

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

**DETERMINAÇÃO CROMATOGRÁFICA E
ELETROFORÉTICA DE DIURÉTICOS E LAXANTES
EM FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS À BASE DE
PLANTAS MEDICINAIS**

DISSERTAÇÃO

Ana Paula Lançanova Moreira

**Santa Maria, RS, Brasil
2012**

**DETERMINAÇÃO CROMATOGRÁFICA E
ELETROFORÉTICA DE DIURÉTICOS E LAXANTES EM
FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS À BASE DE PLANTAS
MEDICINAIS**

por

Ana Paula Lançanova Moreira

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração em Controle da Qualidade e Avaliação Biofarmacêutica de Insumos e Medicamentos, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências Farmacêuticas.**

Orientador: Prof. Dr. Leandro Machado de Carvalho

Santa Maria, RS, Brasil

2012

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

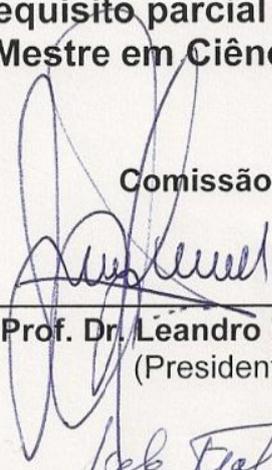
A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**DETERMINAÇÃO CROMATOGRÁFICA E ELETROFORÉTICA DE
DIURÉTICOS E LAXANTES EM FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS
À BASE DE PLANTAS MEDICINAIS**

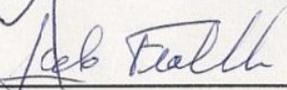
elaborada por
Ana Paula Lançanova Moreira

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

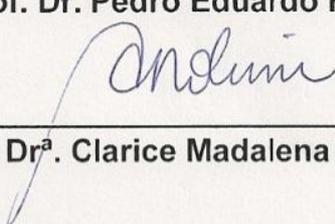
Comissão Examinadora



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



Prof. Dr. Pedro Eduardo Fröhlich (UFRGS)



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

Santa Maria, 20 de Julho de 2012

Dedico este trabalho
Aos meus amados pais, Miguel e Rejane,
pela confiança, suporte e esforços imensuráveis.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, ao Professor Leandro Machado de Carvalho, pela oportunidade em realizar este trabalho. Por sua orientação com todos os significados que esta palavra pode ter e por sua amizade dentro e fora do laboratório.

Por segundo, mas jamais menos importante, à minha família, em especial aos meus pais Miguel Moreira e Rejane Lançanova. Obrigada por toda a confiança depositada em mim, mas, sobretudo ao amor único que só vocês poderiam me dar. Meu amor por vocês também é eterno e incondicional. À minha irmã Bruna, por ter sido sempre muito mais que uma irmã, mas minha grande amiga. Amo-te.

Ao meu amor, Diogo Pizutti Koller, por todos os momentos de alegria, compreensão, apoio, e por todo amor sempre a mim dedicado. Querido, sua presença em minha vida me dá a certeza de que tudo vale a pena.

Um agradecimento mais que especial às minhas amigas queridas Mariele Martini, Larissa Müller, Géssica da Silveira, Luciana Gobo, Daiane Dias e Tatiana Falcão. Vocês são amigas, vocês são parceiras, vocês são irmãs de coração.

À Monique Motta por toda a sua ajuda na realização deste trabalho. Obrigada pelo companheirismo em todos os momentos.

A todos os demais professores e colegas do Lachem. Obrigada pessoal por todos os momentos compartilhados, a convivência, as trocas de experiência, os papos soltos na cozinha, enfim, momentos que contribuíram para o meu crescimento pessoal e profissional ou também que em nada contribuíram, mas que foram felizes. Todos vocês foram importantes direta ou indiretamente na realização deste trabalho. Alguns posso não encontrar mais daqui uns anos, outros talvez a vida permita cruzar mais vezes o caminho, muitos terei como amigos, mas todos serão lembrados sempre com muito carinho.

À banca avaliadora pela disponibilidade em avaliar este trabalho e, desde já, por suas contribuições.

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

À CAPES, pela concessão da bolsa de mestrado.

