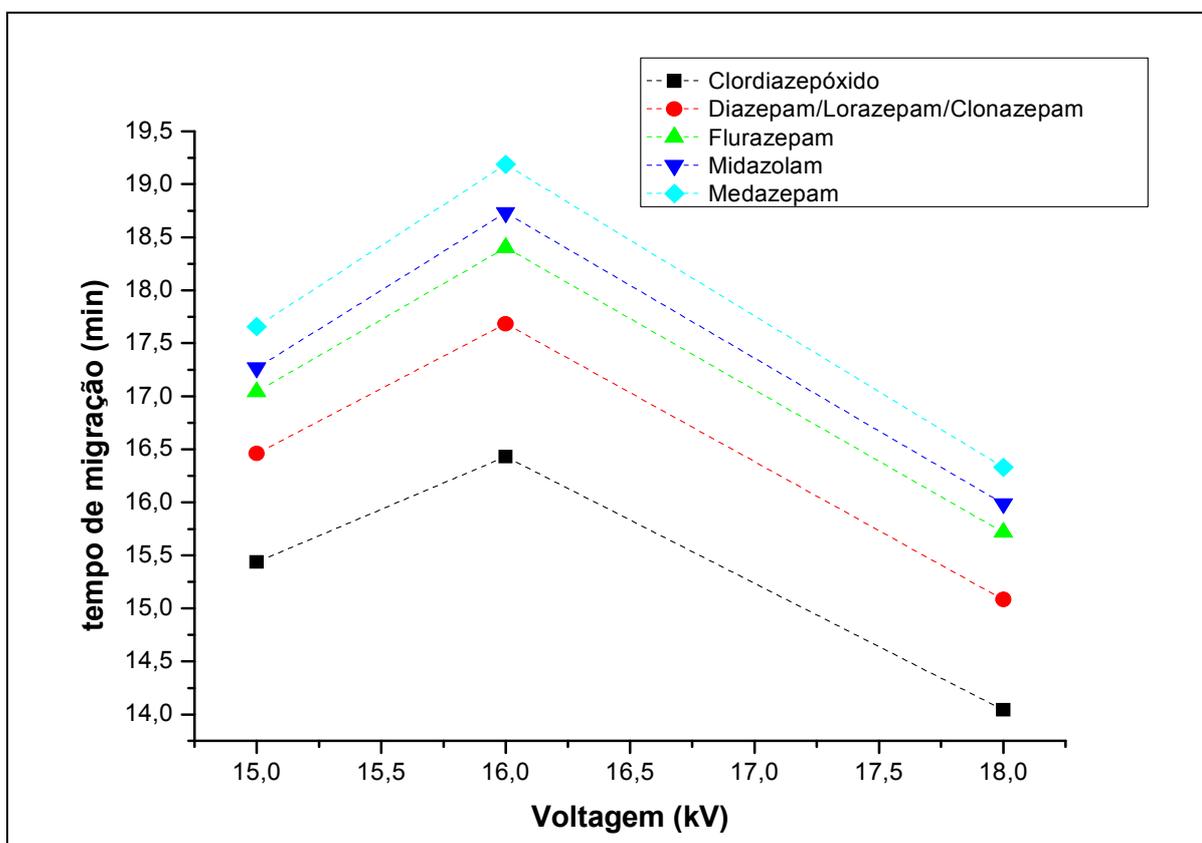


Figura 12: Efeito da voltagem aplicada sobre os tempos de migração dos benzodiazepínicos na concentração de 20 mg L^{-1} . Condições: eletrólito de trabalho tampão fosfato 100 mM, 15% acetonitrila (pH 2,0); capilar de sílica fundida revestido de poliimida de 60 cm de comprimento (com 9,5 cm da janela do detector) e diâmetro interno de $75 \text{ }\mu\text{m}$, operando a 25°C , detecção UV em 200 nm e injeção hidrodinâmica durante 2 segundos, aplicando-se pressão de 30 mBar.

Através dos estudos de otimização da influência de solventes orgânicos e voltagem aplicada, chegou-se a conclusão que a melhor condição experimental para a separação de benzodiazepínicos por CZE, foi utilizar tampão fosfato 100 mM contendo 15% de acetonitrila em pH 2,00 como eletrólito de trabalho, aplicando-se uma voltagem de 15 kV.

A figura 13 mostra a análise dos sete benzodiazepínicos por CZE (clonazepam, clordiazepóxido, diazepam, flurazepam, lorazepam, medazepam e midazolam), onde podemos observar que os fármacos diazepam, lorazepam e clonazepam (pico 4) co-eluíram em uma mesma análise. Esta co-eluição destes três fármacos se deve as suas mobilidades eletroforéticas aparente (μ_i) serem muito parecidas entre si. Os cálculos da mobilidade eletroforética aparente de cada benzodiazepínico, mostrados na Tabela 6, foram realizados conforme a equação (1) (TAVARES, 1996) mostrada anteriormente.

Tabela 6 – Valores de mobilidade eletroforética aparente (μ_i) calculados para os benzodiazepínicos^a.

Benzodiazepínico	Mobilidade eletroforética aparente (μ_i) ($\text{cm}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$)
Clonazepam	$1,3713 \times 10^{-3}$
Clordiazepóxido	$1,39 \times 10^{-3}$
Diazepam	$1,3676 \times 10^{-3}$
Flurazepam	$1,34 \times 10^{-3}$
Lorazepam	$1,3735 \times 10^{-3}$
Medazepam	$1,16 \times 10^{-3}$
Midazolam	$1,29 \times 10^{-3}$

^a Eletrólito de trabalho: Tampão Fosfato 100 mM 15% ACN (pH 2,0).

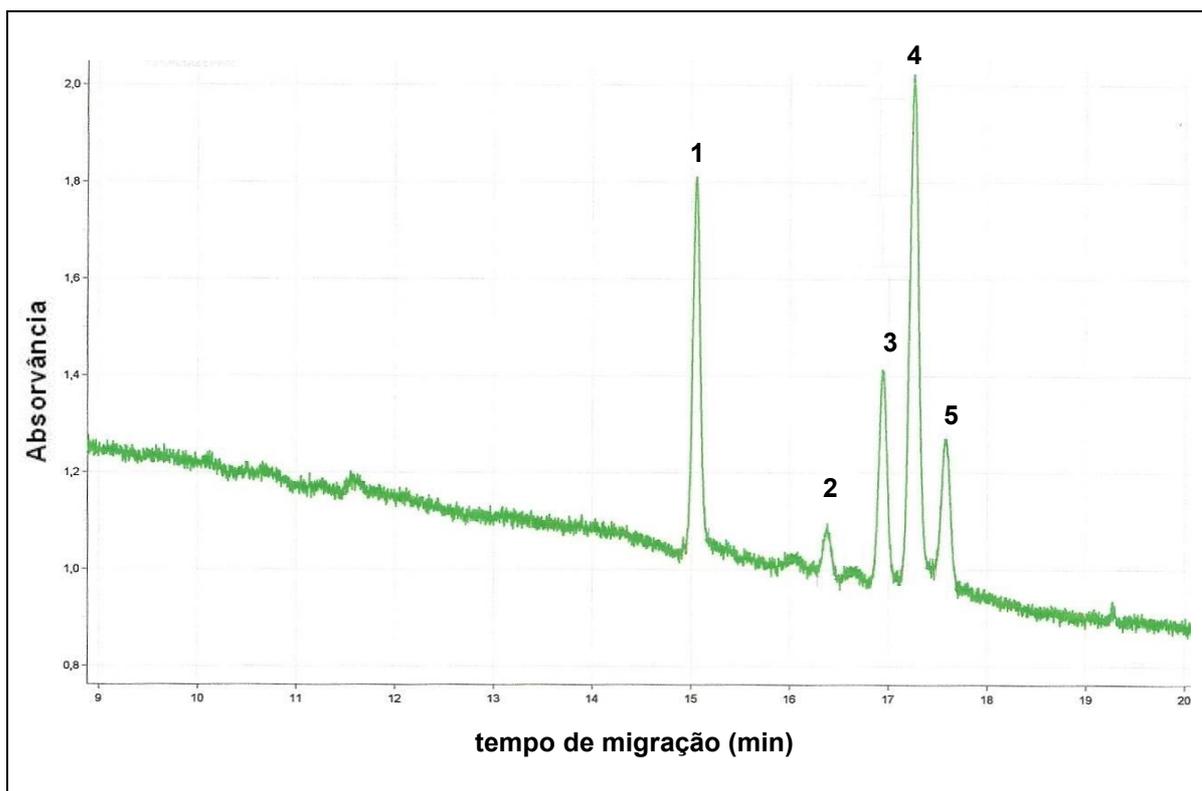


Figura 13: Eletroferograma da separação dos benzodiazepínicos em concentração de 20 mg L^{-1} : (1) Medazepam, (2) Midazolam, (3) Flurazepam, (4) Diazepam/Clonazepam/Lorazepam e (5) Clordiazepóxido. Condições: eletrólito de trabalho tampão fosfato 100 mM , 15% acetonitrila ($\text{pH } 2,0$); capilar de sílica fundida revestido de poliimida de 60 cm de comprimento (com $9,5 \text{ cm}$ da janela do detector) e diâmetro interno de $75 \text{ }\mu\text{m}$, operando a 25°C ; voltagem aplicada de 15 kV ; detecção UV em 200 nm e injeção hidrodinâmica anódica durante 2 segundos com pressão de 30 mBar .

Através do eletroferograma da figura 13, o qual mostra as co-eluições dos fármacos diazepam, clonazepam e lorazepam, realizou-se uma análise individual desses três fármacos com os outros benzodiazepínicos, a fim de se obter uma melhor separação de todos os fármacos em estudo.

Na figura 14 observa-se a análise dos benzodiazepínicos clordiazepóxido, flurazepam, lorazepam, medazepam e midazolam, sem a presença dos fármacos diazepam e clonazepam que co-eluem com o lorazepam. Verifica-se que ocorre a separação de todos os fármacos, porém a resolução dos picos do flurazepam, lorazepam e clordiazepóxido não é a ideal.

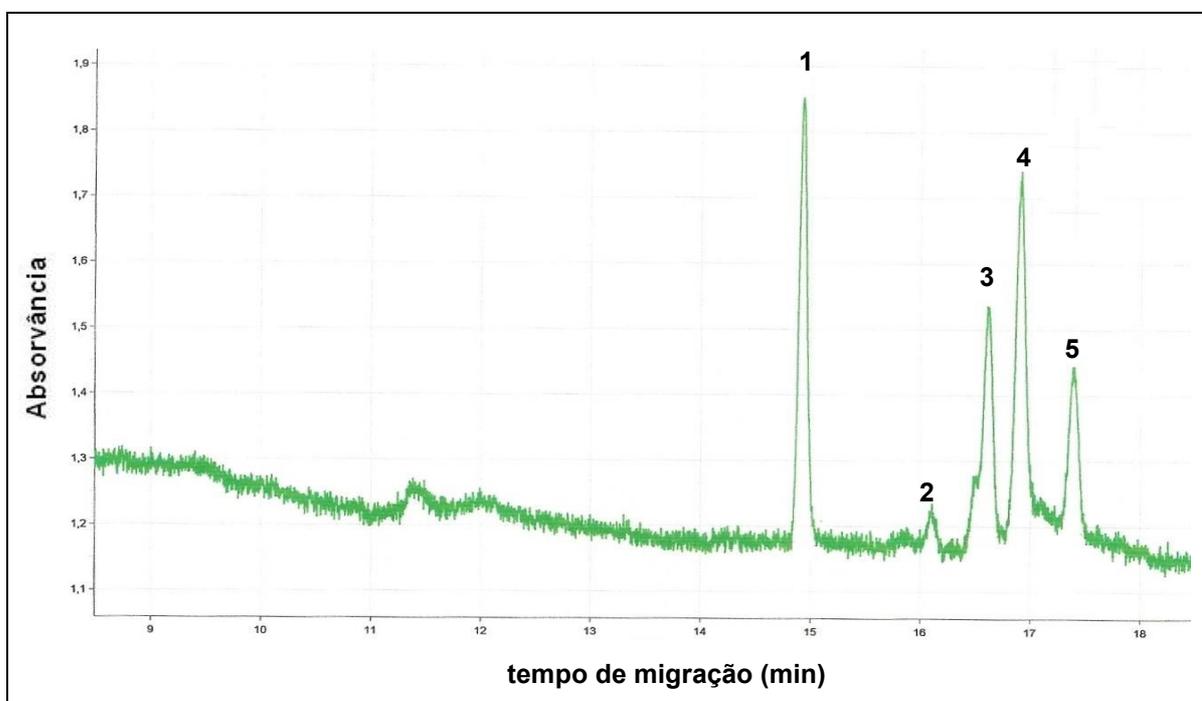


Figura 14: Eletroferograma da separação dos benzodiazepínicos em concentração de 20 mg L^{-1} : (1) Medazepam, (2) Midazolam, (3) Flurazepam, (4) Lorazepam e (5) Clordiazepóxido. Condições: eletrólito de trabalho tampão fosfato 100 mM, 15% acetonitrila (pH 2,0); capilar de sílica fundida revestido de poliimida de 60 cm de comprimento (com 9,5 cm da janela do detector) e diâmetro interno de $75 \mu\text{m}$, operando a 25°C ; voltagem aplicada de 15 kV; detecção UV em 200 nm e injeção hidrodinâmica anódica durante 2 segundos com pressão de 30 mBar.

A figura 15 mostra a análise dos benzodiazepínicos clonazepam, clordiazepóxido, flurazepam, medazepam e midazolam, sem a presença dos fármacos diazepam e lorazepam que co-eluem com o clonazepam. Verifica-se que ocorre a separação de todos os fármacos, porém os picos do clonazepam e do clordiazepóxido co-eluem, mostrando que esta condição também não é a ideal para a separação dos fármacos.

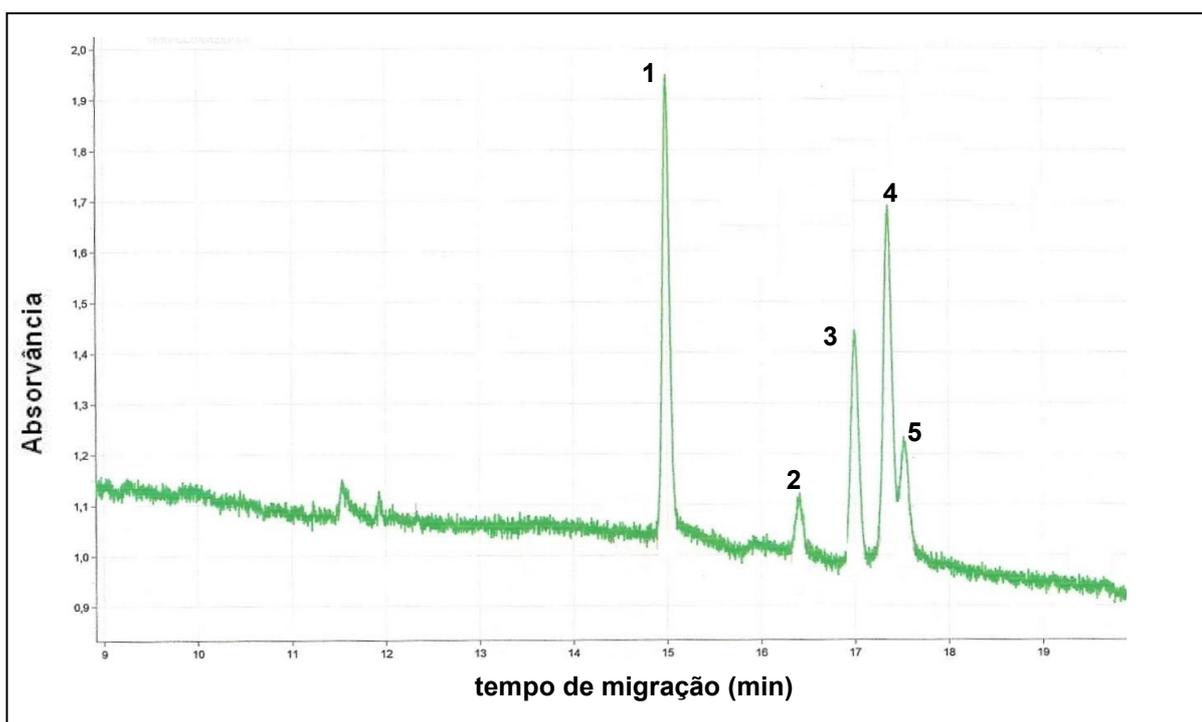


Figura 15: Eletroferograma da separação dos benzodiazepínicos em concentração de 20 mg L^{-1} : (1) Medazepam, (2) Midazolam, (3) Flurazepam, (4) Clonazepam e (5) Clordiazepóxido. Condições: eletrólito de trabalho tampão fosfato 100 mM , 15% acetonitrila ($\text{pH } 2,0$); capilar de sílica fundida revestido de poliimida de 60 cm de comprimento (com $9,5 \text{ cm}$ da janela do detector) e diâmetro interno de $75 \text{ }\mu\text{m}$, operando a 25°C ; voltagem aplicada de 15 kV ; detecção UV em 200 nm e injeção hidrodinâmica anódica durante 2 segundos com pressão de 30 mBar .

