

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

**DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA PARA A
DETERMINAÇÃO DE FARMÁCOS SINTÉTICOS EM
FORMULAÇÕES FITOTERÁPICA EMAGRECEDORAS
EMPREGANDO ELETROFORESE CAPILAR**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Mariele Martini

**Santa Maria, RS, Brasil
2010**

**DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA PARA A
DETERMINAÇÃO DE FARMÁCOS SINTÉTICOS EM
FORMULAÇÕES FITOTERÁPICAS EMAGRECEDORAS
EMPREGANDO ELETROFORESE CAPILAR**

por

Mariele Martini

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

2010

**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 METODOLOGIA PARA A DETERMINAÇÃO
DE FARMÁCOS SINTÉTICOS EM FORMULAÇÕES FITOTERÁPICAS
EMAGRECEDORAS EMPREGANDO ELETROFORESE CAPILAR**

elaborada por
Mariele Martini

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

COMISSÃO EXAMINADORA:

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

Prof. Dr. Claudimir Lucio do Lago (USP)

Prof^a. Dr^a. Andréa Inês Horn Adams (UFSM)

Santa Maria, 23 de fevereiro de 2010.

“Enquanto estivermos tentando, estaremos felizes, lutando pela definição do indefinido, pela conquista do impossível, pelo limite do ilimitado, pela ilusão de viver. Quando o impossível torna-se um desafio, a satisfação está no esforço e não apenas na realização final.”

(Gandhi)

Dedico este trabalho aos meus pais Paulo Juarez Martini e Rosane Jussana Martini e a minha vó Lidia Rieger, pelos esforços, dedicação, incentivo e amor incondicional sempre demonstrados. Sem vocês nada disso teria sido possível, e a minha irmã Litcheri Martini, que onde quer que esteja tenho certeza que esta zelando por mim. Amo vocês.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Leandro Machado de Carvalho, meus sinceros agradecimentos pela oportunidade, pela excelente orientação, pelo apoio, pela paciência e por todas as contribuições para a minha formação pessoal e profissional.

Ao Prof. Dr. Paulo Cícero do Nascimento e a Prof^a. Dr^a. Denise Bohrer do Nascimento pela amizade.

A todos os colegas e amigos do LACHEM, pela convivência, pelo carinho, pela ajuda, pelo apoio e pelo momentos de descontração vividos durante todo esse período.

Gostaria de agradecer em especial ao Luis Ferraz, Alice Raabe, Ana Paula Moreira e a Fernanda Lima, pelo apoio, pelos conselhos, pela ajuda, pela amizade e pelo carinho.

Aos meus pais Paulo Juarez Martini e Rosane Jussana Martini e a minha Vó Lidia Rieger que sempre me apoiaram em cada etapa de minha vida, me ajudando e me incentivando em tudo, meu muito obrigada a vocês.

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 iluminar meus caminhos, me dando força e coragem de seguir em frente!”

RESUMO

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

DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA PARA A DETERMINAÇÃO DE FARMÁCOS SINTÉTICOS EM FORMULAÇÕES FITOTERÁPICAS EMAGRECEDORAS EMPREGANDO ELETROFORESE CAPILAR

AUTORA: MARIELE MARTINI

ORIENTADOR: LEANDRO MACHADO DE CARVALHO

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 23 de fevereiro de 2010.

A adulteração de formulações fitoterápicas emagrecedoras com fármacos sintéticos tem aumentado muito nos últimos anos. Os casos de adulteração têm sido relatados na literatura, comprovando que existe uma maior preocupação com relação a este problema, o que implica no desenvolvimento de metodologias analíticas capazes de detectá-los.

Este trabalho descreve o desenvolvimento de um método para a determinação simultânea de anfepramona, femproporex, sibutramina e fluoxetina empregando eletroforese capilar de zona (CZE) com detecção condutométrica sem contato capacitivamente acoplada (C⁴D), usando um sistema de eletroforese capilar construído em laboratório. As condições otimizadas para a separação dos fármacos por CZE-C⁴D foram as seguintes: eletrólito de trabalho tampão fosfato (pH 5,0) 50 mmol.L⁻¹ contendo acetonitrila 50% (v/v), potencial de separação -15 kV, temperatura de separação 25 °C, injeção hidrodinâmica por gravidade com altura de injeção de 20 cm durante 60 s. A detecção por C⁴D foi realizada usando um detector construído em laboratório, que emprega um gerador de onda senoidal operando a uma frequência de 600 kHz e amplitude de onda de 2 Vpp.

O método de CZE-C⁴D foi validado para a determinação de anfepramona, femproporex, sibutramina e fluoxetina e empregado na análise de formulações fitoterápicas emagrecedoras adquiridas em diferentes farmácias de manipulação na cidade de Santa Maria. Este método mostrou-se adequado na análise dos quatro

fármacos sintéticos estudados, apresentando uma ampla faixa linear de trabalho (10 a 500 mg L⁻¹), baixos limites de detecção (4 a 5 mg L⁻¹), precisão (6 a 9%) e exatidão (95 a 112%). Os ensaios de recuperação realizados promoveram recuperações entre 80 e 120% para os fármacos sintéticos estudados.

O método desenvolvido apresentou alta sensibilidade, seletividade e precisão analítica, podendo ser empregado na determinação destas substâncias como adulterantes em formulações fitoterápicas, tornando-se uma alternativa para órgãos fiscalizadores devido a sua simplicidade, rapidez e baixo custo de análise devido às quantidades reduzidas de reagentes e amostras utilizadas.

Palavras-chaves: Adulterantes, fitoterápicos, eletroforese capilar, detecção por condutividade.

ABSTRACT

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

DEVELOPMENT OF METHODOLOGY FOR THE DETERMINATION OF SYNTHETIC PHARMACEUTICALS IN SLIMMING PHYTOTHERAPEUTIC FORMULATIONS BY CAPILLARY ELECTROPHORESIS

AUTORA: MARIELE MARTINI

ORIENTADOR: LEANDRO MACHADO DE CARVALHO

Date and Local of Defense: Santa Maria, February 23th, 2010.

The adulteration of phytotherapeutic formulations used for weight loss with synthetic pharmaceuticals has been increasing in recent years. The cases of adulteration have been reported in the literature, showing that there is a great concern about this problem, which involves the development of analytical methodologies able to detect them.

This paper describes the development of a method for the simultaneous determination of amfepramone, fenproporex, sibutramine and fluoxetine by using capillary zone electrophoresis (CZE) with capacitively coupled contactless conductivity detection (C⁴D) in a homemade capillary electrophoretic system. The optimized conditions for separation of the pharmaceuticals by CZE-C⁴D were the following: 50 mmol L⁻¹ phosphate buffer (pH 5.0) containing acetonitrile 50% (v/v) as working electrolyte, separation potential of -15 kV, separation temperature of 25 °C, hydrodynamic injection by gravity (20 cm left side elevation for 60 s). The C⁴D detection was performed by using a homemade detector, which employs a sinusoidal wave generator operating at 600 kHz frequency and 2 V_{pp} wave amplitude.

The CZE-C⁴D method was validated for the determination of amfepramone, fenproporex, sibutramine and fluoxetine and it was applied to the analysis of phytotherapeutic formulations used for weight loss, which have been purchased in different commercial pharmacies in the city of Santa Maria. This method was fit in the analysis of four synthetic drugs studied, with a wide linear response range (10 to 500

mg L⁻¹), low detection limits (4 to 5 mg L⁻¹), precision (6 to 9 %) and accuracy (95 to 112 %) . The recovery experiments were carried out in the samples and the recovery values ranged between 80 and 120 % for all the studied samples.

The developed method showed high sensitivity, selectivity and analytical precision and it can be used for determining these substances as contaminants in herbal natural formulations. It also an important alternative to the federal control agencies due to its simplicity, rapidity and low cost of analysis considering the small quantities of reagents and samples used.

Keywords: Adulterants, phytotherapeutics, capillary electrophoresis, detection by conductivity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Fluxograma com as possíveis classes de fármacos sintéticos encontrados como adulterantes em formulações fitoterápicas emagrecedoras e os métodos analíticos disponíveis para a sua determinação.	29
Figura 2: Princípio da CZE. (a) estado inicial, (b) zonas distintas de amostra, gerando uma migração diferencial. <i>Adaptado de</i> Kuhn & Hoffstetter-Kuhn (1993) ..	32
Figura 3: Desenho esquemático da configuração dos eletrodos para C ⁴ D. <i>Adaptado de</i> KUBÁN & HAUSER, 2008.	33
Figura 4: Representação em diagrama de blocos do equipamento de eletroforese capilar construído em laboratório (CARVALHO <i>et al</i> 2009).....	35
Figura 5: Foto do equipamento de CE-C ⁴ D construído em laboratório.....	36
Figura 6: Sistema de injeção hidrodinâmico por gravidade construído no sistema CE-C ⁴ D.....	36
Figura 7: Amostradores automáticos construídos para o sistema CE-C ⁴ D.	37
Figura 8: Fonte de alta tensão empregada no sistema CE-C ⁴ D desenvolvido.	37
Figura 9: Sistema de lavagem do capilar por aplicação de vácuo.....	38
Figura 10: Sistema de controle de temperatura do sistema CE-C ⁴ D.....	39
Figura 11: Sistema de aquecimento via resistência elétrica e ventilação.....	39
Figura 12: Sistema de circulação de ar por ventiladores do sistema CE-C ⁴ D.	40
Figura 13: Gerador de funções (onda senoidal) do sistema CE-C ⁴ D.	40
Figura 14: Foto do detector de condutividade sem contato (C ⁴ D).	41
Figura 15: Representação esquemática do detector condutométrico construído para o equipamento de eletroforese capilar contendo capilar de sílica fundida, eletrodos e amplificadores operacionais.	42
Figura 16: Tela principal do <i>software</i> para operação equipamento CE-C ⁴ D construído em laboratório.....	43
Figura 17: Visão geral do programa que permite a automatização do sistema CE-C ⁴ D desenvolvido.	43
Figura 18: Fluxograma do procedimento de extração das amostras.....	48
Figura 19: Efeito da concentração do eletrólito de trabalho tampão fosfato nos tempos de migração dos fármacos sintéticos em concentrações de 20 mg L ⁻¹ , para concentração do tampão fosfato de 5 a 80 mmol L ⁻¹	51

Figura 20: Eletroferograma dos adulterantes (20 mg L ⁻¹) (a) anfepramona, (b) femproporex, (c) sibutramina, (d) fluoxetina. Eletrólito de trabalho: Fosfato 45 mmol L ⁻¹ (pH 4,0) contendo metanol 30 %(v/v);	51
Figura 21: Efeito da variação do pH no eletrólito de trabalho e nos tempos de migração dos fármacos sintéticos em concentrações de 20 mg L ⁻¹ , para valores de pH (2,0 a 6,0).	52
Figura 22: Efeito da concentração solvente orgânico metanol nos tempos de migração dos fármacos sintéticos em concentrações de 20 mg L ⁻¹ , para concentrações de solvente de 10 a 80 %.	53
Figura 23: Efeito da concentração solvente orgânico acetonitrila nos tempos de migração dos fármacos sintéticos em concentrações de 20 mg L ⁻¹ , para concentrações de solvente de 10 a 80 %.	54
Figura 24: Efeito da variação do pH no eletrólito de trabalho e nos tempos de migração dos fármacos sintéticos em concentrações de 20 mg L ⁻¹ , para valores de pH (4,0 a 5,0).	55
Figura 25: Efeito do potencial de separação nos tempos de migração dos fármacos sintéticos em concentrações de 20 mg L ⁻¹ , para valores de 10, 15 e 20 kV.	56
Figura 26: Efeito da temperatura de separação nos tempos de migração dos fármacos sintéticos em concentrações de 20 mg L ⁻¹ , para valores de 25 a 40°C. ...	57
Figura 27: Efeito do tempo de injeção na área dos picos dos fármacos sintéticos em concentrações de 20 mg L ⁻¹ , para valores de 10 a 90 s.	58
Figura 28: Efeito da altura de injeção na altura dos picos dos fármacos sintéticos em concentrações de 20 mg L ⁻¹ , para valores de 10 a 28 cm.	58
Figura 29: Efeito da amplitude do sinal de detecção na altura dos picos dos fármacos sintéticos em concentrações de 20 mg L ⁻¹ , para valores de 2 a 10 V _{pp}	59
Figura 30: Efeito da frequência de operação do detector na área dos picos dos fármacos sintéticos em concentrações de 20 mg L ⁻¹ , para valores de 100 a 2000 kHz.	60
Figura 31: Eletroferograma dos adulterantes (40 mg L ⁻¹) (a) anfepramona, (b) femproporex, (c) sibutramina, (d) fluoxetina. Eletrólito de trabalho: Fosfato 50 mmol L ⁻¹ (pH 5,0) contendo acetonitrila 50 %(v/v).	61
Figura 32: Curvas analíticas dos 4 fármacos sintéticos.	62
Figura 33: Eletroferograma dos adulterantes e dos interferentes estudados a) anfepramona, (b) femproporex, (c) bupropiona e sibutramina, (e) sertralina, (f) fluoxetina, (g) paroxetina, (h) flurazepam. Eletrólito de trabalho: Fosfato 50 mmol L ⁻¹ (pH 5,0) contendo acetonitrila 50 % (v/v).	66
Figura 34: Eletroferograma dos adulterantes e dos interferentes estudados (a) anfepramona, (b) femproporex, (c) bupropiona, (d) sibutramina, (e) sertralina, (f) fluoxetina, (g) paroxetina, (h) flurazepam. Eletrólito de trabalho: Fosfato 50 mmol L ⁻¹ (pH 5,0) contendo metanol 50 % (v/v).	67

Figura 35: (A): Eletroferograma da amostra Alcachofra (*Cynara scolymus L.*), uma cápsula 500 mg é diluída em 25 mL metanol (extrato metanólico), outras condições experimentais, conforme descrito abaixo. (B): Separação por eletroforese capilar de zona dos adulterantes (a) anfepramona (75 mg), (b) femproporex (25 mg), (c) sibutramina (10 mg) e (d) fluoxetina (60 mg) mais a amostra fitoterápico..... 69

Figura 36: (A): Eletroferograma da amostra Chlorella (*Chlorella pyrenoidosa*), uma cápsula 250 mg é diluída em 25 mL metanol (extrato metanólico), outras condições experimentais, conforme descrito abaixo. (B): Separação por eletroforese capilar de zona dos adulterantes (a) anfepramona (75 mg), (b) femproporex (25 mg), (c) sibutramina (10 mg) e (d) fluoxetina (60 mg) mais a amostra do fitoterápico. 70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Anorexígenos pesquisados, com seus respectivos nomes comerciais, doses diárias, estruturas e pKa.	21
Tabela 2 - Benzodiazepínicos pesquisados, com suas respectivas doses diárias, nomes comerciais, estruturas e pKa.....	22
Tabela 3 - Antidepressivos pesquisados, com suas respectivas doses diárias, nomes comerciais, estruturas e pKa.	25
Tabela 4 - Reagentes e padrões utilizados no desenvolvimento do trabalho.	45
Tabela 5 - Composição das 13 amostras de fitoterápicos adquiridas no mercado local.	47
Tabela 6 - Precisão e precisão intermediária dos fármacos sintéticos.....	63
Tabela 7 - Ensaio de recuperação dos fármacos sintéticos.	64
Tabela 8 - Limites de detecção e quantificação dos fármacos sintéticos estudados.	65
Tabela 9 - Ensaio de recuperação da anfepramona, femproporex, sibutramina e fluoxetina em formulações fitoterápicas emagrecedoras ($n=3$).	71

LISTA DE SIGLAS E ABREVIACOES

SCN	Sistema nervoso central
FDA	Food and Drug Administration
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
GC	Cromatografia gasosa
CE	Eletroforese capilar
CZE	Eletroforese capilar de zona
MEKC	Cromatografia capilar eletrocinética micelar
C⁴D	Detecção condutométrica sem contato capacitivamente acoplada
ACN	Acetonitrila
MeOH	Metanol
V_{PP}	Voltagem pico a pico
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
CV	Coefficiente de variação
RSD	Desvio padrão relativo
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
2.1 Formulações fitoterápicas.....	20
2.2 Fármacos sintéticos usados em formulações emagrecedoras	20
2.2.1 Anorexígenos.....	20
2.2.2 Benzodiazepínicos.....	21
2.2.3 Antidepressivos	24
2.3 Casos de adulteração em fitoterápicos.....	26
2.4 Métodos disponíveis para determinação de adulterantes em formulações fitoterápicas	27
2.4.1 Métodos cromatográficos e eletroforéticos	30
2.4.2 Métodos eletroquímicos e espectroscópicos	31
2.5 Eletroforese capilar de zona e detecção por condutividade sem contato (C ⁴ D) .	32
3 MATERIAIS E MÉTODOS	34
3.1 Instrumentação.....	34
3.1.2 Visão geral e descrição equipamento CE-C ⁴ D construído	34
3.1.3 Automatização do equipamento CE-C ⁴ D construído	42
3.3 Procedimentos analíticos.....	46
3.3.1 Eletrólito de trabalho e amostras	46
3.3.2 Determinação por eletroforese capilar de zona	48
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
4.1 Otimização das separações eletroforéticas	50
4.1.1 Otimização das condições do eletrólito de trabalho.....	50
4.1.2 Otimização dos parâmetros operacionais.....	55
4.2 Validação do método eletroforético	61
4.2.1 Linearidade	61
4.2.2 Precisão.....	62
4.2.3 Exatidão.....	63
4.2.4 Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)	64
4.3 Especificidade do método.....	65

4.4 Aplicação analítica.....	68
5 CONCLUSÃO	74
6 REFERÊNCIAS	75

1 INTRODUÇÃO

A obesidade é reconhecida como uma doença mundial, que afeta milhões de pessoas, o que constitui um problema de saúde pública (CORREIA, 2008). Em virtude disso, a população tem buscado, cada vez mais, tratamentos alternativos para esse problema, sobretudo à base de formulações fitoterápicas. Nesse sentido, a crescente procura por fitoterápicos se deve principalmente à falsa imagem de que, por serem naturais, não causam efeitos adversos nem danos à saúde. A grande disponibilidade e variedade desses produtos no mercado, além do fácil acesso, possibilitam o maior consumo dos mesmos. No entanto, estudos científicos realizados têm revelado a presença de substâncias sintéticas não declaradas adicionadas aos produtos chamados “naturais” (CORREIA, 2008; ALMEIDA *et al.*, 2000; SOMBRA *et al.*, 2005), conferindo a estes um maior efeito, como é o caso da adição de anorexígenos em formulações para emagrecimento.

É relevante destacar que os casos de adulteração infringem a lei de muitos países, uma vez que as formulações são registradas em desacordo com a sua real composição, o que pode levar ao aparecimento de efeitos imprevisíveis, causados por essas substâncias à saúde do usuário, tanto por seus efeitos isolados como pela ocorrência da interação com as demais substâncias presentes (LIANG *et al.*, 2006; CIANCHINO *et al.*, 2008).

Os adulterantes mais encontrados em fitoterápicos para fim emagrecedor são anorexígenos derivados das anfetaminas. Dessa forma estima-se que 80% dos anfetamínicos produzidos legalmente destinam-se às terapias de redução de peso, e 25% dos casos relatados de abuso de anfetamínicos resultam do consumo excessivo de prescrições médicas (OGA *et al.*, 2008). Além dos anorexígenos, coadjuvantes como benzodiazepínicos e antidepressivos são também identificados como adulterantes isolados ou associados a estes nessas formulações (AZEREDO *et al.*, 2005).