À Deus, por Sua luz, benção e proteção.

*“Se eu pudesse deixar algum presente a você,
deixaria aceso o sentimento de amar a vida dos seres humanos.
A consciência de aprender tudo o que foi ensinado pelo tempo a fora.
Lembraria os erros que foram cometidos para que não mais se repetissem.
A capacidade de escolher novos rumos.
Deixaria para você, se pudesse, o respeito àquilo que é indispensável.
Além do pão, o trabalho. Além do trabalho, a ação.
E, quando tudo mais faltasse, um segredo:
o de buscar no interior de si mesmo a resposta e a força para encontrar a saída”.*

Mahatma Gandhi

RESUMO

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

DETERMINAÇÃO CROMATOGRÁFICA E ELETROFORÉTICA DE DIURÉTICOS E LAXANTES EM FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS A BASE DE PLANTAS MEDICINAIS

AUTORA: ANA PAULA LANÇANOVA MOREIRA
ORIENTADOR: LEANDRO MACHADO DE CARVALHO
Local e data da Defesa: Santa Maria, 20 de Julho de 2012

O uso de ervas medicinais como tratamento alternativo tem crescido por se acreditar que produtos naturais não causam danos à saúde. No entanto casos de adulteração de produtos naturais com adição não declarada de fármacos sintéticos, presumidamente para aumentar a eficácia dos mesmos, têm sido relatados na literatura. No caso de formulações emagrecedoras os principais adulterantes já encontrados são anorexígenos, antidepressivos, benzodiazepínicos, diuréticos e laxantes. A identificação destas fraudes só é possível com a aplicação de metodologias analíticas capazes de detectar a presença destes adulterantes nas formulações. Este trabalho descreve o desenvolvimento de duas metodologias empregando técnicas de separação com detecção eletroquímica para a determinação de diuréticos e laxantes como adulterantes em produtos naturais. O método empregando eletroforese capilar de zona (CZE) com detecção por condutividade sem contato (C⁴D) permite a determinação simultânea de amilorida, clortalidona, hidroclorotiazida, furosemida e fenolftaleína nas condições otimizadas: eletrólito de trabalho tampão fosfato 20 mmol L⁻¹ (pH 9,2) contendo metanol 30% (v/v), potencial de separação -15 Kv, temperatura 25 °C; injeção hidrodinâmica por gravidade em 20 cm durante 60 s. O método empregando cromatografia de par iônico (IPC) com detecção por amperometria pulsada (PAD) permite a determinação de hidroclorotiazida, clortalidona e furosemida nas seguintes condições: fase móvel tampão fosfato 5 mmol L⁻¹ (pH 4,5) contendo SDS 0,3 mmol L⁻¹ e metanol 50% (v/v); potencial de amostragem de +0,8 V; potenciais de limpeza de -0,2 V e +1,0 V; e fluxo de 1,0 mL/min. Os dois métodos foram validados nos parâmetros de linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, precisão, exatidão e seletividade e, foram aplicados na análise de 26 amostras de produtos naturais emagrecedores adquiridos de farmácias de manipulação de nove estados brasileiros. Em três das 26 amostras foi identificada a presença ilegal do diurético hidroclorotiazida em concentrações que variaram de 0,6 a 7,0 mg/cápsula. Além disso, outras cinco amostras ditas naturais continham declarado no rótulo das embalagens a presença dos diuréticos sintéticos hidroclorotiazida ou furosemida. Os dois métodos foram capazes de identificar os adulterantes presentes nas amostras com alta seletividade e sensibilidade. Além disso, apresentaram resultados bastante aproximados com relação às concentrações encontradas dos adulterantes nas formulações. Ainda não existe uma regulamentação unificada estabelecida pelos órgãos governamentais para o controle de produtos fitoterápicos. Cada país tem a sua legislação, porém a comercialização destes produtos é globalizada. Talvez por isso a adulteração de produtos naturais vem sendo uma prática recorrente em diversas partes do mundo. Logo, uma regulamentação efetiva para os produtos de origem natural, pode resultar na redução destas infrações, ou punição dos infratores, garantindo assim os direitos dos consumidores de realizar um tratamento de qualidade, seguro e eficaz, sem prejuízo à saúde.

