

**UNIVERSIDADE FEDERAL SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS  
FARMACÊUTICAS**

**ELETROFORESE CAPILAR: UM MÉTODO PARA  
DETERMINAÇÃO DE HIPOGLICEMIANTES COMO  
ADULTERANTES EM FORMULAÇÕES HERBÁREAS  
USADAS NO TRATAMENTO DO DIABETES**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Marlise Ferreira**

**Santa Maria, RS, Brasil  
2012**

**ELETROFORESE CAPILAR: UM MÉTODO PARA  
DETERMINAÇÃO DE HIPOGLICEMIANTES COMO  
ADULTERANTES EM FORMULAÇÕES HERÁBEAS  
USADAS NO TRATAMENTO DO DIABETES**

**por**

**Marlise Ferreira**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências Farmacêuticas.**

**Orientador: Prof. Dr. Leandro Machado de Carvalho**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2012**

**Universidade Federal de Santa Maria  
Centro de Ciências de Saúde  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas**

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

**ELETROFORESE CAPILAR: UM MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO  
DE HIPOGLICEMIANTE COMO ADULTERANTES EM  
FORMULAÇÕES HERBÁREAS USADAS NO TRATAMENTO DO  
DIABETES**

elaborada por  
**Marlise Ferreira**

como requisito parcial para obtenção do grau de  
**Mestre em Ciências Farmacêuticas**

**COMISSÃO EXAMINADORA:**

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

**Carine Viana da Silva, Dra.** (UNIPAMPA)

**Andréa Inês Horn Adams, Dra.** (UFSM)

Santa Maria, 24 de agosto de 2012

Dedico este trabalho a minha mãe Sandra Pippi pelo amor incondicional, incentivo e dedicação. Ao meu noivo Leonardo Mortari, pois com ele atravesso por caminhos desconhecidos na busca de um futuro cada vez melhor. Ao meu irmão pelo amor e apoio.

A minha família que torna possível minha vida acadêmica.

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer ao Professor Dr. Leandro Machado de Carvalho, pela orientação neste trabalho e, principalmente, pela passagem do seu valioso conhecimento e tempo despendido em nossa pesquisa. Espero ter correspondido à altura com o meu trabalho a tarefa a mim designada.

A todos os colegas e amigos do LACHEM pela convivência, carinho, ajuda, apoio e pelos momentos de descontração vividos durante esses dois anos.

As minhas amigas Valéria Dal Prá, Diana Muratt e Mariana Bortoluzi pelo carinho, amizade, conselhos e pela ajuda na realização deste trabalho.

As minhas grandes amigas Graziella Weigert e Joana Forgearini pela amizade, amor, carinho e por estarem sempre me apoiando e incentivando mesmo que de longe.

A minha mãe Sandra Pippi e ao meu irmão Jorge Henrique Pippi Ferreira pelo amor, carinho, dedicação, apoio e incentivo para realização dos meus objetivos. Amo vocês!

Ao meu noivo e futuro esposo Leonardo Appel Mortari, pelo amor, companheirismo, incentivo, dedicação, carinho e compreensão.

Aos meus futuros sogros Cintya Appel Mortari e Antônio Carlos Mortari pelo carinho, amizade, apoio e incentivo.

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

Aos demais professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

A CAPES pelo auxílio financeiro durante a realização deste trabalho.

À Universidade Federal de Santa Maria e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, pela oportunidade de realização deste curso.

**“A Deus pelo dom da vida e por ter possibilitado realizar esta etapa na minha vida. Sei que sem ele nada disso existiria e tudo que venho conquistando e que irei conquistar foi traçado por ele.”**

“É melhor tentar e falhar do que se preocupar em ver a vida passar, é melhor tentar, embora em vão, do que ficar sem fazer nada até o final. Eu prefiro na chuva caminhar do que em dias tristes em casa me esconder, prefiro ser feliz embora louco do que em conformidade viver...”

Martin Luter King

## **RESUMO**

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

### **ELETROFORESE CAPILAR: UM MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE HIPOGLICEMIANTES COMO ADULTERANTES EM FORMULAÇÕES HERBÁREAS USADAS NO TRATAMENTO DO DIABETES**

AUTOR: MARLISE FERREIRA  
ORIENTADOR: LEANDRO MACHADO DE CARVALHO  
Data e Local da Defesa: Santa Maria, 24 de Agosto de 2012.

A popularidade dos fitoterápicos como coadjuvantes no tratamento do diabetes mellitus, tem aumentado nos últimos anos. No entanto, trabalhos recentes têm demonstrado a presença de fármacos sintéticos, como adulterantes, nestas formulações, o que pode causar sérios problemas à saúde do paciente, uma vez que interações e efeitos farmacológicos são imprevisíveis. Este trabalho descreve o desenvolvimento de um método para a determinação simultânea de metformina, glibenclamida, gliclazida e clorpropamida, empregando eletroforese capilar de zona (CZE) com detecção condutométrica sem contato (C<sup>4</sup>D), usando um sistema de eletroforese capilar construído em laboratório. As condições otimizadas para a determinação de adulterantes em fitoterápicos por CZE-C<sup>4</sup>D foram: eletrólito de trabalho acetato de sódio 20 mmol L<sup>-1</sup> (pH 10,0); potencial de separação - 15 kV; temperatura de 25°C; detecção indireta operando em 400kHz e amplitude de onda de 2vpp; e injeção por gravidade de 20 cm por 60 s. O método foi validado e aplicado para a avaliação de hipoglicemiantes em formulações herbáceas comercializadas por farmácias no mercado brasileiro. O método permite a identificação dos adulterantes e sua quantificação a partir de 0,24 mg para a metformina, 0,15 mg para a glibenclamida, 0,33 mg para a gliclazida e 0,24 mg para a clorpropamida.

Palavras-chave: adulteração; formulações herbáceas, diabetes, eletroforese capilar

## **ABSTRACT**

Master Dissertation  
Postgraduate in Pharmaceutical Sciences  
Federal University of Santa Maria, RS, Brazil

### **CAPILLARY ELECTROPHORESIS: A METHOD FOR THE DETERMINATION OF HYPOGLYCEMICS IN HERBAL FORMULATIONS USED FOR THE TREATMENT OF DIABETES**

AUTHOR: MARLISE FERREIRA

ADVISOR: LEANDRO MACHADO DE CARVALHO

Date and Place of the defense: Santa Maria, August 24<sup>th</sup>, 2012

The popularity of herbal medicines as adjuncts in the treatment of diabetes mellitus, has increased in recent years. However, recent studies have demonstrated the presence of synthetic drugs, as adulterants, in these formulations, what can cause serious problems to the health of the patient, since interactions and pharmacological effects are unpredictable. This work describes the development of a method for the simultaneous determination of metformin, glibenclamide, gliclazide and chlorpropamide employing capillary zone electrophoresis (CZE) with contactless conductivity detection (C<sup>4</sup>D). The work was carried out using a capillary electrophoresis system built in the laboratory. The optimized conditions for the determination of adulterants in herbal medicines by CZE-C<sup>4</sup>D were the following: 20 mmol L<sup>-1</sup> sodium acetate at pH 10.0 as working electrolyte, separation potential of -15kV, separation temperature of 25°C, indirect conductivity detection operating at 400 kHz and amplitude wave of 2 V<sub>pp</sub>, hydrodynamic injection by gravity (20 cm left side elevation for 60 s). The method was validated and applied to the determination of hypoglycemics in pharmaceutical formulations commercialized by compounding pharmacies in Brazil. The method allows the identification of adulterants and its quantification from 0.24 mg to metformin, 0.15 mg to glibenclamide, 0.33 mg to gliclazide and 0.24 mg to chlorpropamide.

Keywords: adulterants, herbal-based formulations, diabetes, capillary electrophoresis

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Espécies vegetais mais citadas com efeitos hipoglicemiantes.....	19
Tabela 2 -	Adulterantes encontrados em formulações herbáceas hipoglicemiantes.....	20
Tabela 3 -	Reagentes, matérias-primas e Substância Química de Referência utilizados no desenvolvimento do trabalho.....	25
Tabela 4 -	Composição das 12 amostras adquiridas em farmácias de manipulação.....	26
Tabela 5 -	Hipoglicemiantes pesquisados, como suas respectivas doses diárias, estruturas e $pK_a$ .....	33
Tabela 6 -	Parâmetros de regressão, resultados da análise de variância e apresentação dos limites de quantificação e detecção para quantificação de metformina, glibenclamida, gliclazida e clorpropamida por CZE – $C^4D$ .....	41
Tabela 7 -	Resultados obtidos no teste de recuperação em produtos fitoterápicos através de CZE .....	42

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Representação de um equipamento de eletroforese capilar .....	22
Figura 2 -	Efeito da variação do pH do eletrólito de trabalho no tempo de migração dos fármacos sintéticos, para valores de pH entre 4,0 e 10,0.....	32
Figura 3 -	Efeito da concentração do eletrólito de trabalho acetato de sódio na área dos picos dos fármacos sintéticos, para valores de 15 a 50 mmol L <sup>-1</sup> .....	34
Figura 4 -	(A) Efeito da altura para o tempo de injeção de 60 s na área dos picos dos fármacos sintéticos, para valores de 10, 15, 20 e 25 cm. (B) Efeito da altura para o tempo de injeção de 120 s na área dos picos dos fármacos sintéticos em concentrações de 50 e 100 mg L <sup>-1</sup> , para valores de 10, 15, 20 e 25 cm.....	35
Figura 5 -	Efeito da frequência de operação do detector na área dos picos dos fármacos sintéticos, para valores de 200 a 1000 kHz .....	36
Figura 6 -	Efeito do potencial de separação nos tempos de migração dos fármacos sintéticos, para valores de 5, 10, 15 e 20 Kv .....	37
Figura 7 -	Efeito do potencial de separação nos tempos de migração dos fármacos sintéticos, para valores de 15 a 20 Kv .....	37
Figura 8 -	Eletroferograma dos adulterantes (a) metformina 100 mg L <sup>-1</sup> , (b) glibenclamida 50 mg L <sup>-1</sup> , (c) gliclazida 100 mg L <sup>-1</sup> , (d) clorpropamida 100 mg L <sup>-1</sup> .....	38
Figura 9 -	Distribuição percentual das amostras de formulações herbáceas conforme seu estado de origem .....	43
Figura 10 -	Distribuição das espécies vegetais, isoladas ou em associação, encontradas em medicamento naturais hipoglicemiantes .....	44
Figura 11 -	(A) Amostra 3: Eletroferograma da amostra fitoterápica contendo os adulterantes adicionados ( <i>spike</i> ) (a) metformina 100 mg L <sup>-1</sup> , (b) glibenclamida 50 mg L <sup>-1</sup> , (c) gliclazida 100 mg L <sup>-1</sup> , (d) clorpropamida 100 mg L <sup>-1</sup> , (e) pico da amostra. (B) Amostra 6: Eletroferograma da amostra fitoterápica contendo os adulterantes adicionados ( <i>spike</i> ) (a)	

metformina 100 mg L<sup>-1</sup>, (b) glibenclamida 50 mg L<sup>-1</sup>, (c) gliclazida  
100 mg L<sup>-1</sup>, (d) clorpropamida 100 mg L<sup>-1</sup>, (e) pico da amostra

..... 45

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

**CE** – eletroforese capilar

**CZE** – eletroforese capilar de zona

**C<sup>4</sup>D** – detecção por condutividade sem contato

**ANVISA** – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

**HPLC** – cromatografia líquida de alta eficiência

**GC** – cromatografia gasosa

**MEKC** – cromatografia eletrocinética micelar

**OMS** – organização mundial da saúde

**DPR** – desvio padrão relativo

**ANOVA** – Análise de variância

**LD** – limite de detecção

**LQ** – limite de quantificação

**EOF** – Fluxo eletrosmótico

**V<sub>pp</sub>** – voltagem pico a pico

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	13
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	15
<b>3 REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	16
<b>3.1 Tratamento do diabetes mellitus</b> .....	16
3.1.1 Tratamento medicamentoso.....	16
3.1.2 Formulações herbáceas.....	17
<b>3.2 Adulteração de formulações para o tratamento do diabetes mellitus</b> .....	19
<b>3.3 Análise de adulterantes em formulações para o tratamento do diabetes mellitus</b> .....	21
3.3.1 Métodos cromatográficos .....	21
3.3.2 Métodos eletroforéticos .....	21
3.3.2.1 Eletroforese capilar de zona.....	22
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	23
<b>4.1 Equipamentos</b> .....	23
<b>4.2 Reagentes e soluções</b> .....	24
<b>4.3 Amostras</b> .....	26
<b>4.4 Procedimentos analíticos</b> .....	27
4.4.1 Eletrólito de trabalho....	27
4.4.2 Determinação por eletroforese capilar de zona .....	27
4.4.3 Estudos de otimização das separações eletroforéticas.....	28
4.4.4 Validação do método desenvolvido.....	28
4.4.5 Aplicação analítica .....	30
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÕES</b> .....	30
<b>5.1 Otimização da separação de hipoglicemiantes em formulações farmacêuticas por eletroforese capilar</b> .....	30
<b>5.2 Validação do método desenvolvido</b> .....	39
<b>5.3 Aplicação do método desenvolvido em amostras reais</b> .....	42
5.3.1 Amostragem e panorama do consumo de produtos naturais para o diabetes mellitus no Brasil.....	42
5.3.2 Análise das formulações por eletroforese capilar.....	44
<b>6 CONCLUSÕES</b> .....	47
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	48

# 1 INTRODUÇÃO

O diabetes mellitus é uma enfermidade crônica do metabolismo, determinada pela redução de insulina e elevação da taxa de glicose no sangue (LAMEIRA; PINTO, 2008). A doença manifesta-se quando o pâncreas não produz insulina suficiente devido a destruição auto-imune das células  $\beta$  (tipo 1), ou pela resistência a insulina em alguns órgãos, principalmente no fígado, no músculo esquelético e nos adipócitos, quando o corpo não consegue utilizar efetivamente a insulina produzida (tipo 2) (RANG et al., 2007).