Os anorexígenos femproporex, anfepramona e mazindol são as principais substâncias identificadas como adulterantes em formulações “naturais” emagrecedoras, por apresentarem a capacidade de induzir a falta ou a perda de

apetite, aumentar a sensação de saciedade e reduzir a absorção intestinal de gordura (LIMA, 2009). Porém, apresentam vários efeitos colaterais como humor instável, dor de cabeça, depressão nervosa, irritabilidade e até dependência química (NAPPO *et al.*, 1993). Já os benzodiazepínicos como o diazepam, bromazepam, flurazepam, midazolam, entre outros, são frequentemente associados às formulações como adulterantes por minimizarem os efeitos colaterais apresentados pelos anorexígenos, sendo assim capazes de mascarar a presença destes. Seu efeito ansiolítico auxilia também na diminuição da ansiedade, característica em certos casos de pacientes obesos (LIMA, 2009; NAPPO *et al.*, 1993; CHAVES *et al.*, 1994; PIRNAY *et al.*, 2002; GUNNAR *et al.*, 2005). Outra classe comumente identificada nas adulterações é a dos antidepressivos destacando-se a fluoxetina, que além de eficaz na depressão podem ser utilizados no tratamento de distúrbios alimentares como transtorno obsessivo compulsivo e bulimia (SILVA, 2006).

Tendo em vista a crescente procura por fitoterápicos emagrecedores e a necessidade de metodologias analíticas eficientes para a identificação e quantificação de possíveis adulterantes, desenvolveu-se, neste trabalho, um método analítico que emprega eletroforese capilar de zona com detecção indireta por condutividade sem contato (CZE-C⁴D) para a determinação de anfepramona, femproporex, sibutramina e fluoxetina, sendo estes os mais encontrados em casos de adulteração. Entretanto, a adulteração em formulações fitoterápicas emagrecedoras é muito grande, várias classes de fármacos sintéticos são utilizados como os benzodiazepínicos, antidepressivos e os laxantes. Portanto, fez-se um estudo dos possíveis interferentes que poderiam estar presentes como adulterantes nestas formulações.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Formulações fitoterápicas

O consumo de formulações fitoterápicas vem crescendo notadamente nos últimos anos, e está associado à grande variedade e disponibilidade destes produtos no mercado, além do fácil acesso que possibilita o maior consumo dos mesmos. Estima-se que o Brasil movimentava anualmente 160 milhões de dólares com a venda de produtos à base de formulações fitoterápicas (CARVALHO *et al.*, 2008).

No Brasil o órgão responsável pela regulamentação de produtos fitoterápicos é a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e, segundo a portaria nº 6 de 31 de janeiro de 1995, fitoterápico é “todo medicamento tecnicamente obtido e elaborado empregando-se exclusivamente matérias-primas vegetais com finalidade profilática, curativa ou para fins de diagnósticos, com benefício para o usuário” (JUNIOR *et al.*, 2005).

A Resolução RDC nº 48 de 16 de março de 2004 da ANVISA, visa à normatização para registro de medicamentos fitoterápicos e determina os aspectos essenciais ao registro, como identificação botânica das espécies vegetais utilizadas, padrão de qualidade e identidade e provas de eficácia e segurança que validem as indicações terapêuticas propostas (JUNIOR *et al.*, 2005).

2.2 Fármacos sintéticos usados em formulações emagrecedoras

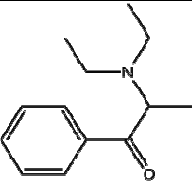
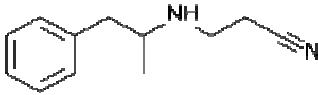
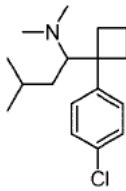
2.2.1 Anorexígenos

Os anorexígenos ou supressores do apetite promovem perdas de peso reduzindo o apetite e aumentando a sensação de plenitude. Os anorexígenos derivados das anfetaminas são os mais utilizados, os quais reduzem o apetite por

aumento da serotonina ou das catecolaminas, neurotransmissores, que afetam o estado emocional e o apetite (NAPPO *et al.*, 1993; CUNHA *et al.*, 2002).

Os anorexígenos estudados neste trabalho estão listados na Tabela 1, com suas respectivas doses diárias, nomes comercialmente disponíveis, pKa, além da sua estrutura química.

Tabela 1 – Anorexígenos pesquisados, com seus respectivos nomes comerciais, doses diárias, estruturas e pKa.

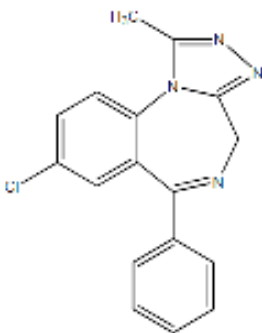
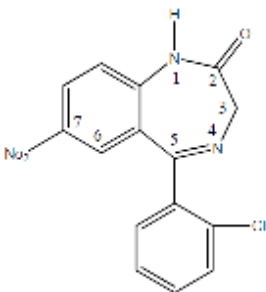
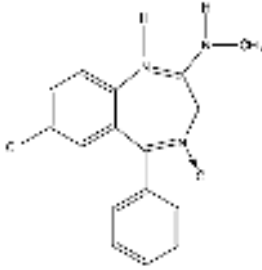
Fármaco Sintético	Nome comercial	Doses diárias em mg	Estrutura	pKa
Anfepramona	Inibex S [®] Dualid S [®] Hipofagin S [®]	50-75		-
Femproporex	Desobesi [®]	25		-
Sibutramina	Sibutran [®] Reductil [®] Meridia [®]	10		9,69

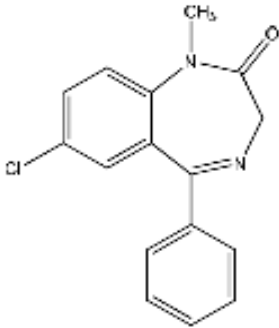
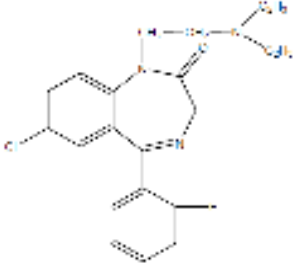
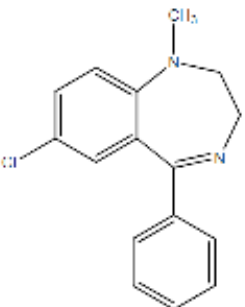
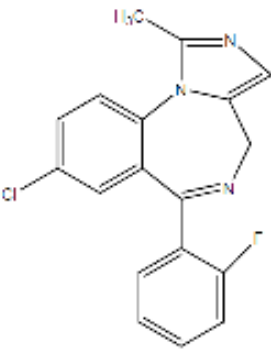
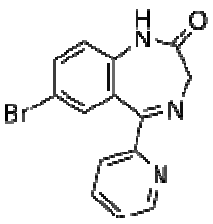
2.2.2 Benzodiazepínicos

Os benzodiazepínicos estão entre os fármacos mais prescritos e utilizados em todo o mundo. Apresentam efeitos sedativos, ansiolíticos e hipnóticos. São, ainda, relaxantes musculares, anticonvulsivantes, produzem dependência, reações de abstinência. Os mesmos são associados a substâncias emagrecedoras, a fim de diminuir seus efeitos colaterais (CUNHA *et al.*, 2002).

Os benzodiazepínicos estudados se encontram na Tabela 2, com suas respectivas doses diárias, nomes comercialmente disponíveis, pKa, além da sua estrutura química.

Tabela 2 – Benzodiazepínicos pesquisados, com suas respectivas doses diárias, nomes comerciais, estruturas e pKa.

Fármaco Sintético	Nome comercial	Doses diárias em mg	Estrutura	pKa
Alprazolam	Frontal [®]	0,75 - 1,5		2,4
Clonazepam	Rivotril [®]	1,5 - 10		1,50
Clordiazepóxido	Librium [®]	15 - 40		4,60

Diazepam	Valium®	4 - 40		3,30
Flurazepam	Dalmadorm®	40 - 100		2,41 e 8,2
Medazepam	Serenium®	10		6,20
Midazolam	Dormonid®	7,5 - 15		1,70
Bromazepam	Lexotam®	1,5- 15		2,9

2.2.3 Antidepressivos

Os antidepressivos foram descobertos no final da década de 50 e, desde lá, novas classes de antidepressivos estão sendo estudadas. Eles são classificados de acordo com sua estrutura química ou suas propriedades farmacológicas. As classes de antidepressivos mais conhecidas são tricíclicos (ADT) e os inibidores seletivos de recaptação da serotonina (ISRS), entretanto, existe uma variedade de substâncias com diferentes mecanismos de ação que são utilizadas no tratamento da depressão e eventualmente em outros transtornos psiquiátricos (MORENO *et al.*, 1999; PEIXOTO *et al.*, 2008).

Tricíclicos (ADTs)

Os antidepressivos tricíclicos estão entre os primeiros antidepressivos descobertos, os quais foram descobertos a partir de observações clínicas. Os ADT bloqueiam as bombas de recaptação da serotonina, noradrenalina e dopamina. São considerados fármacos de escolha em depressões graves e em pacientes hospitalizados. Os efeitos colaterais mais comuns causados pelos ADT são: boca seca, visão turva, retenção urinária, aumento da frequência cardíaca, tremores das mãos e sedação (MORENO *et al.*, 1999; PEIXOTO *et al.*, 2008).

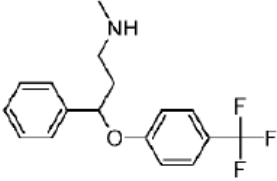
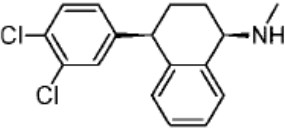
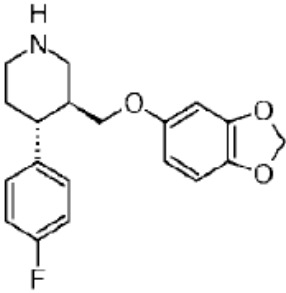
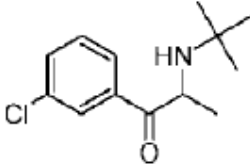
Inibidores seletivos de recaptação da serotonina (ISRS)

Os ISRS começaram a ser utilizados no início da década de 80 para tratamento da depressão, e vem ocupando o lugar dos ADT em razão do seu melhor perfil de efeitos colaterais. Os ISRS inibem de forma potente e seletiva a recaptação da serotonina. Seus efeitos colaterais mais frequentemente relatados são: náuseas, vômitos, diarreia, ansiedade, insônia, nervosismo, alteração do sono, fadiga, perda

ou ganho de peso, tremores e disfunções sexuais (MORENO *et al.*, 1999; PEIXOTO *et al.*, 2008).

As doses diárias recomendadas, nomes comerciais, estruturas e o pKa dos antidepressivos estudados estão na Tabela 3.

Tabela 3 – Antidepressivos pesquisados, com suas respectivas doses diárias, nomes comerciais, estruturas e pKa.

Fármaco Sintético	Nome comercial	Doses diárias em mg	Estrutura	pK _a
Fluoxetina	Prozac [®]	20-60		9,50
Sertralina	Zoloft [®]	50-200		9,16
Paroxetina	Aropax [®]	20-60		9,51
Bupropiona	Wellbutrin [®]	200 - 450		7,16

2.3 Casos de adulteração em fitoterápicos

A procura por fitoterápicos como tratamento alternativo para emagrecer tem sido impulsionada através de propagandas enganosas por parte dos fabricantes e a partir dos padrões de beleza pree-estabelecidos pela mídia que levam a população a uma busca desenfreada por estes produtos. Neste contexto, acompanham este crescimento os casos de adulteração desses fitoterápicos com drogas sintéticas, promovendo a estes efeitos milagrosos e satisfazendo às expectativas do público alvo através de um tratamento eficaz, a curto prazo e “sem danos à saúde”.

Os casos de adulteração tem sido relatados na literatura, comprovando que uma maior preocupação com relação a este problema implica no desenvolvimento de metodologias analíticas capazes de detectá-los, além de permitir um maior controle fiscal destas formulações.

Em dois casos abordados na literatura (COHEN, 2008), houve a identificação da adulteração de suplementos dietéticos de origem brasileira comercializados nos Estados Unidos. Em uma das formulações, constatou-se a presença de femproporex e clordiazepóxido e, em outra a presença de femproporex e fluoxetina, segundo informação divulgada pelo FDA (Food and Drug Administration). Em ambos os casos, a fraude foi descoberta porque os pacientes apresentaram diversos sintomas após a ingestão das cápsulas, como dor de cabeça, dor no peito, palpitações, insônia, náuseas e fadiga, levantando uma suspeita que levou à posterior investigação do conteúdo das formulações.

Outro caso relatado refere-se a um fitoterápico de origem chinesa (JUNG *et al.*, 2006) que revelou a presença de sibutramina, a qual não estava declarada no rótulo do produto. O paciente apresentou dor de cabeça, vertigem e entorpecimento após a ingestão da cápsula. Após a procura de auxílio médico, a análise de urina e da própria cápsula confirmou a presença do adulterante na formulação.

Com o propósito de investigar possíveis adulterações, Almeida e colaboradores (2000) desenvolveram um método analítico para a determinação de anfepramona, femproporex e diazepam em cápsulas rotuladas como produtos naturais utilizadas para o tratamento da obesidade. O trabalho foi aplicado na análise de vinte amostras, das quais 40% apresentaram diazepam, anfepramona e femproporex como adulterantes.

Com o mesmo intuito de analisar a presença de benzodiazepínicos e anorexígenos em formulações naturais destinadas a regimes de emagrecimento, Auricchio e colaboradores (1991) empregaram técnicas de cromatografia em camada delgada e espectrofotometria na região do ultravioleta na análise de setenta e quatro amostras. Apesar de estarem identificadas como medicamento natural ou homeopático, 50% das amostras encontravam-se associadas a anorexígenos e benzodiazepínicos. A mesma técnica de cromatografia em camada delgada foi empregada também por Cunha e colaboradores (2002), na análise de 40 amostras, para avaliar a incidência de fármacos anorexígenos sintéticos em “produtos naturais” para emagrecimento. Neste estudo, 18% das amostras apresentaram adulteração com fármacos sintéticos não declarados na formulação, como anfepramona, femproporex, fluoxetina e benzocaína, um anestésico local.

A determinação de benzodiazepínicos e anfepramona por voltametria foi realizada por Correia (2008), possibilitando o desenvolvimento de um método alternativo para o controle e fiscalização da adulteração em formulações fitoterápicas. O método validado foi empregado na análise de 13 amostras de formulações fitoterápicas utilizadas no tratamento da obesidade e, dentre estas, quatro acusaram a presença de benzodiazepínicos (clonazepam e diazepam) como adulterantes.

2.4 Métodos disponíveis para determinação de adulterantes em formulações fitoterápicas

Considera-se alto o risco que as substâncias sintéticas adicionadas ilegalmente em formulações fitoterápicas podem vir a ocasionar à saúde do indivíduo que as utiliza, uma vez que, por desconhecer a sua real composição, o paciente pode associar a outros medicamentos de forma errônea ou ingerí-las em altas doses para obter melhores resultados. Portanto, o desenvolvimento de metodologias analíticas capazes de identificar de maneira seletiva e quantitativa substâncias sintéticas que possam estar presentes como adulterantes nestas formulações é de extrema relevância, tanto do ponto de vista clínico como toxicológico. Nesse contexto, a pesquisa envolvida com o desenvolvimento de

metodologias analíticas capazes de identificar possíveis espécies adulterantes deve, primeiramente, eleger as prováveis classes de compostos que podem aparecer nessas formulações. Depois de identificadas as prováveis classes, segue-se então para o estudo individualizado dos fármacos mais utilizados em cada classe (p.ex. anorexígeno) na presença de outros possíveis fármacos que podem estar associados (p.ex. ansiolíticos, antidepressivos). O esquema abaixo mostra algumas possibilidades de adulteração envolvendo diferentes classes de fármacos. A classificação desenvolvida na Figura 1 baseia-se nos casos de adulteração já relatados na literatura, envolvendo as mais prováveis classes de adulterantes em formulações emagrecedoras. Como se pode observar, um estudo sistemático com relação às possíveis classes de adulterantes pode restringir os analitos a serem estudados por um determinado método analítico. No entanto, os principais requisitos a serem preenchidos por um método de escolha são seletividade e sensibilidade, uma vez que a possibilidade de adulteração é bastante ampla considerando as prováveis classes. Um vez selecionada a classe de adulterante a ser estudada, todos os demais prováveis adulterantes passam a ser possíveis interferentes na medida do método analítico escolhido. Essas interferências devem ser investigadas de maneira sistemática, para garantir a aplicabilidade do método a amostras reais, em que existe uma certa imprevisibilidade quanto ao tipo e classe de adulterante a ser encontrado.

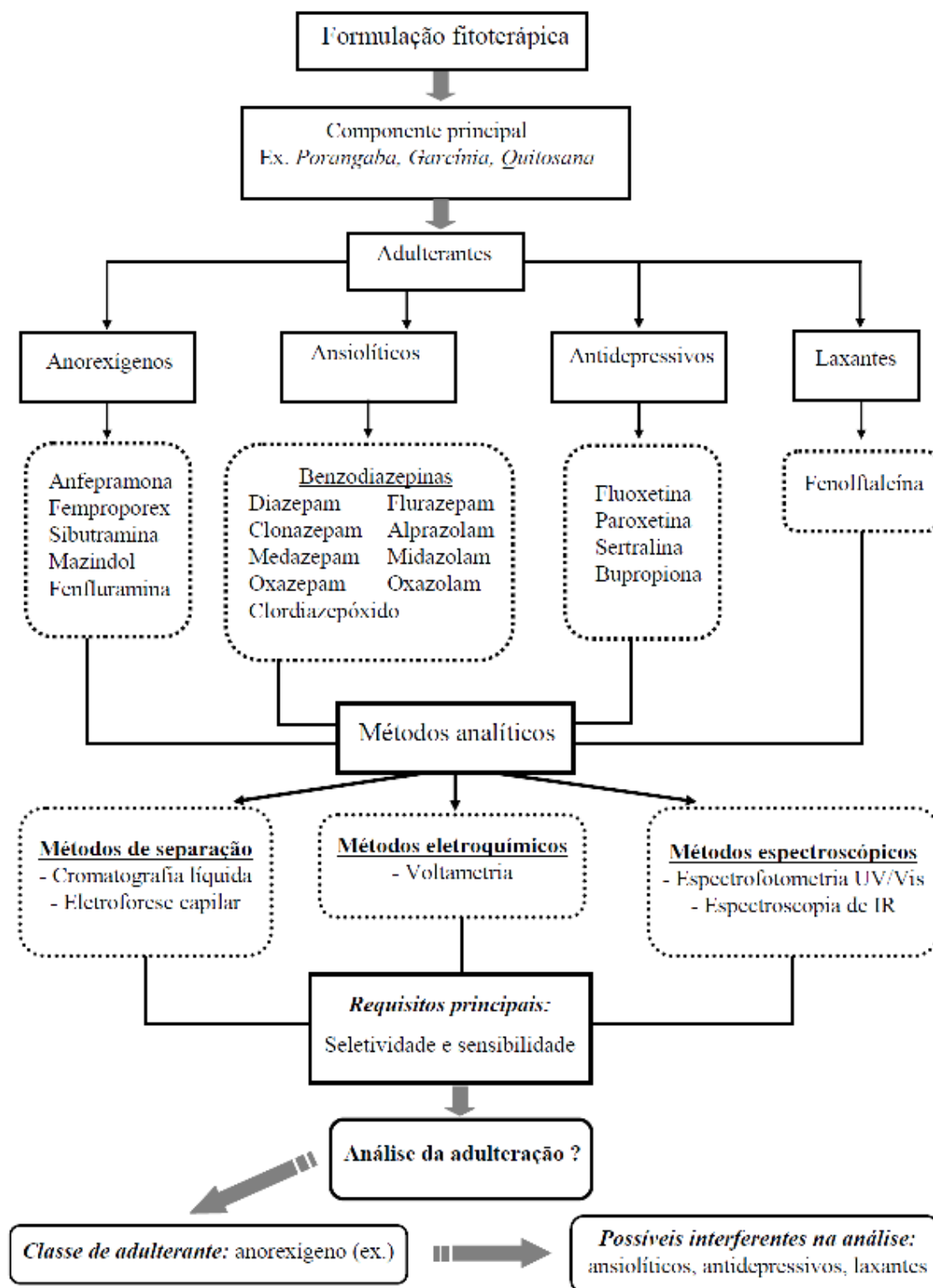


Figura 1: Fluxograma com as possíveis classes de fármacos sintéticos encontrados como adulterantes em formulações fitoterápicas emagrecedoras e os métodos analíticos disponíveis para a sua determinação.