Palavras-chave: Formulações farmacêuticas, adulterantes, diuréticos, laxantes, métodos de separação, detecção eletroquímica.

ABSTRACT

Master Dissertation
Program of Postgraduate in Pharmaceutical Science
Federal University of Santa Maria

CHROMATOGRAPHIC AND ELECTROPHORETIC DETERMINATION OF DIURETICS AND LAXATIVES IN HERBAL-BASED PHARMACEUTICAL FORMULATIONS

AUTHOR: ANA PAULA LANÇANOVA MOREIRA
ADVISOR: LEANDRO MACHADO DE CARVALHO
Local and date of Defesa: Santa Maria, July 20th, 2012.

The use of herbal medicines as an alternative treatment has increased by the belief that natural products do not cause damage to health. However cases in which natural products are added of synthetic drugs not declared, presumably to enhance the effectiveness them have been reported in the literature. In the case of weight loss formulations the main adulterants found are appetite suppressants, antidepressants, benzodiazepines, diuretics and laxatives. The identification of these frauds is only possible by applying the analytical methods able to detect the presence of adulterants in the formulations. This paper describes the development of two methods employing separation techniques with electrochemical detection for the determination of diuretics and laxatives as adulterants in herbal products. The method employing capillary zone electrophoresis (CZE) with contactless conductivity detection (C⁴D) allows the simultaneous determination of amiloride, chlorthalidone, hydrochlorothiazide, furosemide and phenolphthalein in the following optimized conditions: working electrolyte phosphate buffer 20 mmol L⁻¹ (pH 9.2) containing 30% methanol (v/v) separation potential -15 kV, temperature 25 °C, injection hydrodynamic by gravity in 20 cm for 60 seconds. The method employing ion pair chromatography (IPC) with pulsed amperometric detection (PAD) allows the determination of hydrochlorothiazide, chlorthalidone and furosemide on the following conditions: mobile phase phosphate buffer 5 mmol L⁻¹ (pH 4.5) containing SDS 0.3 mmol L⁻¹ and 50% methanol (v/v), sample potential of +0.8 V, the cleaning potential of -0.2 V and +1.0 V, and flow rate of 1.0 mL/min. Both methods were validated in the parameters of linearity, limit of detection limit of quantification, precision, accuracy and selectivity, and were applied in the analysis of 26 samples of natural weight loss products purchased from pharmacies in nine Brazilian states. In three of 26 samples were identified the presence of illegal diuretic hydrochlorothiazide in concentrations ranging from 0.6 to 7.0 mg/capsule. In addition, five other samples called naturals contained declared on the label of the packaging the presence of synthetic diuretics hydrochlorothiazide or furosemide. Both methods were able to identify the adulterants present in samples with high selectivity and sensitivity. Furthermore, they presented very approximate results in the concentration of adulterants found in the formulations. There is still no unified regulation established by the government for control of herbal products. Each country has its laws, but the marketing is global. Maybe this is the reason why the adulteration of natural products has been a recurring practice in various parts of the world. Therefore, effective regulation for the natural products can result in the reduction of these offenses, and punishment of offenders, thus ensuring the rights of consumers to make quality treatment, safe and effective, without prejudice to health.