Na figura 16, observa-se a separação ideal nas condições otimizadas dos benzodiazepínicos clordiazepóxido, diazepam, flurazepam, medazepam e midazolam, sem a presença dos fármacos lorazepam e clonazepam que co-eluem com o diazepam. Verifica-se que o fármaco diazepam nas condições ideais otimizadas, em comparação com os fármacos lorazepam e clonazepam, os quais co-eluem quando juntos numa mesma análise, teve uma melhor e completa separação dos fármacos em estudo, assim como uma melhor resolução dos picos. Porém, deve-se ressaltar que os fármacos lorazepam (figura 14) e clonazepam (figura 15), também podem ser detectados por CZE em uma amostra adulterada.

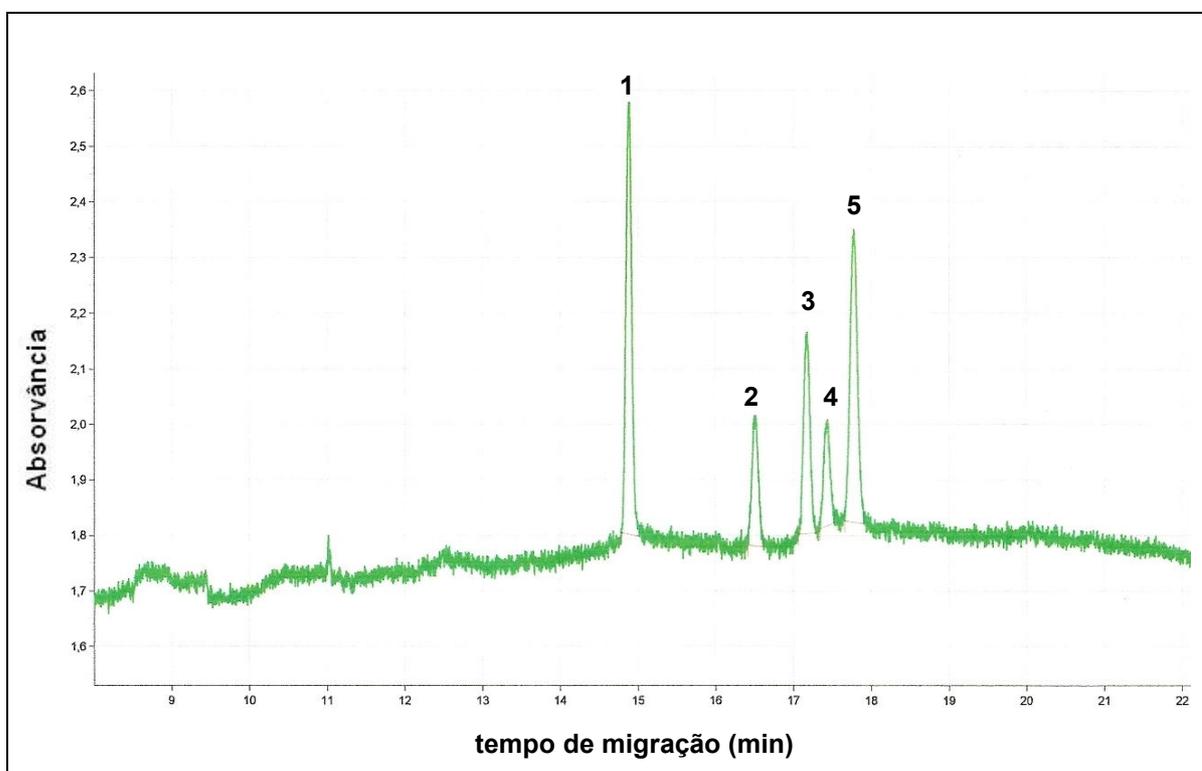


Figura 16: Eletroferograma otimizado na separação dos benzodiazepínicos em concentração de 20 mg L^{-1} : (1) Medazepam, (2) Midazolam, (3) Flurazepam, (4) Diazepam e (5) Clordiazepóxido. Condições: eletrólito de trabalho tampão fosfato 100 mM , 15% acetonitrila ($\text{pH } 2,0$); capilar de sílica fundida revestido de poliimida de 60 cm de comprimento (com $9,5 \text{ cm}$ da janela do detector) e diâmetro interno de $75 \mu\text{m}$, operando a 25°C ; voltagem aplicada de 15 kV ; detecção UV em 200 nm e injeção hidrodinâmica anódica durante 2 segundos com pressão de 30 mBar .

4.2 Separação de adulterantes empregando cromatografia líquida de alta eficiência por fase reversa (RP-HPLC)

Foram analisados sete benzodiazepínicos por RP-HPLC: alprazolam, clonazepam, clordiazepóxido, diazepam, lorazepam, medazepam e midazolam.

A otimização para a separação desses fármacos envolveram estudos de comprimento de onda de detecção, efeito da concentração do solvente acetonitrila na composição do eluente, efeito do pH do eluente e o efeito do fluxo do eluente.

O comprimento de onda ideal para leitura não é necessariamente aquele no qual o composto apresenta absorção máxima e sim aquele no qual o composto absorve livre de interferentes, assim, analisou-se o espectro de absorção molecular de cada fármaco para a escolha de um comprimento de onda que fosse capaz de detectar satisfatoriamente os sete benzodiazepínicos em estudo, a partir de soluções metanólicas dos padrões a uma concentração de 10 mg L^{-1} , conforme mostrado na figura 17.

Após o estudo do comprimento de onda de detecção de cada analito pelo espectrofotômetro HP, no qual selecionou-se três comprimentos de onda de maior absorvância (208, 230 e 315 nm), usou-se o próprio detector do sistema cromatográfico, o qual possui uma lâmpada de deutério e um monocromador, que permitiu a escolha do um comprimento de onda de 230 nm, o qual mostrou-se o mais adequado para a separação dos analitos em questão.

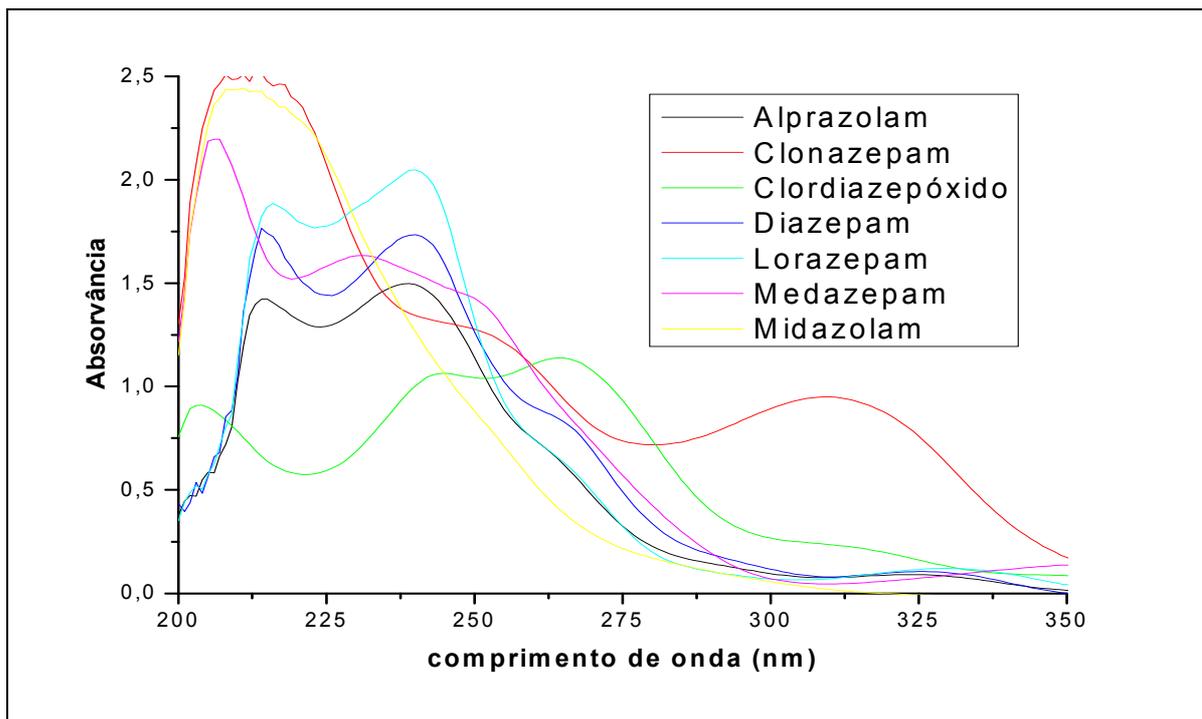


Figura 17: Espectros de absorção molecular dos sete benzodiazepínicos em concentração de 10 mg L⁻¹.

Para as determinações por RP-HPLC usou-se o modo de eluição isocrática, a qual é feita mantendo-se constante a composição da fase móvel do início ao fim da análise. O solvente de eluição deve eluir de forma eficiente os analitos de interesse e permitir que os interferentes contidos na amostra permaneçam retidos no cartucho. O ideal é eluir os analitos de interesse em um pequeno volume de eluente, de forma que os analitos estejam em uma concentração adequada para ser injetada no cromatógrafo (VOGEL *et al.*, 1992).

A escolha do solvente de eluição depende da polaridade relativa do solvente e da sua capacidade em remover os analitos da fase sólida adsorvente. Para adsorventes menos polares como o C₁₈ e C₈, o solvente de eluição precisa ter características bem polares, como por exemplo, o metanol, a acetonitrila e o acetato de etila (VOGEL *et al.*, 1992).

O efeito da concentração de acetonitrila na composição do eluente na separação dos benzodiazepínicos foi estudado através de diferentes concentrações

de acetonitrila adicionadas no eluente de trabalho, a fim de se obter uma melhor separação dos benzodiazepínicos analisados (figura 18).

Utilizou-se o solvente acetonitrila no eluente nas seguintes concentrações: ACN:H₂O (v/v): 40:60, 50:50, 60:40 e, também utilizou-se o solvente orgânico tetraidrometilfurano (THF) na condição ACN:H₂O:THF 40:50:10 (v/v).

Verificou-se que o eluente ACN:H₂O:THF 40:50:10 (v/v) e os eluentes ACN:H₂O 60:40 e 50:50 (v/v) possuíram perfis semelhantes, com menores tempos de retenção, porém não se conseguiu uma separação eficiente dos analitos. Já o eluente ACN:H₂O 40:60 (v/v), apresentou um maior tempo de retenção, porém conseguiu-se a separação completa de todos os analitos.

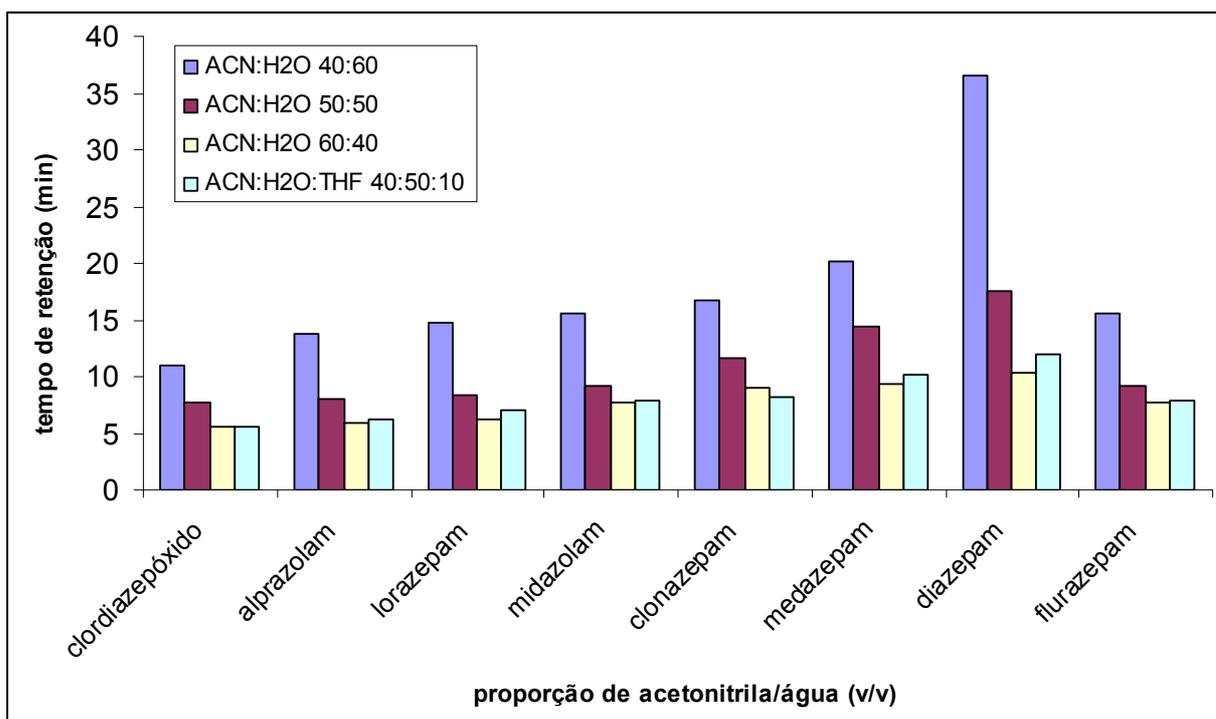


Figura 18: Tempo de retenção dos benzodiazepínicos na concentração de 20 mg L⁻¹ em função da concentração de acetonitrila no eluente ACN:H₂O (v/v), em concentrações de 40:60, 50:50, 60:40 e 40:50:10 de ACN:H₂O:THF; (pH 4,0) em fluxo 0,5 mL/min; detecção UV em 230 nm e injeção de 20 µL.

Um dos parâmetros de separação mais importantes em HPLC é o pH do eluente de trabalho, o qual pode influenciar na seletividade do método, por isso realizou-se um estudo sobre o efeito do pH do eluente ACN:H₂O 40:60 (v/v) na separação dos benzodiazepínicos.