A prevenção e o controle da hiperglicemia através de dieta e modificações no estilo de vida são os alvos principais no controle do diabetes mellitus (HERMAN; CROFFORD, 1997). A terapêutica medicamentosa é feita através da administração parenteral de insulina ou com medicamentos hipoglicemiantes orais, os quais atuam na produção e utilização de insulina, bem como, auxiliam na absorção de açúcares pelo intestino (RANG et al., 2007).

O aumento da incidência desta doença, a busca por uma melhor qualidade de vida dos pacientes diabéticos, o preço elevado e, muitas vezes, a ineficácia dos hipoglicemiantes de referência, propicia um notável aumento na demanda por terapias alternativas, como plantas medicinais e medicamentos herbáceos (ENGEL; STRAUS, 2002). A crença popular de que os medicamentos naturais são inofensivos e que não causam danos à saúde, além, da facilidade de acesso a esses medicamentos, dos preços geralmente baixos, das curas aparentes e, os anúncios, muitas vezes, enganosos são provavelmente as principais causas do sucesso desses produtos.

Atualmente, um problema comum e recorrente com os medicamentos herbáceos tem sido a adulteração com fármacos sintéticos, uma prática relatada em todas as escalas da produção farmacêutica. Trabalhos científicos têm demonstrado casos de adulteração de formulações herbáceas com clorpropamida, glibenclamida, gliclazida, glimepirida, glipizida, metformina, mitiglinida, nateglinida, fenformina, pioglitazona, repaglinida, rosiglitazona e tolbutamida (GOUDIE; KAYE, 2001; WANG et al., 2009; LOW et al., 2009; LI et al., 2010; CUI et al., 2010).

A adulteração de produtos naturais utilizados para diabetes com hipoglicemiantes podem causar sérios problemas à saúde do paciente. Os principais efeitos colaterais dessa classe de fármacos incluem hipoglicemia, alterações hematológicas, distúrbios gastrintestinais, reações alérgicas, transaminases elevadas, edema e anemia. Interações e efeitos farmacológicos imprevisíveis podem ocorrer quando um fármaco sintético é

adicionado a um produto natural que, além de ter ação sobre o diabetes, contém outras substâncias na sua composição.

Neste contexto, é relevante destacar que a adulteração de formulações herbáceas com substâncias sintéticas é considerada uma prática ilegal, uma vez que as formulações são registradas em desacordo com a sua verdadeira composição (LIANG et al., 2006).

Baseado na demanda crescente de formulações herbáceas e da necessidade de métodos analíticos para identificação seletiva e quantificação de possíveis adulterantes, foi desenvolvido um novo método baseado na separação por eletroforese capilar de zona (CZE) com detecção condutométrica sem contato (C<sup>4</sup>D) para avaliar os principais medicamentos hipoglicemiantes (metformina, clorpropamida, glibenclamida e gliclazida) usados no tratamento do diabetes mellitus que, conseqüentemente, podem estar presentes como adulterantes em formulações à base de plantas. O método proposto foi aplicado para a avaliação dos adulterantes em amostras de formulações herbáceas comercializados por farmácias de manipulação no mercado brasileiro.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

O objetivo deste trabalho é desenvolver um método analítico que emprega eletroforese capilar de zona com detecção indireta por condutividade sem contato (CZE-C<sup>4</sup>D) para a determinação de metformina, glibenclamida, gliclazida e clorpropamida como adulterantes em formulações herbáceas utilizadas no tratamento da diabetes mellitus.

### **2.2 Objetivos Específicos**

- Desenvolver e otimizar um método por eletroforese capilar de zona para determinar fármacos hipoglicemiantes em formulações herbáceas utilizadas no tratamento do diabetes mellitus;
- Avaliar os parâmetros de linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção, limite de quantificação e especificidade do método;
- Traçar um panorama do consumo de produtos herbários para diabetes mellitus no Brasil.
- Aplicar o método desenvolvido na determinação dos fármacos sintéticos em formulações herbáceas usadas no tratamento do diabetes mellitus comercializadas no estado do Rio Grande do Sul, Brasil.

## 3 REFERENCIAL TEÓRICO

### 3.1 Tratamento do diabetes mellitus

#### 3.1.1 Tratamento medicamentoso

O tratamento do paciente diabético tem por objetivo atingir o equilíbrio metabólico, procurando tornar os níveis de glicemia, da pressão arterial e do peso, o mais próximo do normal. O controle do diabetes inclui medidas não-medicamentosas como exercício físico, dieta alimentar equilibrada e medidas medicamentosas, onde o controle da glicemia é realizado através de medicamentos orais e medicamentos injetáveis (insulina) (WAJCBURG; AGUIAR; OLIVEIRA, 1999).

Para o tratamento do diabetes tipo 1, a administração via parenteral de preparações de insulina é essencial. Os hipoglicemiantes orais, comumente chamados de antidiabéticos, são medicamentos que têm como finalidade atuar na produção e na utilização da insulina, assim como na absorção dos açúcares pelo intestino. Essa classe de medicamentos já é usada há muitos anos no tratamento de pacientes com diabetes tipo 2, com eficácia e segurança já confirmadas na literatura médica (RANG et al., 2007).

Os antidiabéticos são classificados de acordo com o mecanismo de ação em sulfoniluréias (secretagogos de insulina), biguanidas, tiazolidinedionas (sensibilizadores de insulina) e inibidores da  $\alpha$ -glicosidase (anti-hiperglicemiantes) (SILVA, 2010).

As sulfoniluréias provocam a hipoglicemia por estimular a liberação de insulina das células- $\beta$  do pâncreas (GOODMAN; GILMAN, 2010). Seus principais representantes são a clorpropamida, a glibenclamida, a glimepirida, a gliclazida e a glipizida. Os efeitos colaterais mais frequentes nesta classe são: hipoglicemia, reações alérgicas, prurido, eritema, urticária, náuseas, vômitos e alterações hematológicas. A hipoglicemia tem sido relatada com todas as sulfoniluréias, porém é mais comum com as de ação prolongada, como a clorpropamida. A glibenclamida causa mais hipoglicemia que a glipizida, a gliclazida e a glimepirida, devido à sua meia-vida mais prolongada. São contra-indicadas na gravidez, lactação, insuficiência

renal e hepática. A clorpropamida não deve ser utilizada em pacientes idosos, pois pode levar à hipoglicemia grave (SILVA, 2010).

A classe das biguanidas é representada principalmente pela metformina. Este fármaco reduz os níveis da glicose, pois diminui a produção hepática da mesma e aumenta a ação da insulina no músculo e tecido adiposo. Outro provável mecanismo para a redução da glicose plasmática é a redução da absorção intestinal de glicose (GOODMAN; GILMAN, 2010). O uso das biguanidas requer cuidado, pois não devem ser administradas a gestantes, nefropatas, e pacientes com risco cardiovascular. Os efeitos colaterais mais comuns são náusea, anorexia, diarreia e vômitos (SILVA, 2010). A metformina não provoca a liberação de insulina e, em geral, não causa hipoglicemia, mesmo em altas doses (GOODMAN; GILMAN, 2010).

Os fármacos estudados neste trabalho foram a glibenclamida, a gliclazida, a clorpropamida e a metformina, por serem os mais utilizados na terapêutica, de menor custo e maior facilidade de acesso as matérias-primas.

### 3.1.2 Formulações herbáceas

A incidência cada vez maior do diabetes, juntamente com o preço e muitas vezes a ineficácia dos fármacos hipoglicemiantes de referência, torna notável o aumento da procura por terapias alternativas, como os fitoterápicos e drogas vegetais. Assim, as ervas medicinais com atividades hipoglicemiantes são cada vez mais buscadas por pacientes e profissionais da saúde (RANG; DALE, 1993; DEY; ATTELE; YUAN, 2002). Este fato tem sido referenciado pelo Comitê de Especialistas em Diabetes da Organização Mundial da Saúde - OMS (BELTRAME, 2001; DEY; ATTELE; YUAN, 2002; VIANA, 2004).

No Brasil, o órgão responsável pela regulamentação de produtos fitoterápicos é a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e, segundo a resolução nº 17 de 24 de fevereiro de 2000, fitoterápico é todo “medicamento farmacêutico obtido por processos tecnologicamente adequados, empregando-se exclusivamente matérias-primas vegetais, com finalidade profilática, curativa, paliativa ou para fins de diagnóstico”. Não são considerados medicamentos fitoterápicos aqueles que, na sua composição, contenham substâncias ativas isoladas, de qualquer origem, nem as associações destas com extratos vegetais (BRASIL, 2000).

Na última década, pode-se observar um aumento na regulamentação dos fitoterápicos pela ANVISA, que assinou uma série de leis para padronizar a manipulação e comercialização destes produtos. Atualmente, está em vigor a RDC nº 14 de 31 de março de 2010, que dispõe sobre o registro de medicamento fitoterápicos (BRASIL, 2010).

No ano de 2009, a ANVISA publicou uma lista, a partir de uma consulta pública, contendo 66 plantas com seu nome científico, nome popular, posologia, indicações e contra-indicações (BRASIL, 2009). Esta lista leva em conta apenas o que já está cientificamente comprovado, ou seja, o que realmente possa causar algum efeito benéfico no tratamento das doenças citadas. A alegação “hipoglicemiante” ou “antidiabético” não é citada nesta lista, demonstrando que as espécies, conhecidas como hipoglicemiantes na cultura popular, ainda não têm comprovação científica, sendo que a ANVISA levou em consideração apenas o uso dessas drogas na forma de chás.

Ainda hoje, há um descrédito dos médicos e profissionais da saúde quanto ao potencial terapêutico dos produtos naturais. No entanto, os pacientes persistem em usar estes produtos, muitas vezes associados aos medicamentos sintéticos, podendo causar sérios riscos à saúde dos usuários, devido à potencialização dos seus efeitos e uma severa hipoglicemia (CARVALHO; DINIZ; MUKHERJEE, 2005).

As espécies mais citadas, em artigos científicos, como plantas utilizadas para o tratamento do diabetes mellitus, estão listadas na tabela 1.

As questões relacionadas à segurança das formulações herbáreas são complexas e incluem a toxicidade dos constituintes das plantas, a presença de contaminantes (como metais pesados e resíduos de pesticidas) e/ou adulterantes e a interação entre as plantas e os fármacos sintéticos (BOGUZ et al., 2006).

Tabela 1 – Espécies vegetais mais citadas com efeitos hipoglicemiantes.

<b>Nome científico</b>	<b>Nome popular</b>
<i>Allium sativum</i>	Alho
<i>Anacardium occidentale</i>	Cajueiro
<i>Annona muricata</i>	Graviola
<i>Averrhoa carambola</i>	Carambola
<i>Bauhinia candicans (ou B. forficata)</i>	Pata-de-vaca
<i>Caesalpinia férrea</i>	Pau-ferro
<i>Gymnema silvestre</i>	Gymnema silvestre
<i>Phyllanthus niruri</i>	Quebra-pedra
<i>Syzygium jambolanum</i>	Jambolão
<i>Cissus sicyoides</i>	Insulina vegetal
<i>Baccharis genistelooides</i>	Carqueja

Fonte: DEY; ATTELE; YUAN, 2002; CARVALHO; DINIZ; MUKHERJEE, 2005; NEGRI, 2005; BORGES; BAUTISTA; GUILERA, 2008.