Keywords: Pharmaceutical formulations, adulterants, diuretics, laxatives, methods of separation, electrochemical detection.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Representação em diagrama de blocos do equipamento de eletroforese capilar construído em laboratório (CARVALHO *et al*, 2009).....29
- Figura 2** - Representação estrutural do surfactante aniônico Dodecil Sulfato de Sódio (SDS).....33
- Figura 3** - Ciclo de potencial aplicado ao eletrodo permitindo o seu recondicionamento e regeneração. E_1 é o potencial de amostragem, enquanto E_2 é o potencial de oxidação e E_3 o potencial de redução.....35
- Figura 4** - Foto do equipamento CE-C⁴D construído em laboratório.....42
- Figura 5** - Foto do equipamento HPLC-PAD (Metrohm[®], Suíça).....44
- Figura 6** - Foto da célula de detecção aberta com o eletrodo de trabalho de ouro (Au) e o eletrodo de referência de hidrogênio (Hy-REF) empregado na detecção amperométrica (Metrohm[®], Suíça)..... 45
- Figura 7** - Efeito da concentração do tampão fosfato no eletrólito de trabalho sob os tempos de migração dos fármacos sintéticos em concentrações de 100 mg L⁻¹. Condições: eletrólito de trabalho com metanol 30% (pH 9,2), potencial de separação -15 Kv, capilar de sílica fundida 75 µm × 360 µm × 68 cm (46 cm até o detector); detecção indireta por C⁴D operando em 400 kHz; temperatura 25 °C; injeção hidrodinâmica por gravidade de 20 cm durante 60 s.....49
- Figura 8** - Efeito da variação do pH no eletrólito de trabalho e nos tempos de migração dos fármacos sintéticos em concentrações de 100 mg L⁻¹, para valores de pH (7,0 a 10,0). Condições: eletrólito de trabalho tampão fosfato 20 mmol L⁻¹ contendo metanol 30% (v/v), potencial de separação -15 Kv, capilar de sílica fundida 75 µm × 360 µm × 68 cm (46 cm até o detector); detecção indireta por C⁴D operando em 400 kHz; temperatura 25 °C; injeção hidrodinâmica por gravidade de 20 cm durante 60 s.....50
- Figura 9** - Efeito da concentração solvente orgânico metanol nos tempos de migração dos fármacos sintéticos em concentrações de 100 mg L⁻¹, para concentrações de solvente de 5 a 50%. Condições: eletrólito de trabalho tampão fosfato 20 mmol L⁻¹ (pH 9,2), potencial de separação -15 Kv, capilar de sílica fundida 75 µm × 360 µm × 68 cm (46 cm até o detector); detecção indireta por C⁴D operando em 400 kHz; temperatura 25 °C; injeção hidrodinâmica por gravidade de 20 cm durante 60 s.....52
- Figura 10** - Efeito do potencial de separação nos tempos de migração dos fármacos sintéticos em concentrações de 100 mg L⁻¹, para valores de 8-17 kV. Condições: eletrólito de trabalho tampão fosfato 20 mmol L⁻¹ (pH 9,2) contendo metanol 30% (v/v), capilar de sílica fundida 75 µm × 360 µm × 68 cm (46 cm até o detector); detecção indireta por C⁴D operando em 400 kHz; temperatura 25 °C; injeção

hidrodinâmica por gravidade de 20 cm durante 60 s.....53

Figura 11 - Efeito do tempo de injeção na área dos picos dos fármacos sintéticos em concentrações de 100 mg L^{-1} , para valores de 60 e 120 s. Condições: eletrólito de trabalho tampão fosfato 20 mmol L^{-1} (pH 9,2) contendo metanol 30% (v/v), potencial de separação -15 Kv, capilar de sílica fundida $75 \mu\text{m} \times 360 \mu\text{m} \times 68 \text{ cm}$ (46 cm até o detector); detecção indireta por C^4D operando em 400 kHz; temperatura $25 \text{ }^\circ\text{C}$; injeção hidrodinâmica por gravidade de 20 cm.....54

Figura 12 - Efeito da altura de injeção na altura dos picos dos fármacos sintéticos em concentrações de 100 mg L^{-1} , para valores de 10, 15, 20 e 25 cm. Condições: eletrólito de trabalho tampão fosfato 20 mmol L^{-1} (pH 9,2) contendo metanol 30% (v/v), potencial de separação -15 Kv, capilar de sílica fundida $75 \mu\text{m} \times 360 \mu\text{m} \times 68 \text{ cm}$ (46 cm até o detector); detecção: indireta C^4D operando em 400 kHz; temperatura $25 \text{ }^\circ\text{C}$; injeção hidrodinâmica por gravidade de 60 s.....54

Figura 13 - Efeito da frequência de operação do detector na área dos picos dos fármacos sintéticos em concentrações de 100 mg L^{-1} , para valores de 200 a 1000 kHz. Condições: eletrólito de trabalho tampão fosfato 20 mmol L^{-1} (pH 9,2) contendo metanol 30% (v/v), potencial de separação -15 Kv, capilar de sílica fundida $75 \mu\text{m} \times 360 \mu\text{m} \times 68 \text{ cm}$ (46 cm até o detector); detecção indireta por C^4D ; temperatura $25 \text{ }^\circ\text{C}$; injeção hidrodinâmica por gravidade de 20 cm durante 60 s.....55