Observa-se na figura 19, que a variação de pH teve relação direta com os tempos de retenção dos analitos, assim como a detecção dos sinais obtidos. Em valores de pH 3,5 os tempos de retenção dos analitos foram menores, porém os picos ficaram mais próximos um do outro, ocorrendo uma co-eluição entre os analitos e, em valores de pH 4,0, apesar dos tempos de retenção serem maiores, verificou-se que a separação dos analitos foi mais eficiente, diminuindo a co-eluição entre os picos.

Dessa forma o pH da fase móvel foi ajustado para pH 4,0 com solução aquosa de ácido fosfórico (1:1, v/v) para garantir uma adsorção reprodutível dos analitos na fase sólida e uma menor retenção dos compostos interferentes na mesma, permitindo assim que os sítios ativos da C₁₈ retivessem com mais seletividade os analitos.

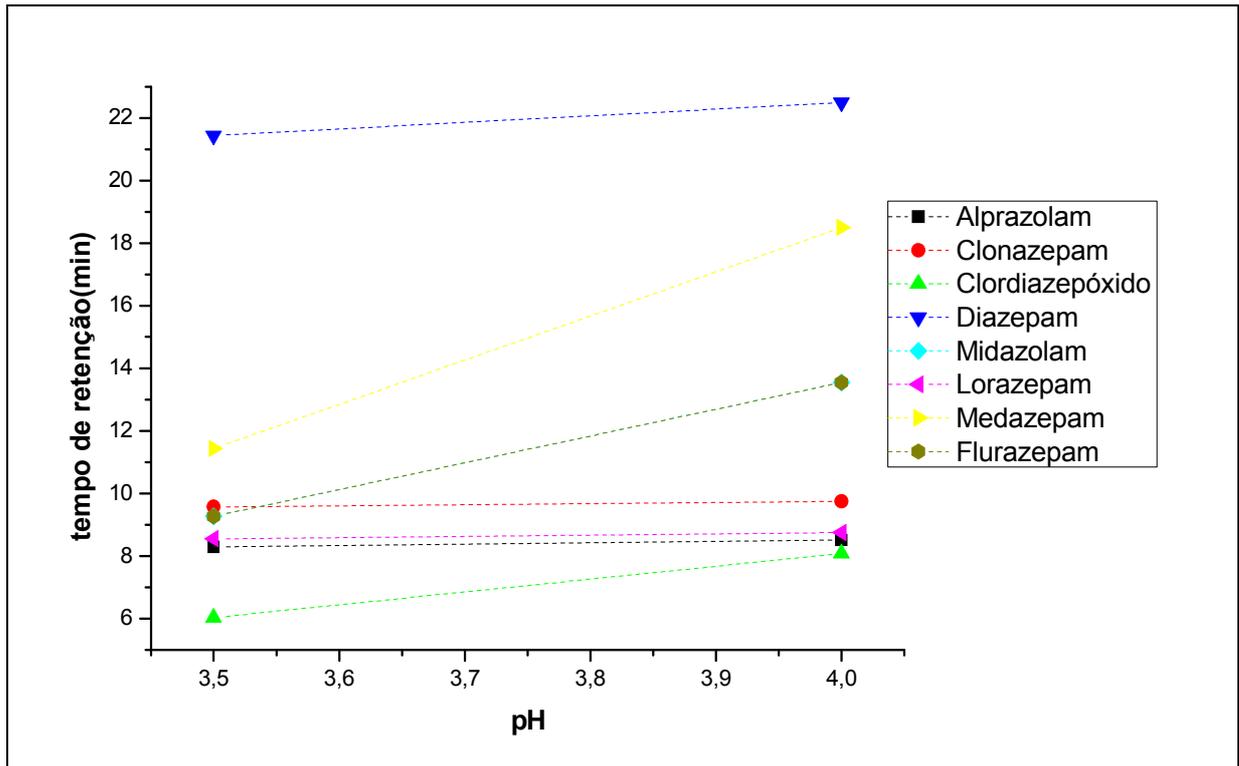


Figura 19: Tempo de retenção dos benzodiazepínicos na concentração de 20 mg L^{-1} em função do pH de eluente. Condições: eluente acetonitrila:água 40:60 (v/v), pH 3,5 e 4,0 em fluxo 0,5 ml/min; detecção UV em 230 nm e injeção de $20 \mu\text{L}$.

O efeito do fluxo de eluente ACN:H₂O 40:60 (v/v) na separação foi estudado através de testes com velocidades de fluxos de fase móvel em 0,5; 0,7 e 1,0 mL/min, para verificar a separação dos benzodiazepínicos em estudo. Conforme a figura 20, verifica-se que em um fluxo menor, maior o tempo de retenção dos analitos, porém a eficiência de separação torna-se maior, assim como a separação dos fármacos.

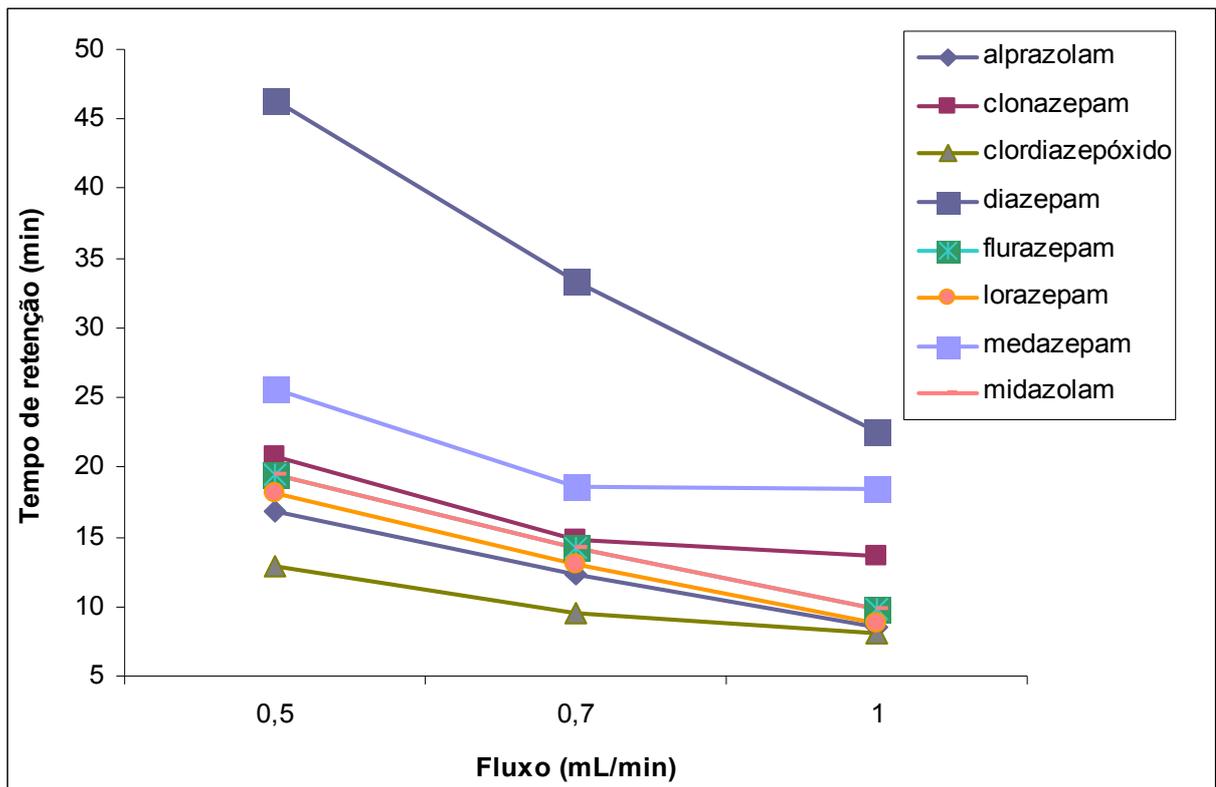


Figura 20: Efeito do fluxo (0,5; 0,7 e 1,0 mL/min) de eluente nos tempos de retenção dos benzodiazepínicos na concentração de 20 mg L⁻¹. Condições: eluente acetonitrila:água 40:60 (v/v) (pH 4,0); detecção UV em 230 nm e injeção de 20 µL.

Para a identificação dos benzodiazepínicos estudados, alprazolam, clonazepam, clordiazepóxido, diazepam, flurazepam, lorazepam, medazepam e midazolam, optou-se pelo uso de cromatografia de fase reversa, de eluição isocrática e com detecção UV em 230 nm.

Como apresentado na figura 21, a separação dos analitos não foi completa, visto que o fármaco flurazepam co-eluiu com o midazolam, e também não se obteve uma boa resolução dos picos e separação eficiente do clonazepam e lorazepam.

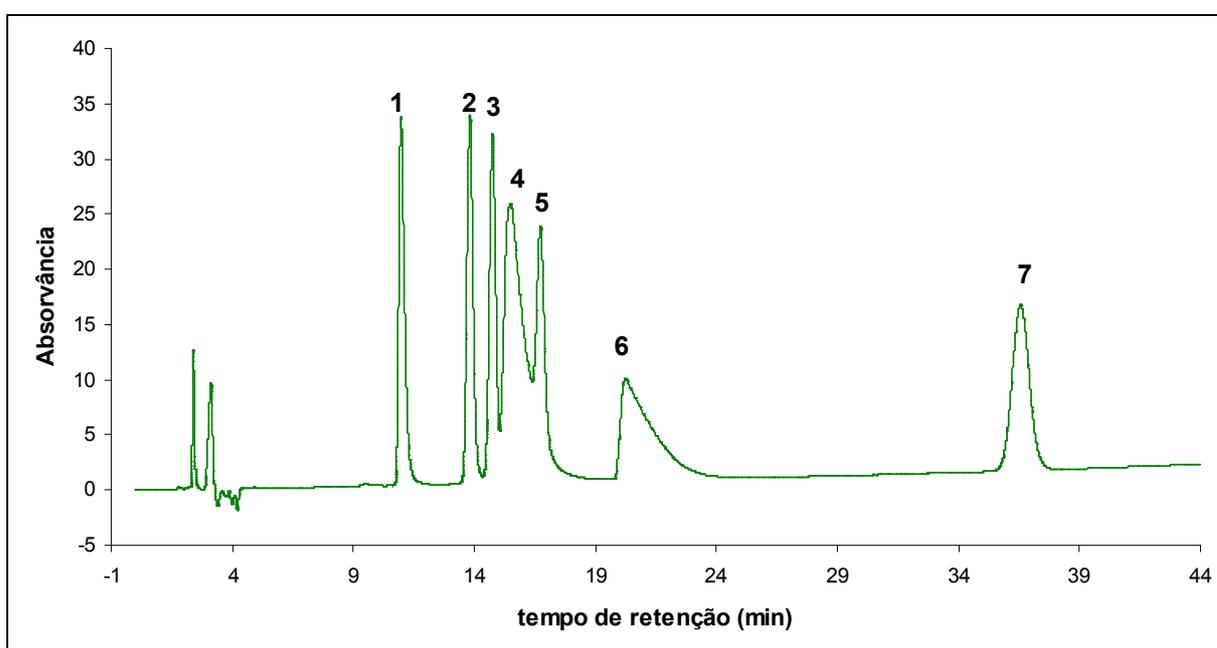


Figura 21: Cromatograma da separação de sete benzodiazepínicos na concentração de 20 mg L^{-1} : (1) Clordiazepóxido, (2) Alprazolam, (3) Lorazepam, (4) Flurazepam, (5) Clonazepam, (6) Medazepam, (7) Diazepam. Condições: eluente acetonitrila:água 40:60 (v/v) (pH 4,0) em fluxo $0,5 \text{ mL/min}$; detecção UV em 230 nm e injeção de $20 \text{ }\mu\text{L}$.

Podemos observar no cromatograma da figura 22 que o tempo de retenção do diazepam ocorreu em 36 minutos e que a separação completa de todos os outros fármacos foi em menos de 20 minutos, enquanto que na figura 21, além de não ter-se obtido uma completa separação dos fármacos lorazepam, flurazepam e clonazepam, o tempo de retenção do fármaco diazepam foi maior (em 39 minutos).

Porém, deve-se ressaltar que o fármaco flurazepam (figura 21) também pode ser detectado por RP-HPLC em uma amostra adulterada.

Com os estudos envolvendo o fluxo, o pH e a concentração de solvente na fase móvel, determinou-se que a melhor condição de separação para os benzodiazepínicos em estudo, conforme figura 22, foram em fluxo 0,5 mL/min, onde obteve-se uma melhor separação e resolução dos picos, assim como para valores de pH 4,0 e uma concentração de eluente 40:60 ACN:H₂O (v/v). Portanto, a otimização e a validação do método, foi realizada nestas condições.

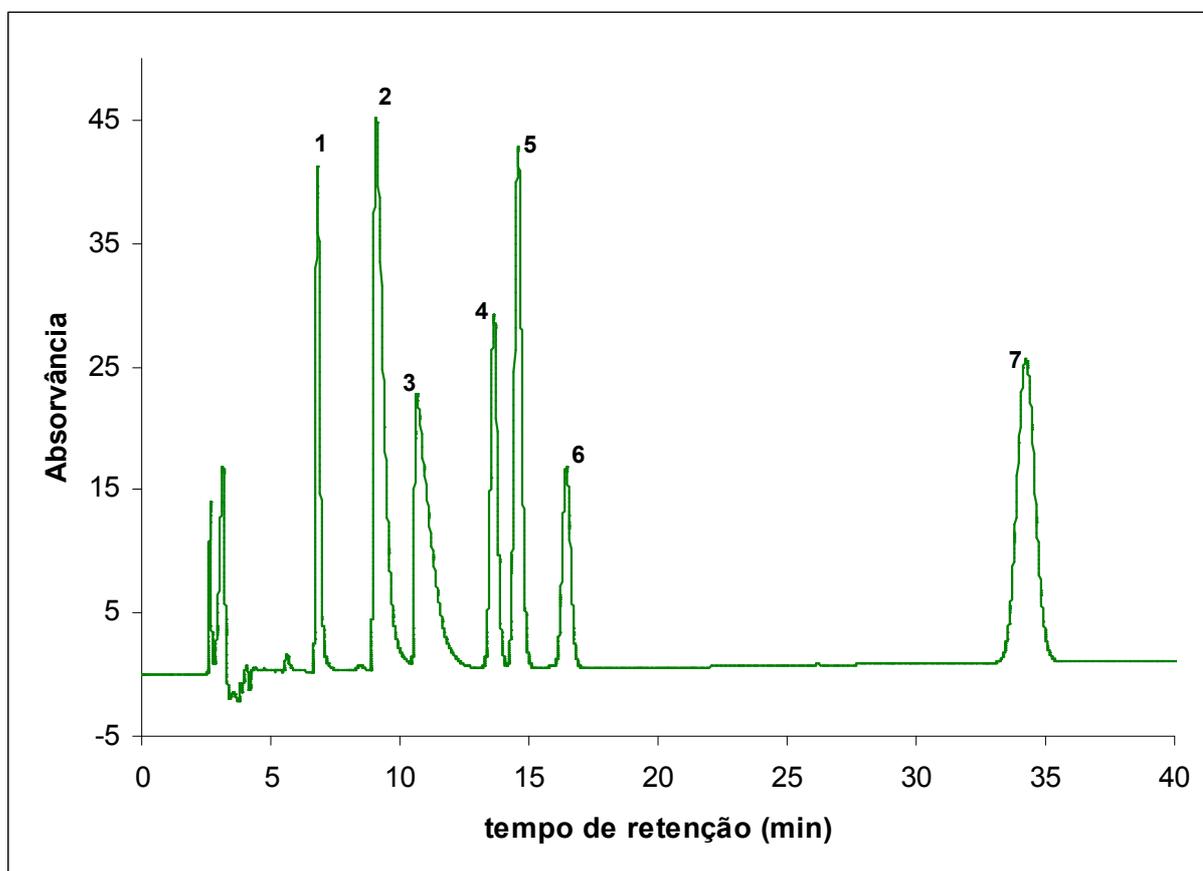


Figura 22: Cromatograma otimizado da separação de sete benzodiazepínicos na concentração de 20 mg L⁻¹: (1) Clordiazepóxido, (2) Alprazolam, (3) Lorazepam, (4) Midazolam, (5) Clonazepam, (6) Medazepam, (7) Diazepam. Condições: eluente acetonitrila:água 40:60 (v/v) (pH 4,0) em fluxo 0,5 mL/min; detecção UV em 230 nm e injeção de 20 µL.