2.4.1 Métodos cromatográficos e eletroforéticos

A maioria dos estudos de adulteração em formulações fitoterápicas utiliza métodos cromatográficos para a determinação e identificação de adulterantes. Esses métodos podem ser aplicados a misturas complexas por apresentarem grande poder de separação, o que é importante na análise de formulações fitoterápicas, que apresentam grande número de substâncias químicas. Além disso, a cromatografia é o método mais conhecido e difundido em todo o mundo, sendo uma realidade quando se trata de análises de rotina.

Dentre as técnicas cromatográficas, a que mais se destaca na identificação e quantificação de adulterantes em formulações fitoterápicas é a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), por ser uma técnica relativamente simples, que não exige etapas dispendiosas de pré-análise, com realização da análise em tempo satisfatório e apresentando resultados sensíveis o suficiente para detectar adulterantes que normalmente são adicionados em baixas concentrações (PARODI *et al.*, 1993; ALMEIDA *et al.*, 1999; KU *et al.*, 1999; ALMEIDA *et al.*, 2000; MIKAMI *et al.*, 2005; LIANG *et al.*, 2006; WANG *et al.*, 2008;).

Apesar de ser tecnicamente semelhante à HPLC, a cromatografia gasosa (GC) não é amplamente empregada na análise de adulterantes principalmente por impossibilitar a determinação de compostos não voláteis, termicamente lábeis ou altamente polares (MCAVOY *et al.*, 1999; LURIE, 1998). Por essas razões, é praticamente inviável empregar GC como método de quantificação e identificação de adulterantes nessas formulações (MCAVOY *et al.*, 1999).

A eletroforese capilar (CE) é uma técnica que vem ganhando espaço entre as técnicas de análise convencionais para a determinação de adulterantes em formulações fitoterápicas para emagrecimento. As vantagens oferecidas como o alto poder de separação e resolução, o rápido tempo de análise, o baixo consumo de reagentes e amostras fazem da eletroforese capilar uma metodologia atrativa neste tipo de investigação (TAGLIARO *et al.*, 1996; TAVARES, 1997; JAGER *et al.*, 2001; SILVA, 2003; ANASTOS *et al.*, 2005; SILVA *et al.*, 2006; HANCU *et al.*, 2007).

Por ser uma técnica relativamente nova, a CE tem incentivado o desenvolvimento de metodologias em busca do seu aperfeiçoamento, bem como tem permitido a expansão da sua aplicação através de uma instrumentação simples

e robusta (TAGLIARO *et al.*, 1996). Assim, a versatilidade da eletroforese capilar é derivada da existência de diferentes modos de separação, sendo os mais empregados nas análises de adulteração a eletroforese capilar de zona (CZE) e a cromatografia capilar eletrocínética micelar (MEKC).

2.4.2 Métodos eletroquímicos e espectroscópicos

Dentre os métodos eletroquímicos, os voltamétricos são os mais estudados em se tratando de análises de adulteração em formulações fitoterápicas. Os métodos voltamétricos apresentam uma determinação sensível e seletiva para alguns compostos orgânicos, de acordo com o comportamento eletroquímico variado das espécies no eletrodo de trabalho (CORREIA, 2008). Os métodos voltamétricos diferenciam-se de outros métodos como HPLC e CE por possibilitarem a medição em amostras complexas sem a necessidade da total solubilização e de exaustivas etapas de filtrações até a completa separação dos excipientes insolúveis, como é o caso de comprimidos ou cápsulas, formas em que geralmente estão apresentadas as formulação fitoterápicas (CARVALHO, 2007). Além disso, os métodos voltamétricos são vantajosos com relação ao custo da análise, quanto à aquisição e manutenção e ao tempo reduzido de análise (CORREIA, 2008; CARVALHO, 2007).

O trabalho desenvolvido por Carvalho e colaboradores (CARVALHO, 2007) envolveu a determinação da anfepramona, um dos anorexígenos mais consumidos no mundo, adicionado em misturas sintéticas contendo outros anorexígenos, além de benzodiazepínicos e antidepressivos que normalmente podem estar presentes de forma ilegal em formulações comercializadas como naturais para fim emagrecedor.

Dentre as metodologias aplicadas em análises para a determinação de adulterantes em formulações fitoterápicas, os métodos espectroscópicos são os menos empregados. Por ser uma técnica relativamente simples, rápida e eficaz em termos de custos, pode ser aplicada em testes de rotina para investigação de possíveis formulações adulteradas. Contudo, essas metodologias não são suficientemente específicas em relação ao fornecimento de informações em matrizes complexas, sendo necessário etapas de pré-análise para a minimização de interferências (FENG, 2007).

2.5 Eletroforese capilar de zona e detecção por condutividade sem contato (C⁴D)

A eletroforese capilar de zona (CZE) é um dos modos de separação mais utilizados na prática, devido à facilidade de implementação e à otimização das condições experimentais (TAVARES, 1997). A técnica se baseia 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 (Figura 2) (TAVARES, 1996). A velocidade com que cada zona se desloca é dependente do campo elétrico aplicado, das mobilidades dos analitos e do fluxo eletroosmótico.

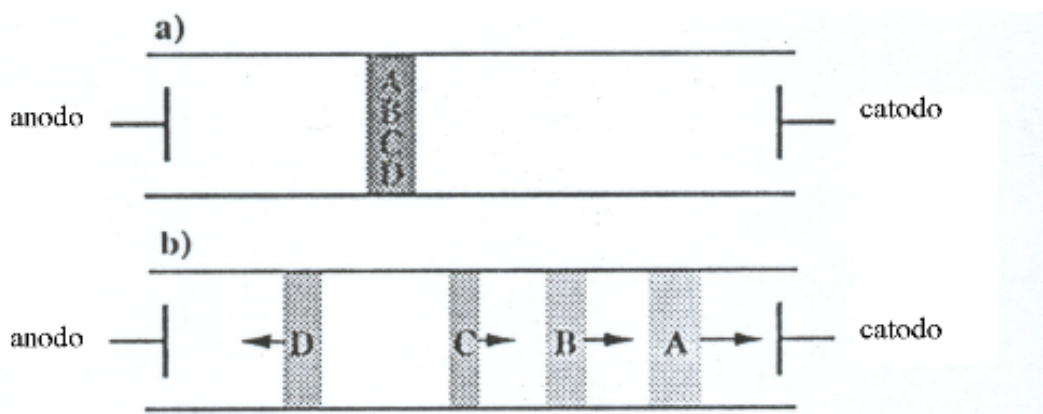


Figura 2: Princípio da CZE. (a) estado inicial, (b) zonas distintas de amostra, gerando uma migração diferencial. *Adaptado de Kuhn & Hoffstetter-Kuhn (1993)*

O sistema de detecção C⁴D utilizado é composto basicamente por dois eletrodos posicionados na parede externa do capilar (Figura 3), um sinal senoidal de corrente alternada de alta frequência é aplicado a um dos eletrodos posicionados na cela de detecção (e_1) e o outro eletrodo (e_2) está ligado a um conversor (corrente/tensão) e a um amplificador. O eletrólito de corrida no *gap* de detecção exibe uma resistência que diminui com a passagem de uma zona de um soluto iônico, devido ao aumento da condutividade da solução neste ponto. A reatância

capacitiva diminui com o aumento da frequência, e a impedância do capilar é reduzida permitindo que as variações de condutividade no interior do capilar sejam observadas mesmo com os eletrodos posicionados no lado externo do capilar. Assim detecção C⁴D previne a contaminação e desgaste dos eletrodos além da eliminação da interferência dos altos potenciais utilizados na separação (SILVA, 2003; SILVA *et al.*, 2002).

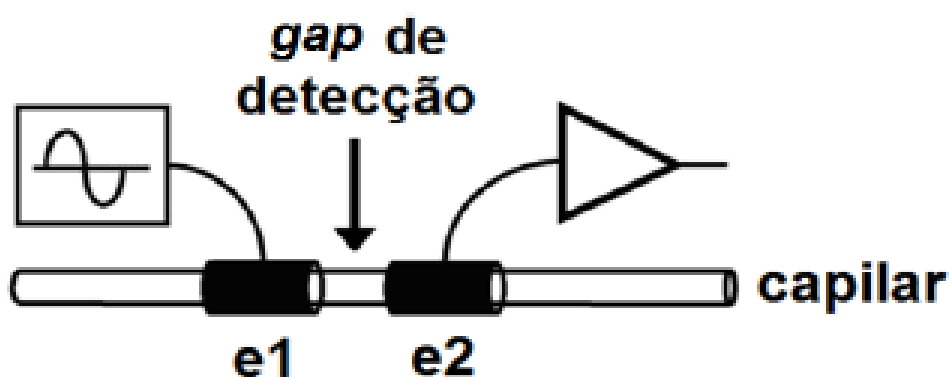


Figura 3: Desenho esquemático da configuração dos eletrodos para C⁴D. *Adaptado de KUBÁN & HAUSER, 2008.*

A sensibilidade do detector C⁴D 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 tampão, um pico negativo é registrado; por outro lado, se a zona possuir condutividade superior que o tampão de corrida, um pico positivo é registrado. Portanto, a condutividade do tampão é de extrema importância em C⁴D (SILVA, 2001).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Instrumentação

- Equipamento de eletroforese capilar com detector por condutividade sem contato (CE-C⁴D) construído em laboratório.

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

- As medidas do pH foram realizadas em pHmetro digital (Digimed DM 20, São Paulo, Brasil) usando eletrodo de vidro combinado.

- A água utilizada no preparo das soluções primeiramente sofreu um processo de destilação, seguido de deionização e, após, purificação em um sistema Milli-Q (resistividade de 18,2 M Ω cm⁻¹).

- Utilizou-se um sistema de filtração a vácuo para filtração do eletrólito de trabalho usando filtro de acetato de celulose 0,45 μ m (Sartorius, Alemanha).

- As soluções de eletrólito de trabalho foram sonicadas em ultra-som (Unique, São Paulo, Brasi) durante 30 minutos.

3.1.2 Visão geral e descrição equipamento CE-C⁴D construído

O equipamento de CZE empregado neste trabalho foi desenvolvido em laboratório (SPENGLER, 2008), baseado nos trabalhos pioneiros publicados por do Lago e Silva (1998), bem como Zemmann e colaboradores (1998). A Figura 4 mostra um diagrama de blocos do equipamento de eletroforese capilar construído em laboratório com identificação de cada uma das suas partes.

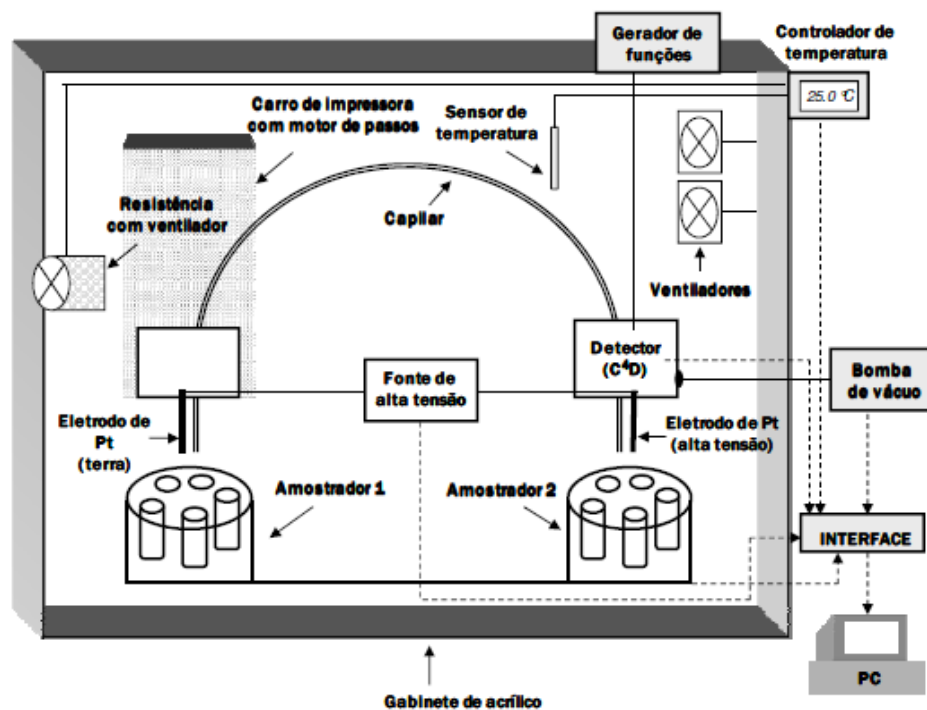


Figura 4: Representação em diagrama de blocos do equipamento de eletroforese capilar construído em laboratório (CARVALHO *et al* 2009).

A Figura 5 mostra o equipamento de eletroforese capilar com detecção condutométrica sem contato capacitivamente acoplada (CE-C⁴D) construído em laboratório.

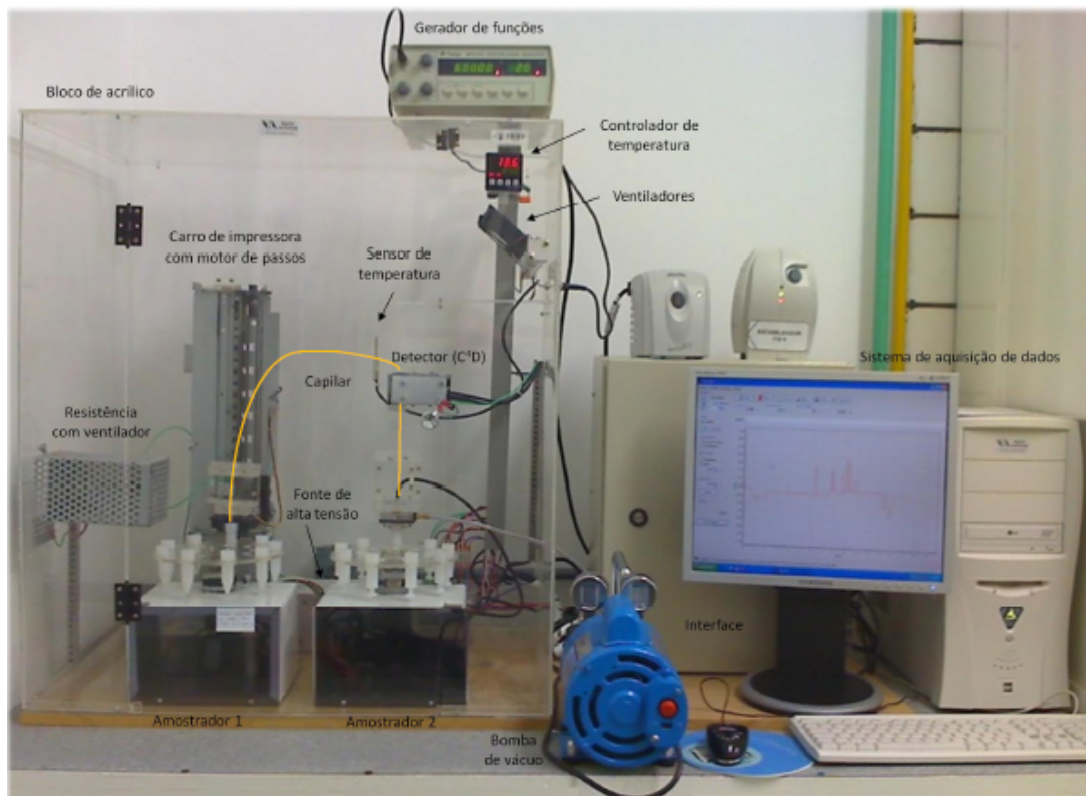


Figura 5: Foto do equipamento de CE-C⁴D construído em laboratório.

O equipamento é constituído de um sistema de injeção hidrodinâmico por gravidade (Figura 6), onde uma das extremidades do capilar é elevada até uma determinada altura, fazendo com que um pequeno volume de amostra seja introduzido no capilar.

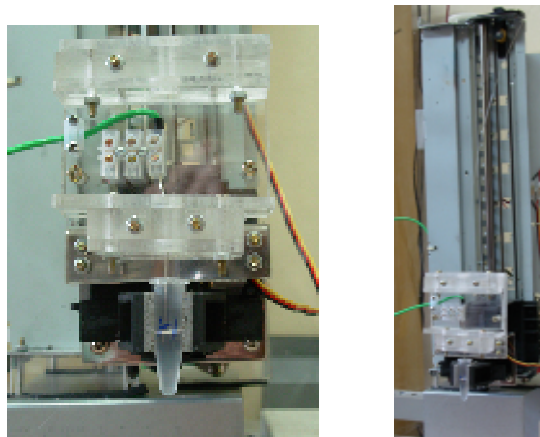


Figura 6: Sistema de injeção hidrodinâmico por gravidade construído no sistema CE-C⁴D.

Dois amostradores automáticos (Figura 7) são utilizados, um para o lado da injeção e outro para o lado da detecção, sendo que cada amostrador é constituído de duas partes: um carrossel, contendo nove reservatórios, e um braço mecânico para introdução do capilar e eletrodo através da elevação do reservatório.

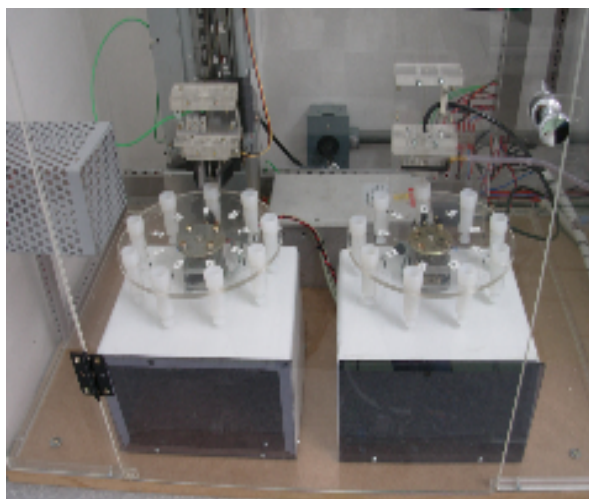


Figura 7: Amostradores automáticos construídos para o sistema CE-C⁴D.