### 3.2 Adulteração de formulações para o tratamento do diabetes mellitus

Os principais fatores que contribuem para os efeitos adversos e outros problemas de saúde, decorrentes da utilização de formulações à base de plantas, consistem no fácil acesso aos produtos contaminados e/ou adulterados e as características específicas de cada produto. Os casos de adulteração relacionados a estes produtos “naturais” têm aumentado nos últimos anos, não somente em relação aos fármacos sintéticos, mas também aos seus compostos análogos (KESTING; HUANG; SORENSEN, 2010).

A ocorrência de casos de adulteração com fármacos sintéticos pode provocar toxicidade aguda ou crônica, além de efeitos adversos e interações com outros fármacos (JUNG; HERMANN-CLAUSEN; WEINMANN, 2006).

As interações e efeitos farmacológicos são imprevisíveis quando os fármacos hipoglicemiantes são adicionados ilegalmente às formulações herbáceas, pois estas além de ter ação sobre o diabetes pode conter outras substâncias na sua composição. Os principais efeitos colaterais dessa classe de drogas incluem hipoglicemia, alterações hematológicas, distúrbios

gastrintestinais, reações alérgicas e anemia (GOODMAN; GILMAN, 2010; SILVA, 2010). Quando as sulfoniluréias, principalmente clorpropamida e glibenclamida, são adicionadas as formulações herbáceas usadas no tratamento do diabetes, podem provocar uma hipoglicemia grave.

Trabalhos científicos têm demonstrado casos de adulteração de fitoterápicos com fármacos hipoglicemiantes. Assim, os fármacos mais citados como adulterantes são a glibenclamida, a glimepirida, a glipizida, a gliclazida, a clorpropamida e a metformina (HUANG; WEN; HSIAO, 1997; GOUDIE; KAYE, 2001; WANG et al., 2009; LOW et al., 2009; PANG et al., 2009; LI et al., 2010; CUI et al., 2010).

A identificação destes casos vem sendo realizada através da análise das formulações “naturais” suspeitas, bem como através da investigação dos efeitos adversos relatados pelos consumidores. Alguns casos de adulteração de formulações herbáceas com fármacos hipoglicemiantes estão descritos na tabela 2.

Tabela 2 – Adulterantes encontrados em formulações herbáceas hipoglicemiantes

<b>Adulterantes</b>	<b>Origem / Detecção</b>	<b>Referências</b>
Glibenclamida	Malásia / Austrália	GOUDIE; KAYE, 2001
Glibenclamida	China / Taiwan	HUANG; WEN; HSIAO, 1997
Fenformina	China / Cingapura	KOH; WOO, 2000
Glibenclamida	China / Taiwan	KU et al., 2003
Gliclazida, glimepirida, fenformina, glibenclamida, rosiglitazona e metformina	China / China	PANG et al., 2009
Glibenclamida	Índia / Reino Unido	PADINJAKARA et al., 2009
Glibenclamida, gliclazida, glimepirida, metformina, rosiglitazona, mitiglinida	China / China	CUI et al., 2010
Metformina	China / China	ZHOU et al., 2011
Glibenclamida, fenformina, metformina, rosiglitazona e gliclazida	China / China	CHING et al., 2011

### **3.3 Métodos para determinação adulterantes em formulações para o tratamento do diabetes mellitus**

#### **3.3.1 Métodos cromatográficos**

Os métodos cromatográficos podem ser aplicados para determinar e identificar adulterantes em formulações herbáceas, uma vez que possuem ampla capacidade de separação, combinado com a sensibilidade da detecção e seletividade dos compostos ativos. Estas características são importantes para a análise de fitoterápicos, que podem conter, além de uma mistura complexa, adulterantes sintéticos. Além disso, a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) é um método popular para a análise de medicamentos fitoterápicos, pois não é limitado pela volatilidade e/ou estabilidade dos compostos da amostra. Já a cromatografia gasosa (GC), é empregada com menor frequência para a determinação de adulterantes em fitoterápicos, devido à necessidade de derivatização da amostra de compostos não voláteis antes da análise (CARVALHO et al., 2011).

#### **3.3.2 Métodos eletroforéticos**

A eletroforese capilar (CE) é uma técnica adequada para uma ampla gama de problemas analíticos e, por isso, vem ganhando destaque entre as técnicas de separação convencionais para a análise de medicamentos fitoterápicos. Algumas vantagens, como alta resolução, curto tempo de análise e baixo consumo de reagentes e amostra, tornam a eletroforese capilar um método atrativo para a investigação de adulterantes (TAVARES, 1997; JAGUER; TAVARES, 2001; SILVA, 2003; ANATOS; BARNETT; LEWIS, 2005).

Uma das maiores vantagens da CE consiste na simplicidade de sua instrumentação. O equipamento consiste basicamente de uma fonte de alta tensão, capilares de sílica fundida, eletrodos (que geralmente são de platina), um detector apropriado e um computador para análise dos dados (Figura 1) (TAVARES, 1996; SPENGLER, 2009). 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  $\mu$ A. Essa fonte é conectada, através dos

eletrodos de platina, a dois reservatório preenchidos com eletrólito de trabalho. Os capilares são imersos na solução e, assim, ficam preenchidos com o eletrólito, completando o contato elétrico no sistema (TAVARES, 1996).

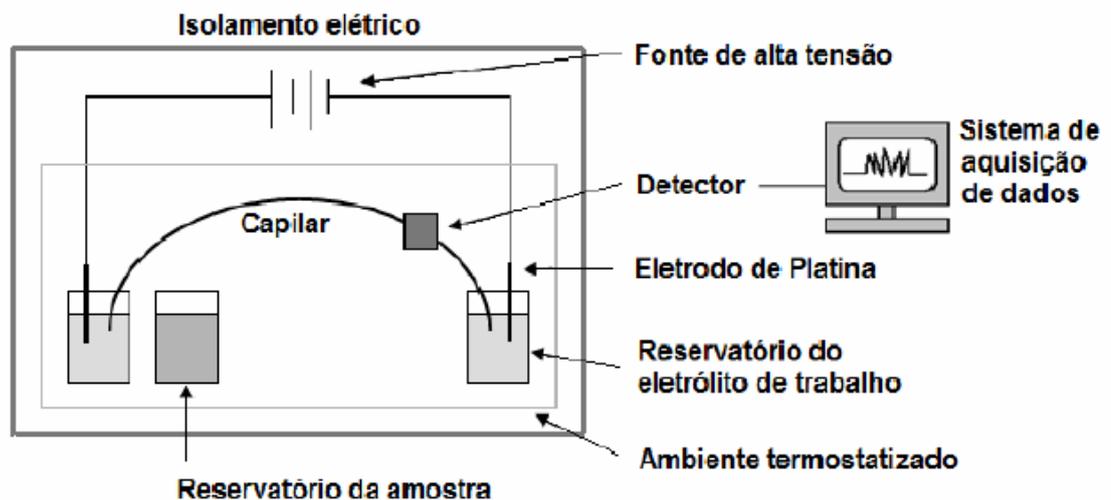


Figura 1 – Representação de um equipamento de eletroforese capilar.

Existem cinco formas de operação de CE baseados em mecanismos de separação diferentes: eletroforese capilar de zona (CZE), eletroforese capilar em gel (CGE), cromatografia eletrocínética micelar (MEKC), eletroforese capilar com focalização isoeletrica (IEF) e isotacoforese capilar (CITP).

Os métodos mais empregados para a avaliação de adulterantes em fitoterápicos são a CZE e a (MEKC), sendo que a CZE é um dos métodos de separação mais utilizados na prática, devido à sua facilidade de implementação e otimização das condições experimentais (TAVARES, 1997).

### 3.3.2.1 Eletroforese capilar de zona

A técnica de CZE baseia-se na migração diferenciada das espécies em zonas distintas, quando estas são submetidas à aplicação de um campo elétrico. Ânions migram em direção ao ânodo e cátions em direção ao cátodo (TAVARES, 1996). A velocidade com que cada zona se

desloca é dependente do campo elétrico aplicado, das mobilidades dos analitos e do fluxo eletrosmótico (EOF). O tempo necessário para um composto percorrer o capilar até o ponto de detecção é chamado de tempo de migração.

Para a determinação de adulterantes em formulações herbáceas os detectores mais utilizados são o UV e o DAD. Além desse, outros detectores universais, tais como os baseados em condutometria sem contato ( $C^4D$ ), têm sido utilizados para avaliação de adulterantes (CARVALHO et al., 2010).

Alguns critérios devem ser considerados na escolha do detector para uma análise em particular. São eles: sensibilidade, seletividade, intervalo linear de concentração e ruído. E, obviamente, o detector deve atender às necessidades exigidas pelo método eletroforético. A resposta do detector deve produzir uma relação conhecida e reprodutível com a concentração dos analitos (TAVARES, 1996).

A sensibilidade do detector  $C^4D$  está relacionada com a diferença de condutividade entre o tampão de corrida e a zona que migra no capilar. Se a zona analisada possuir condutividade menor que o eletrólito, um pico negativo é registrado; por outro lado, se a zona possuir condutividade maior que o eletrólito de corrida, um pico positivo é registrado (SILVA, 2001). Portanto, a condutividade do eletrólito é de extrema importância na detecção por condutividade. A detecção por  $C^4D$  é mais facilmente implementada e este pode ser aplicado na análise de compostos orgânicos e inorgânicos, incluindo produtos farmacêuticos (KUBÁN; HAUSER, 2008).

## **4 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1 Equipamentos**

-Equipamento de eletroforese capilar com detecção por condutividade sem contato (CE- $C^4D$ ) construído em laboratório (SPENGLER, 2009; CARVALHO et al., 2009).

-Os reagentes sólidos foram pesados utilizando uma balança analítica Sartorius (Goettingen, Alemanha) com precisão de 0,0001g.

-As medidas de pH foram realizadas em pHmetro digital Metrohm pensalab. Para a calibração do equipamento utilizaram-se tampões de calibração de pH 4,00 e pH 7,00 (Digimed), a  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ .

-A água utilizada para o preparo das soluções primeiramente sofreu um processo de destilação, seguido de deionização e, após, purificação em um sistema Milli-Q (resistividade de  $18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$ ).

- Foi utilizado um sistema de filtração a vácuo para filtração do eletrólito de trabalho com filtro de acetato de celulose  $0,45 \mu\text{m}$  (Sartorius, Alemanha).

-As soluções de eletrólito de trabalho foram sonicadas em ultra-som (Unique, São Paulo, Brasil).

## 4.2 Reagentes e soluções

As matérias-primas de grau farmacêutico foram obtidas junto a farmácias de manipulação ou fornecedores do segmento farmacêutico, acompanhadas de laudo analítico. Os fármacos escolhidos para o estudo foram a metformina, glibenclamida, gliclazida e clorpropamida. As formulações herbáreas usadas no tratamento do diabetes mellitus foram adquiridas em farmácias de manipulação do estado do Rio Grande do Sul, Brasil.

Os demais reagentes utilizados no trabalho são de grau P.A. ou HPLC. Os reagentes, matérias-primas e padrão empregados são apresentados na tabela 3.

As soluções padrão dos hipoglicemiantes (metformina, glibenclamida, gliclazida e clorpropamida) foram preparadas nas concentrações de  $1000 \text{ mg L}^{-1}$  através das diluições das matérias-primas e da substância química de referência de cada fármaco, em balão volumétrico de 50 ml com metanol. As soluções foram mantidas sob refrigeração. A partir das soluções em estoque foram preparadas as soluções de trabalho, por meio de diluição em metanol.

As soluções de  $1000 \text{ mg L}^{-1}$  foram preparadas a partir da dissolução de 0,05g de cada um dos fármacos sintéticos metformina, glibenclamida, gliclazida e clorpropamida, em balão de 50 ml com metanol. Já as soluções dos fármacos interferentes investigados anorexígenos (anfepamina, femproporex, sibutramina) e diuréticos (amilorida, furosemida, clortalidona e hidroclorotiazida) foram preparadas a partir da dissolução de 0,01g de cada fármaco em um balão de 10 ml com metanol/água 50%. As soluções de trabalho foram preparadas na concentração de  $50 \text{ mg L}^{-1}$  a partir da diluição da solução estoque em metanol/água 50%.