4.3 Estudo dos interferentes na determinação dos benzodiazepínicos

Neste estudo investigou-se a possível interferência de três anorexígenos (anfepiramina, femproporex e sibutramina) e de um antidepressivo (fluoxetina), através da adição de quantidades conhecidas de cada fármaco interferente (20 mg L⁻¹), na presença de uma concentração fixa dos benzodiazepínicos estudados (20 mg L⁻¹). Os interferentes estudados foram escolhidos de forma que representassem duas classes de adulterantes (anorexígenos e antidepressivo), os quais são mais comumente usados nas adulterações de fármacos fitoterápicos.

Conforme o cromatograma mostrado na figura 23, observa-se que os anorexígenos e o antidepressivo testados não interferiram de forma significativa no sinal cromatográfico dos benzodiazepínicos, isto é, mesmo com a presença dos interferentes, e mesmo com uma pequena alteração no tempo de retenção, ainda se consegue identificar no cromatograma todos os benzodiazepínicos estudados. Os sinais dos interferentes não aparecem no cromatograma, devido ao fato dos benzodiazepínicos absorverem em comprimentos de onda diferentes dos interferentes. Os benzodiazepínicos foram analisados em comprimentos de onda de 208, 230 e 315 nm, enquanto os interferentes absorvem no comprimento de onda de 204 nm.

Conclui-se então, que a determinação cromatográfica dos benzodiazepínicos pode ser realizada na presença dos interferentes estudados sem nenhuma interferência.

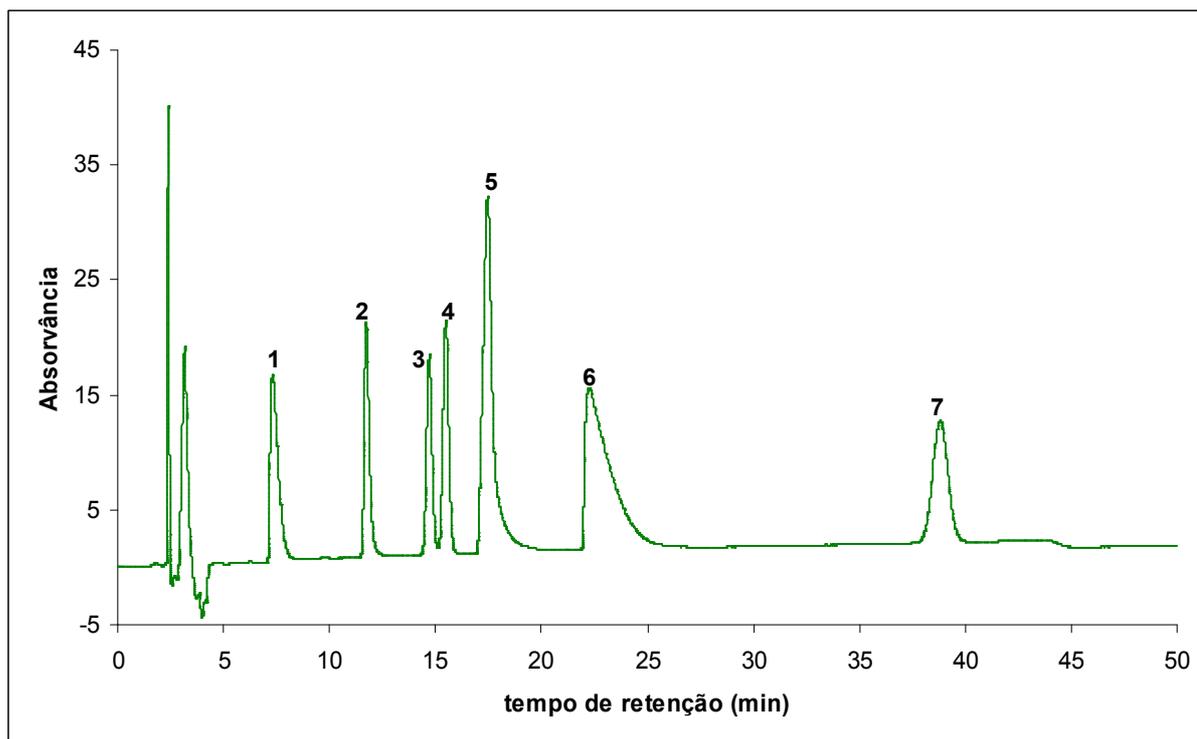


Figura 23: Cromatograma otimizado da separação de sete benzodiazepínicos (20 mg L^{-1}) com a mistura dos interferentes anfepramona, femproporex e siburamina (anorexígenos) e fluoxetina (antidepressivo) (20 mg L^{-1}): (1) Clordiazepóxido, (2) Alprazolam, (3) Lorazepam, (4) Midazolam, (5) Clonazepam, (6) Medazepam, (7) Diazepam. Condições: eluente acetonitrila:água 40:60 (v/v) (pH 4,0) em fluxo 0,5 mL/min; detecção UV em 230 nm e injeção de 20 μL .

4.4 Validação do Método Cromatográfico

Definidas as melhores condições de separação para os fármacos estudados, conforme Tabela 7, o passo seguinte foi a validação do método analítico.

O desenvolvimento de um método analítico é um processo de avaliação que estima sua eficiência. É de fundamental importância dispor-se de meios e critérios objetivos para demonstrar que o método que se está executando conduz a resultados confiáveis e adequados à qualidade pretendida (INMETRO, 2003). Essa avaliação normalmente é realizada através do processo de validação. A validação

de um procedimento analítico objetiva demonstrar que o mesmo é adequado para a análise pretendida (ICH, 2005).

A validação deve garantir, por meio de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados. Os parâmetros analíticos devem ser baseados na finalidade de uso do método, desta forma, os experimentos podem ser limitados ao que realmente é necessário (RIBANI *et al.*, 2004).

Optou-se pela validação apenas do método por RP-HPLC devido à melhor eficiência de separação obtida entre os benzodiazepínicos em estudo, quando comparada ao método de CZE.

Tabela 7 - Condições cromatográficas otimizadas para a separação dos benzodiazepínicos.

Fase móvel	acetonitrila:água 40:60 (v,v) (pH 4,0)
Modo de eluição	Isocrático
Comprimento de onda (λ)	230 nm
Volume de injeção dos fármacos	20 μ L

4.4.1 Processo de validação

A necessidade de mostrar a qualidade de medições químicas, através de sua comparabilidade, rastreabilidade e confiabilidade, está sendo cada vez mais reconhecida e exigida. Para garantir que um novo método analítico gere informações confiáveis e interpretáveis sobre a amostra, ele deve sofrer uma avaliação denominada validação (RIBANI *et al.*, 2004).

A validação de um método analítico assegura a credibilidade deste durante a rotina laboratorial (ICH, 2005). É um processo pelo qual se estabelece, por estudos de laboratório, que as características de desempenho do método satisfazem as exigências para avaliação analítica pretendida (USP 28, 2005). A validação não infere que o método é livre de erros, somente confirma que ele é adequado para a proposta (MEHTA, 1997). Segundo a Resolução n°899 de maio de 2003 (BRASIL,

2003b), a qual dispõe uma guia para a validação de métodos analíticos e bioanalíticos, a validação deve garantir, por meio de estudos experimentais, que o método atende as exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados. A resolução também ressalta que todos os equipamentos e materiais devem apresentar-se devidamente calibrados e os analistas devem ser qualificados e adequadamente treinados.

Os parâmetros analíticos que devem ser determinados durante a validação dos métodos de análise incluem a linearidade, a exatidão, a precisão, a especificidade, a robustez e os limites de detecção e quantificação (ICH, 2005; USP 28, 2005). Apesar de esforços realizados para uma harmonização das definições em torno da validação, a literatura disponível demonstra diferenças, o que acaba ocasionando discordâncias entre os profissionais de controle de qualidade no que diz respeito à definição e execução dos parâmetros analíticos de validação. É de responsabilidade do analista, identificar quais deles devem ser avaliados durante o desenvolvimento do método analítico (ERMER, 2001). O tipo de método e seu respectivo uso determinam quais os parâmetros que devem ser investigados (RIBANI *et al.*, 2004).

O desenvolvimento do trabalho foi realizado de acordo com protocolos e resoluções das agências reguladoras brasileiras e internacionais, como a Agência de Vigilância Sanitária (ANVISA), Resolução nº899 de maio de 2003 (BRASIL, 2003b) e o Protocolo Harmonizado Internacional (ICH, 2005).

4.4.1.1 Linearidade

Corresponde a capacidade que um método analítico tem de fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra (ICH, 2005), em uma faixa de concentração específica e, pode ser observada pelo gráfico dos resultados dos ensaios em função da concentração do analito, pelo coeficiente de correlação (r) do gráfico. Recomenda-se que sua determinação seja realizada através de, no mínimo, cinco concentrações diferentes, e que seja repetida em diferentes dias. Os resultados devem ser analisados por métodos apropriados como, por exemplo, o cálculo de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados (BRASIL, 2003b).

No método validado neste trabalho, a linearidade foi avaliada através da construção de três curvas de calibração desenvolvidas em dias diferentes e contendo cinco níveis de concentração cada uma delas, avaliando-se a correlação linear.

A Tabela 8 apresenta as equações das curvas analíticas para os benzodiazepínicos estudados, assim como suas faixas de concentração linear.

Tabela 8 - Resultados obtidos para calibração dos benzodiazepínicos.

Benzodiazepínico	Equação da reta* (y=ax+b)	r	Faixa linear (mg L⁻¹)
Alprazolam	$y = 0,43 x + 0,72$	0,99	1,16 - 75,00
Clonazepam	$y = 0,30 x + 1,77$	0,99	1,68 - 75,00
Clordiazepóxido	$y = 0,36 x + 1,39$	0,99	1,39 - 75,00
Diazepam	$y = 0,69 x + 3,26$	0,99	0,72 - 100,00
Lorazepam	$y = 0,75 x + 0,58$	0,99	0,67 - 50,00
Medazepam	$y = 0,577 x + 3,40$	0,99	0,87 - 40,00
Midazolam	$y = 0,43 x + 1,26$	0,99	1,15 - 50,00

* onde: x=concentração (mg L⁻¹) e y=área

Através da faixa linear obtida de cada benzodiazepínico, pode-se perceber que o lorazepam e o diazepam apresentam a maior sensibilidade dentre os benzodiazepínicos.

Analisando-se as equações das curvas obtidas pode-se concluir que o método foi linear para todos os fármacos, já que os coeficientes de correlação (r) foram todos maiores que 0,99; o que segundo a literatura é satisfatório (BRASIL, 2003b; INMETRO, 2003).

4.4.1.2 Precisão

A precisão é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, em condições definidas. É normalmente determinada para circunstâncias específicas de medição e pode ser expressa por meio da repetitividade e da precisão intermediária (ICH, 2005).

A precisão é geralmente expressa como desvio padrão relativo (DPR) ou coeficiente de variação percentual (CV%), e é dependente da concentração do analito, devendo ser determinada para um diferente número de concentrações (BRASIL, 2003b; INMETRO, 2003; ICH, 2005).

Para o método validado neste trabalho a precisão foi determinada a partir de sete determinações em um mesmo dia e sob as mesmas condições da amostra, contendo os sete padrões dos fármacos em concentração igual de 15 mg L^{-1} . As áreas dos picos foram determinadas e então calculou-se o desvio padrão relativo entre as áreas obtidas.

A Tabela 9 apresenta os resultados da precisão para cada benzodiazepínico estudado.

Tabela 9 - Valores de DPR obtidos para os benzodiazepínicos em estudo durante os ensaios de precisão.

Benzodiazepínico	DPR (%)
Alprazolam	6,89
Clonazepam	8,73
Clordiazepóxido	7,85
Diazepam	7,74
Lorazepam	7,86
Medazepam	5,35
Midazolam	7,14

Para validação de métodos cromatográficos, na análise de traços ou impurezas, aceita-se que a precisão apresente RSD de até 20% (RIBANI *et al.*, 2004). Portanto, todos os resultados obtidos estão dentro dos limites sugeridos.

4.4.1.3 Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ)

O limite de detecção (LD) de um método é a menor concentração do analito presente em uma amostra que pode ser detectada e o limite de quantificação (LQ) é a menor concentração do analito em uma amostra que pode ser quantificada com precisão e exatidão aceitáveis, nas condições experimentais estabelecidas.

No método que foi validado neste trabalho, os limites de detecção e quantificação foram calculados a partir das fórmulas (2) e (3), respectivamente, descritas conforme o International Conference on Harmonisation (ICH) de 2005.

$$LD = 3,3\sigma / IC$$

(2)

Onde:

σ = desvio padrão do intercepto da curva padrão

IC = inclinação da curva padrão

$$LQ = 10\sigma / IC$$

(3)

Onde:

σ = desvio padrão do intercepto da curva padrão

IC = inclinação da curva padrão

A Tabela 10 apresenta os resultados de LDs e LQs para os benzodiazepínicos em estudo.

Tabela 10 - Resultados obtidos para LD e LQ dos benzodiazepínicos.

Benzodiazepínico	LD (mg L⁻¹)	LQ (mg L⁻¹)
Alprazolam	0,38	1,16
Clonazepam	0,55	1,68
Clordiazepóxido	0,45	1,39
Diazepam	0,24	0,72
Lorazepam	0,22	0,67
Medazepam	0,29	0,88
Midazolam	0,38	1,15

4.4.1.4 Exatidão

Representa a proximidade dos resultados obtidos pelo método com os valores aceitos como referência (ICH, 2005). A exatidão pode ser expressa como percentual de resposta obtido através de ensaio de uma quantidade da substância de pureza conhecida SQR (substância química de referência) incorporada em um meio de composição definida. Pode ser determinada através do teste de recuperação, em que quantidades conhecidas da substância química de referência são adicionadas a amostra, e então recuperadas.

A exatidão foi determinada através do teste de recuperação, sendo expressa como percentual de recuperação, analisando-se dez amostras contendo os sete padrões de benzodiazepínicos em concentração conhecida de 15 mg L⁻¹.

A partir das áreas dos picos dos analitos, calculou-se as concentrações dos fármacos, utilizando as curvas de calibração. Os resultados foram expressos como percentual de recuperação da concentração medida em relação à concentração real. A percentagem de recuperação (R%) foi calculada pela equação (4) (BRASIL, 2003b).

$$R (\%) = \frac{\text{massa obtida}}{\text{massa real}} \times 100 \quad (4)$$

A Tabela 11 apresenta os resultados de recuperação de cada benzodiazepínico.

Tabela 11 - Resultados obtidos nos testes de recuperação dos benzodiazepínicos em estudo.