Para as separações eletroforéticas, uma fonte de alta tensão (Figura 8) aplica uma diferença de potencial de até ± 30 kV entre o cátodo e o ânodo (eletrodos de platina), ambos mergulhados na solução do eletrólito de trabalho juntamente com o capilar.

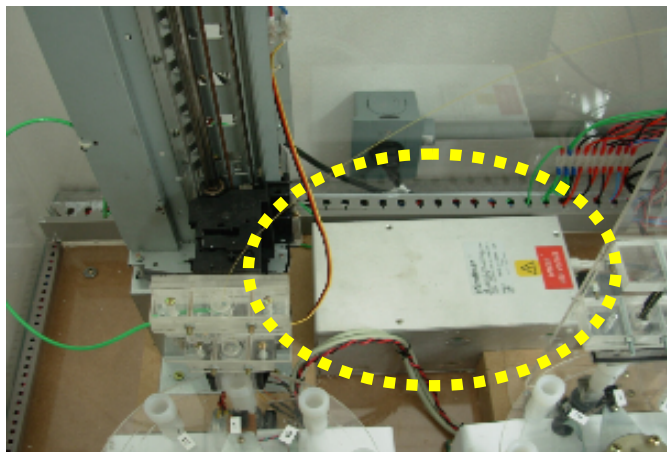


Figura 8: Fonte de alta tensão empregada no sistema CE-C⁴D desenvolvido.

O sistema de lavagem do capilar utiliza uma bomba de vácuo para a aplicação de pressão negativa no capilar, na extremidade do detector, conforme mostrado na Figura 9.

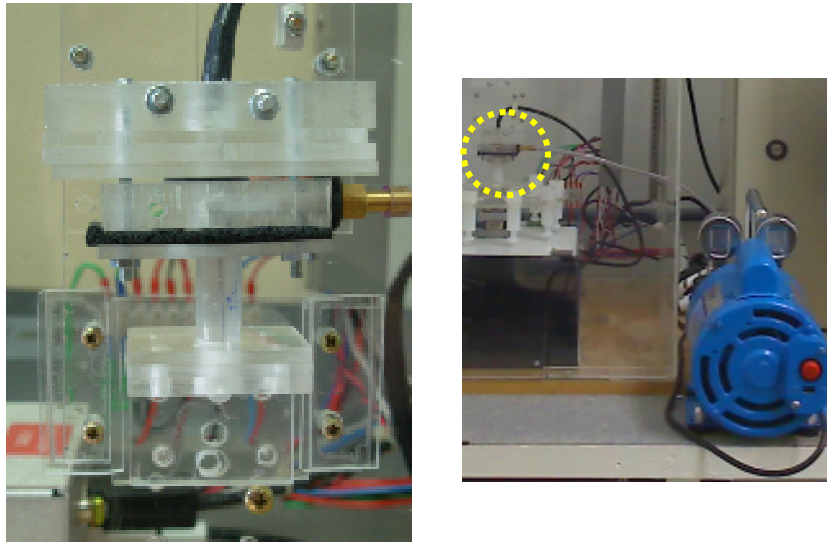


Figura 9: Sistema de lavagem do capilar por aplicação de vácuo.

O sistema de controle da temperatura do equipamento é feito por um controlador de temperatura digital. Este recebe o sinal de um sensor de temperatura posicionado no interior do bloco de acrílico, ao lado do detector (Figura 10), e indica a temperatura no display, e controla a temperatura através do acionamento da resistência (aquecimento) (Figura 11) ou ventiladores (resfriamento) (Figura 12). A temperatura em vermelho no display apresenta o valor da temperatura atual, e o valor em verde apresenta o valor programado da temperatura. O controlador recebe o sinal do sensor e indica a temperatura no painel.

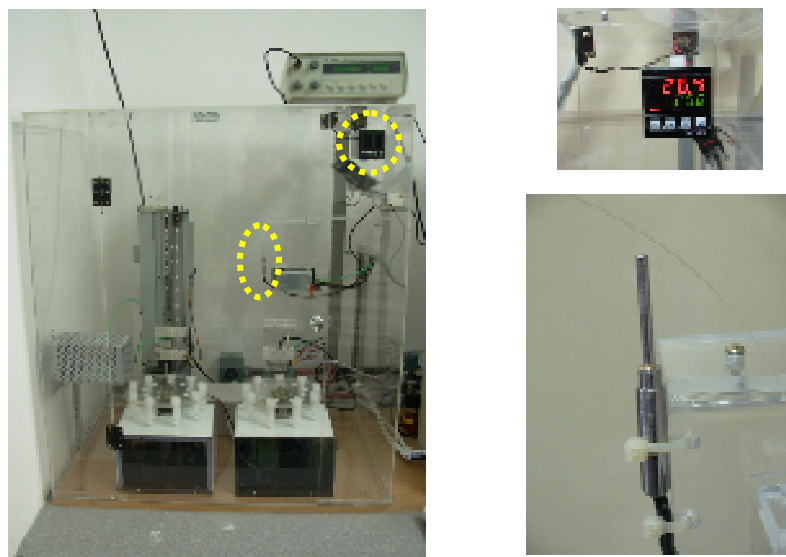


Figura 10: Sistema de controle de temperatura do sistema CE-C⁴D.

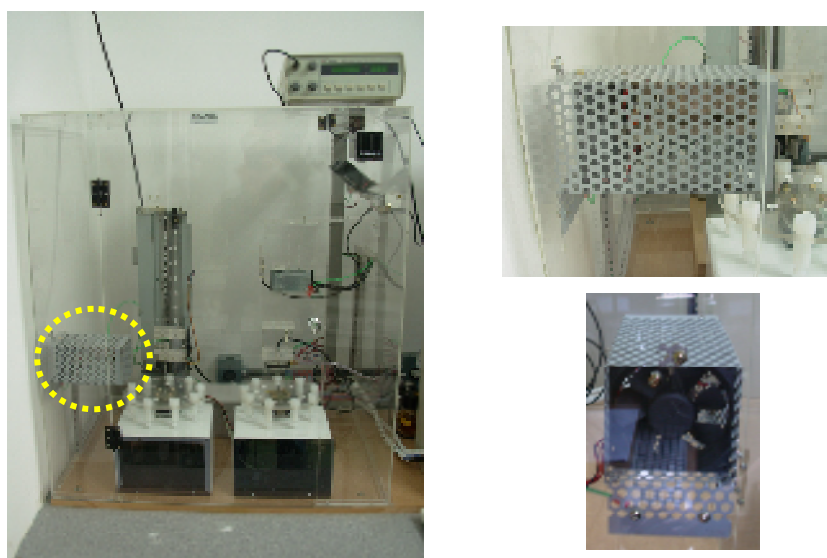


Figura 11: Sistema de aquecimento via resistência elétrica e ventilação.

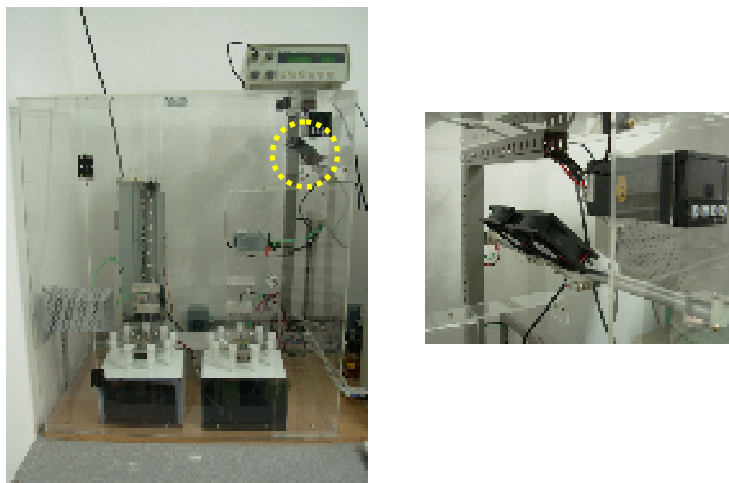


Figura 12: Sistema de circulação de ar por ventiladores do sistema CE-C⁴D.

O gerador de funções, que se localiza na parte superior do bloco de acrílico (Figura 13), é responsável pela aplicação de um sinal de onda senoidal de alta frequência em um dos eletrodos localizados na placa do circuito de detecção, que envolvem o capilar.

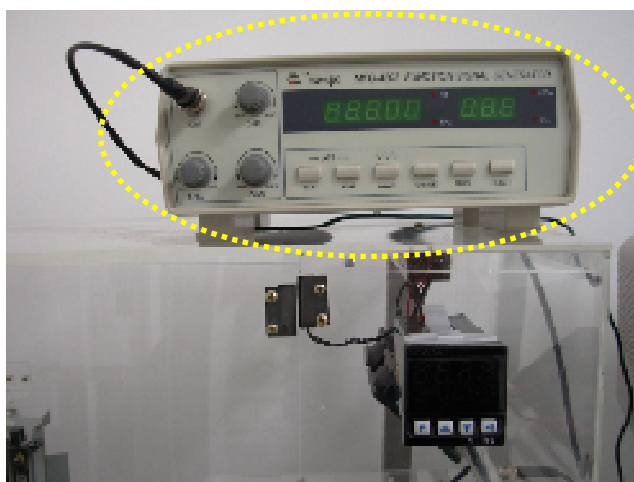


Figura 13: Gerador de funções (onda senoidal) do sistema CE-C⁴D.

O detector de condutividade sem contato (Figura 14) é composto por um conversor de corrente em tensão, retificador com amplificação de 10x, entrada do sinal de alta frequência, eletrodo de aplicação do sinal de alta frequência, eletrodo de detecção, filtro passa-baixas, buffer (ganho unitário), correção da linha de base com amplificação de 30x e circuito de proteção para a entrada da placa de interface, conforme mostrado esquematicamente na Figura 15.

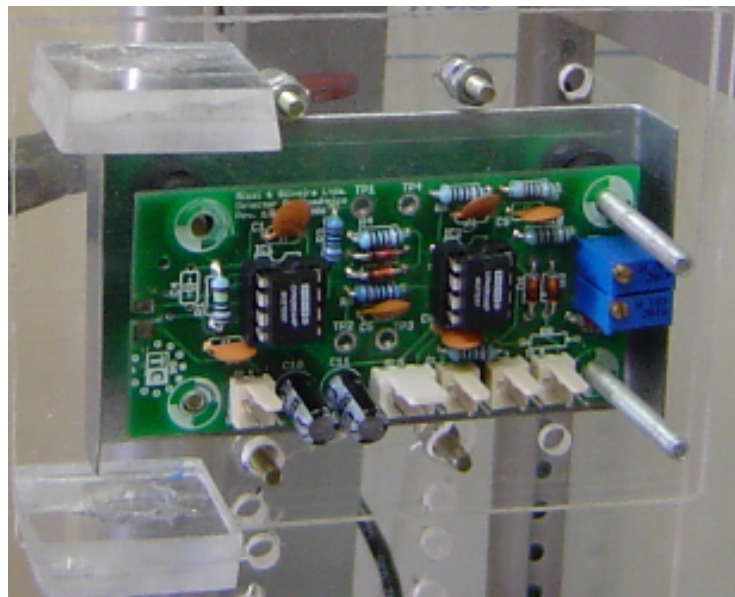


Figura 14: Foto do detector de condutividade sem contato (C⁴D).

A Figura 15 abaixo mostra a representação esquemática do circuito de detecção por condutividade sem contato construído e empregado no sistema CE-C⁴D, de acordo com trabalho publicado recentemente por este grupo de pesquisa (CARVALHO *et al.*, 2009).

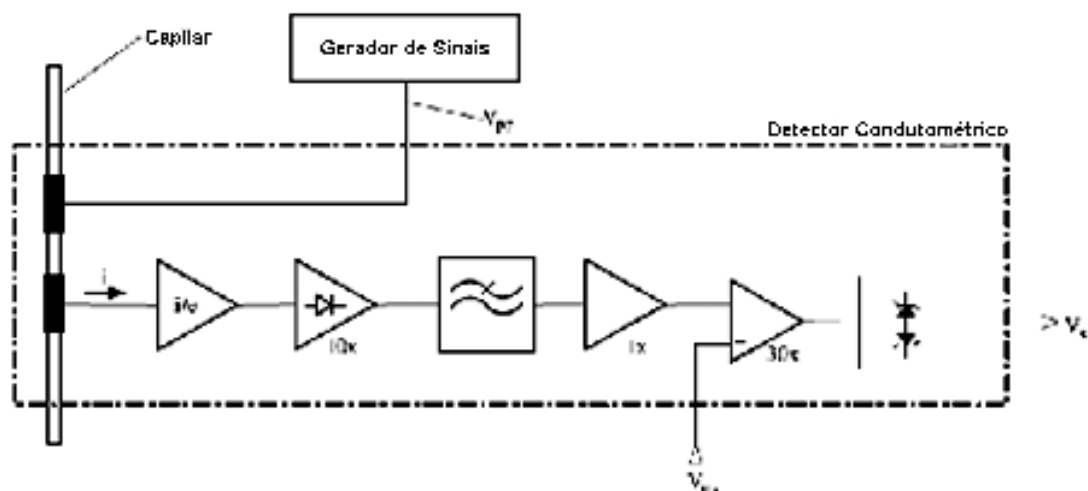


Figura 15: Representação esquemática do detector condutométrico construído para o equipamento de eletroforese capilar contendo capilar de sílica fundida, eletrodos e amplificadores operacionais.

3.1.3 Automação do equipamento CE-C⁴D construído

O equipamento de CE-C⁴D construído em laboratório possui um *software* de aquisição de dados que permite operar o equipamento na forma manual, na qual todos os comandos são feitos manualmente pelo operador durante a análise, como injeção da amostra, acionamento (abre e fecha) garra de injeção, referenciar e posicionar os amostradores, liga e desliga bomba de vácuo.

No entanto, o *software* utilizado foi modificado e permitiu operar o equipamento na forma manual ou automatizada, na qual a opção automatizada é selecionada clicando no botão Programa de análise (Figura 16). Como pode ser visto na Figura 17, o programa de análise é composto por uma lista de comandos para o equipamento, sendo estes executados sequencialmente. Tudo é programado, e cada corrida é salva em um arquivo nomeado antes de se iniciar o programa. Aqui, podem ser criados vários programas de acordo com a quantidade de injeções a serem realizadas. Quando o programa é iniciado, o operador não realiza mais nenhum comando, sendo todas as etapas realizadas automaticamente pelo programa desenvolvido.

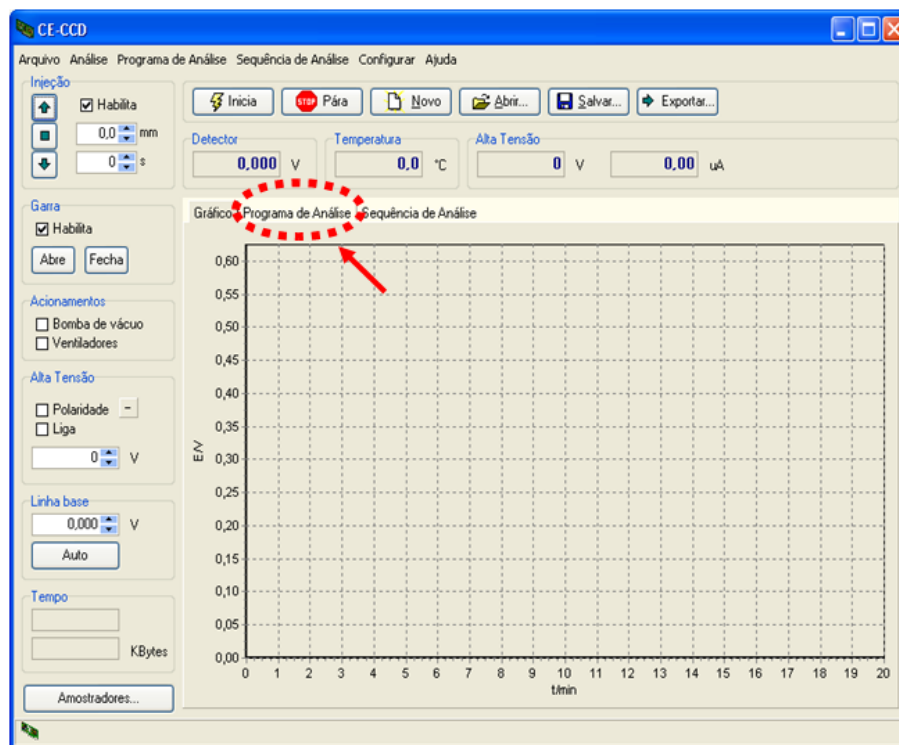


Figura 16: Tela principal do software para operação equipamento CE-C⁴D construído em laboratório.

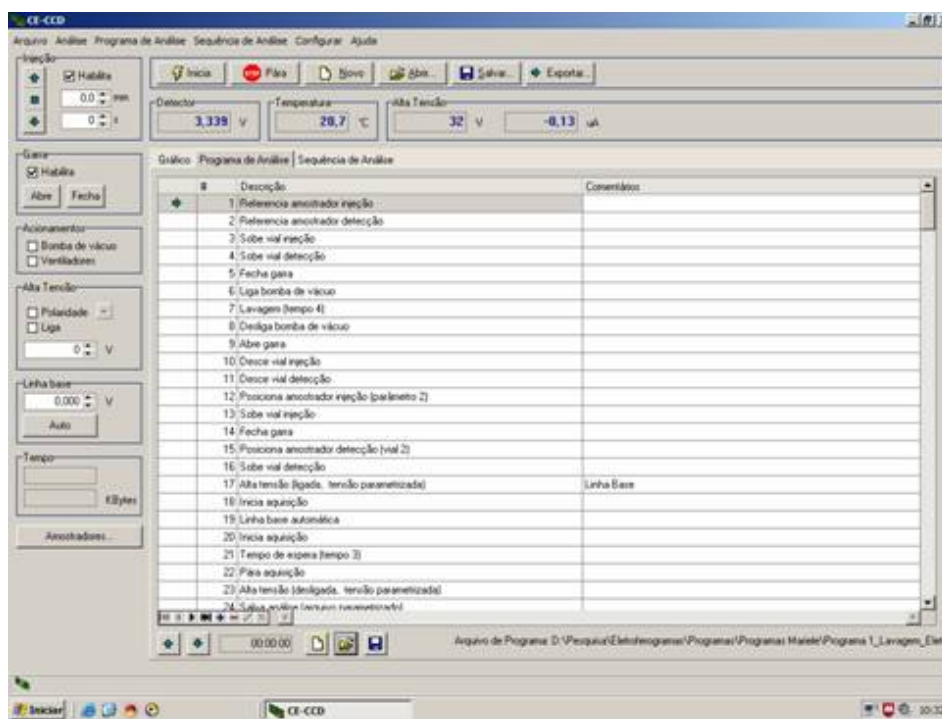


Figura 17: Visão geral do programa que permite a automatização do sistema CE-C⁴D desenvolvido.