As soluções de acetato de sódio e tampão fosfato foram preparadas na concentração de  $0,5 \text{ mol L}^{-1}$  (soluções estoque) e diariamente estas soluções foram diluídas em água ultrapura para o preparo das soluções de trabalho. O pH da solução de acetato de sódio foi ajustado com ácido acético  $0,5 \text{ mol L}^{-1}$  e hidróxido de sódio  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  e  $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ . Já o pH do tampão fosfato foi ajustado com ácido fosfórico  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  e hidróxido de sódio  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  e  $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ .

Tabela 3 – Reagentes, matérias-primas e substância química de referencia utilizados no desenvolvimento do trabalho.

Reagentes	Fornecedor	Pureza
Metanol	Tedia	99,9%
Ácido Acético P.A. Glacial	Vetec	99,7%
Acetato de sódio	Sigma Aldrich	-
Ácido fosfórico	Merck	85,0%
Fosfato monobásico de sódio	Merck	-
Hidróxido de sódio P.A.	Vetec	-
Metformina	Deg	100,8%
Glibenclamida	Genix	99,5%
Gliclazida	Farmacopéia Brasileira	-
Clorpropamida	Deg	99,8%
Anfepramona	Genix	98,0%
Femproporex	Genix	100,42%
Sibutramina	Deg	99,3%
Amilorida	Deg	100,46%
Clortalidona	Deg	98,5%
Hidroclorotiazida	Deg	99,4%
Furosemida	Galena	99,2%

### 4.3 Amostras

A amostragem foi realizada de forma aleatória na internet, utilizando como termo de pesquisa “farmácia de manipulação”. Entrou-se em contato com 91 farmácias de manipulação por telefone e via e-mail. As informações sobre amostras de formulações herbáceas foram obtidas em farmácias do Distrito Federal e de oito estados brasileiros: Ceará, Goiás, Minas Gerais, Rio Grande do Sul, Rio de Janeiro, Santa Catarina, São Paulo e Paraná. As amostras de formulações herbáceas utilizadas neste trabalho estão listadas na tabela 4.

Antes do processo de extração das amostras, foi realizado o ensaio de peso médio para cápsulas conforme a Farmacopéia Brasileira 5ª edição (2010), seguido da pesagem do pó (peso médio de 20 cápsulas) e dissolução deste em 50 mL de metanol, obtendo-se o extrato metanólico. Em seguida, o extrato obtido foi filtrado através de algodão e em membrana de acetato de celulose 0,45 µm. Este processo foi realizado para todas as amostras em estudo.

Tabela 4 – Composição declarada das 12 amostras adquiridas em farmácias de manipulação.

<b>Amostra</b>	<b>Composição declarada</b>
1	<i>Gymnema silvestre</i> 250mg
2	<i>Gymnema silvestre</i> 100mg
3	Pata de vaca, carqueja, insulina vegetal
4	Alcachofra 400mg
5	<i>Gymnema silvestre</i> 100mg
6	Jambolão, pata de vaca, insulina vegetal
7	Berinjela 400mg
8	Alcachofra 400mg
9	Alcachofra 400mg
10	Berinjela 400mg
11	<i>Gymnema silvestre</i> 100mg
12	Alcachofra 200mg, carqueja 150mg, pata de vaca 150mg

## 4.4 Procedimentos analíticos

### 4.4.1 Eletrólito de trabalho

A solução do eletrólito de trabalho foi preparada diariamente através da diluição da solução estoque ( $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ ) em água ultrapura. O pH da solução foi ajustado com as soluções de NaOH  $1 \text{ mol L}^{-1}$  e  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  e, em seguida foi filtrada em membrana de acetato de celulose  $0,45 \mu\text{m}$ . Por fim, a solução foi sonicada em sistema ultra-som por 30 min.

### 4.4.2 Determinação por eletroforese capilar de zona

Todas as determinações eletroforéticas foram realizadas no aparelho de eletroforese capilar com detecção por condutividade sem contato (CE-C<sup>4</sup>D). Os hipoglicemiantes estudados como adulterantes foram determinados pelo método de eletroforese capilar de zona (CZE). A fonte de alta tensão foi configurada para detecção indireta dos fármacos na forma catiônica, com injeção anódica e detecção catódica.

O capilar utilizado é de sílica fundida (Micro Tube, São Paulo/SP) com 68 cm de comprimento,  $75 \mu\text{m}$  de diâmetro interno e  $360 \mu\text{m}$  de diâmetro externo.

Para o condicionamento do capilar novo, fez uma lavagem com NaOH  $1 \text{ mol L}^{-1}$ , durante 40 minutos, empregando vácuo, em pressão constante de  $-400 \text{ mmHg}$ . Em seguida fez-se uma lavagem com água ultrapura, durante 15 minutos e, por fim com eletrólito de trabalho por 30 minutos. Diariamente, fez-se a lavagem do capilar com NaOH  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  e com água ultrapura, durante 15 minutos cada, e 30 minutos com o eletrólito de trabalho. No final do dia o capilar foi lavado com eletrólito de trabalho e água ultrapura por 30 minutos cada.

O sistema de injeção hidrodinâmica é baseado na elevação de uma das extremidades do capilar até uma determinada altura (máximo 28 cm por um tempo de até 60 s), provocando, assim, a entrada de certo volume de analito.

#### 4.4.3 Estudos de otimização das separações eletroforéticas

Os estudos de otimização do método tem como objetivo obter a melhor resolução dos picos, a estabilidade da linha base e o menor tempo de migração das espécies.

Inicialmente, a otimização do método envolveu a escolha do eletrólito de trabalho, a avaliação do pH do eletrólito em função dos valores de pKa dos fármacos e a adição de solventes orgânicos no eletrólito. Foram avaliados o tampão fosfato de sódio e o acetato de sódio nas concentrações de 15 a 50 mmol L<sup>-1</sup> e os valores de pH foram variados entre 4,0 e 10,0. A adição de metanol foi estudada nas concentrações de 5 a 25%.

Após a etapa da otimização das condições do eletrólito de trabalho para a separação dos fármacos sintético por CZE foi feita a otimização dos parâmetros operacionais: injeção da amostra, potencial de separação e, do parâmetro de detecção por condutividade: frequência de operação do detector. Os tempos de injeção foram avaliados em 60 e 120 s para as alturas de 10 a 25 cm, o potencial de separação foi estudado em quatro diferentes potenciais (5, 10, 15, 20 kV) e a frequência do detector foi estudada de 200 a 1000 kHz.

#### 4.4.4 Validação do método desenvolvido

A validação do método proposto no presente trabalho foi baseada em algumas fontes bibliográficas (BRASIL, 2003; ICH, 2005; USP 35, 2012).

a) Linearidade: avaliada através da análise de variância (ANOVA). Foram determinadas seis concentrações dos fármacos e os testes foram realizados em três dias diferentes para cada fármaco. As concentrações utilizadas para a determinação da faixa linear foram de 10, 20, 50, 75, 100 e 150 mg L<sup>-1</sup> para metformina, gliclazida e clorpropamida e, 10, 20, 30, 40, 50 e 60 mg L<sup>-1</sup> para glibenclamida. Estas soluções foram preparadas a partir da diluição das soluções estoque (1000 mg L<sup>-1</sup>) em metanol.

b) Precisão: foi avaliada como uma porcentagem de recuperação, obtida a partir da análise de amostras contendo quantidades conhecidas de substâncias hipoglicemiantes de referência e pelo teste F. Avaliada a partir de seis determinações a 100% da concentração de

trabalho em um mesmo dia, sob as mesmas condições (intra-dia) e em três dias diferentes (inter-dia). Os fármacos metformina, gliclazida e clorpropamida foram analisados na concentração de 100 mg L<sup>-1</sup> e a glibenclamida na concentração de 50mg L<sup>-1</sup>, preparadas a partir da diluição das soluções estoque (1000 mg L<sup>-1</sup>) em metanol.

c) Exatidão: foi determinada através do teste de recuperação, sendo expressa como percentual de recuperação. Foram realizadas três determinações de cada concentração. A amostra foi contaminada com o fármaco sintético, na concentração de 25 mg L<sup>-1</sup>, antes do processo de extração com metanol. Em seguida, as demais concentrações, foram preparadas a partir da amostra contaminada. As concentrações dos fármacos adicionadas às amostras foram 25,00; 34,92; 44,68 e 54,12 mg L<sup>-1</sup>. As percentagens de recuperação (R%) foram calculadas pela expressão:

$$R\% = [(CF - CNF) / CP].100$$

Onde:

CF = concentração do fármaco encontrado na amostra adicionada de padrão

CNF = concentração de fármaco encontrado na amostra não adicionada de padrão

CP = concentração de padrão adicionado à amostra.

d) Especificidade: foi avaliada através do estudo de outros fármacos sintéticos como interferentes na análise dos hipoglicemiantes. Os fármacos estudados como interferentes foram os anorexígenos (anfepirazona, femproporex e sibutramina) e os diuréticos (amilorida, furosemida, hidroclorotiazida e clortalidona). Os interferentes estudados foram adicionados na concentração de 50mg L<sup>-1</sup> a solução padrão dos fármacos hipoglicemiantes.

e) Limite de quantificação (LQ): representa a menor concentração da substância em exame que pode ser quantificada com um certo limite de confiabilidade utilizando um determinado procedimento experimental. Os limites de quantificação foram calculados a partir da fórmula descrita no ICH (1996), que utiliza o desvio padrão do intercepto e inclinação da curva padrão:

$$LQ = 10\sigma / IC$$

Onde:

$\sigma$  = desvio padrão do intercepto da curva padrão

IC = inclinação da curva padrão

f) Limite de detecção (LD): representa a menor concentração da substância em exame que pode ser detectada com um certo limite de confiabilidade utilizando um determinado procedimento experimental. Os limites de detecção foram calculados através da fórmula descrita no ICH (1996), baseado no desvio padrão do intercepto e a inclinação da curva padrão:

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

Onde:

$\sigma$  = desvio padrão do intercepto da curva padrão

IC = inclinação da curva padrão

#### 4.4.5 Aplicação analítica

O método desenvolvido por CZE-C<sup>4</sup>D foi aplicado na determinação dos quatro fármacos hipoglicemiantes em amostras de formulações herbáceas usadas no tratamento da Diabetes mellitus, com o intuito de verificar a aplicabilidade do método para determinação de adulterantes em amostras reais. As formulações herbáceas foram adquiridas em farmácias de manipulação do estado do Rio Grande do Sul.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 5.1 Otimização da separação de hipoglicemiantes em formulações farmacêuticas por eletroforese capilar

Inicialmente, a otimização do método eletroforético envolveu a escolha do eletrólito de trabalho. Foram avaliados o tampão fosfato de sódio e o acetato de sódio para a separação

dos fármacos estudados. A baixa solubilidade dos hipoglicemiantes em água limita a escolha dos eletrólitos, pois pode ocasionar a queda de corrente após a corrida analítica devido à precipitação dos fármacos no interior do capilar. Sendo assim, optou-se pelo uso do acetato de sódio como eletrólito de trabalho, uma vez que este aumenta a solubilidade dos fármacos em água, reduzindo a queda de corrente.

Como tentativa para melhorar a solubilidade dos fármacos no eletrólito, fez-se o uso de solventes orgânicos. A adição de metanol foi estudada nas concentrações de 5 a 25%. Observou-se que quanto maior a concentração de metanol adicionada ao eletrólito de trabalho, melhor a resolução dos picos e maior o tempo de migração das espécies. Entretanto, a adição de metanol no acetato de sódio não foi satisfatória, uma vez que o acetato, em certas concentrações, precipita com acetato, facilitando a queda de corrente durante as corridas e o aumento de ruídos na linha base.

Após a escolha do eletrólito de trabalho, passou-se ao estudo do pH do eletrólito. Nesta etapa, uma ampla faixa de pH foi investigada devido a variabilidade dos valores de  $pK_a$  dos fármacos em estudo. Os valores de pH foram variados entre 4,0 e 10,0, como pode ser visto na figura 2. Os resultados obtidos para os quatro fármacos estudados mostraram que a variação do pH influencia no aparecimento dos picos e nos tempos de migração obtidos.