Benzodiazepínico	Recuperação (%)
Alprazolam	100,01
Clonazepam	117,81
Clordiazepóxido	88,12
Diazepam	109,12
Lorazepam	99,92
Medazepam	98,85
Midazolam	115,86

Para formulações fitoterápicas seguiu-se a recomendação de que, para validação de métodos cromatográficos e eletroforéticos, as recuperações devem estar entre 70 e 120% (RIBANI *et al.*, 2004). Todos os valores obtidos apresentaram-se dentro desse intervalo e, portanto, o método está de acordo com os parâmetros exigidos.

4.5 Aplicação analítica do método desenvolvido e validado

A aplicação do método cromatográfico para a determinação dos benzodiazepínicos (alprazolam, clonazepam, clordiazepóxido, diazepam, lorazepam, medazepam e midazolam) foi realizada em treze amostras de formulações fitoterápicas para emagrecimento obtidas em diferentes farmácias de manipulação na cidade de Santa Maria-RS.

Este estudo teve como objetivo investigar uma possível adulteração destas formulações fitoterápicas com os benzodiazepínicos estudados neste trabalho. Assim, treze amostras de formulações fitoterápicas foram analisadas nas mesmas condições experimentais cromatográficas otimizadas para os benzodiazepínicos, conforme descrito anteriormente.

Com o objetivo de tornar a determinação dos fármacos mais simples e rápida, optou-se pela determinação simultânea dos benzodiazepínicos nas treze amostras de fitoterápicas utilizadas para este estudo. A determinação simultânea dos benzodiazepínicos nas amostras fitoterápicas foi realizada de acordo com os procedimentos cromatográficos otimizadas descritos no item 4.2.

As determinações simultâneas dos benzodiazepínicos nas treze formulações fitoterápicas para emagrecimento por RP-HPLC podem ser observadas nos cromatogramas apresentados nas figuras 24A a 24N, onde é mostrado no detalhe de cada cromatograma, o perfil de cada amostra dos fitoterápicos.

Verifica-se um perfil semelhante em todas as amostras analisadas, para tempo de retenção entre zero e sete minutos, o que comprova a ausência de interferência mútua da matriz da amostra e das espécies com relação aos tempos de retenção de cada fármaco, mostrando que um fármaco não interfere na determinação do outro, possibilitando um “screening” da amostra com relação à adulteração por benzodiazepínicos.

Como se pode observar nos cromatogramas das figuras 24A a 24 N, comparando-se com o perfil de cada amostra dos fitoterápicos mostrados no detalhe de cada cromatograma, conclui-se que nenhum dos treze fitoterápicos analisados apresentou adulteração pelas substâncias estudadas neste trabalho.

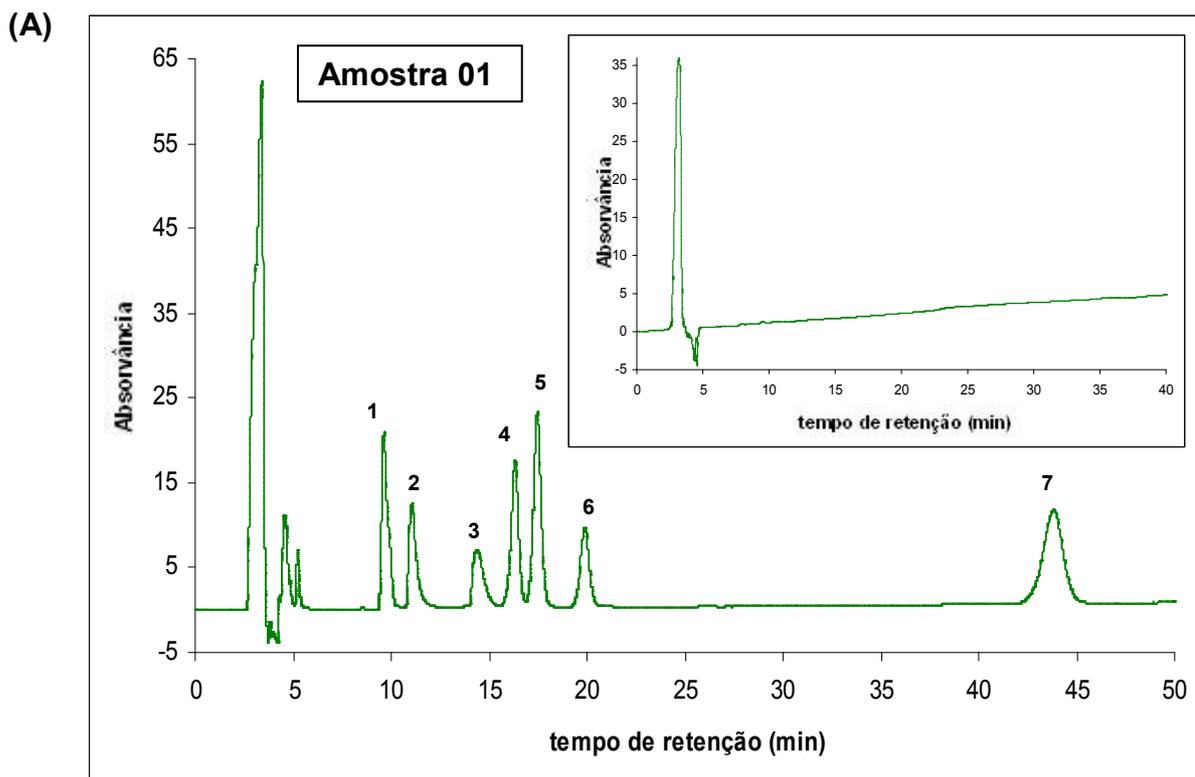
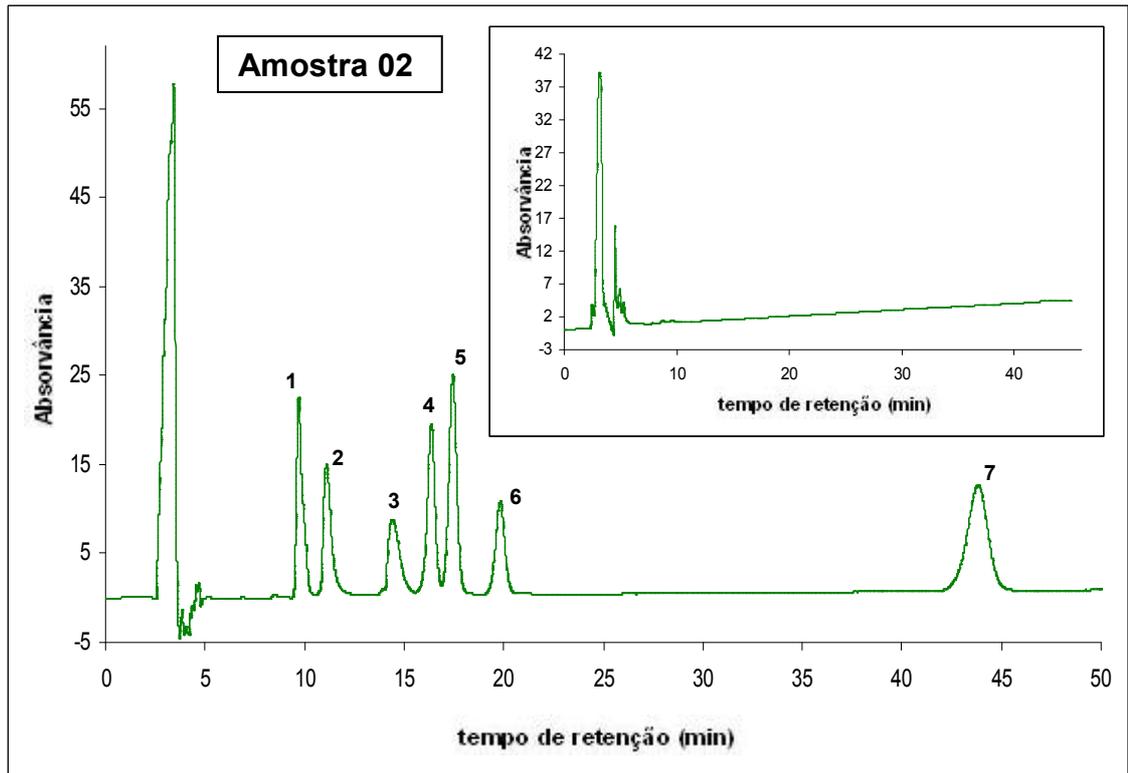
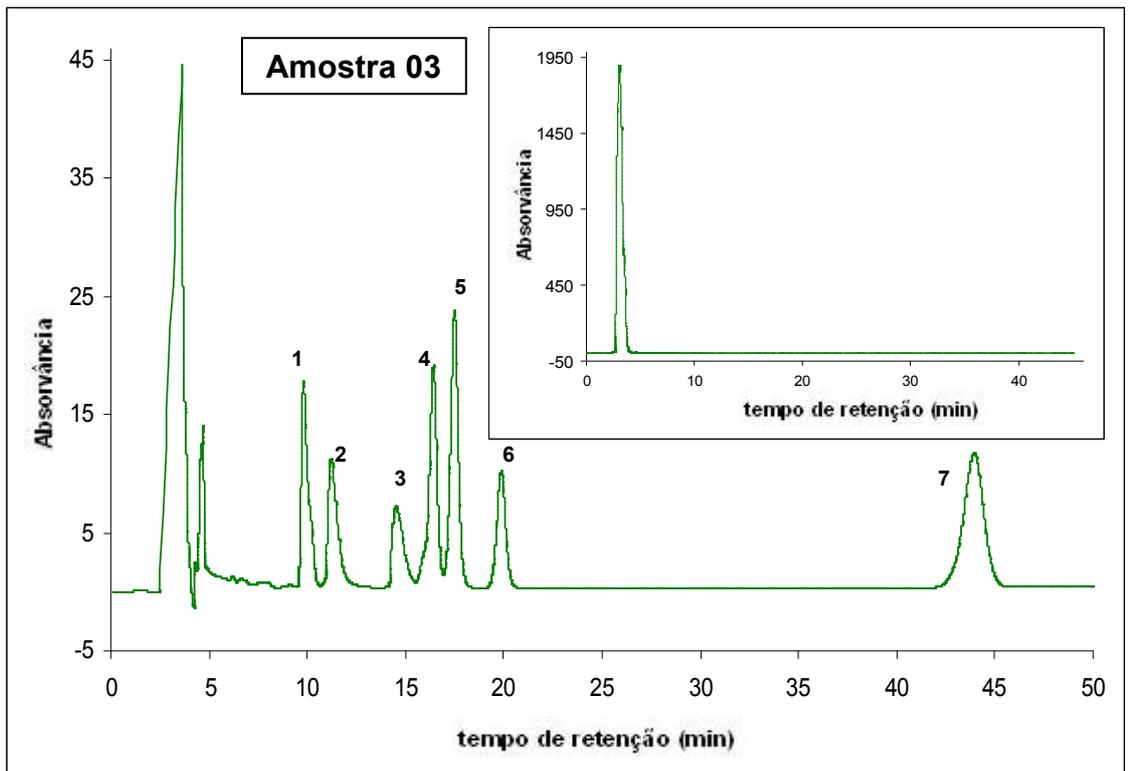


Figura 24: Cromatogramas de determinação simultânea dos benzodiazepínicos (20 mg L^{-1}) adicionados nas amostras de formulações fitoterápicas de emagrecimento: (1) Clordiazepóxido, (2) Alprazolam, (3) Lorazepam, (4) Midazolam, (5) Clonazepam, (6) Medazepam, (7) Diazepam. (A) amostra 01, (B) amostra 02, (C) amostra 03, (D) amostra 04, (E) amostra 05, (F) amostra 06, (G) amostra 07, (H) amostra 08, (I) amostra 09, (J) amostra 010, (L) amostra 011, (M) amostra 012, (N) amostra 013. No detalhe de cada cromatograma é mostrado o perfil de cada amostra fitoterápica sem a adição dos fármacos. Condições: eluente acetonitrila:água 40:60 (v/v) (pH4,0) em fluxo $0,5 \text{ mL/min}$; detecção UV em 230 nm e injeção de $20 \text{ }\mu\text{L}$.

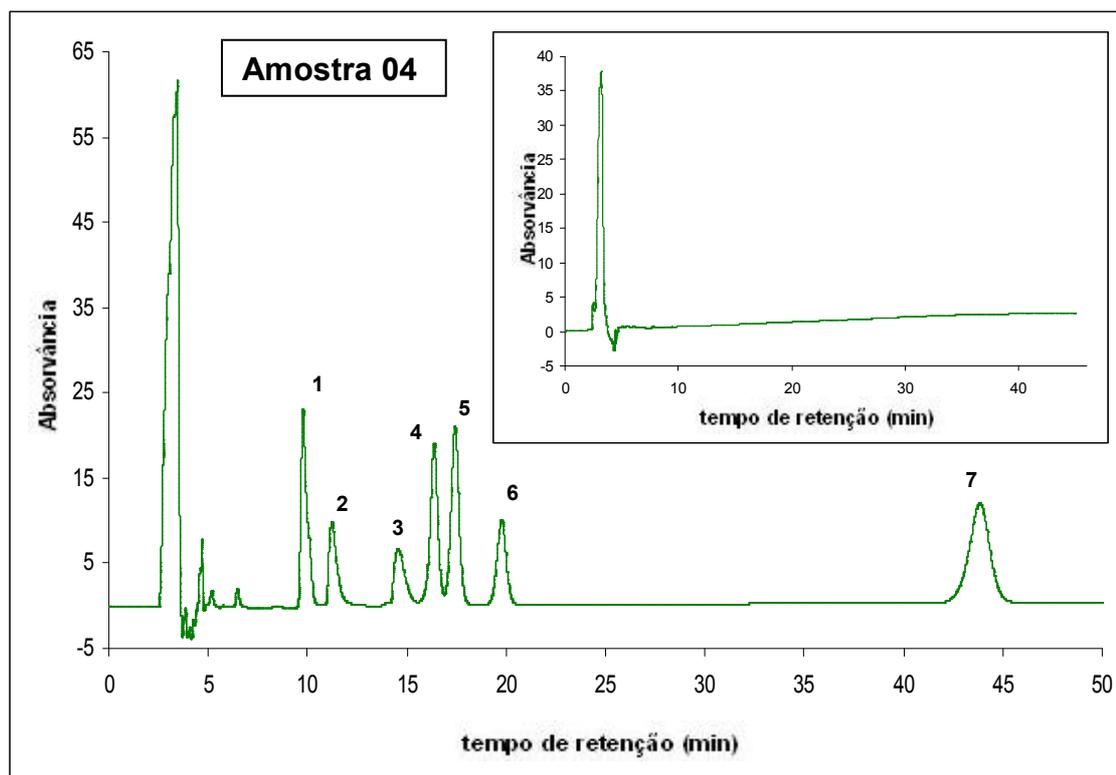
(B)