3.2 Reagentes e soluções

Como padrões foram empregadas matérias-primas de grau farmacêutico, obtidas junto a farmácias ou fornecedores do segmento farmacêutico, acompanhadas do laudo analítico. As mesmas foram usadas como recebidas.

Os demais reagentes empregados foram de grau P.A. ou HPLC. Na Tabela 4, são apresentados todos os reagentes e padrões empregados.

As solução padrão dos anorexígenos (anfeparamona, femproporex, sibutramina), dos benzodiazepínicos (alprazolam, clonazepam, clordiazepóxido, diazepam, flurazepam, medazepam, midazolam, bromazepam), dos antidepressivos (fluoxetina, bupropiona, sertralina, paroxetina) e do laxante (fenolftaleína), foram preparadas nas concentrações 1 g L^{-1} através das dissoluções dos padrões de cada fármaco, em balão volumétrico de 10 e 50 mL com metanol. As soluções foram mantidas sob refrigeração. A partir das soluções em estoque se prepararam-se as soluções de trabalho, por meio de diluições em água ultra pura.

As soluções de trabalho 1 g L^{-1} foram preparadas a partir da dissolução de 50 mg de cada um dos fármacos sintéticos anfeparamona, femproporex, sibutramina e fluoxetina, em balão de 50 mL com metanol.

Já as soluções de trabalho 1 g L^{-1} dos interferentes investigados benzodiazepínicos (alprazolam, clonazepam, clordiazepóxido, diazepam, flurazepam, medazepam, midazolam, bromazepam), dos antidepressivos (bupropiona, sertralina, paroxetina) e do laxante (fenolftaleína) foram preparados a partir da dissolução de 10 mg de cada padrão em um balão de 10 mL com metanol.

A solução tampão fosfato monobásico de sódio $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ foi preparada pela dissolução de 5,9989 g em balão de 100 mL com água ultra pura. Após a solubilização, o pH da solução de trabalho foi ajustado com ácido fosfórico $0,1 \text{ mol L}^{-1}$.

Tabela 4 - Reagentes e padrões utilizados no desenvolvimento do trabalho.

Reagentes	Fornecedores	Pureza (%)
Metanol grau HPLC	Merck	-
Acetonitrila grau HPLC	Tedia	-
Acido fosfórico 85% (m/v)	Merck	-
Fosfato monobásico de sódio P.A.	Merck	-
Hidróxido de sódio P.A.	Vetec	-
Anfepramona	Genix Ind. Farm. Ltda	98%
Femproporex	Genix Ind. Farm. Ltda	100,42%
Sibutramina	Deg	99,30%
Fluoxetina	Deg	100,5%
Diazepam	Deg	98,99%
Flurazepam	Deg	99,56%
Alprazolam	Deg	100,18%
Bromazepam	Opção Fênix Dist. Ins. Ltda	99,8%
Clonazepam	Opção Fênix Dist. Ins. Ltda	99,9%
Medazepam	Pharma Nostra	98,79%
Clordiazepóxido	Opção Fênix Dist. Ins. Ltda	99,57%
Midazolam	Pharma Nostra	100,06%
Bupropiona	Genix Ind. Farm. Ltda	100,0%
Sertralina	Deg	99,26%
Paroxetina	Genix Ind. Farm. Ltda	99,94%
Fenolftaleína	Deg	-

3.3 Procedimentos analíticos

3.3.1 Eletrólito de trabalho e amostras

A solução do eletrólito de trabalho foi preparada diariamente através da diluição da solução estoque. O pH da solução foi ajustado com uma solução de ácido fosfórico $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e, em seguida, foi filtrado em membrana $0,45 \mu\text{m}$. Por fim, a solução foi sonicada em um sistema de ultra-som por 30 min.

As amostras de fitoterápicos utilizadas neste trabalho foram adquiridas na cidade de Santa Maria-RS e estão listadas na Tabela 5 segundo a sua composição e quantidade de pó por cápsula.

O processo de extração das amostras (Figura 18) foi realizado através da dissolução do conteúdo total de uma cápsula em 25 mL de metanol, obtendo-se o extrato metanólico. Depois disso, o extrato metanólico foi filtrado através de algodão e, em seguida, em membrana de acetato de celulose $0,45 \mu\text{m}$.

Tabela 5 - Composição das 13 amostras de fitoterápicos adquiridas no mercado local.

Amostra	Composição	Quantidade de pó/caps. (mg)
1	- Fibra de maçã 100mg - Quitosana 250mg	350
2	- Quitosana	350
3	- Quitosana - Vitamina C	500
4	- Quitosana - Ágar - Vitamina C	500
5	- Garcinia Cambuja	300
6	- Quitosana - Vitamina C	325
7	- Porangaba	250
8	- Caralluma Fimbriata	500
9	- Hoodia Gordonii	500
10	- Chlorella	250
11	- Chá Verde	450
12	-Spirulina, Maracujá, Centelha Asiática, Cáscara Sagrada, Goma Guar, - Garcinia	570
13	- Alcachofra	500

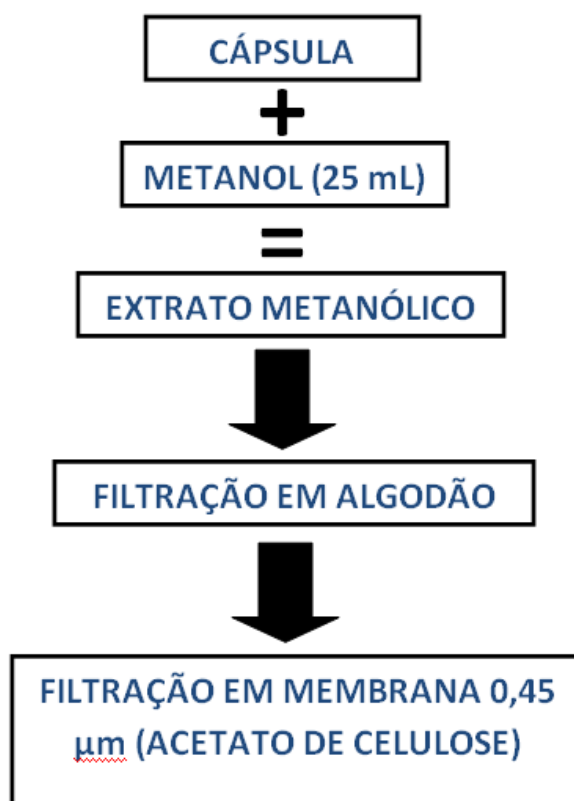


Figura 18: Fluxograma do procedimento de extração das amostras.

3.3.2 Determinação por eletroforese capilar de zona

Todas as determinações eletroforéticas foram realizadas no aparelho de eletroforese capilar descrito no item 3.1.2 (página 34). Os adulterantes estudados foram determinados pelo método de eletroforese capilar de zona. A fonte de alta tensão utilizada foi configurada para detecção indireta dos fármacos na forma catiônica, com injeção anódica e detecção catódica.

Utilizou-se capilar de sílica fundida (Micro Tube, São Paulo/SP) com 68 cm comprimento (46 cm até o detector) com 75 μm de diâmetro interno e 360 μm de diâmetro externo.

Para o condicionamento do capilar novo, primeiramente, fez-se uma lavagem com NaOH 1 mol L⁻¹, durante 40 minutos, empregando vácuo, em pressão constante de -400 mmHg. Em seguida fez-se uma lavagem com água ultrapura, durante 15

minutos, e depois disso, com o eletrólito de trabalho durante 30 minutos. No início de cada semana, lavou-se com NaOH 0,1 mol L⁻¹ e com água ultrapura, durante 15 minutos cada, e 30 minutos com o eletrólito. Nos outros dias da semana, a lavagem do capilar foi feita somente com o eletrólito durante 30 minutos, no início de cada dia. Entre as injeções das amostras, fez-se a lavagem do capilar com eletrólito de trabalho, durante 5 minutos, e no final do dia, o capilar foi lavado somente com eletrólito de trabalho por 20 minutos.

O sistema de injeção hidrodinâmica das amostras 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 amostra. As análises foram realizadas em temperatura de 25°C.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O trabalho de mestrado realizado por Spengler (2008) tratou inicialmente da construção de um sistema de eletroforese capilar com detecção C^4D , o qual é baseado nos protótipos descritos na literatura por do Lago e colaboradores (2002) e por Böckel e colaboradores (2005). A otimização do sistema desenvolvido por Spengler (2008) aplicado à separação de cátions metálicos foi recentemente descrito na literatura (CARVALHO *et al.*, 2009). Dentro desse contexto, o objeto de pesquisa aqui apresentado trata da aplicação desse sistema para a separação e detecção indireta de fármacos na forma catiônica. Os capítulos a seguir tratam da otimização da separação destas espécies por CZE- C^4D e da validação do método para a determinação dos fármacos amfepramona, femproporex, sibutramina e fluoxetina como adulterantes em formulações fitoterápicas emagrecedoras.

4.1 Otimização das separações eletroforéticas

4.1.1 Otimização das condições do eletrólito de trabalho

Inicialmente, a otimização do método eletroforético envolveu a escolha do eletrólito de trabalho. Optou-se pelo tampão fosfato de sódio, que foi avaliado nas concentrações de 5 a 80 mmol L⁻¹, como mostrado na Figura 19 para a separação dos adulterantes anfepramona, femproporex, sibutramina e fluoxetina. Pode-se observar que os tempos de migração não apresentaram grandes variações nas diferentes concentrações de fosfato estudadas. A concentração de 50 mmol L⁻¹ foi a de escolha, pois se mostrou a mais satisfatória dentre as concentrações estudadas. Entretanto, a resolução dos picos e a estabilidade da linha de base não se mostraram satisfatórias, variando-se somente o tampão fosfato. Além disso, houve coeluição da anfepramona e do femproporex (Figura 20) em quase todas as concentrações de fosfato analisadas. Sendo assim, passou-se então para o estudo do efeito do pH do eletrólito de trabalho.

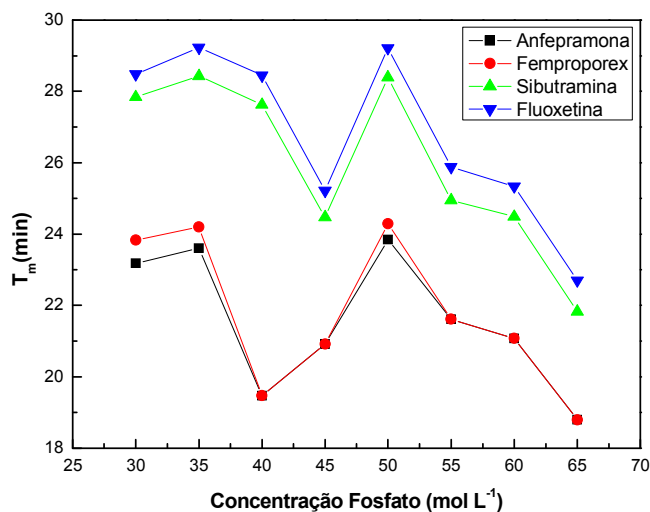


Figura 19: Efeito da concentração do eletrólito de trabalho tampão fosfato nos tempos de migração dos fármacos sintéticos em concentrações de 20 mg L^{-1} , para concentração do tampão fosfato de 5 a 80 mmol L^{-1} . Condições: eletrólito de trabalho metanol 30% (pH 4,0), potencial de separação -15Kv, capilar: sílica fundida $75 \mu\text{m} \times 360 \mu\text{m} \times 68 \text{ cm}$ (46 cm até o detector); detecção: indireta C⁴D operando em 600 kHz e 2 Vpp; temperatura: 25°C ; injeção amostra: hidrodinâmica por gravidade: 20 cm durante 60 s.

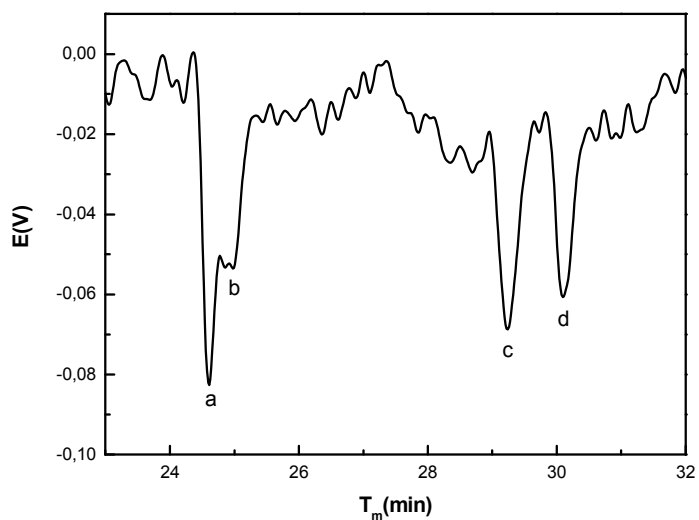


Figura 20: Eletroferograma dos adulterantes (20 mg L^{-1}) (a) anfepramona, (b) femproporex, (c) sibutramina, (d) fluoxetina. Eletrólito de trabalho: Fosfato 45 mmol L^{-1} (pH 4,0) contendo metanol 30 % (v/v); E= -15 kV. Capilar: sílica fundida $75 \mu\text{m} \times 360 \mu\text{m} \times 68 \text{ cm}$ (46 cm até o detector); detector C⁴D operando com 600 kHz e 2 Vpp; temperatura: 25°C ; injeção hidrodinâmica por gravidade: 20 cm por 60 s.

Sabendo-se que o pH do eletrólito de trabalho é o parâmetro de separação mais importante em eletroforese capilar por influenciar na seletividade do sistema, este foi investigado em diferentes valores de pH (2,0 a 6,0) para o tampão fosfato 50 mmol L⁻¹, contendo metanol 30% (v/v), como pode ser visto Figura 21. Os resultados obtidos para os quatro fármacos estudados mostraram que a variação do pH deste não modifica significativamente os tempos de migração obtidos. O pH de escolha foi o pH 4,0, pois dentre os pH estudados, foi o que promoveu melhor resolução dos picos. A fim de melhorar a resolução dos picos, a estabilidade da linha de base e diminuir o tempo de migração das espécies, investigou-se a adição de solventes orgânicos metanol e acetonitrila no eletrólito de trabalho.

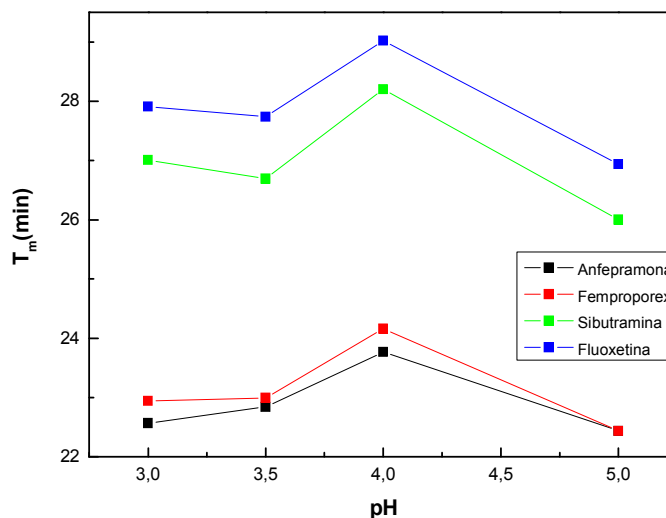


Figura 21: Efeito da variação do pH no eletrólito de trabalho e nos tempos de migração dos fármacos sintéticos em concentrações de 20 mg L⁻¹, para valores de pH (2,0 a 6,0). Condições: eletrólito de trabalho tampão fosfato 50 mmol L⁻¹ contendo metanol 30% (v/v), potencial de separação -15Kv, capilar: sílica fundida 75 μ m \times 360 μ m \times 68 cm (46 cm até o detector); detecção: indireta C⁴D operando em 600 kHz e 2 Vpp; temperatura: 25°C; injeção amostra: hidrodinâmica por gravidade: 20 cm durante 60 s.

A adição dos solventes orgânicos metanol (MeOH) e acetonitrila (ACN) ao eletrólito de trabalho foi analisada nas concentrações de 10 a 80% (v/v). O solvente orgânico metanol promoveu a diminuição do fluxo eletroosmótico, enquanto o solvente orgânico acetonitrila causou uma mudança na viscosidade da solução do eletrólito de trabalho, tornando este menos viscoso, o que promoveu mudanças de

mobilidade aparente, e, portanto, na migração relativa das espécies orgânicas. Observou-se também que quanto maior a concentração de metanol, maior o tempo de migração das espécies (Figura 22), enquanto que com a acetonitrila ocorreu o contrário, quanto maior a concentração do solvente, menor o tempo de migração (Figura 23). Em ambos os casos, a concentração do solvente orgânico escolhida foi de 50%. Finalmente, ao comparar a estabilidade da linha base obtida com o eletrólito de trabalho fosfato 50 mmol L⁻¹ (pH 5,0) contendo ACN 50% (v/v), esta foi superior àquela obtida com o eletrólito de trabalho fosfato 50 mmol L⁻¹ (pH 5,0) contendo MeOH 50% (v/v).

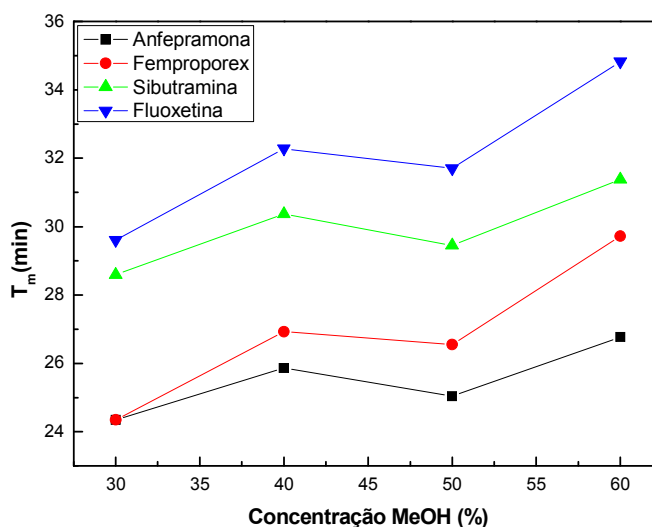


Figura 22: Efeito da concentração solvente orgânico metanol nos tempos de migração dos fármacos sintéticos em concentrações de 20 mg L⁻¹, para concentrações de solvente de 10 a 80 %. Condições: eletrólito de trabalho tampão fosfato 50 mmol L⁻¹ (pH 4,0), potencial de separação -15Kv, capilar: sílica fundida 75 µm × 360 µm × 68 cm (46 cm até o detector); detecção: indireta C⁴D operando em 600 kHz e 2 Vpp; temperatura: 25°C; injeção amostra: hidrodinâmica por gravidade: 20 cm durante 60 s.