Primeiramente, foi testada a possibilidade de separar os fármacos na sua forma protonada. No entanto, os picos eletroforéticos da glibenclamida e clorpropamida não foram observados no intervalo de pH entre 4,0 e 7,0, ocorrendo o mesmo para a gliclazida no intervalo de pH entre 4,0 e 6,0. Por outro lado, o pico da metformina pode ser observado em valores de pH maiores que 4,0. O pH 10,0 foi escolhido como ideal, uma vez que este permitiu a separação e detecção de todos os adulterantes por condutividade sem contato, em um tempo de corrida menor.

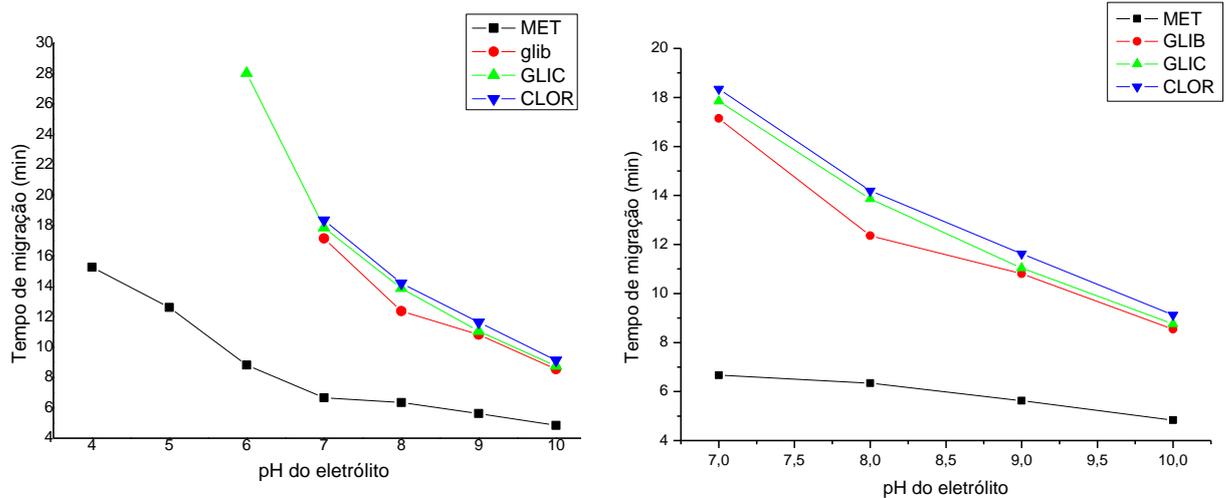
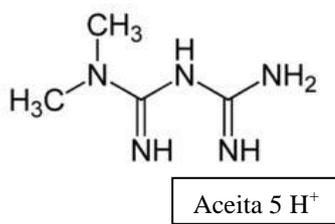
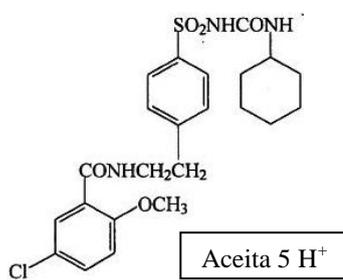
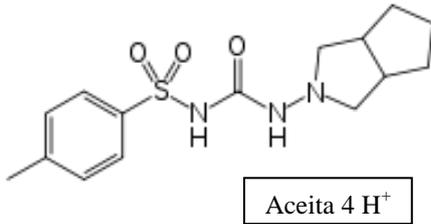
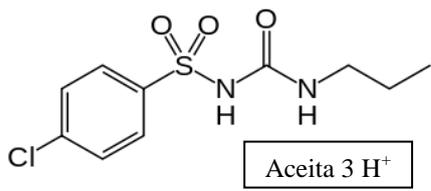


Figura 2 – Efeito da variação do pH do eletrólito de trabalho no tempo de migração dos fármacos sintéticos, para valores de pH entre 4,0 e 10,0. Condições: fármacos nas concentrações de  $50 \text{ mg L}^{-1}$  (glibenclamida) e  $100 \text{ mg L}^{-1}$  (metformina, gliclazida e clorpropamida); eletrólito de trabalho acetato de sódio  $50 \text{ mmol L}^{-1}$ ; potencial de separação - 15 Kv; capilar de sílica fundida  $75 \text{ } \mu\text{m} \times 360 \text{ } \mu\text{m} \times 68 \text{ cm}$  (46 cm até o detector); detecção: indireta  $\text{C}^4\text{D}$  operando em, 600 kHz e 2Vpp; temperatura:  $25^\circ\text{C}$ ; injeção da amostra: hidrodinâmica por gravidade (20 cm durante 60 s).

Os fármacos estudados têm vários grupos funcionais que podem aceitar íons hidrogênio, o que torna possível estarem na forma protonada em valores de pH entre 7,0 e 10,0. Este fato pode explicar a separação dos fármacos em pH 10,0 usando detecção no lado catódico do sistema eletroforético. Além disso, sabe-se que acima de pH 8,0 o fluxo eletrosmótico (EOF) tem uma grande magnitude. Como consequência, o EOF é dirigido para o cátodo e os cátions orgânicos são, também, carregados no capilar pelo EOF existente.

As doses diárias recomendadas, as estruturas e o  $\text{pK}_a$  dos hipoglicemiantes estudados, estão na tabela 5.

Tabela 5 – Hipoglicemiantes pesquisados, como suas respectivas doses diárias, estruturas e  $pK_a$ .

Fármaco sintético	Doses diárias (mg)	Estrutura	$pK_a$
Metformina	500 – 2550		2,8 12,4
Glibenclamida	5 – 20		5,3 6,3 13,72*
Gliclazida	80 – 320		5,98 7,8 14,13*
Clorpropamida	125 – 500		4,8 – 5,0 17,07*

Valores preditos (fonte: <http://www.drugbank.ca>)

Sendo assim, passou-se para o estudo da concentração do eletrólito de trabalho. O acetato de sódio foi avaliado nas concentrações de 15 a 50  $\text{mmol L}^{-1}$ , como mostrado na figura 3. Pode-se observar que os tempos de migração não apresentaram grandes variações nas concentrações testadas. Entretanto, observou-se que a áreas dos picos diminuem conforme aumenta a concentração do acetato. A concentração de 20  $\text{mmol L}^{-1}$  foi a de escolha, pois se mostrou mais satisfatória dentre as concentrações estudadas. Dessa forma, obteve-se as condições do eletrólito de trabalho otimizadas, as quais foram acetato de sódio 20  $\text{mmol L}^{-1}$  em pH 10,0.

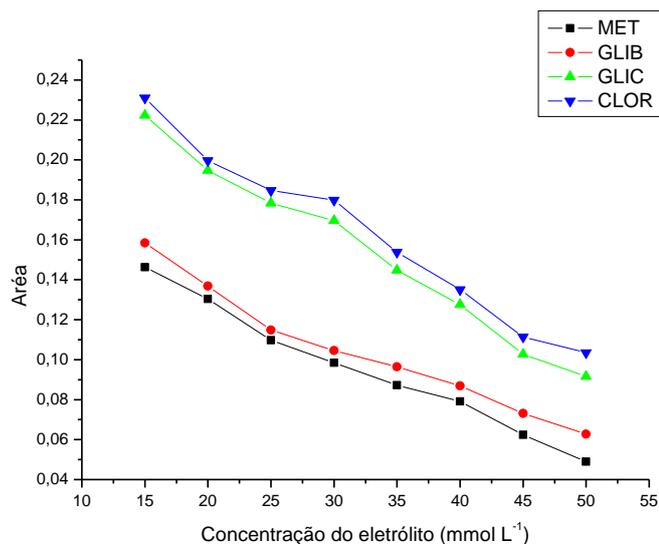


Figura 3 – Efeito da concentração do eletrólito de trabalho acetato de sódio na área dos picos dos fármacos sintéticos, para valores de 15 a 50 mmol L<sup>-1</sup>. Condições: fármacos nas concentrações de 50 mg L<sup>-1</sup> (glibenclamida) e 100 mg L<sup>-1</sup> (metformina, gliclazida e clorpropamida); eletrólito de trabalho acetato de sódio pH 10,0; potencial de separação -15 Kv; capilar de sílica fundida 75 μm x 360 μm x 68 cm (46 cm até o detector ); detecção: indireta C<sup>4</sup>D operando em 600 kHz e 2Vpp; temperatura: 25°C; injeção da amostra: hidrodinâmica por gravidade (20 cm durante 60 s).

Após a etapa de otimização das condições do eletrólito de trabalho para a separação dos quatro fármacos, passou-se para a otimização dos parâmetros operacionais como a injeção das amostras, potencial de separação e frequência de operação.

Os tempos de injeção foram avaliados em 60 e 120 s para as alturas de 10 a 25 cm, como pode ser visto na figura 4. Observou-se que quanto maior o tempo e a altura de injeção, maior a quantidade de amostra injetada, refletindo diretamente no aumento da altura e área do pico. Como consequência, foi observada a coeluição de alguns dos picos, já que três dos quatro fármacos estudados saem muito próximos. Levando-se em conta a melhor resolução dos picos, foram escolhidas como condições para a injeção hidrodinâmica por gravidade o tempo de 60s e a altura de 20 cm.

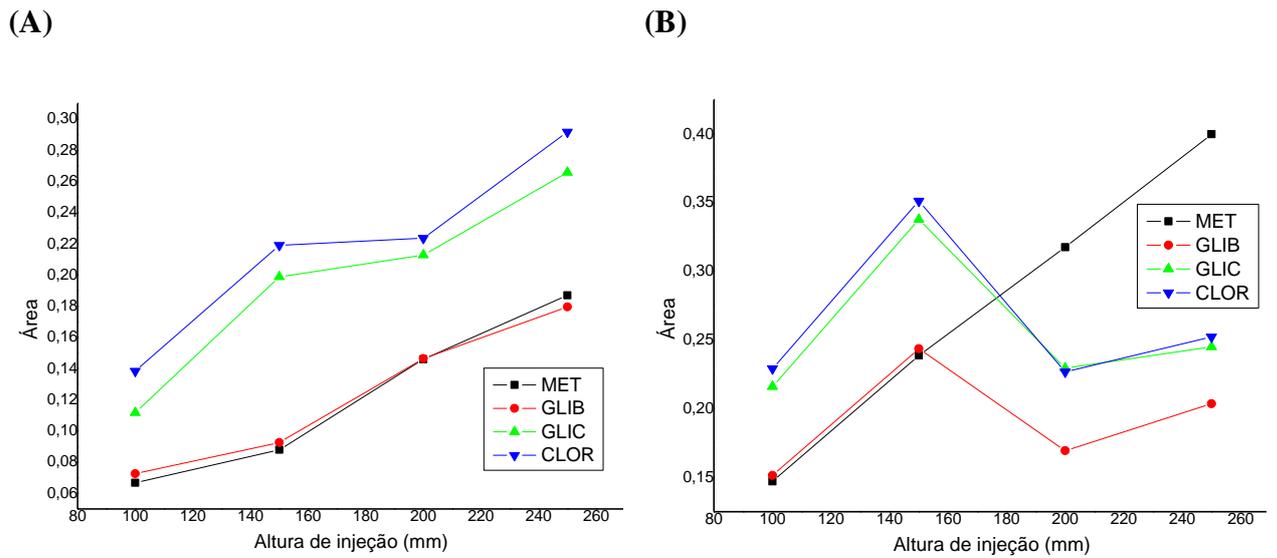


Figura 4 – (A) Efeito da altura para o tempo de injeção de 60 s na área dos picos dos fármacos sintéticos, para valores de 10, 15, 20 e 25 cm. (B) Efeito da altura para o tempo de injeção de 120 s na área dos picos dos fármacos sintéticos, para valores de 10, 15, 20 e 25 cm. Condições: fármacos nas concentrações de  $50 \text{ mg L}^{-1}$  (glibenclamida) e  $100 \text{ mg L}^{-1}$  (metformina, gliclazida e clorpropamida); eletrólito de trabalho acetato de sódio  $20 \text{ mmol L}^{-1}$  pH 10,0; potencial de separação -15 Kv; capilar de sílica fundida  $75 \mu\text{m} \times 360 \mu\text{m} \times 68 \text{ cm}$  (46 cm até o detector); detecção: indireta  $\text{C}^{4}\text{D}$  operando em 600 kHz e 2Vpp; temperatura:  $25^{\circ}\text{C}$ ; injeção da amostra: hidrodinâmica por gravidade.

Com relação às condições de detecção por  $\text{C}^{4}\text{D}$ , foi avaliada a frequência de operação do detector que pode influenciar na relação sinal/ruído de espécies iônicas. A frequência foi estudada de 200 a 1000 kHz (Figura 5) e não apresentou influência significativa na relação sinal/ruído. Optou-se pela frequência de 400 kHz, a qual mostrou relação satisfatória entre área e forma do pico.