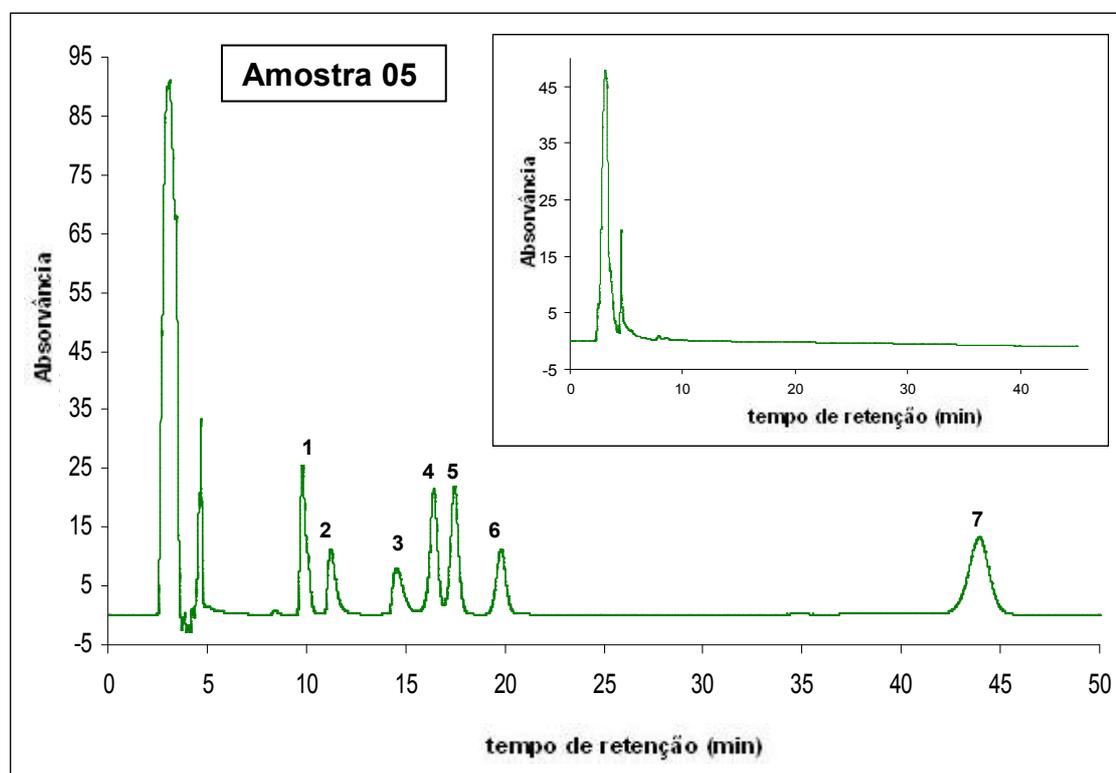
(C)



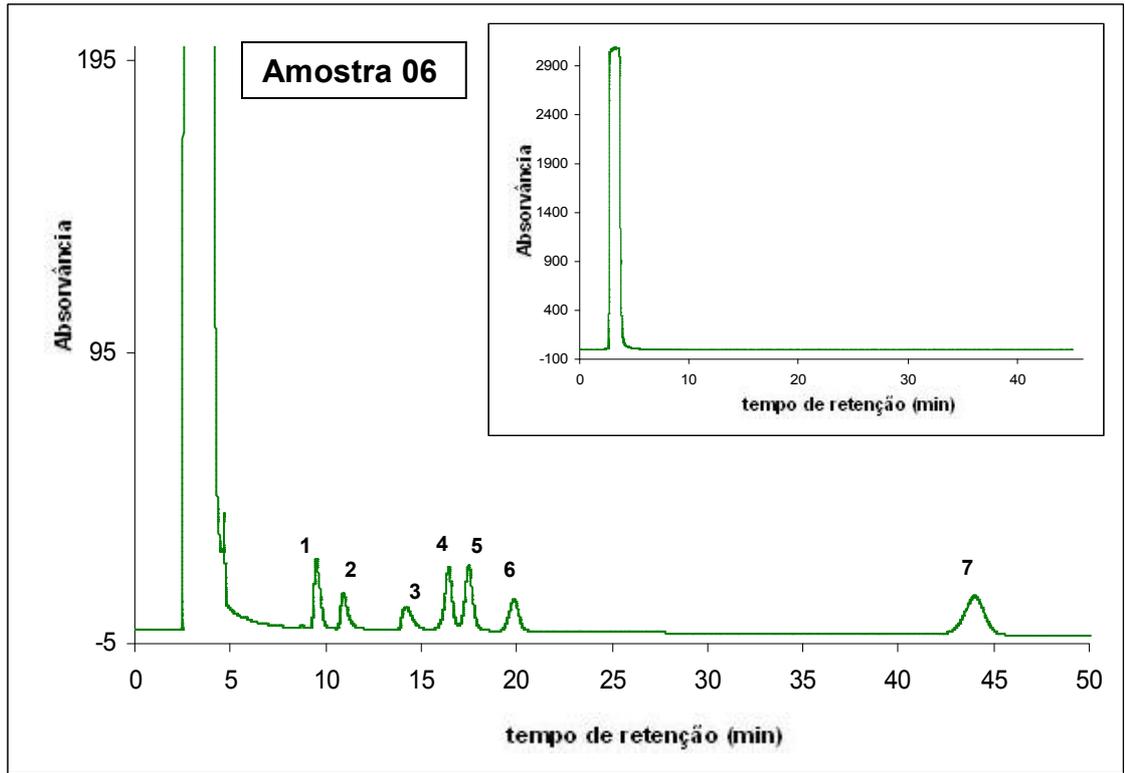
(D)



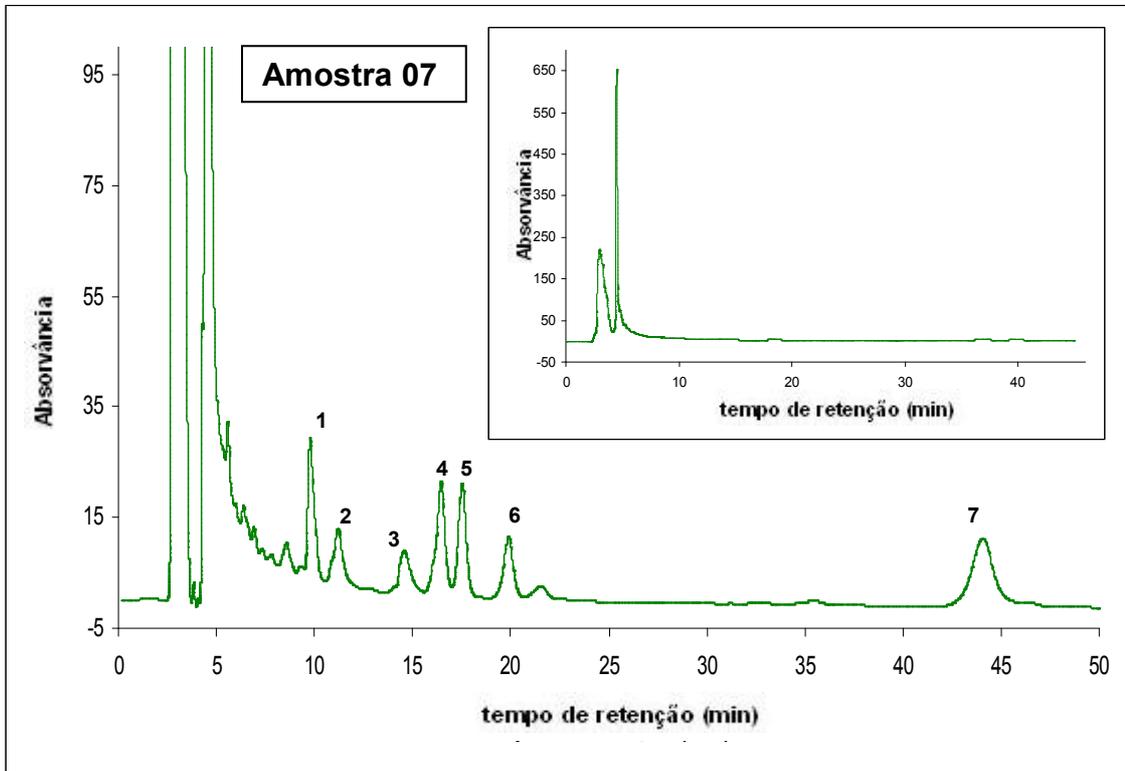
(E)



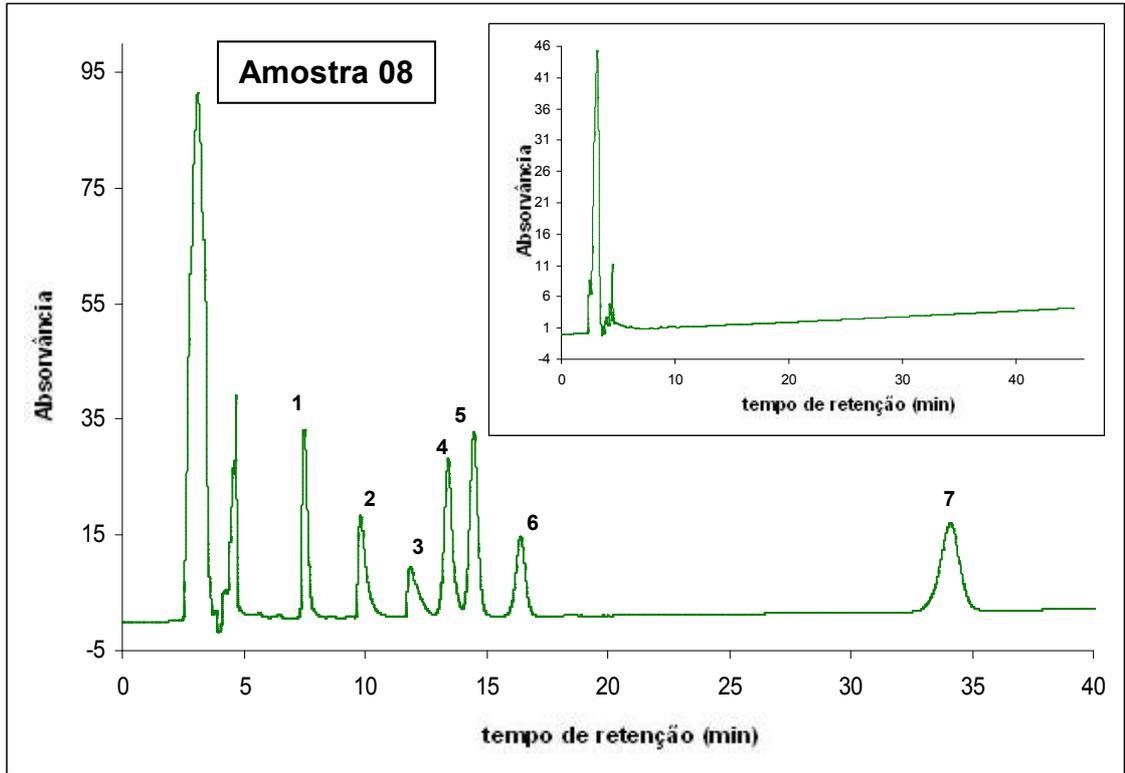
(F)



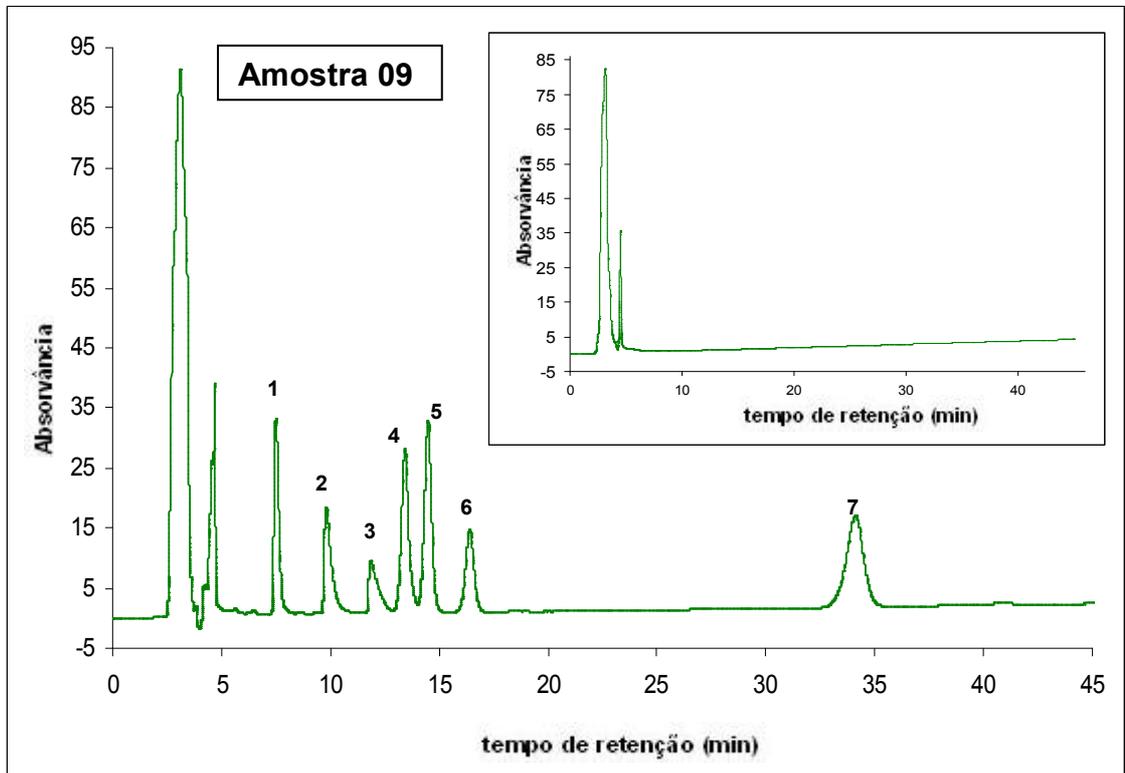
(G)



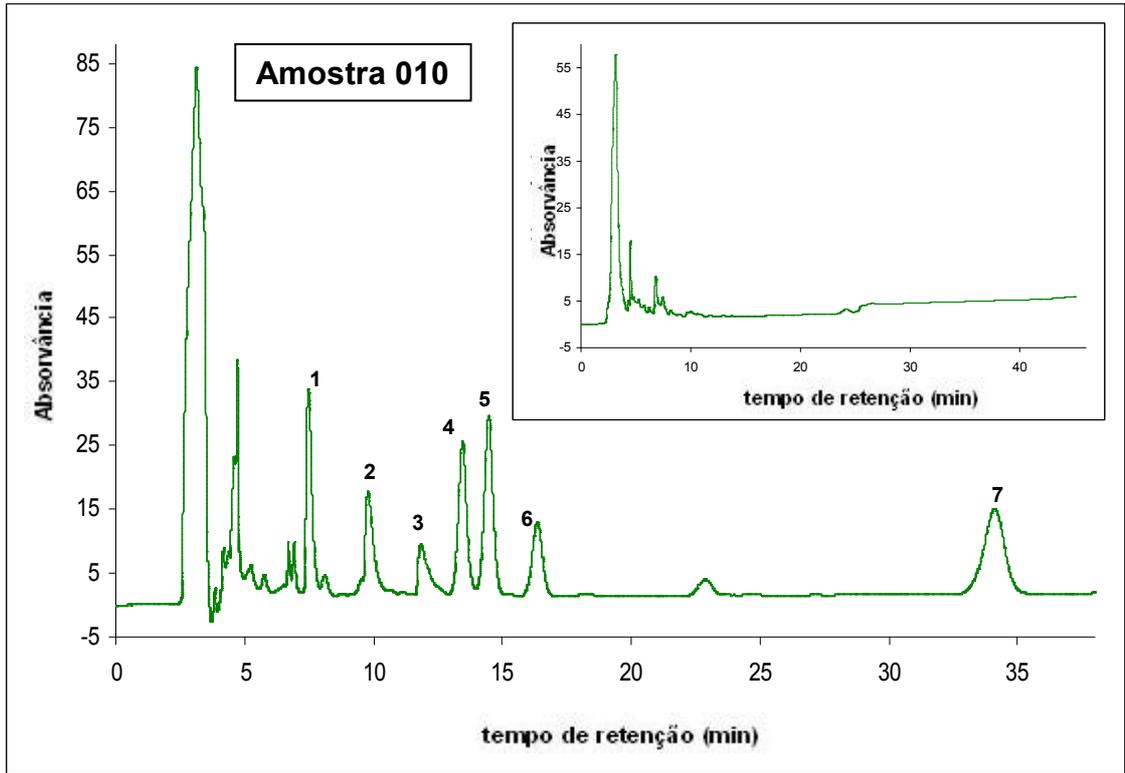
(H)