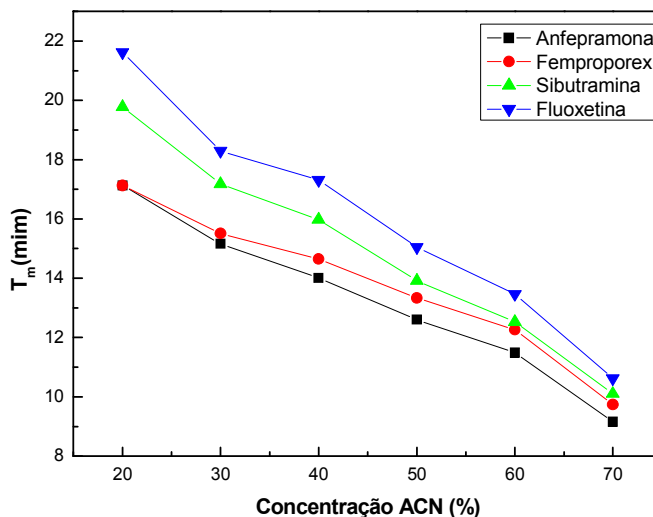


Figura 23: Efeito da concentração solvente orgânico acetonitrila nos tempos de migração dos fármacos sintéticos em concentrações de 20 mg L^{-1} , para concentrações de solvente de 10 a 80 %. Condições: eletrólito de trabalho tampão fosfato 50 mmol L^{-1} (pH 4,0), potencial de separação -15Kv, capilar: sílica fundida $75 \mu\text{m} \times 360 \mu\text{m} \times 68 \text{ cm}$ (46 cm até o detector); detecção: indireta C^4D operando em 600 kHz e 2 Vpp; temperatura: 25°C ; injeção amostra: hidrodinâmica por gravidade: 20 cm durante 60 s.

A fim de finalizar as condições do eletrólito de trabalho, foi feito um segundo estudo sobre o efeito nos tempos de migração dos fármacos sintéticos, agora com as condições otimizadas do tampão fosfato e da concentração do solvente orgânico acetonitrila. Pode-se verificar que o tempo de migração dos quatro fármacos sintéticos foram reduzidos em pH 5,0 (Figura 24). Dessa forma, obteve-se as condições do eletrólito de trabalho otimizadas, que foram tampão fosfato 50 mmol L^{-1} (pH 5,0) contendo acetonitrila 50% (v/v).

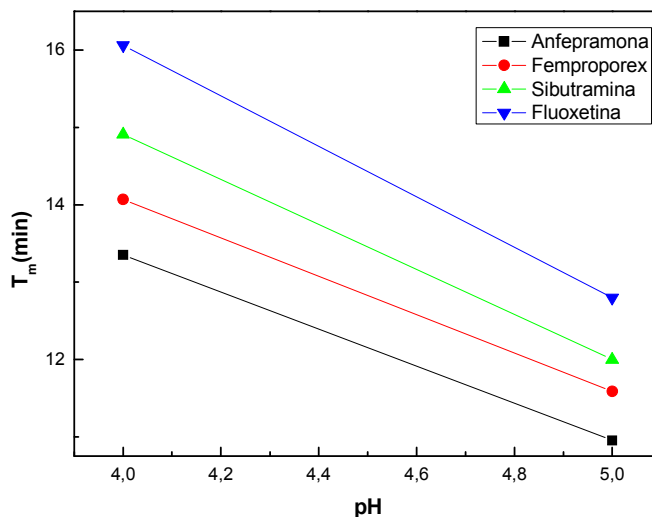


Figura 24: Efeito da variação do pH no eletrólito de trabalho e nos tempos de migração dos fármacos sintéticos em concentrações de 20 mg L^{-1} , para valores de pH (4,0 a 5,0). Condições: eletrólito de trabalho tampão fosfato 50 mmol L^{-1} contendo acetonitrila 50% (v/v), potencial de separação -15Kv, capilar: sílica fundida $75 \mu\text{m} \times 360 \mu\text{m} \times 68 \text{ cm}$ (46 cm até o detector); detecção: indireta C^4D operando em 600 kHz e 2 Vpp; temperatura: 25°C ; injeção amostra: hidrodinâmica por gravidade: 20 cm durante 60 s.

4.1.2 Otimização dos parâmetros operacionais

Após a etapa da otimização das condições do eletrólito de trabalho para a separação dos quatro fármacos sintéticos por CZE, passou-se para a otimização dos parâmetros eletroforéticos como potencial de separação, temperatura, injeção da amostra, bem como os parâmetros de detecção por condutividade (frequência de operação e amplitude do sinal). O potencial de separação foi estudado em três diferentes potenciais 10, 15 e 20 kV (Figura 25), e como esperado, quanto maior o potencial aplicado, menor o tempo de migração dos fármacos em potenciais maiores que 15 kV. Entretanto, o ruído da linha de base e a dispersão dos picos aumentaram. No entanto, o potencial de separação de 15 kV mostrou uma boa estabilidade da linha de base e boa resolução dos picos dos fármacos sintéticos estudados.

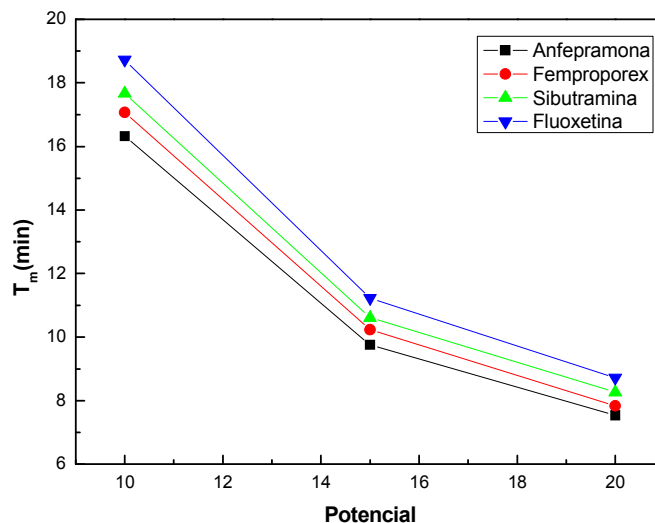


Figura 25: Efeito do potencial de separação nos tempos de migração dos fármacos sintéticos em concentrações de 20 mg L^{-1} , para valores de 10, 15 e 20 kV. Condições: eletrólito de trabalho tampão fosfato 50 mmol L^{-1} (pH 5,0) contendo acetonitrila 50% (v/v), capilar: sílica fundida $75 \mu\text{m} \times 360 \mu\text{m} \times 68 \text{ cm}$ (46 cm até o detector); detecção: indireta C^{4}D operando em 600 kHz e 2 Vpp; temperatura: 25°C ; injeção amostra: hidrodinâmica por gravidade: 20 cm durante 60 s.

O efeito da temperatura de separação é importante, pois está diretamente ligada à reprodutibilidade das separações eletroforéticas. A mesma foi estudada numa faixa de (25 a 40°C) como mostrado na Figura 26. A temperatura está diretamente ligada à mobilidade das espécies: quanto maior a temperatura, menor o tempo de migração, ocasionada pela diminuição da viscosidade do eletrólito. Entretanto, o aquecimento elevado ocasiona aumento do ruído da linha de base e, conseqüentemente, a deformação dos picos devido ao aquecimento pelo efeito Joule. A melhor temperatura observada foi de 25°C , com a qual obtiveram-se melhor resolução e forma dos picos.

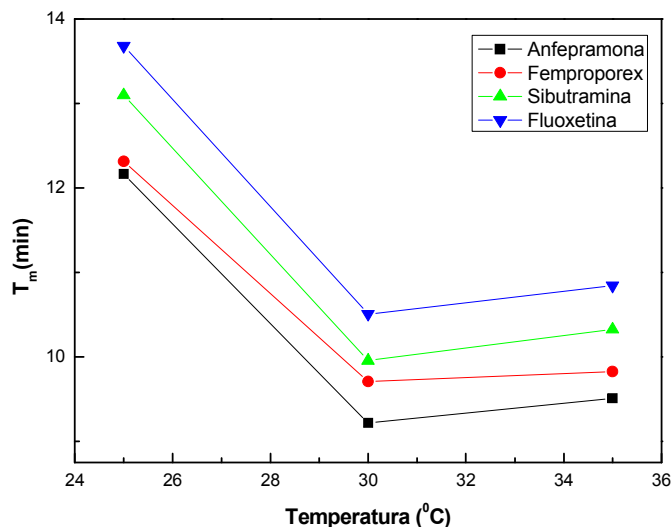


Figura 26: Efeito da temperatura de separação nos tempos de migração dos fármacos sintéticos em concentrações de 20 mg L^{-1} , para valores de 25 a 40°C . Condições: eletrólito de trabalho tampão fosfato 50 mmol L^{-1} (pH 5,0) contendo acetonitrila 50% (v/v), potencial de separação -15Kv, capilar: sílica fundida $75 \mu\text{m} \times 360 \mu\text{m} \times 68 \text{ cm}$ (46 cm até o detector); detecção: indireta C^4D operando em 600 kHz e 2 Vpp; injeção amostra: hidrodinâmica por gravidade: 20 cm durante 60 s.

Conforme descrito por Carvalho e colaboradores (CARVALHO *et al* 2009), o sistema de eletroforese capilar construído em laboratório utilizado neste trabalho é equipado com um sistema de injeção hidrodinâmica por gravidade. Assim os parâmetros de altura e tempo de injeção definem a quantidade de amostra que é introduzida no capilar. Os tempos de injeção estudados variaram de 10 a 90 s (Figura 27). Enquanto que a altura de injeção variou de 10 a 28 cm (Figura 28). Dessa forma, observou-se, em ambos os casos, 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, a coeluição de alguns dos picos foi observada para tempos e altura de injeção maiores, já que os quatro fármacos estudados saem muito próximos. Considerando esses fatores escolheram-se como condições para injeção, altura de 20 cm e tempo 60 s, nas quais obtiveram-se condições ideais de injeção, levando em conta a sensibilidade e a resolução dos picos.

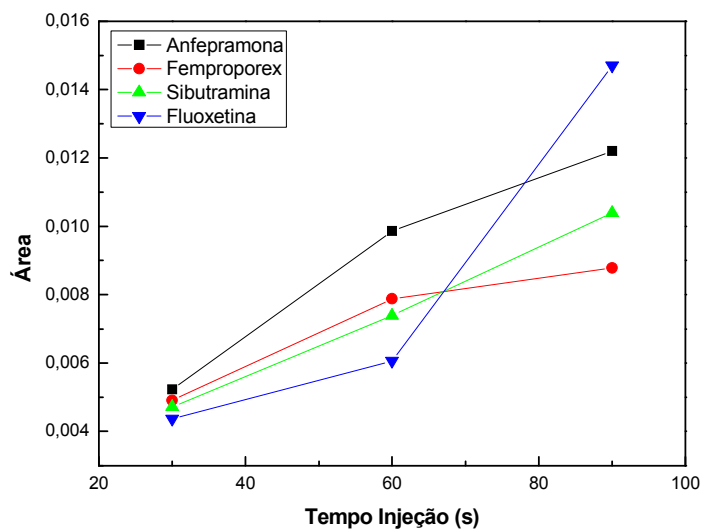


Figura 27: Efeito do tempo de injeção na área dos picos dos fármacos sintéticos em concentrações de 20 mg L^{-1} , para valores de 10 a 90 s. Condições: eletrólito de trabalho tampão fosfato 50 mmol L^{-1} (pH 5,0) contendo acetonitrila 50% (v/v), potencial de separação -15Kv, capilar: sílica fundida $75 \mu\text{m} \times 360 \mu\text{m} \times 68 \text{ cm}$ (46 cm até o detector); detecção: indireta C^4D operando em 600 kHz e 2 Vpp; temperatura: 25°C ; injeção amostra: hidrodinâmica por gravidade: 20 cm.

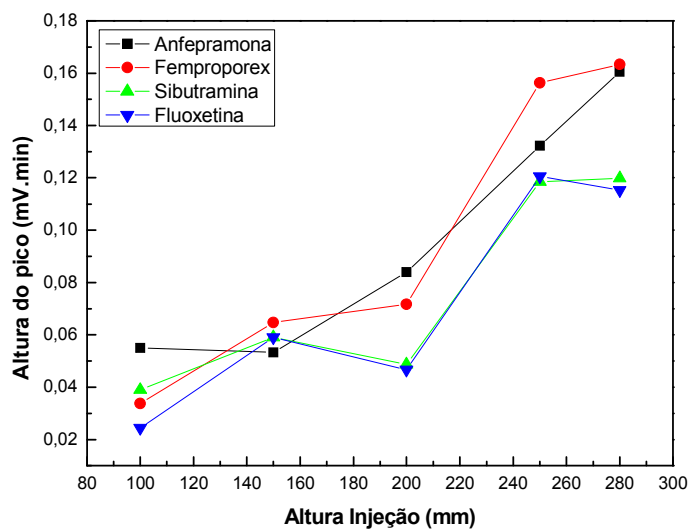


Figura 28: Efeito da altura de injeção na altura dos picos dos fármacos sintéticos em concentrações de 20 mg L^{-1} , para valores de 10 a 28 cm. Condições: eletrólito de trabalho tampão fosfato 50 mmol L^{-1} (pH 5,0) contendo acetonitrila 50% (v/v), potencial de separação -15Kv, capilar: sílica fundida $75 \mu\text{m} \times 360 \mu\text{m} \times 68 \text{ cm}$ (46 cm até o detector); detecção: indireta C^4D operando em 600 kHz e 2 Vpp; temperatura: 25°C ; injeção amostra: hidrodinâmica por gravidade: durante 60 s.

Com relação aos parâmetros de detecção por C^4D , sabe-se que a frequência de operação do detector e a amplitude do sinal de detecção influenciam na relação sinal:ruído de espécies iônicas. Neste trabalho, observou-se que a detecção indireta da anfepramona, femproporex, sibutramina e fluoxetina como espécies catiônicas se deslocam através do capilar, influenciadas pela amplitude da onda senoidal numa faixa que variou de 2 a $10V_{PP}$, conforme mostrado na Figura 29. No entanto, a frequência de operação do detector, que variou de 100-2000 kHz (Figura 30), não teve influência significativa na relação sinal:ruído. A relação entre a altura e a forma do pico foi obtida em intervalo de 600-1000 kHz. Assim, optaram-se pela amplitude do sinal de detecção de $2 V_{PP}$ e frequência de operação do detector de 600 kHz.

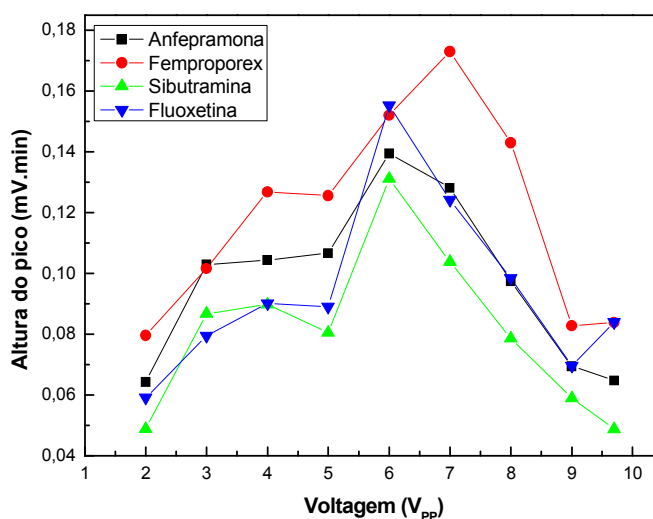


Figura 29: Efeito da amplitude do sinal de detecção na altura dos picos dos fármacos sintéticos em concentrações de 20 mg L^{-1} , para valores de 2 a $10 V_{PP}$. Condições: eletrólito de trabalho tampão fosfato 50 mmol L^{-1} (pH 5,0) contendo acetonitrila 50% (v/v), potencial de separação -15Kv, capilar: sílica fundida $75 \mu\text{m} \times 360 \mu\text{m} \times 68 \text{ cm}$ (46 cm até o detector); detecção: indireta C^4D operando em 600 kHz; temperatura: 25°C ; injeção amostra: hidrodinâmica por gravidade: 20 cm durante 60s.

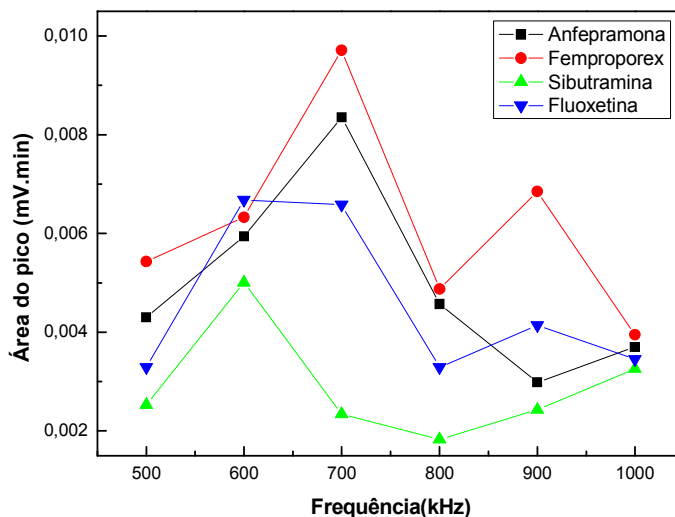


Figura 30: Efeito da frequência de operação do detector na área dos picos dos fármacos sintéticos em concentrações de 20 mg L^{-1} , para valores de 100 a 2000 kHz. Condições: eletrólito de trabalho tampão fosfato 50 mmol L^{-1} (pH 5,0) contendo acetonitrila 50% (v/v), potencial de separação -15Kv, capilar: sílica fundida $75 \mu\text{m} \times 360 \mu\text{m} \times 68 \text{ cm}$ (46 cm até o detector); detecção: indireta C^4D operando em $2 V_{pp}$; temperatura: 25°C ; injeção amostra: hidrodinâmica por gravidade: 20 cm durante 60s.

As condições otimizadas para a determinação dos adulterantes investigados por CZE- C^4D foram as seguintes: eletrólito de trabalho tampão fosfato 50 mmol L^{-1} (pH 5,0) contendo acetonitrila 50% (v/v), potencial de separação 15kV, temperatura de separação 25°C , injeção por gravidade de 20 cm durante 60 s, amplitude do sinal na detecção $2V_{pp}$ e frequência de operação do detector 600 kHz. A Figura 31 mostra o eletroferograma da separação dos quatro adulterantes sob as condições otimizadas.

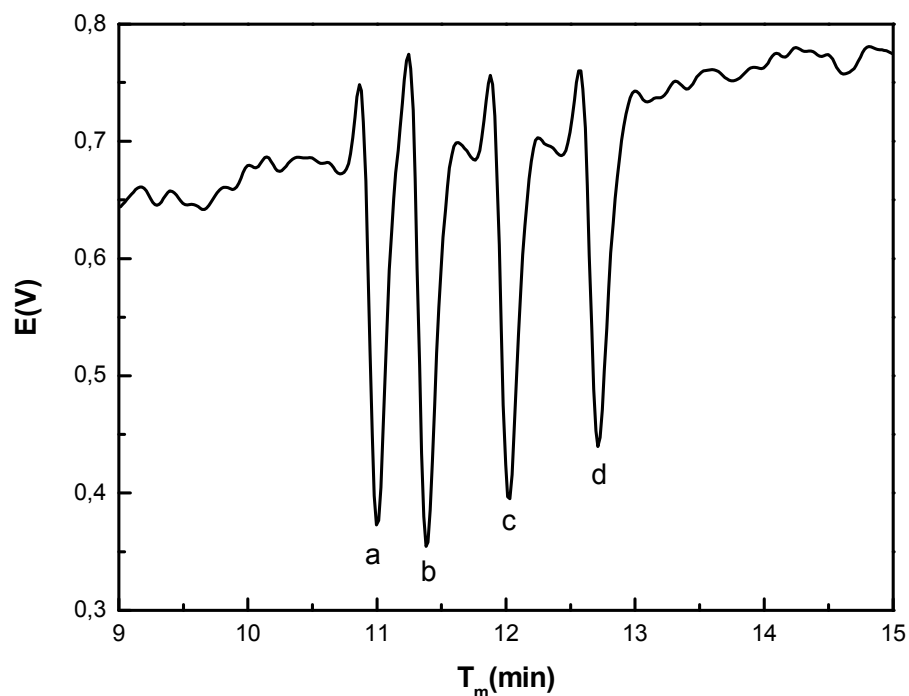


Figura 31: Eletroferograma dos adulterantes (40 mg L^{-1}) (a) anfepramona, (b) femproporex, (c) sibutramina, (d) fluoxetina. Eletrólito de trabalho: Fosfato 50 mmol L^{-1} (pH 5,0) contendo acetonitrila 50 % (v/v). $E = -15 \text{ kV}$. Capilar: sílica fundida $75 \mu\text{m} \times 360 \mu\text{m} \times 68 \text{ cm}$ (46 cm até o detector); detector C^4D operando com 600 kHz e 2 Vpp; temperatura: 25°C ; injeção hidrodinâmica por gravidade: 20 cm por 60 s.