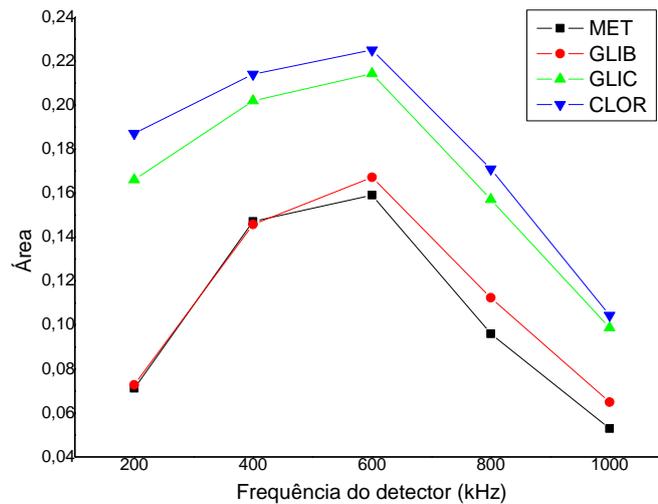


Figura 5 – Efeito da freqüência de operação do detector na área dos picos dos fármacos sintéticos, para valores de 200 a 1000 kHz. Condições: fármacos nas concentrações de 50 mg L<sup>-1</sup> (glibenclamida) e 100 mg L<sup>-1</sup> (metformina, gliclazida e clorpropamida); eletrólito de trabalho acetato de sódio 20 mmol L<sup>-1</sup> pH 10,0; potencial de separação -15 Kv; capilar de sílica fundida 75 µm x 360 µm x 68 cm (46 cm até o detector ); detecção: indireta C<sup>4</sup>D operando em 2Vpp; temperatura: 25°C; injeção da amostra: hidrodinâmica por gravidade (20 cm durante 60 s).

Sendo assim, o potencial de separação foi estudado em quatro diferentes potenciais (5, 10, 15, 20 kV) (Figura 6) e, como esperado, quanto maior o potencial aplicado, menor o tempo de migração dos fármacos. Para melhor avaliação do potencial, foram estudados os potenciais entre -10 e -15 kV (Figura 7), sendo que o potencial de -15 Kv mostrou uma boa estabilidade da linha base e uma melhor resolução dos picos dos fármacos estudados.

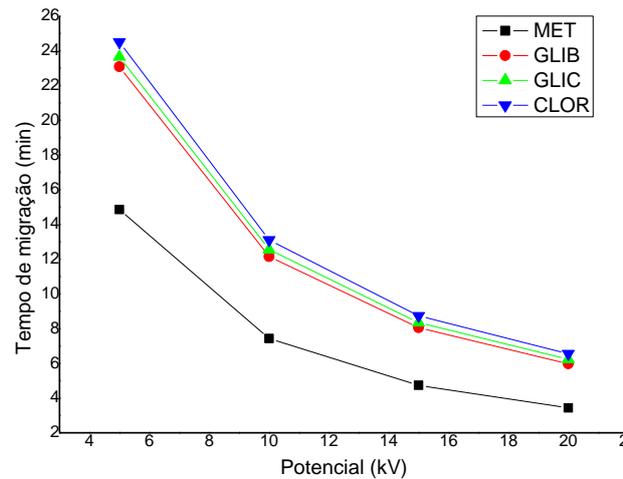


Figura 6 – Efeito do potencial de separação nos tempos de migração dos fármacos sintéticos, para valores de 5, 10, 15 e 20 Kv. Condições: fármacos nas concentrações de  $50 \text{ mg L}^{-1}$  (glibenclamida) e  $100 \text{ mg L}^{-1}$  (metformina, gliclazida e clorpropamida); eletrólito de trabalho acetato de sódio  $20 \text{ mmol L}^{-1}$  pH 10,0; capilar de sílica fundida  $75 \mu\text{m} \times 360 \mu\text{m} \times 68 \text{ cm}$  (46 cm até o detector); detecção: indireta  $\text{C}^4\text{D}$  operando em 400 kHz e 2Vpp; temperatura:  $25^\circ\text{C}$ ; injeção da amostra: hidrodinâmica por gravidade (20 cm durante 60 s).

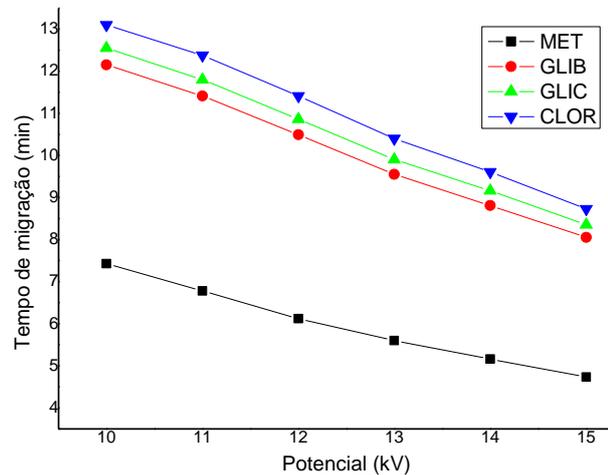


Figura 7 – Efeito do potencial de separação nos tempos de migração dos fármacos sintéticos, para valores de 10 a 15 Kv. Condições: fármacos nas concentrações de  $50 \text{ mg L}^{-1}$  (glibenclamida) e  $100 \text{ mg L}^{-1}$  (metformina, gliclazida e clorpropamida); eletrólito de trabalho acetato de sódio  $20 \text{ mmol L}^{-1}$  pH 10,0; capilar de sílica fundida  $75 \mu\text{m} \times 360 \mu\text{m} \times 68 \text{ cm}$  (46 cm até o detector); detecção: indireta  $\text{C}^4\text{D}$  operando em 400 kHz e 2Vpp; temperatura:  $25^\circ\text{C}$ ; injeção da amostra: hidrodinâmica por gravidade (20 cm durante 60 s).

As condições otimizadas para a determinação de adulterantes em formulações herbáceas por CZE-C<sup>4</sup>D foram as seguintes: eletrólito de trabalho acetato de sódio 20 mmol L<sup>-1</sup> (pH 10,0), potencial de separação - 15 kV, frequência de operação do detector 400 kHz e injeção por gravidade de 20 cm por 60 s. A figura 8 mostra o eletroferograma da separação dos quatro adulterantes sob as condições otimizadas.

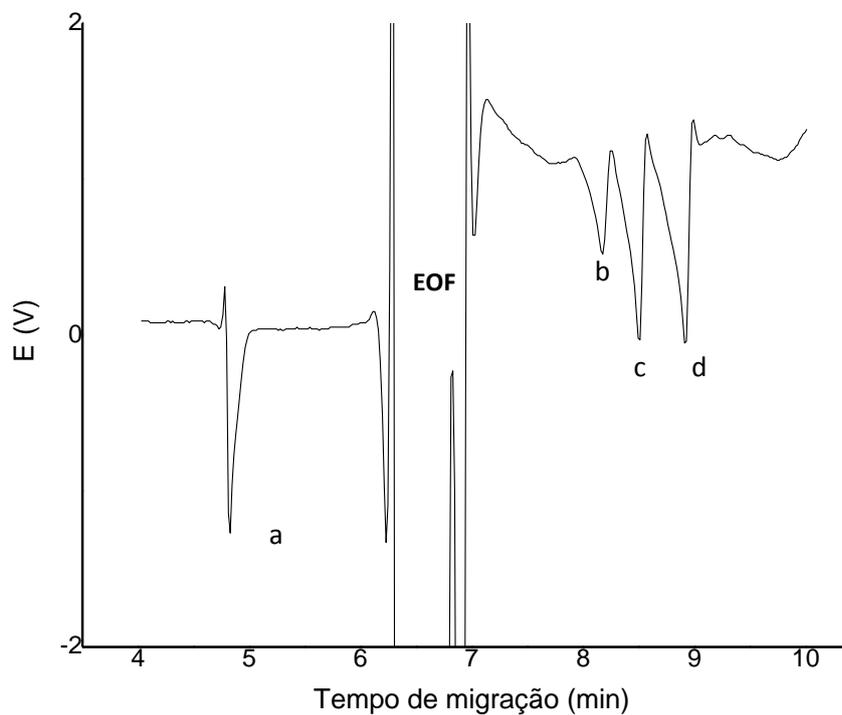


Figura 8 – Eletroferograma dos adulterantes (a) metformina 100 mg L<sup>-1</sup>, (b) glibenclamida 50 mg L<sup>-1</sup>, (c) gliclazida 100 mg L<sup>-1</sup>, (d) clorpropamida 100 mg L<sup>-1</sup>. Condições: eletrólito de trabalho acetato de sódio 20 mmol L<sup>-1</sup> pH 10,0; potencial de separação -15 Kv; capilar de sílica fundida 75 µm x 360 µm x 68 cm (46 cm até o detector); detecção: indireta C<sup>4</sup>D operando em 400 kHz e 2Vpp; temperatura: 25°C; injeção da amostra: hidrodinâmica por gravidade (20 cm durante 120 s).

## 5.2 Validação do método desenvolvido

O método de CZE-C<sup>4</sup>D desenvolvido no presente trabalho foi avaliado em relação aos seguintes parâmetros de validação: especificidade, linearidade, limite de quantificação, limite de detecção, precisão e exatidão.

A especificidade de um método analítico representa sua capacidade de sofrer a influência única e exclusiva da substância que se quer analisar. Pode-se avaliar este parâmetro estudando outros fármacos sintéticos como interferentes na análise dos hipoglicemiantes. Os interferentes estudados foram os anorexígenos femproporex, anfepramona e sibutramina; e os diuréticos hidroclorotiazida, furosemida, amilorida e clortalidona. Os diuréticos foram escolhidos devido a semelhança das suas estruturas com as dos hipoglicemiantes, já os anorexígenos foram escolhidos devido a possibilidade associação com os hipoglicemiantes com a finalidade de emagrecimento.

Entre os sete possíveis interferentes aqui estudados, apenas três foram detectados pelo método CZE-C<sup>4</sup>D: clortalidona, furosemida e amilorida, sendo que apenas uma coeluição foi observada entre clorpropamida e furosemida. No entanto, a presença de ambos os fármacos como adulterantes em formulações herbáceas não foi descrita na literatura até o momento, sendo também bastante improvável a associação destes medicamentos em formulações para o tratamento do diabetes. Os outros fármacos estudados como interferentes provavelmente não foram detectados porque em pH 10,0 eles não estão bem ionizados e/ou coeluem com o EOF, principalmente na sua forma neutra, assim pode-se dizer que o método apresenta especificidade mesmo na presença destas outras substâncias.

Os dados da linearidade foram validados pela análise de variância (ANOVA), que demonstrou regressão linear significativa e nenhum desvio da linearidade significativo ( $P < 0,05$ ). Os dados referentes ao tratamento estatístico sobre os valores experimentais obtidos para a curva padrão, através da análise de variância, encontram-se na tabela 5.

A sensibilidade foi avaliada através da determinação dos limites de detecção e de quantificação dos fármacos hipoglicemiantes no sistema eletroforético empregado. Determinaram-se esses limites utilizando as equações descritas no item 4.4.4 letras (e) e (f). A tabela 6 apresenta os resultados obtidos da validação do método desenvolvido. O método proposto apresentou baixos limites de detecção (2,02 a 5,77  $\mu\text{g/mL}$ ) para a avaliação dos fármacos sintéticos como adulterantes em formulações herbáceas e, estes fármacos podem ser quantificados entre 6,11  $\mu\text{g/mL}$  e 17,49  $\mu\text{g/mL}$ .

A precisão foi avaliada como uma porcentagem de recuperação obtido a partir da análise de amostras contendo quantidades conhecidas de substâncias hipoglicemiantes de referência e pelo teste F. A precisão do método analítico foi demonstrada pela repetibilidade (intra-dia) e precisão inter-dias (3 dias). Os DPR foram 0,57, 0,89, 0,17 e 0,41, respectivamente, para a metformina, glibenclamida, gliclazida e clorpropamida. Os valores de F calculados foram 1,83; 0,96; 1,69 e 0,28; respectivamente para metformina, glibenclamida, gliclazida e clorpropamida (valor de F tabelado: 4,26), indicando que não houve diferença significativa entre os resultados obtidos em dias diferentes.