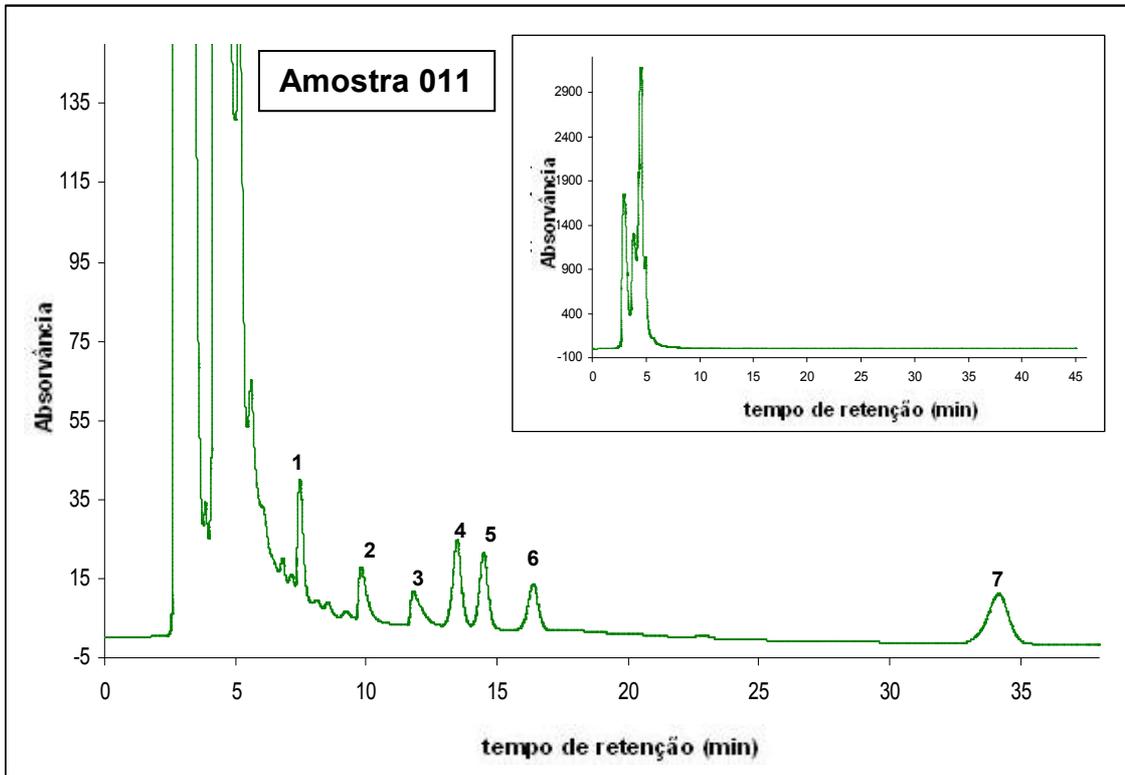
(I)



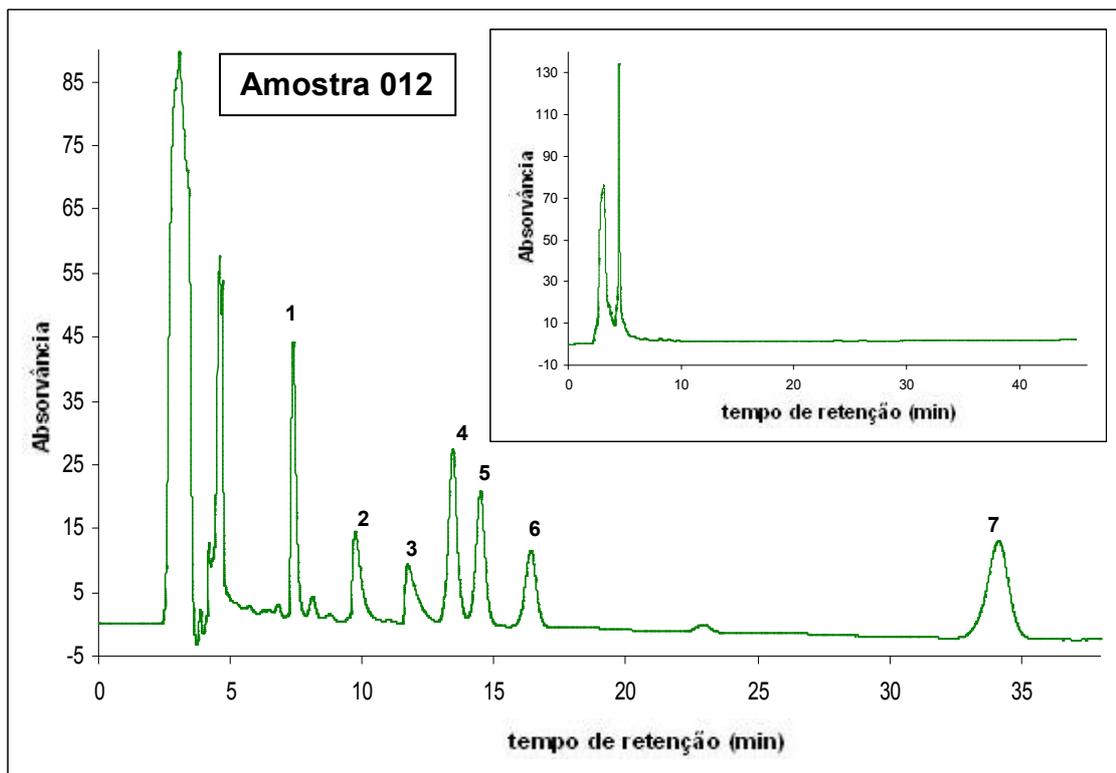
(J)



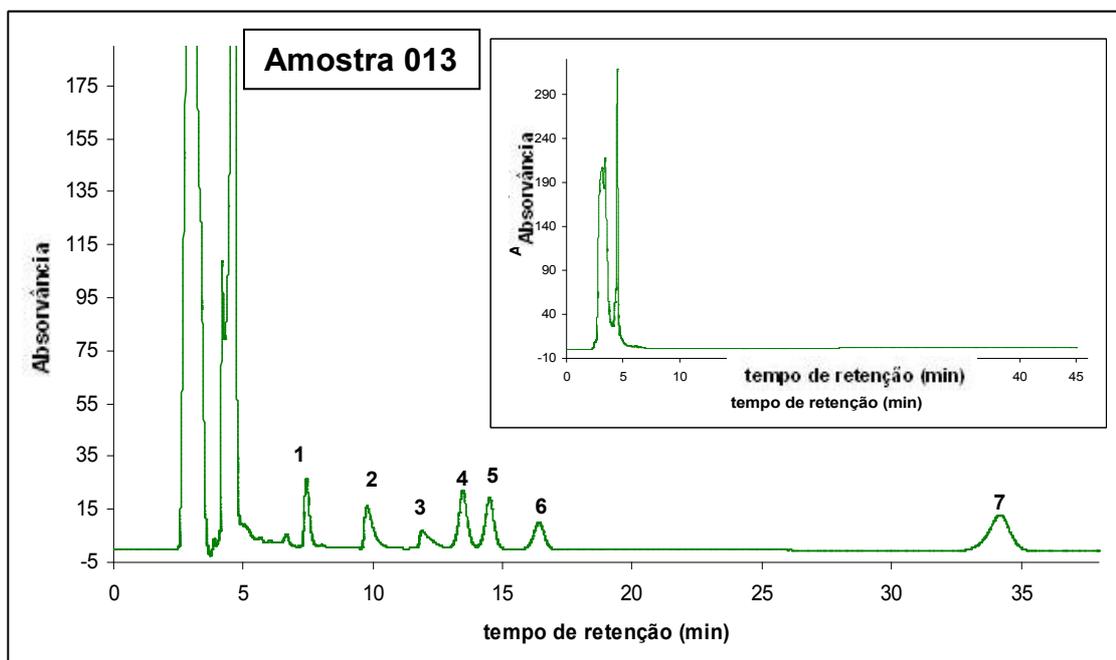
(L)



(M)



(N)



4.5.1 Determinação de benzodiazepínicos em amostras de formulações fitoterápicas para emagrecimento por RP-HPLC

Foram realizados ensaios de recuperação com o objetivo de avaliar a eficiência do método cromatográfico nas amostras reais de fitoterápicos. Para este estudo foram elaboradas adições conhecidas na amostra 02 (*Quitosana*), com a intenção de simular uma amostra real adulterada com os sete benzodiazepínicos estudados (alprazolam, clonazepam, clordiazepóxido, diazepam, lorazepam, medazepam e midazolam).

Os ensaios de recuperação dos benzodiazepínicos na amostra são mostrados nas Tabelas 12 e 13. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

Tabela 12 – Resultado dos ensaios de recuperação na amostra 02 (*Quitosana*) adicionada com 1,0 mg dos benzodiazepínicos empregando RP-HPLC.

Benzodiazepínico	Determinado (mg/cápsulas)	Recuperação (%)
Alprazolam	0,90	90,71 ± 1,53
Clonazepam	1,00	100,03 ± 1,15
Clordiazepóxido	0,96	96,17 ± 4,64
Diazepam	1,10	110,5 ± 0,71
Lorazepam	0,84	84,25 ± 0,56
Medazepam	1,02	102,00 ± 5,96
Midazolam	1,09	109,55 ± 2,70

Tabela 13 – Resultado dos ensaios de recuperação na amostra 02 (*Quitosana*) adicionada com 10,0 mg dos benzodiazepínicos empregando RP-HPLC.

Benzodiazepínico	Determinado (mg/cápsulas)	Recuperação (%)
Alprazolam	8,62	86,21 ± 1,05
Clonazepam	10,00	100,00 ± 0,99
Clordiazepóxido	9,77	97,72 ± 6,82
Diazepam	10,40	104,06 ± 0,44
Lorazepam	8,43	84,36 ± 1,13
Medazepam	10,31	103,16 ± 2,26
Midazolam	11,23	112,32 ± 3,04

A recuperação depende da matriz da amostra, do procedimento de extração e da concentração do analito. Os intervalos aceitáveis de recuperação para análises de resíduos geralmente estão entre 70 e 120 %, com precisão de até ± 20%. Porém, dependendo da complexidade analítica e da amostra, este valor pode ser de 50 a 120%, com precisão de até ±15% (RIBANI *et al.*, 2004). Portanto, os valores encontrados para as recuperações das amostras estão dentro da faixa aceitável, sendo assim, o método adequado.

5. CONCLUSÕES

Através do método de CZE com detecção UV pode-se identificar todos os benzodiazepínicos (clonazepam, clordiazepóxido, diazepam, flurazepam, lorazepam, medazepam e midazolam) em estudo com eficiência. Porém, a técnica de separação CZE foi eficiente somente na separação de cinco benzodiazepínicos (diazepam, clordiazepóxido, flurazepam, medazepam e midazolam) estudados, pois os fármacos clonazepam e lorazepam co-eluem com o diazepam numa mesma análise, mas também podem ser identificados numa amostra, desde que as análises sejam feitas separadamente, escolhendo-se um dos fármacos para analisar.

Assim, faz-se necessário citar o uso da cromatografia eletrocínética micelar (MEKC), a qual faz uso de agentes tensoativos adicionados ao eletrólito de trabalho, como uma técnica mais adequada e de maior eficiência na separação de todos estes fármacos em estudo.

Neste trabalho também desenvolveu-se um método por RP-HPLC com detecção UV para a determinação simultânea de benzodiazepínicos como adulterantes em formulações fitoterápicas para emagrecimento.

Este método mostrou-se adequado na análise dos benzodiazepínicos, apresentando as seguintes vantagens: linearidade, alta sensibilidade, seletividade, precisão analítica, simplicidade e baixo custo. A fase móvel constituída de acetonitrila:água (40:60, v/v) separou adequadamente os compostos entre si. A detecção UV foi adequada, atingindo-se bons limites de detecção e possibilitando, também, a confirmação da identidade dos compostos.

Na validação do método cromatográfico obteve-se resultados satisfatórios. As curvas analíticas apresentaram valores de coeficientes de correlação (r) maiores que 0,99 para as faixas de concentração necessárias às aplicações. Os valores de limite de detecção e de quantificação foram adequados para a análise dos benzodiazepínicos em estudo.

Analisou-se 13 amostras fitoterápicas para emagrecimento e nenhuma apresentou adulteração pelos benzodiazepínicos estudados. O método proposto para a determinação simultânea dos benzodiazepínicos mostrou-se útil e aplicável em amostras reais, visto que, se alguma das amostras fosse realmente adulterada, o método poderia identificar esta adulteração.

É importante ressaltar que a adulteração desses fitoterápicos, geralmente ocorre pelo uso de somente um benzodiazepínico, assim, o método cromatográfico proposto neste trabalho apresenta a vantagem de que pode identificar uma adulteração individual de cada um dos sete benzodiazepínicos (alprazolam, clonazepam, clordiazepóxido, diazepam, lorazepam, medazepam e midazolam) estudados ou então fazer uma determinação simultânea.

Outra vantagem do método é a diminuição da quantidade de amostra necessária para as análises simultâneas. No caso de amostras de difícil obtenção, em uma pequena alíquota de amostra várias espécies podem ser facilmente determinadas simultaneamente.

Os ensaios de recuperação realizados nas amostras fitoterápicas a partir da adição de concentrações conhecidas dos benzodiazepínicos (alprazolam, clonazepam, clordiazepóxido, diazepam, lorazepam, medazepam e midazolam) mostraram-se satisfatórios e dentro do recomendado: entre 84,25 e 112,32 %. Comprovando, assim, a aplicabilidade do método na determinação de benzodiazepínicos como adulterantes em formulações fitoterápicas para emagrecimento.

Dentre os métodos cromatográficos publicados para a determinação de benzodiazepínicos, o método desenvolvido e validado neste trabalho é o primeiro a descrever a determinação simultânea de benzodiazepínicos como adulterantes em formulações fitoterápicas para emagrecimento. Assim, o método é vantajoso em relação aos outros existentes e abre uma nova possibilidade dentro do contexto da análise cromatográfica de fármacos, proporcionando um “*screening*” rápido da amostra quanto à presença de benzodiazepínicos como adulterantes.

Apesar de ainda não haver legislação estabelecida pela ANVISA para o controle da adulteração de formulações fitoterápicas, a adulteração em si é uma prática recorrente em vários países. Os adulterantes escolhidos neste trabalho estão entre os mais freqüentemente encontrados em casos de adulteração.

Comparando-se a análise por CZE e RP-HPLC, pode-se dizer que ambas apresentaram resultados satisfatórios, permitindo a adequada separação dos compostos em um baixo tempo de análise. Além disso, os dois métodos podem ser uma alternativa para o controle e fiscalização (análise forense) do uso abusivo destes fármacos presentes em formulações fitoterápicas passíveis de adulteração.

6. REFERÊNCIAS

ABESO, Associação Brasileira para o Estudo da Obesidade e da Síndrome Metabólica. **Parecer Técnico-Científico do Grupo Acessor de Estudos sobre medicamentos Anorexígenos.** Disponível em: <http://www.abeso.org.br/pdf/informe2.pdf>. Acesso em 20 jan 2009.