4.2 Validação do método eletroforético

4.2.1 Linearidade

A linearidade está relacionada com a capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância em exame dentro de uma determinada faixa de aplicação (RIBANI *et al* 2004). A construção da curva deve ser feita por no mínimo cinco pontos que não incluam o ponto zero. Neste trabalho, a curva analítica foi feita através da injeção de seis pontos, e cada

ponto foi injetado três vezes, obtendo-se um coeficiente de correlação acima de 0,99 para os quatro fármacos sintéticos. A faixa linear para anfepramona, femproporex e sibutramina é de 10,0 a 500,0 mg L⁻¹, e para a fluoxetina é de 10,0 a 400,0 mg L⁻¹, enquanto, que a faixa de trabalho escolhida para os quatro fármacos estudados é de 10 a 150 mg L⁻¹ como mostrado na figura Figura 32.

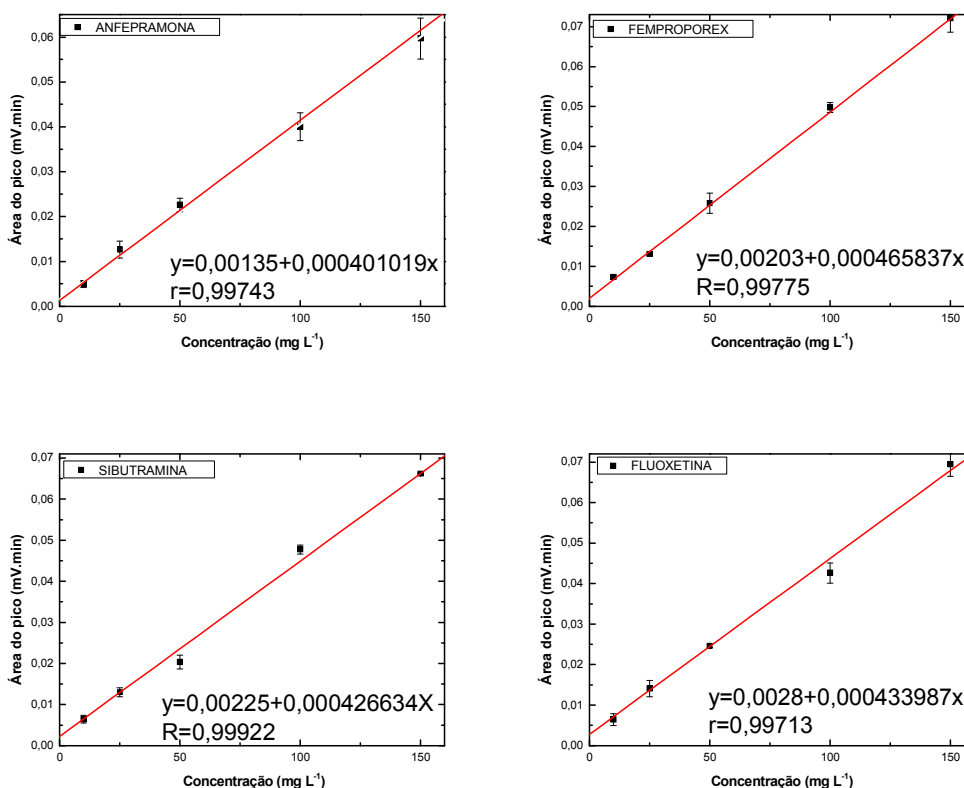


Figura 32: Curvas analíticas dos 4 fármacos sintéticos.

4.2.2 Precisão

A precisão está relacionada com repetibilidade da medida, ou seja, a dispersão dos resultados entre ensaios independentes de uma mesma amostra. E isso é calculado através da fórmula abaixo, onde (RSD) é o desvio padrão relativo também conhecido como coeficiente de variação (CV), (S) é o desvio padrão absoluto

e

\bar{X} é a média aritmética (RIBANI *et al* 2004). A precisão foi calculada, neste trabalho, através da injeção da mesma concentração cinco vezes, obtendo-se o desvio padrão relativo.

$$RSD(\%) \text{ ou } CV(\%) = \frac{S}{\bar{X}} \times 100$$

A precisão intermediária indica o efeito das variações das médias em diferentes dias ou diferentes analistas. A precisão intermediária foi calculada através da média de três dias diferentes, onde em um desses dias, um outro analista realizou as medidas. A Tabela 6 abaixo mostra a precisão e a precisão intermediária encontrada para cada fármaco sintético:

Tabela 6 - Precisão e precisão intermediária dos fármacos sintéticos.

Fármacos sintéticos	RSD (%)	RSD (%) intermediária
Anfepramona	9,8	10,0
Femproporex	8,9	11,3
Sibutramina	6,1	10,5
Fluoxetina	8,5	10,7

4.2.3 Exatidão

A exatidão representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados em um determinado ensaio e um valor de referência aceito como verdadeiro (RIBANI *et al* 2004). A exatidão foi calculada, neste trabalho, através da adição de padrão, injetando-se cinco vezes a mesma concentração, a equação da reta ($y = ax + b$) foi usada para determinar recuperação (%), onde a área é representada por (y) e a concentração (x). A exatidão intermediária foi calculada

através da média de três dias. A Tabela 7 mostra os resultados obtidos da exatidão e da exatidão intermediária.

Tabela 7 - Ensaio de recuperação dos fármacos sintéticos.

Fármacos sintéticos	Recuperação (%)	Recuperação (%) intermediária
Anfepramona	95,4	94,2
Femproporex	112,4	113,2
Sibutramina	100,8	100,9
Fluoxetina	108,9	107,1

4.2.4 Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)

O limite de detecção representa a menor concentração da substância em exame que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada (RIBANI *et al* 2004). O limite de detecção foi calculado através da injeção de cinco vezes a mesma concentração (5 mg L⁻¹), utilizando a fórmula abaixo. Onde o desvio padrão é (S), e o coeficiente angular da curva analítica é (b).

$$LD = \frac{3 \times S}{b}$$

O limite de quantificação representa a menor concentração da substância em exame que pode ser determinada com um nível de incerteza aceitável (RIBANI *et al* 2004). O limite de quantificação foi determinado através da injeção de cinco vezes a mesma concentração (5 mg L⁻¹), utilizando a fórmula abaixo. O desvio padrão é representado por (S) e o coeficiente angular da curva analítica por (b).

$$LQ = \frac{10 \times S}{b}$$

Os limites de detecção e quantificação obtidos se encontram na Tabela 8.

Tabela 8 - Limites de detecção e quantificação dos fármacos sintéticos estudados.

Fármacos sintéticos	LD (mg L⁻¹)	LQ (mg L⁻¹)
Anfepramona	4,1	13,5
Femproporex	4,7	15,6
Sibutramina	5,3	17,5
Fluoxetina	4,1	13,8

4.3 Especificidade do método

A influência de outros possíveis adulterantes, tais como antidepressivos, benzodiazepínicos e laxantes, sobre a avaliação dos fármacos sintéticos, foi investigada para avaliar a real aplicabilidade do método CZE em formulações fitoterápicas. Essas possíveis interferências podem ser causados por fármacos sintéticos nas suas formas catiônicas em pH 5,0, com tempos de migração semelhantes aos da anfepramona, femproporex, sibutramina, ou fluoxetina. Os interferentes estudados foram benzodiazepínicos alprazolam, clonazepam, clordiazepóxido, diazepam, flurazepam, medazepam, midazolam e bromazepam; antidepressivos bupropiona, sertralina e paroxetina e o laxante fenolftaleína. Todos esses interferentes também podem estar presentes como coadjuvantes em fitoterápicos para emagrecimento. Entre os 12 possíveis interferentes aqui estudados, apenas quatro foram detectados pelo método CZE-C⁴D, produzindo novos picos no eletroferograma: os antidepressivos bupropiona, sertralina, paroxetina, e o benzodiazepínico flurazepam. Com o uso do eletrólito de trabalho tampão fosfato 50 mmol L⁻¹ (pH 5,0) e acetonitrila 50% (v/v) como aditivo orgânico, foi observada no eletroferograma (Figura 33) a coeluição da sibutramina e

bupropiona, sendo a única interferência da separação CZE dos adulterantes estudados.

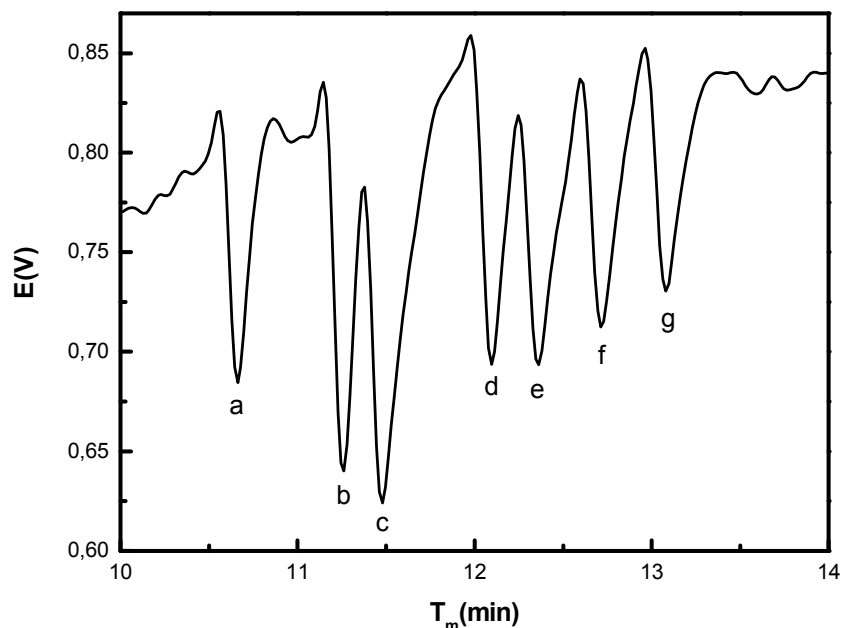


Figura 33: Eletroferograma dos adulterantes e dos interferentes estudados a) anfepramona, (b) femproporex, (c) bupropiona e sibutramina, (e) sertralina, (f) fluoxetina, (g) paroxetina, (h) flurazepam. Eletrólito de trabalho: Fosfato 50 mmol L⁻¹ (pH 5,0) contendo acetonitrila 50 % (v/v). E= -15 kV. Capilar: sílica fundida 75 μm x 360 μm, 68 cm (46 cm até o detector); detector C⁴D operando com 600 kHz e 2 Vpp; temperatura: 25°C; injeção hidrodinâmica por gravidade: 20 cm por 60 s.

No entanto, essa interferência não aparece se o aditivo orgânico no eletrólito de trabalho tampão fosfato 50 mmol L⁻¹ for alterada para 50% metanol (v/v). Além disso, o tempo de análise é superior, assim, os quatro adulterantes que foram os objetivos deste trabalho podem ser determinados por CZE na presença de 12 outros fármacos sintéticos. O eletroferograma na Figura 34 mostra que o método CZE investigado neste trabalho também cria a possibilidade de determinar, simultaneamente, oito adulterantes (anfepramona, femproporex, bupropiona, sibutramina, sertralina, fluoxetina, paroxetina, e flurazepam) em uma única corrida de 30 min, nas mesmas condições otimizadas, alterando somente o solvente orgânico, usando no eletrólito de trabalho tampão fosfato 50 mmol L⁻¹ (pH 5,0)

contendo metanol 50% (v/v). No entanto, a investigação sistemática da separação por CZE destes compostos como possíveis adulterantes de formulações de fitoterápicos será discutida em um trabalho futuro.

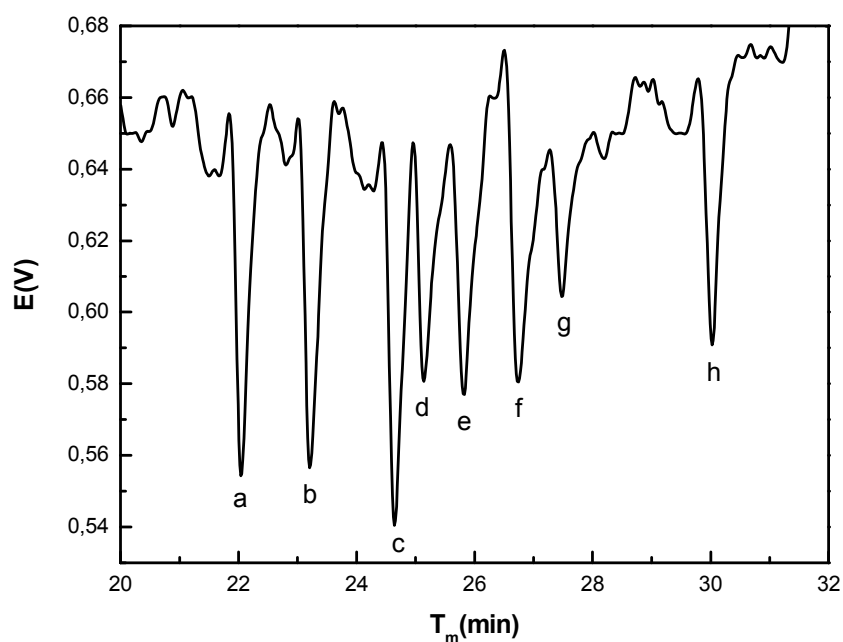


Figura 34: Eletroferograma dos adulterantes e dos interferentes estudados (a) anfepramona, (b) femproporex, (c) bupropiona, (d) sibutramina, (e) sertralina, (f) fluoxetina, (g) paroxetina, (h) flurazepam. Eletrólito de trabalho: Fosfato 50 mmol L⁻¹ (pH 5,0) contendo metanol 50 % (v/v). E= -15 kV. Capilar: sílica fundida 75 µm x 360 µm, 68 cm (46 cm até o detector); detector C⁴D operando com 600 kHz e 2 Vpp; temperatura: 25°C; injeção hidrodinâmica por gravidade: 20 cm por 60 s.

4.4 Aplicação analítica

Treze amostras de formulações fitoterápicas emagrecedoras foram analisadas pelo método desenvolvido por CZE-C⁴D, com o intuito de verificar casos de adulteração com substâncias sintéticas. Foram selecionados fitoterápicos à base de Porangaba (*Cordia salicifolia*), Quitosana, Garcinia (*Garcinia sp*), Caralluma Fimbriata (*Caralluma adscendens*), Hoodia Gordonii (*Hoodia gordonii*), Chlorella (*Chlorella pyrenoidosa*), Chá Verde (*Camellia sinensis*), Spirulina (*Spirulina maxima Setchet Gardner*) e Alcachofra (*Cynara scolymus L.*), os quais foram adquiridas em diferentes farmácias de manipulação na cidade de Santa Maria/RS. Primeiramente, foi feito um *screening* em cada uma das treze amostras, a fim de identificar a adulteração com algum dos fármacos sintéticos estudados. Não foi observada adulteração com os fármacos sintéticos anfepramona, femproporex, sibutramina e fluoxetina nas amostras analisadas. Os interferentes bupropiona, sertralina, paroxetina e flurazepam também não foram encontrados como adulterantes nas treze amostras estudadas. Para os ensaios de aplicabilidade do método proposto por CZE, ensaios de recuperação foram realizados em 7 amostras (Quitosana, Chlorella, Alcachofra, Algas Regi, Garcinia Camboja, Hoodia Gordonii, Caralluma Fibrata, Fibrothin). As amostras foram contaminadas com duas dosagens diferentes (dose diária, e metade da dose diária) de anfepramona, femproporex, sibutramina e fluoxetina, para simular a adulteração da amostra. A Tabela 9 e (Figura 35 e Figura 36) mostram os resultados obtidos para as avaliações em triplicata dos adulterantes adicionados às amostras. Os valores de recuperação mostraram-se satisfatórios, uma vez que variaram de 80,0-120,0% para todos os adulterantes investigados. Esses valores de recuperação demonstram a confiabilidade do método para a avaliação desses fármacos em amostras adulteradas por esses fármacos sintéticos.

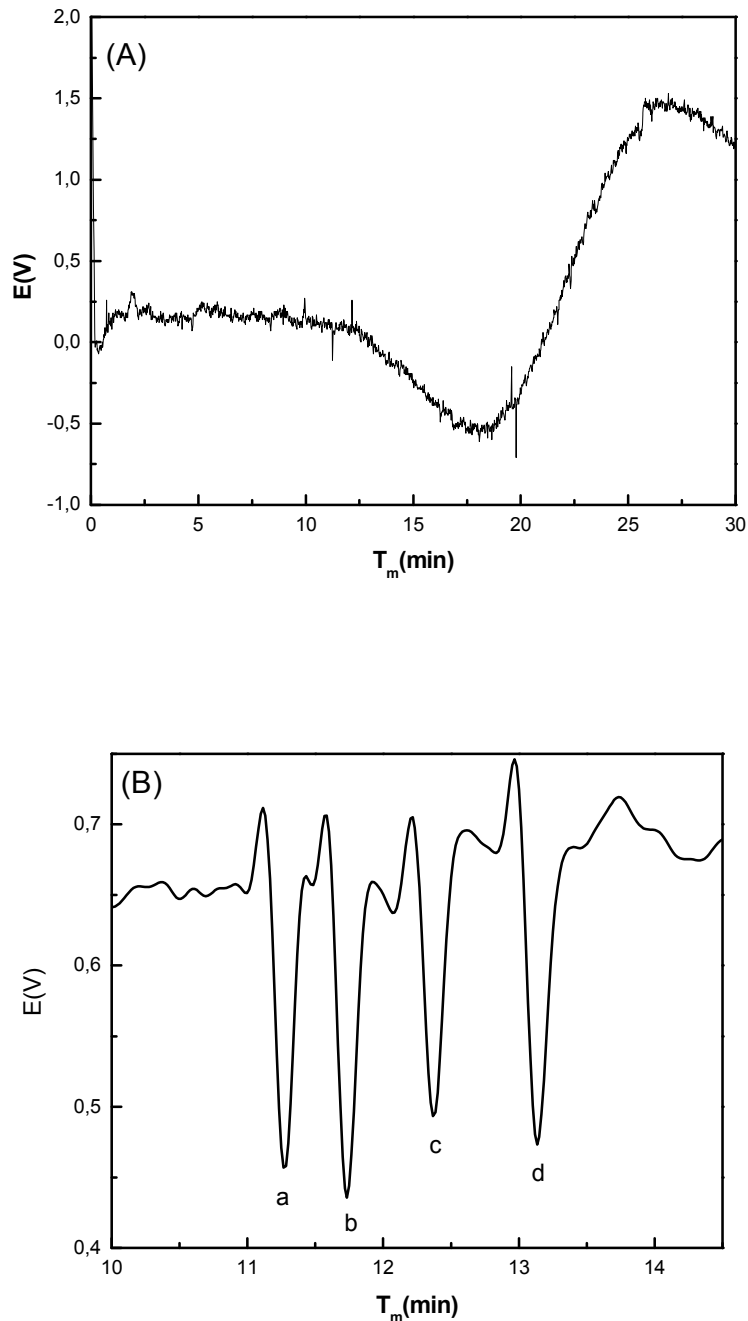


Figura 35: (A): Eletroferograma da amostra Alcachofra (*Cynara scolymus L.*), uma cápsula 500 mg é diluída em 25 mL metanol (extrato metanólico), outras condições experimentais, conforme descrito abaixo. (B): Separação por eletroforese capilar de zona dos adulterantes (a) anfepramona (75 mg), (b) femproporex (25 mg), (c) sibutramina (10 mg) e (d) fluoxetina (60 mg) mais a amostra fitoterápico. Eletrólito de trabalho: Fosfato 50 mM (pH 5,0) contendo acetonitrila 50 % (v/v); Amostra: 1:60 diluição, uma cápsula 500 mg Alcachofra (*Cynara scolymus L.*) diluída em 25 mL metanol (extrato metanólico). E= -15 kV. Capilar: sílica fundida 75 μ m x 360 μ m x 68 cm (46 cm até o detector); detector C⁴D operando com 600 kHz e 2 Vpp; temperatura: 25°C; injeção hidrodinâmica por gravidade: 20 cm por 60 s.