A exatidão do método (Tabela 7) mostrou-se aceitável para a determinação e quantificação dos fármacos estudados, como adulterantes, em formulações herbáreas. Os valores de recuperação dos fármacos variaram de 94,12 a 103,38%.

Tabela 6 – Parâmetros de regressão, resultados da análise de variância e apresentação dos limites de quantificação e detecção para quantificação de metformina, glibenclamida, gliclazida e clorpropamida por CZE – C<sup>4</sup>D.

Parâmetros	metformina <sup>a</sup>	Glibenclamida <sup>a</sup>	Glicazida <sup>a</sup>	Clorpropamida <sup>a</sup>
Faixa de concentração linear	10 – 150 (µg /mL)	10 – 60 (µg /mL)	10 – 150 (µg /mL)	10 – 150 (µg /mL)
Inclinação ± desvio padrão	0,0017 ± 0,00002	0,0026 ± 0,000041	0,0019 ± 0,000031	0,0020 ± 0,000041
Intercepto ± desvio padrão	-0,0037 ± 0,002	-0,0086 ± 0,002	0,0004 ± 0,003	0,0022 ± 0,003
Coefficiente de Correlação (r)	0,9994	0,9990	0,9989	0,9982
Análise de variância				
Regressão linear <sup>b</sup>	4275,6 (4,75)	9072,86 (4,75)	8842,1 (4,75)	5849,2 (4,75)
Desvio da Linearidade <sup>b</sup>	0,59 (3,26)	2,22 (3,26)	2,39 (3,26)	2,61 (3,26)
Limites				
LQ	9,73 (µg/mL)	6,09 (µg/mL)	13,52 (µg/mL)	17,49 (µg/mL)
LD	3,21 (µg/mL)	2,01 (µg/mL)	4,46 (µg/mL)	5,77 (µg/mL)

<sup>a</sup> Dados obtidos a partir de três curvas padrões

<sup>b</sup> Valores em parênteses correspondem aos valores críticos de *F* para *P* = 0,05

Tabela 7 – Resultados obtidos no teste de recuperação em produtos fitoterápicos através de CZE.

Produto	Quantidade de fármaco		% Recuperação <sup>b</sup>
	Adicionada µg/mL	Recuperada µg/mL <sup>a</sup>	
Metformina	25,00	24,06	96,24 ± 0,71
	34,92	33,95	97,22 ± 0,82
	44,68	43,26	96,82 ± 1,04
	54,12	54,64	100,96 ± 0,95
glibenclamida	25,00	23,53	94,12 ± 0,93
	34,92	37,79	96,79 ± 1,08
	44,68	42,74	95,66 ± 1,03
	54,12	55,94	103,38 ± 0,95
Gliclazida	25,00	24,03	96,12 ± 1,12
	34,92	34,11	97,70 ± 1,05
	44,68	44,58	99,79 ± 0,87
	54,12	53,32	98,52 ± 1,07
clorpropamida	25,00	23,57	94,28 ± 0,89
	34,92	33,68	96,47 ± 0,97
	44,68	43,07	96,41 ± 0,92
	54,12	54,03	99,85 ± 1,05

<sup>a</sup> Cada valor é a média de três determinações

<sup>b</sup> Valores ± DP (n=3)

### 5.3 Aplicação do método desenvolvido em amostras reais

#### 5.3.1 Amostragem e panorama do consumo de produtos naturais para o diabetes mellitus no Brasil

A amostragem foi realizada com o objetivo de traçar um panorama do consumo de produtos naturais utilizados para o tratamento do diabetes no Brasil. A distribuição das farmácias por estado pode ser visualizada na figura 9. Pode-se observar que os estados do Rio Grande do Sul, São Paulo, Goiás e Rio de Janeiro são os que comercializam um maior número de produtos herbáceos utilizados para o tratamento do diabetes.

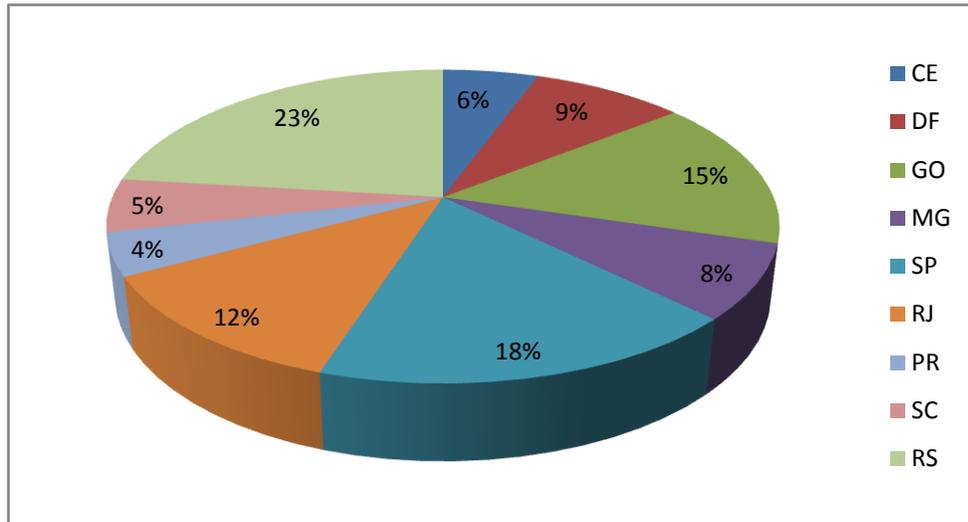


Figura 9 – Distribuição percentual das amostras de formulações herbáceas conforme seu estado de origem

Foi realizado um total de 91 contatos com as farmácias pesquisadas, sendo que desse total 85,7% retornaram ao contato. 50,5% destas farmácias vendem fitoterápicos (cápsulas e/ou extratos) para o tratamento do diabetes, sendo que 29,7% pediram receita médica e 20,8% dispensaram o receituário médico. Do restante das farmácias que responderam ao contato, 16,5% vendem apenas chás e 18,7% não manipulam fitoterápicos para diabetes.

As espécies vegetais comercializadas pelas farmácias, tanto na forma de fitoterápicos como drogas vegetais, ou ambos, provavelmente por terem uma maior procura pelos consumidores, foram quantificados e esquematizados no gráfico a seguir (Figura 10).

Através do gráfico pode-se perceber a prevalência de algumas espécies sobre outras, evidenciadas através do maior número de farmácias que as comercializam. Os princípios ativos, isolados ou em associações, mais utilizados em fitoterápicos hipoglicemiantes são pata de vaca, insulina vegetal, berinjela, gymnema silvestre, farinha de banana verde, farinha de maracujá, jambolão, carqueja, alcachofra e garcínea.

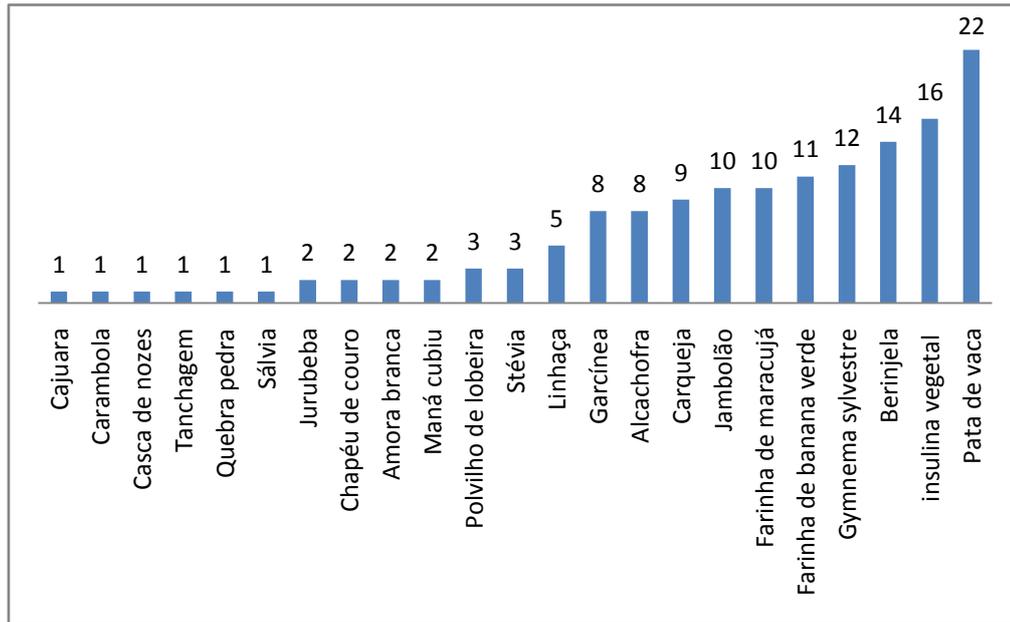


Figura 10 – Distribuição das espécies vegetais, isoladas ou em associação, encontradas em medicamentos naturais hipoglicemiantes no Brasil.

### 5.3.2 Análise das formulações por eletroforese capilar

Doze amostras de fitoterápicos hipoglicemiantes foram analisadas pelo método desenvolvido por CZE-C<sup>4</sup>D, com o intuito de verificar casos de adulteração com substâncias sintéticas e avaliar a aplicabilidade do método em amostras reais.

Foram selecionados fitoterápicos a base de gymnema silvestre, pata de vaca, carqueja, pedra ume, alcachofra, jambolão, berinjela e garcínea, adquiridos em farmácias de manipulação. A análise das amostras foi feita através de um *screening* em cada uma das doze amostras, com o objetivo de identificar a adulteração com os fármacos sintéticos estudados. As amostras suspeitas passaram por uma etapa de confirmação, porém nenhum caso de adulteração com fármacos sintéticos foi confirmado (Figura 11). Portanto, das doze amostras submetidas à análise pelo método CZE-C<sup>4</sup>D, nenhuma apresentou adulteração com os fármacos sintéticos estudados.

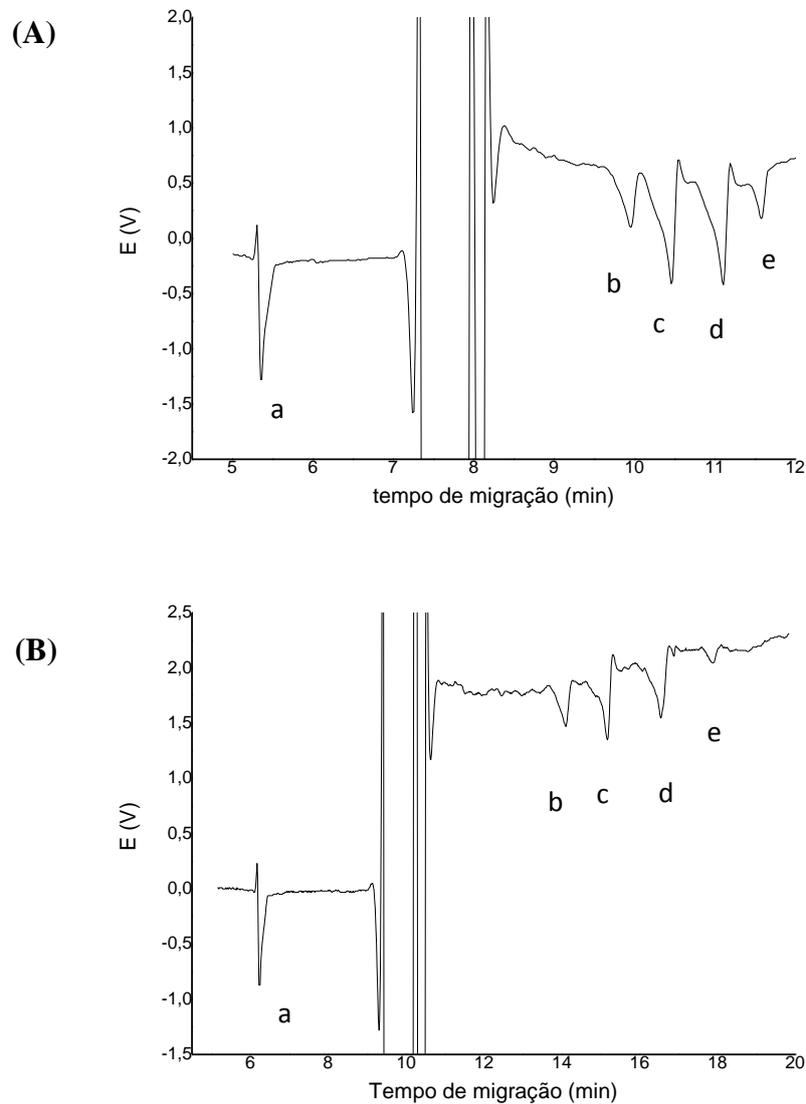


Figura 11 – (A) Amostra 3: Eletroferograma da amostra fitoterápica contendo os adulterantes adicionados (*spike*) (a) metformina  $100 \text{ mg L}^{-1}$ , (b) glibenclamida  $50 \text{ mg L}^{-1}$ , (c) gliclazida  $100 \text{ mg L}^{-1}$ , (d) clorpropamida  $100 \text{ mg L}^{-1}$ , (e) pico da amostra. (B) Amostra 6: Eletroferograma da amostra fitoterápica contendo os adulterantes adicionados (*spike*) (a) metformina  $100 \text{ mg L}^{-1}$ , (b) glibenclamida  $50 \text{ mg L}^{-1}$ , (c) gliclazida  $100 \text{ mg L}^{-1}$ , (d) clorpropamida  $100 \text{ mg L}^{-1}$ , (e) pico da amostra. Condições: eletrólito de trabalho acetato de sódio  $20 \text{ mmol L}^{-1}$  pH 10,0; potencial de separação  $-15 \text{ Kv}$ ; capilar de sílica fundida  $75 \mu\text{m} \times 360 \mu\text{m} \times 68 \text{ cm}$  (46 cm até o detector); detecção: indireta  $\text{C}^4\text{D}$  operando em  $400 \text{ kHz}$  e  $2\text{Vpp}$ ; temperatura:  $25^\circ\text{C}$ ; injeção da amostra: hidrodinâmica por gravidade (20 cm durante 120 s).