ABESO, Associação Brasileira para o Estudo da Obesidade e da Síndrome Metabólica. **Obesidade em notícia.** Disponível em: <http://www.abeso.org.br>. Acesso em: 20 jan 2009.

ABU-QARE, A. W.; ABOU-DONIA, M. B. A validated HPLC method for the determination of pyridostigmine bromide, acetaminophen, acetylsalicylic acid and caffeine in rat plasma and urine. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 26, p. 939-947, 2001.

ALMEIDA, A. E. **Anorexígenos e diazepam: desenvolvimento de metodologia analítica de aplicação em formulações farmacêuticas.** Dissertação de Mestrado, Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, 1997.

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

ALMEIDA, A. E.; RIBEIRO, M. L. High Performance Liquid Chromatographic determination of anfepramone hydrochloride, mazindol and diazepam in tablets. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 22, n° 11, p. 1759-1769, 1999.

ALMEIDA, A.E.; RIBEIRO, M.L.; POLESE, L. Determination of amfepramone hydrochloride, femproporex, and diazepam in so-called "natural" capsules used in the treatment of obesity. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 23, n. 7, p. 1109-1118, 2000.

ALTRIA, K D. **Capillary Electrophoresis Guidebook: Principles, Operation, and Applications**. V 52, Totowa: Humana Press, 1996.

ALTRIA, K. D. Determination of drug-related impurities by capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v. 735, p. 43-56, 1996.

ALTRIA, K D; ELDER, D. Overview of the status and applications of capillary electrophoresis to the analysis of small molecules. **Journal of Chromatography A**, v. 1023, p. 1-4, 2004.

ALTRIA, K. D.; Mc CLEAN, R. Development and optimization of a generic micellar electrokinetic capillary chromatography method to support analysis of a wide range of pharmaceuticals and excipients. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 18, p. 807-813, 1998.

ANDREOLLI, R. S.; CASTRO, R. C.; MENDES, R. A. Obesidade. **Racine**, v.57, p. 38-47, 2000.

AZEREDO, F. S. *et al.* Validação de técnica analítica em cromatografia em camada delgada comparativa para identificação de fármacos anorexígenos sintéticos em produtos fitoterápicos. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 1, p. 17-24, 2004.

BAKER, R D. **Capillary Electrophoresis**. 1 ed. New York: John Wiley & Sons, Inc., 1995.

BERNARDI, F.; CICHELERO, C.; VITOLO, R. Comportamento de restrição alimentar e obesidade. **Revista de Nutrição**, v.18, nº1, p. 85-93, 2005.

BOOHREM, R. L. **Dicionário da Medicina Natural**. Rio de Janeiro: Reader's Digest, 1997.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC nº 18, de 28 de janeiro de 2003a**. Publica a atualização do Anexo I, Listas de Substâncias Entorpecentes, Psicotrópicas, Precursoras e Outras sob Controle Especial, da Portaria SVS/MS n.º 344, de 12 de maio de 1998. Disponível em: <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=1363&word>. Acesso em 10 jul 2009.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução nº 899, de 29 de maio de 2003b**. Determina a publicação do guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Disponível em: <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=15132&word>. Acesso em: 05 mar 2009.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução CFF nº 273, 30 de agosto de 1995 do Conselho Federal de Farmácia**. Dispõe sobre manipulação medicamentosa. Disponível em: <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=8191>. Acesso em 01 jun 2009.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 17, de 24 de fevereiro de 2000**. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. Disponível em: <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=1380>. Acesso em 01 jun 2009.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução nº 1477, de 11 de julho de 1997 do Conselho Federal de Medicina**. Dispõe sobre o uso de substâncias tipo anfetaminas, isoladamente ou em associação com benzodiazepínicos, diuréticos, hormônios e laxantes, com finalidade exclusiva de tratamento de obesidade ou emagrecimento. Disponível em: <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=6320>. Acesso em 01 jun 2009.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria n° 344, de 12 de maio de 1998 da Secretaria da Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde. **Regulamento Técnico sobre substâncias e medicamentos sujeitos a controle especial**. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/controlados/conceito.htm>. Acesso em 01 jun 2009.

BOGUZ, M. J. *et al.* Application of LC-ESI-MS for detection of synthetic adulterants in herbal remedies. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 41, p. 554-564, 2006.

BORGES, K. B. *et al.* Simultaneous determination of multibenzodiazepines by HPLC/UV: Investigation of liquid-liquid and solid-phase extractions in human plasma. **Talanta**, v. 78, p. 233-241, 2009.

CALIXTO, J.B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (Phytotherapeutic agents). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.33, n° 1, p.179-189, 2000.

CASTRO, A. *et al.* LC-MS/MS method for the determination of nine antidepressants and some of their main metabolites in oral fluid and plasma. Study of correlation between venlafaxine concentrations in both matrices. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 48, p. 183-193, 2008.

CIRIMELE, V.; KINTZ, P.; LUDS, B. Screening for forensically relevant benzodiazepines in human hair by gas chromatography-negative ion chemical ionization-mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 700, p. 119-129, 1997.

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

CHOI, D.W.; KIM, J.H.; CHO, SO Y.; KIM, D.H.; CHANG, S.Y. Regulation and quality control of herbal drugs in Korea. **Toxicology**, v.181-182, n° 1, p. 581-586, 2002.

COLLINS, C. H. & GUIMARÃES, L. F. L., Cromatografia líquida de alta eficiência. In: Collins, C. H. & Braga, G. L.; **Introdução a Métodos Cromatográficos**. 3^a ed. São Paulo: Ed. UNICAMP, p 179 – 243, 1988.

CORDERO, R.; PATERSON, S. Simultaneous quantification of opiates, amphetamines, cocaine and metabolites and diazepam and metabolite in a single hair sample using GC-MS. **Journal of Chromatography B**, v. 850, p. 423-431, 2007.

COSTA, A. G. et al. O uso da internet como meio auxiliar para o tratamento do excesso de peso. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabolismo**, v. 49, p. 303-307, 2005.

CUNHA, L. C. *et al.* Revisão e avaliação crítica da incidência de fármacos anorexígenos sintéticos em “produtos naturais” para o emagrecimento em Goiânia-GO. **Revista Brasileira de Toxicologia**, v.15, n. 2, p. 69-73, 2002.

ELVIN-LEWIS, M. Should we be concerned about herbal remedies. **Journal of Ethnopharmacology**, v.75, n° 1, p.141-164, 2001.

ERMER, J. Validation in Pharmaceutical Analysis. Part I: An Integrated approach. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v.24. p. 755-767,2001.

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

ERNST, E. Toxic heavy metals and undeclared drugs in Asian herbal medicines. **Pharmacological Sciences**, v.23, n° 3, p. 136-139, 2002b.

FDA. U. S. Food and Drug Administration. **Index to Drug-Specific Information**. Disponível em: <http://www.fda.gov/Drugs/DrugSafety/PostmarketDrugSafetyInformationforPatientsandProviders/ucm111085.htm>. Acesso em 01 jun de 2009.

GERTNER, E. *et al.* Complications resulting from the use of chinese herbal medications containing undeclared prescription drugs. **Arthritis Rheumatism**, v. 38, p. 614–617, 1995.

GOODMAN, L. S.; GILMANN, A. G. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 11^a ed. Rio de Janeiro: Mc Graw Hill, 2006.

HANCU, G.; GÁSPÁR, A.; GYÉRESI, Á. Separation of 1,4-Benzodiazepines by micellar elektrokinetic capillary chromatography. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v. 69, p. 251-259, 2007.

HANSEN, S. H.; SHERIBAH, Z. A. Comparison of CZE, MECK MEEKC and non-aqueous capillary eletrophoresis for the determination of impurities in bromazepam. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 39, p. 322-327, 2005.

HARRIS, D. C. **Análise química quantitativa**. 5^a ed. Rio de Janeiro: LCT, 2001.

HJÉRTEN, S. Free Zone Electrophoresis. **Chromatographic Reviews**, v. 9, p. 122-219, 1967.

HUANG, W. F.; WEN, K. C.; HSIAO, M. L. Adulteration by synthetic therapeutic substances of traditional Chinese medicines in Taiwan. **Journal of Clinical Pharmacology**, v. 37, n° 4, p.344-350, 1997.

ICH. **International Conference on Harmonisation of Technical Requerimentes for Registration of Pharmaceutical for Human Use: Validation of analytical procedures:methodology**. ICH Steering Committee, 2005.

INMETRO, Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. “Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos”. **DOQ-CGCRE-008 – Revisão 01**, Brasil, 2003.

JORGENSON, J. W.; LUKACS, K. D. Zone Electrophoresis in open tubular glass capillaries. **Analytical Chemistry**, v. 53, p. 1289-1302, 1981.

KATZUNG, B. G. **Farmacologia Básica e Clínica**. 9^a ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S. A., 2006.

KINTZ, P. *et al.* Screening and confirmatory method for benzodiazepines and hypnotics in oral fluid by LC-MS/MS. **Forensic Science International**, v. 150, p. 213-220, 2005.

KLEINSCHNITZ, M.; HERDERICH, M.; SCHREIER, P. Determination of 1-4-benzodiazepines by high-performance liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v.676, p. 61-67, 1996.

KOROLKOVAS, A.; BURCKHALTER, J. H. **Química Farmacêutica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S. A., 1988.

KU, Y-R. *et al.* Analysis and confirmation of synthetic anorexics in adulterated traditional Chinese medicines by high-performance capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v. 848, p. 537-543, 1999.

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

KUMAZAWA, T. *et al.* Simultaneous determination of methamphetamine and amphetamine in human urine using pipette tip solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 44, p. 602-607, 2007.

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

LEE, X-P. *et al.* Simple method for determination of triazolam in human plasma by high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 41, p. 64-69, 2006.

LIANG, Q. *et al.* Rapid and reliable determination of illegal adulterant in herbal medicines and dietary supplements by LC/MS/MS. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, V. 40, n. 2, p. 305-311, 2006.

LIU, S. Y. *et al.* LC and LC-MS-MS analyses of undeclared codeine in antiasthmatic Chinese proprietary medicine. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, V. 22, p. 481-486, 2000.

LIU, S. Y. *et al.* HPLC and GC-MS screening of Chinese proprietary medicine for undeclared therapeutic substances. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, V. 24, p. 983-992, 2001.

MARCHI, I. *et al.* Development and validation of a liquid chromatography-atmospheric pressure photoionization-mass spectrometry method for the quantification of alprazolam, flunitrazepam and their main metabolites in haemolysed blood. **Journal of Chromatography B**, article in press, 2008.

Mc CLEAN, S. *et al.* Determination of 1,4-benzodiazepines and their metabolites by capillary electrophoresis and high-performance liquid chromatography using ultraviolet and electrospray ionisation mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 838, p. 273-291, 1999.

Mc CLEAN, S.; O'KANE, E. J.; SMYTH, W. F. Electrospray ionization- mass spectrometry characterization of selected anti-psycothic drugs and their detection and determination in human hair samples liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 740, p. 141-157, 2000.

MEHTA, A.C. Quality management in drug. **Analyst**. v. 122, p. 83-88, 1997.

MIKAMI, E. *et al.* Simultaneous Analysis of seven benzodiazepines in dietary supplements as adulterants using High Performance Liquid Chromatography and its application to an identification system for diazepam. **Journal of Health Science**, v. 51, n° 3, p. 278-283, 2005.

MIKKERS, F. E. P.; EVERAERTS, F. M.; VERHEGGEN, T. P. E. M. J. High Performance Zone Electrophoresis. **Journal of Chromatography**, v.169, p. 11-20, 1979.

PARODI, B. *et al.* Herbal mixtures with claimed slimming activity: determination by TLC and HPLC of illegally added drugs. **Pharmazie**, v. 48, n° 9, p. 678-681, 1993.

PRADO, M. S. A. *et al.* Comparison of capillary electrophoresis and reversed-phase liquid chromatography methodologies for determination of diazepam in pharmaceutical tablets. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 37, p. 273-279, 2005.

QUEIROZ, S. C. N.; JARDIM, I. C. S. F. **Chemkeys**. Disponível em http://www.chemkeys.com/bra/md/mds_11/elec4p_4/fluele_2/fluele_2.htm. Acesso em 20 nov 2008.

QUINTELA, O. *et al.* Liquid Chromatography-electrospray ionization mass spectrometry for the determination of nine selected benzodiazepines in human plasma and oral fluid. **Journal of Chromatography B**, v. 825, p. 63-71, 2005.

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

SILVA, P. **Farmacologia**. 7ª ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S. A., 2006.

SMINK, B. E. *et al.* Quantitative analysis of 33 benzodiazepines, metabolites and benzodiazepine-like substances in whole blood by liquid chromatography-(tandem) mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 811, p. 13-20, 2004.

STEINHOFF, B. Future perspectives for the regulation of traditional herbal medicinal products in Europe. **Phytomedicine**, v. 9, p. 572, 2002.

SOMBRA, L.L. *et al.* Comparative study between capillary electrophoresis and high performance liquid chromatography in x0201; guaranax0201; based phytopharmaceuticals. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 36, p. 989-994, 2005.

TAVARES, M. F. M. Eletroforese Capilar: Conceitos Básicos. **Química Nova**, v. 19, n. 2, p. 173-181, 1996.

TAVARES, M. F. M. Mecanismos de Separação em Eletroforese Capilar. **Química Nova**, v. 20, n. 5, p. 493-511, 1997.

TERABE, S.; OTSUKA, K.; ICHIKAWA, K.; TSUCHIYA, A.; ANDO, T. Electrokinetic separations with micellar solutions and open-tubular capillaries. **Analytical Chemistry**, v. 56, n. 1, p. 113-111, 1984.

TESKE, M.; TRENTINI, A. M. M. **Herbarium – Compêndio de Fitoterapia**. 3ª ed. Curitiba: Herbarium – Laboratório Botânico Ltda, 1995.

TOMITA, M.; TOSHIKO, O. Application of capillary electrophoresis to the simultaneous screening and quantitation of benzodiazepines. **Journal of Chromatography B: Biomedical Applications**, v. 678, p. 331-337, 1996.

TONHI, E. *et al.* Fases estacionárias para cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE-FR) baseadas em superfícies de óxidos inorgânicos funcionalizados. **Química Nova**, São Paulo, v. 25, n. 4, 2002.

UNODC, **United Nations Office on Drugs and Crime**. Disponível em: <<http://www.unodc.org/unodc/en/data-and-analysis/WDR.html>>. Acesso em: 05 mar. 2009.

USP 28. **The United States Pharmacopeia**. Rockville. United States Convention Inc, 2005.

VANHOENACKER, G. *et al.* Analysis of Benzodiazepines in Dynamically coated capillaries by CE-DAD, CE-MS and CE-MS². **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 34, p. 595-606, 2004.

VEUTHEY, J. L. Capillary electroforesis in pharmaceutical and biomedical analysis. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 381, n. 1, p. 93-95, 2005.

VOGEL, A. I. *et al.* **Análise Química Quantitativa**. 5^a ed. Rio de Janeiro: LTC, 1992.

YANO, H. M. *et al.* Pesquisa de anorexígenos e benzodiazepínicos em formulações emagrecedoras e avaliação de rotulagem, em análises da Seção de Farmacognosia do Instituto Adolfo Lutz no período de junho de 2004 a março de 2007. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 67, n° 1, p. 78-82, 2008.

YEE, S-K. *et al.* Regulatory control of Chinese Proprietary Medicines in Singapore. **Health Policy**, v. 71, p.133-149, 2005.

ZUCCOLOTTO, T.; APEL, M.; RATES, S.M.K. Avaliação da qualidade de produtos fitoterápicos comercializados em Porto Alegre- RS. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v.58, n° 2, p. 25-31, 1999.