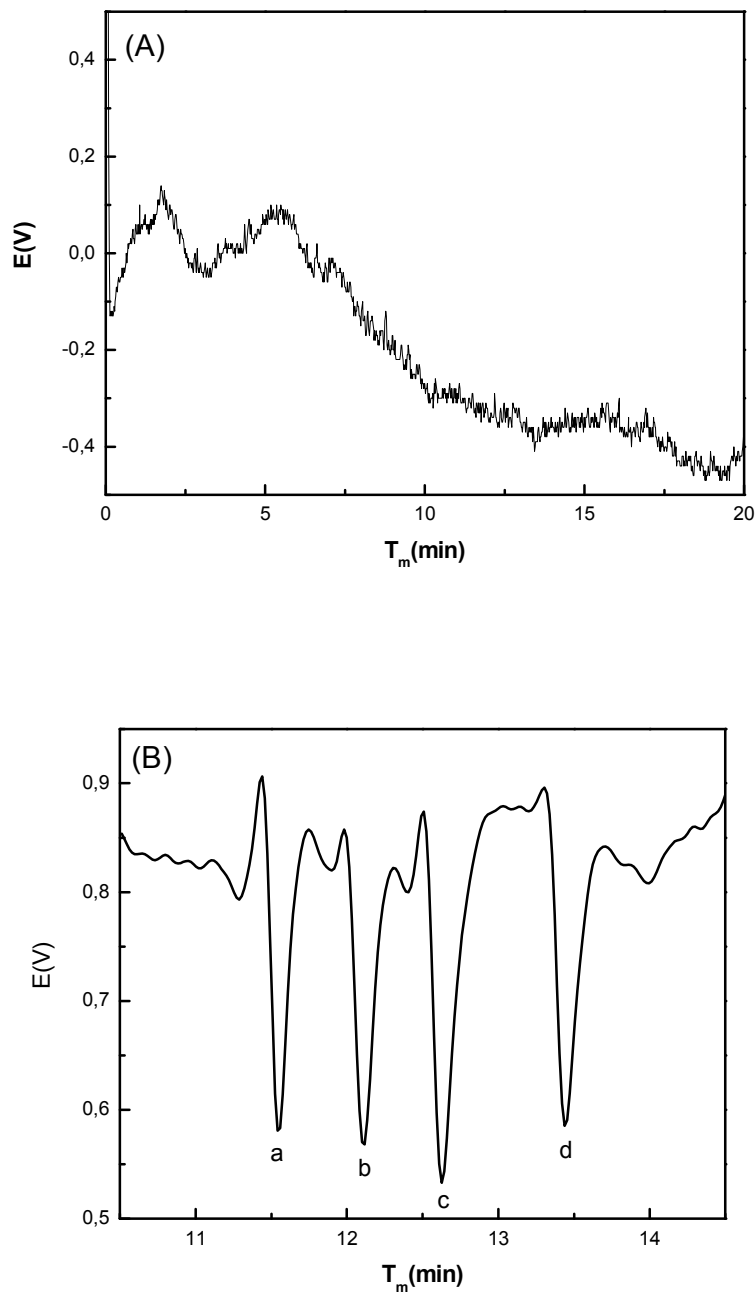


Figura 36: (A): Eletroferograma da amostra *Chlorella* (*Chlorella pyrenoidosa*), uma cápsula 250 mg é diluída em 25 mL metanol (extrato metanólico), outras condições experimentais, conforme descrito abaixo. (B): Separação por eletroforese capilar de zona dos adulterantes (a) anfepramona (75 mg), (b) femproporex (25 mg), (c) sibutramina (10 mg) e (d) fluoxetina (60 mg) mais a amostra do fitoterápico. Eletrólito de trabalho: Fosfato 50 mM (pH 5,0) contendo acetonitrila 50 % (v/v); Amostra: 1:60 diluição, cápsula 250 mg *Chlorella* (*Chlorella pyrenoidosa*) diluída em 25 mL metanol (extrato metanólico). $E = -15$ kV. Capilar: sílica fundida $75 \mu\text{m} \times 360 \mu\text{m} \times 68$ cm (46 cm até o detector); detector C^{14}D operando com 600 kHz e 2 Vpp; temperatura: 25°C ; injeção hidrodinâmica por gravidade: 20 cm por 60 s.

Tabela 9 - Ensaio de recuperação da anfepramona, femproporex, sibutramina e fluoxetina em formulações fitoterápicas emagrecedoras ($n=3$).

Fitoterápicos + Adulterantes	Adulterante (mg)		
	Adicionado	Encontrado	Recuperação (%)
<i>Alcachofra</i>			
Anfepramona	75,0	85,4	113,8
	37,5	40,8	108,8
Femproporex	25,0	25,6	102,3
	12,5	13,6	108,9
Sibutramina	10,0	9,83	98,3
	5,0	5,3	105,9
Fluoxetina	60,0	60,1	100,2
	30,0	34,5	115,0
<i>Chlorella</i>			
Anfepramona	75,0	71,3	95,0
	37,5	37,7	100,6
Femproporex	25,0	20,0	80,0
	12,5	13,0	104,0
Sibutramina	10,0	10,8	107,8
	5,0	4,9	97,4
Fluoxetina	60,0	58,7	97,8
	30,0	29,7	99,1
<i>Algas Regi</i>			
Anfepramona	75,0	75,8	101,1
	37,5	36,8	98,2
Femproporex	25,0	24,5	98,0
	12,5	13,0	103,4
Sibutramina	10,0	10,7	106,9
	5,0	5,3	106,3
Fluoxetina	60,0	68,0	113,2
	30,0	30,9	103,0

Garcinia Camboja

Anfepramona	75,0	81,7	109,0
	37,5	35,8	95,5
Femproporex	25,0	27,6	110,3
	12,5	11,8	94,0
Sibutramina	10,0	10,4	103,9
	5,0	5,0	100,3
Fluoxetina	60,0	59,6	99,4
	30,0	31,8	105,9

Hoodia Gordonii

Anfepramona	75,0	85,7	114,2
	37,5	40,8	108,9
Femproporex	25,0	26,7	106,9
	12,5	12,6	100,6
Sibutramina	10,0	11,0	110,4
	5,0	6,0	119,1
Fluoxetina	60,0	65,8	109,6
	30,0	31,4	104,6

Caralluma Fibrata

Anfepramona	75,0	84,4	112,5
	37,5	37,8	100,7
Femproporex	25,0	26,1	104,3
	12,5	13,03	104,3
Sibutramina	10,0	10,6	105,7
	5,0	6,0	119,3
Fluoxetina	60,0	69,5	115,9
	30,0	34,2	114,0

<i>Fibrothin</i>			
Anfepramona	75,0	74,8	99,7
	37,5	38,6	103,0
Femproporex	25,0	26,0	103,9
	12,5	12,0	96,6
Sibutramina	10,0	10,0	100,5
	5,0	5,4	108,2
Fluoxetina	60,0	61,7	102,9
	30,0	31,9	106,2

5 CONCLUSÃO

Neste trabalho, desenvolveu-se um método analítico utilizando eletroforese capilar de zona com detecção condutométrica sem contato capacitivamente acoplada (C⁴D), para a determinação de anfepramona, femproporex, sibutramina e fluoxetina, em formulações fitoterápicas emagrecedoras. Esse método mostrou-se adequado na análise de anfepramona, femproporex, sibutramina e fluoxetina, apresentando uma ampla faixa linear de trabalho (10 a 500 mg.L), baixos limites de detecção (4 a 5 mg.L), precisão (6 a 9%), exatidão (95 a 112%), baixo consumo de reagente e tempo reduzido de análise (15 min).

O método CZE-C⁴D também permitiu a determinação de outros fármacos sintéticos como possíveis adulterantes em formulações fitoterápicas: bupropiona, sertralina, paroxetina e flurazepam, usando as mesmas condições experimentais, alterando somente o solvente orgânico de acetonitrila para metanol no eletrólito de trabalho tampão fosfato 50 mmol L⁻¹ (pH 5,0). Portanto, este é o primeiro trabalho que descreve um método que é capaz de determinar, simultaneamente, oito possíveis adulterantes sintéticos das classes dos anorexígenos, antidepressivos e ansiolíticos.

Amostras de formulações fitoterápicas emagrecedoras adquiridas em farmácias locais foram analisadas, e nenhuma apresentou adulteração pelos fármacos sintéticos estudados: anfepramona, femproporex, sibutramina e fluoxetina. Os ensaios de recuperação realizados nas amostras de fitoterápicos com adição de concentrações conhecidas dos fármacos sintéticos em duas dosagens, mostraram-se satisfatórios, com recuperações entre 80 e 120%.

Dessa forma o método CZE-C⁴D apresentado neste trabalho permite o *screening* rápido de amostras em relação à presença de fármacos sintéticos como adulterantes, o que poderia ser muito útil para inspeções de formulações fitoterápicas emagrecedoras comerciais. Embora ainda não exista oficialmente normas estabelecidas por órgãos fiscalizadores para o controle de formulações fitoterápicas, a adulteração destas formulações é uma prática recorrente em todo o mundo. Nesse contexto, os fármacos sintéticos estudados são os mais citados em casos de adulteração em nível mundial em formulações fitoterápicas emagrecedoras.

6 REFERÊNCIAS

ALMEIDA, A.E.; RIBEIRO, M.L. High-performance liquid chromatographic determination of amfepramone hydrochloride, mazindol, and diazepam in tablets. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 22, 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.

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

AURICCHIO, M.T.; BATISTIC, M.A.; MARKMAN, B.E.O. Detecção de anorexígenos e benzodiazepínicos em formulações "naturais" empregadas em regimes de emagrecimento. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 51, p. 105-110, 1991.

AZEREDO, F.S.; GUIMARÃES, R.I.; PAULA, J.R.; CUNHA, L.C. Validação de técnica analítica em cromatografia em camada delgada comparativa para identificação de fármacos anorexígenos sintéticos em produtos fitoterápicos. **Infarma**, v. 17, n. 5/6, p. 86-88, 2005.

BÖCKEL, W.J.; MARTINI, E. M.A.; SANTOS, D.; PIATNICKI, C.M.S. Um equipamento de eletroforese capilar com detecção condutométrica construído em laboratório. **Química Nova**, v. 28, n. 6, p. 1106-1110, 2005.

CARVALHO, A.C.B.; BALBINO, E.E.; MACIEL, A; PERFEITO, J.P.S. Situação do registro de medicamentos fitoterápicos no Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 2, p. 314-319, 2008.

CARVALHO, L.M. de; NASCIMENTO, P.C. do; BOHRER, D.; CORREIA, D.; BAIROS, A.V. de; POMBLUM, V.J. Voltammetric behavior of amfepramone (diethylpropion) at the hanging mercury drop electrode and its analytical determination in pharmaceutical formulations. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 18, p. 789-796, 2007.

CARVALHO, L.M. de; SPENGLER, C.; LIMA, A. P. S. de; RAABE, A.; MARTINI, M.; NASCIMENTO, P. C. do; BOHRER D. Determinação simultânea de cátions empregando eletroforese capilar com detecção condutométrica sem contato em equipamento construído em laboratório. **Química Nova**, v.32, n. 8, p. 2203-2208, 2009.

CIANCHINO, V.; ACSTA, G.; ORTEGA, C. MARTÍNEZ, L.D.; GOMEZ, M. R.; Analysis of potential adulteration in herbal medicines and dietary supplements for the weight control by capillary electrophoresis. **Food Chemistry**, v. 108, p. 1075-1081, 2008.

CHAVES, M.A.; AKATUKA, A.S.; TRUJILLO, L.M. Dietilpropiona, femproporex, diazepam e fenolftaleína: Determinação em formulações para emagrecimento. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 54, n. 1, p. 36-43, 1994.

COHEN, P.A. Imported fenproporex – based diet pills from Brazil: a report of two cases. **Journal General Internal Medicine**, p. 430-433, 2008.

CORREIA, D. **Determinação voltamétrica de 1,4-benzodiazepínicos e dietilpropiona como adulterantes em fitoterápicos para emagrecimento.** Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Santa Maria, Brasil, 2008.

CUNHA, C.L.; AZEREDO, S.F.; GUIMARÃES, I.R.; Paula, R.J. 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, p. 69-73, 2002.

FENG, L.; SHU, L.; JIAN, L.; GUILIANG, C.; YAN, C.; YUNPENG, Q.; YIFENG, C.; YUTIAN, W. A new method for testing synthetic drugs adulterated in herbal medicines based on infrared spectroscopy. **Analytica Chimica Acta**, v. 589, p. 200-207, 2007.

GUNNAR, T.; ARINIEMI, K.; LILLSUNDE, P. Determination of 14 benzodiazepines and hydroxy metabolites, zaleplon and zolpidem as tert-butyldimethylsilyl derivatives compared with other common silylating reagents in whole blood by gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 818, p. 175-189, 2005.

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

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

JUNIOR, V.F.V.; PINTO, A.C.; MACIEL, M.A.M. Plantas medicinais: cura segura?. **Química Nova**, v.28, n. 3, p. 519-529, 2005.

KU, Y.-R.; CHANG, Y.-S.; WEN, K.-C.; HO, L.-K. 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.

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

LIANG, Q.; QU, J.; LUO, G.; WANG, Y. 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.

LIMA, A. P. S. **Desenvolvimento de métodos eletroforéticos cromatográficos para a determinação de benzodiazepínicos como adulterantes em formulações fitoterápicas para emagrecimento**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Santa Maria, Brasil, 2009.

LURIE, I.S. Capillary electrophoresis of illicit drug seizures. **Forensic Science International**, v. 92, p. 125-136, 1998.

MCAVOY, Y.; COLE, M.D.; GUENIAT, O. Analysis of amphetamines by supercritical fluid chromatography, high-performance liquid chromatography, gas chromatography and capillary zone electrophoresis a preliminary comparison. **Forensic Science International**, v. 102, p. 13-22, 1999.

MIKAMI, E.; GOTO, T.; OHNO, T.; OKA, H.; KANAMORI, H. 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 Health Science**, v. 51, p. 278-283, 2005.

MORENO, R.A.; MORENO, D.H.; SOARES, M.B.M. Psicofarmacologia de antidepressivos. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v.21, p. 24-40, 1999.

NAPPO, S.A.; CARLINI, E.A. Revisão: medicamentos anorexígenos. **Infarma**, p. 6-9, 1993.

OGA, S.; CAMARGO, M.M. DE A. BATISTUZZO, J.A DE O.; **Fundamentos de Toxicologia**, 3ª Ed. 2008.

PARODI, B.; CAVIGLIOLI, G.; BACHI, A.; CAFAGGI, S.; ROMUSSI, G. Herbal mixtures with claimed slimming activity: Determination by TLC and HPLC of illegally added drugs. **Pharmazie**, v. 48, p. 678-681, 1993.

PEIXOTO, H.G.E.; VASCONCELOS, I.A.L.; SAMPAIO, A.C.M.; ITO, M.K. Antidepressivos e alterações no peso corporal. **Revista de nutrição**, v.21, p. 341-348, 2008.

PIRNAY, S.; RICORDEL, I.; LIBONG, D.; BOUCHONNET. Sensitive method for the detection of 22 benzodiazepines by gas chromatography-ion trap tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 954, p. 235-245, 2002.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C.B.G.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F.; MELO, L.F.C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, N. 5, p. 771-780, 2004.

SANTOS, M.M.C. dos; FAMILA, V.; GONÇALVES, M.L.S. Square-wave voltammetric techniques for determination of psychoactive 1,4-benzodiazepine drugs. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 374, p. 1074-1081, 2002.

SILVA, J. A. F. da; do LAGO, C. L. An Oscillometric Detector for Capillary Electrophoresis. **Analytical Chemistry**, v.70, p.4339-4343,1998.

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

SILVA, J.A.F da; GUZMAN, N.; LAGO, C.L.do. Contactless conductivity detection for capillary electrophoresis: Hardware improvements and optimization of the input-signal amplitude and frequency. **Journal of Chromatography A**, v. 942, p. 249-258, 2002.

SILVA, J.A.F. da. Detecção eletroquímica em eletroforese capilar. **Química Nova**, v. 26, n. 1, p. 56-64, 2003.

SILVA, J.A.F. da.; Frassetto, L. Utilização de um monitor de vídeo como fonte de alta tensão para eletroforese capilar. **Química Nova**, v. 29, n. 6, p. 1377-1380, 2006.

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

SPENGLER, C. **Determinação simultânea de cátions empregando eletroforese capilar com detecção condutométrica sem contato em equipamento construído em laboratório**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Santa Maria, Brasil, 2008.

SOMBRA, L.B.; GÓMEZ, M.R.; OLSINA, R.; MARTÍNEZ, L.D.; SILVA, M.F. Comparative study between capillary electrophoresis and high performance liquid chromatography in guaranax based phytopharmaceuticals. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 36, p. 989-994, 2005.

TAGLIARO, F.; TURRINA, S.; SMITH, F.P. Capillary electrophoresis: principles and applications in illicit drug analysis. **Forensic Science International**, v. 77, p. 211-229, 1996.

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.

ZEMANN, A. J.; SCHNELL, E.; VOLGGER, D.; BONN, G. K. Contactless conductivity detection for capillary electrophoresis. **Analytical Chemistry**, v. 70, n. 7, p. 563-567, 1998.

WANG, J.; CHEN, B.; YAO, S. Analysis of six synthetic adulterants in herbal weight-reducing dietary supplements by LC electrospray ionization-MS. **Food Additives and Contaminants**, v. 25, p. 822-830, 2008.