Como pode-ser observar na figura 11, o método desenvolvido permite a identificação dos adulterantes estudados nas amostras após a solubilização da formulação seguida da etapa de filtração. A matriz da amostra não interfere na identificação e determinação dos fármacos estudados baseado no tempo de migração e no método da adição do padrão (substância química de referência). O mesmo comportamento eletroforético mostrado na figura 15 foi observado em todas as amostras analisadas.

## 6 CONCLUSÕES

O método por CZE desenvolvido mostrou-se adequado para a determinação simultânea dos fármacos metformina, glibenclamida, gliclazida e clorpropamida, devido à adequada separação dos fármacos estudados, a alta resolução, o curto tempo de análise e, o baixo consumo de reagentes e amostras. O método apresentou uma ampla faixa linear de trabalho (para glibenclamida de 10 a 60  $\mu\text{g/mL}$ , para metformina, gliclazida e clorpropamida de 10 a 150  $\mu\text{g/mL}$ ), baixos limites de detecção (2,02 a 5,77  $\mu\text{g/mL}$ ), exatidão (94,12 a 103,38%), precisão e especificidade.

Através da pesquisa realizada para a aquisição das amostras, foi possível verificar que os princípios ativos mais utilizados em formulações herbáreas hipoglicemiantes são pata de vaca, insulina vegetal, berinjela, gymnema silvestre, farinha de banana verde, farinha de maracujá, jambolão, carqueja, alcachofra e garcínea.

Doze amostras foram submetidas à análise pelo método CZE-C<sup>4</sup>D e nenhuma apresentou adulteração com os fármacos sintéticos estudados. No entanto, o método proposto para a determinação simultânea dos hipoglicemiantes mostrou-se útil e aplicável em amostras reais, visto que, se alguma das amostras estivesse realmente adulterada, o método poderia identificar esta adulteração.

O método permite a identificação dos adulterantes e sua quantificação a partir de 0,24 mg para a metformina, 0,15 mg para a glibenclamida, 0,33 mg para a gliclazida e 0,24 mg para a clorpropamida. Sendo que as doses mínimas diárias para glibenclamida, gliclazida, clorpropamida e metformina são respectivamente 5 mg, 80 mg, 125 mg e 500 mg, portanto o método desenvolvido é uma alternativa rápida e confiável para a triagem de hipoglicemiantes em produtos herbáceos, o que pode contribuir para a melhoria do controle de qualidade e critérios de comercialização para estes produtos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANASTOS, N.; BARNETT, N. W.; LEWIS, S. W. Capillary electrophoresis for forensic drug analysis: A review. **Talanta**, v. 67, p. 269-279, 2005.

BELTRAME, F. L. et al. Estudo fitoquímico e avaliação do potencial anti-diabético do *Cissus Sycioides* L. (Vitaceae). **Química Nova**, n. 24, p. 783-785, 2001.

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

BORGES, K.B.; BAUTISTA, H. B.; GUILERA, S. Diabetes-Utilização de plantas medicinais como forma opcional de tratamento. **Revista eletrônica de farmácia**, v. 5, n. 2, p. 12-20, 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 17 de 24 de fevereiro de 2000. D.O.U., Poder Executivo, Brasília, DF, 25 fev. 2000.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE 899, de 29 de maio de 2003. D.O.U., Poder Executivo, Brasília, DF, 02 jun. 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 14 de 31 de março de 2010. D.O.U., Poder Executivo, Brasília, DF, 5 abr. 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Farmacopéia Brasileira 5 ed. Brasília: Fiocruz, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Consulta Pública nº 35, de 12 de junho de 2009. D.O.U. 23 jun. 2009. Disponível em: <http://www4.anvisa.gov.br/base/visadoc/CP/CP%5B26836-1-0%5D.PDF>. Acesso em: 13 de julho de 2012.

CARVALHO, A. C. B.; DINIZ, M. F. F. M.; MUKHERJEE, R. Estudos da atividade antidiabética de algumas plantas de uso popular contra o diabetes no Brasil. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 86, p. 11-16, 2005.

CARVALHO, L. M. et al. Determination of synthetic pharmaceuticals in phytotherapeutics by capillary zone electrophoresis with contactless conductivity detection (CE-C<sup>4</sup>D). **Microchemical Journal**, v. 96, p. 114-119, 2010.

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

CHING et al. Adulteration of herbal antidiabetic products with undeclared pharmaceuticals: a case series in Hong Kong. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 73, n. 5, p. 795-800, 2011.

CUI, M. et al. Simultaneous Determination of 14 Illegal Adulterants in Chinese Proprietary Medicines Using Reversed-Phase Ion-Pair LC; **Chromatographia**, v. 72, p.1189, 2010.

DEY, L; ATTELE, A. S.; YUAN, C. S. et al. Alternative Therapies for Type 2 Diabetes. **Alternative Medicine Review**, v. 7, n 1, p. 45-58, 2002.

ENGEL, L.W.; STRAUS, S.E. Development of therapeutics: opportunities within complementary and alternative medicine. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 1, p. 229–237, 2002.

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

GOODMAN, L. S.; GILMAN, A (Trad. COSENDEY, C. H. A. et al). **As bases farmacológicas da terapêutica**. 11 ed., Porto Alegre: AMGH, 2010.

GOUDIE, A. M.; KAYE, J. M. Contaminated medication precipitating hypoglycemia. **Medical Journal Australia**, v.175, n. 5, p. 256–257, 2001.

HERMAN, W. H.; CROFFORD, O. B. **The relationship between diabetic control and complications**. In J. C. Pickup & G. Williams (Eds.), *Textbook of diabetes* (pp. 41.1-41.11). Oxford: Blackwell Scientific. 1997.

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

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

JAGER, A. V.; TAVARES, M. F. M. Determinação simultânea de cátions por eletroforese capilar: fundamentos e aplicações. **Química Nova**, v. 24, n. 3, p. 363-373, 2001.

JUNG, J.; HERMANN-CLAUSEN, M.; WEINMANN, W. Anorectic sibutramine detected in a Chinese herbal drug for weight loss. **Forensic Science International**, v. 161, n. 2, p. 221-222, 2006.

KESTING, J. R.; HUANG, J.; SORENSEN, D. Identification of adulterants in a Chinese herbal medicine by LC-HRMS and LC-MS-SPE/NMR and comparative in vivo study with standards in a hypertensive rat model. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 51, n. 3, p. 705-711, 2010.

KOH, H. W.; WOO, S. O. Chinese proprietary medicine in Singapore. Regulatory control of toxic heavy metals and undeclared drugs. **Drug Safety**, v. 23, n. 5, p. 351-362, 2000.

KU, Y. R. et al. Analysis of synthetic anti-diabetic drugs in adulterated traditional Chinese medicines by high-performance capillary electrophoresis. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 33, n. 2, p. 329-334, 2003.

KUBAN, P.; HAUSER, P. A review of the recent achievements in capacitively coupled contactless conductivity detection. **Analytica Chimica Acta**, v. 607, p. 15-29, 2008.

LAMEIRA, O. A.; PINTO, J. E. B. P. **Plantas medicinais: do cultivo, manipulação e uso à recomendação popular**. Belém, Pará: Embrapa Amazônia Oriental, 2008.

LI, N. et al. A rapid and reliable UPLC-MS/MS method for the identification and quantification of fourteen synthetic anti-diabetic drugs in adulterated Chinese proprietary medicines and dietary supplements. **Biomedical Chromatography**, v. 24, n. 11, p. 1255-1261, 2010.

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.

LOW, M. Y. et al. Safety and quality assessment of 175 illegal sexual enhancement products seized in red-light districts in Singapore; **Drugs Safety**, v. 32, p. 1141, 2009.

NATIONAL INSTITUTE FOR PUBLIC HEALTH AND THE ENVIRONMENT. **Trends in drug substances detected in illegal weightloss medicines and dietary supplements - A 2002–2007 survey and health risk analysis.** Disponível em: <<http://www.rivm.nl/bibliotheek/rapporten/370030002.pdf>>. Acesso em: 10 junho 2012.

NEGRI, G. Diabetes mellitos: plantas e princípios ativos hipoglicemiantes. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n. 2, 2005

PADINJAKARA, R. N. K. et al. Herbal Remedy for Diabetes: Two Case reports. **Experimental and Clinical Endocrinology and Diabetes**, v. 117, n. 1, p. 3-5, 2009.

PANG, W. et al. LC-MS–MS in MRM Mode for Detection and Structural Identification of Synthetic Hypoglycemic Drugs Added Illegally to ‘Natural’ Anti-Diabetic Herbal Products. **Chromatographia**, v. 70, n. 9-10, p. 1353–1359, 2009.

RANG, H. P.; DALE, M. M. **Diabetes Mellitus** In RANG HP & DALE MM *Farmacologia*. 2<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 306-311, 1993.

RANG, H. P. et al (Trad. do NASCIMENTO, A. P.); **Farmacologia**, 6<sup>a</sup> ed., Elsevier: Rio de Janeiro, 2007.

SILVA, J. A. F da. **Detecção condutométrica sem contato (oscilométrica) para eletroforese capilar de zona e cromatografia micelar eletrocínética.** 2001. Tese (Doutorado em Química), Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.

SILVA, J. A. F. da. Detecção Eletroquímica em Eletroforese Capilar, **Química Nova**, v. 26, n.1, p. 56–64, 2003.

SILVA, P. **Farmacologia**. 8. ed. Rio de Janeiro : Guanabara Koogan, 2010.

SPENGLER, C. **Determinação simultânea de cátions empregando eletroforese capilar com detecção condutométrica sem contato em equipamento construído em laboratório.** 2009. Dissertação (Mestrado em Química), Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2009.

SWARTZ, M.E.; KRULL, I.S. Validação de métodos cromatográficos. **Journal of pharmacy technology**, v 2, n 3, p.12-20, 1998.

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

TAVARES, M. F. M. Separation mechanisms in capillary electrophoresis. **Química Nova**, v. 20, n. 5, p. 493-511, 1997.

USP 35. **The United States Pharmacopeia 35-NF 30**, 35 ed., United States, 2012.

VIANA, G.S. et al. Hypoglycemic and anti-lipemic effects of the aqueous extract from *Cissus sycioides*. **BMC Pharmacology**, n 4, p. 9-15, 2004.

WAJCBERG, E.; AGUIAR, R. S. B.; OLIVEIRA, J. E. P. Tratamento do diabetes mellitus: medidas não medicamentosas. **ARS CVRANDI**. v. 32, n. 7, p. 29-32, 1999.

WANG, J. et al. Simultaneous of illegal additives in dietary supplements and traditional medicines by high performance liquid chromatographyelectrospray ionization mass spectrometry. **Food and Chemical**, v. 113, n. 227, 2009.

ZHOU, Z. et al. Rapid screening for synthetic antidiabetic drug adulteration in herbal dietary supplements using direct analysis in real time mass spectrometry. **Analyst**. n 136, p. 2613-2618, 2011.