Figura 14 - Eletroferograma dos adulterantes (100 mg L^{-1}) (a) amilorida, (b) clortalidona, (c) fenolftaleína, (d) hidroclorotiazida, (e) furosemida. Condições: eletrólito de trabalho tampão fosfato 20 mmol L^{-1} (pH 9,2) contendo metanol 30% (v/v), potencial de separação -15 Kv, capilar de sílica fundida $75 \mu\text{m} \times 360 \mu\text{m} \times 68 \text{ cm}$ (46 cm até o detector); detecção indireta por C^4D operando em 400 kHz; temperatura $25 \text{ }^\circ\text{C}$; injeção hidrodinâmica por gravidade de 20 cm durante 60 s.....56

Figura 15 - Eletroferograma dos adulterantes e dos interferentes estudados (100 mg L^{-1}) (a) fluoxetina, (b) paroxetina, (c) amilorida, (d) anfepramona, (e) clortalidona, (f) fenolftaleína, (g) hidroclorotiazida, (h) furosemida. Condições: eletrólito de trabalho tampão fosfato 20 mmol L^{-1} (pH 9,2) contendo metanol 30% (v/v), potencial de separação -15 Kv, capilar de sílica fundida $75 \mu\text{m} \times 360 \mu\text{m} \times 68 \text{ cm}$ (46 cm até o detector); detecção indireta por C^4D operando em 400 kHz; temperatura $25 \text{ }^\circ\text{C}$; injeção hidrodinâmica por gravidade de 20 cm durante 60 s.....57

Figura 16 - Eletroferograma de amostra fitoterápica A, na qual foi detectado o pico eletroforético da hidroclorotiazida. A amostra contém *Fucus vesiculosus* 80 mg, *Centella asiatica* 80 mg, *Spirulina maxima* 80 mg, *Passiflora* sp. 50 mg, *Rhamnus purshiana* 100 mg, cafeína 30 mg, hidroclorotiazida 10 mg. Condições: eletrólito de trabalho tampão fosfato 20 mmol L^{-1} (pH 9,2) contendo metanol 30% (v/v), potencial de separação -15 Kv, capilar de sílica fundida $75 \mu\text{m} \times 360 \mu\text{m} \times 68 \text{ cm}$ (46 cm até o detector); detecção indireta por C^4D operando em 400 kHz; temperatura $25 \text{ }^\circ\text{C}$; injeção hidrodinâmica por gravidade de 20 cm durante 60 s.....61

Figura 17 - Eletroferograma de amostra fitoterápica B, na qual foi detectado o pico eletroforético da furosemida. A amostra contém *Cassia augustifolia*, *Fucus vesiculosus*, furosemida, *Rhamnus purshiana*, *Garcinia cambogia*, *Cyamopsis* sp.

Condições: eletrólito de trabalho tampão fosfato 20 mmol L⁻¹ (pH 9,2) contendo metanol 30% (v/v), potencial de separação -15 Kv, capilar de sílica fundida 75 µm × 360 µm × 68 cm (46 cm até o detector); detecção indireta por C⁴D operando em 400 kHz; temperatura 25 °C; injeção hidrodinâmica por gravidade de 20 cm durante 60 s.....61

Figura 18 – Estudo do potencial dos adulterantes estudados na faixa de -0,2 V a +1,1 V pelo modo DC (corrente contínua, do inglês, *direct current*) do equipamento. Adulterantes: furosemida, hidroclorotiazida, clortalidona, amilorida e fenolftaleína (10 mg L⁻¹). Fase móvel: tampão fosfato 5 mmol L⁻¹ (pH 4,5) e metanol 50% (v/v).....64

Figura 19 - Ciclo de potencial escolhido para o recondicionamento e regeneração do eletrodo de ouro. O potencial de amostragem (E₁) escolhido foi +0,8 V, enquanto que o potencial de oxidação (E₂) foi de +1,0 V e o potencial de redução (E₃) de -0,2 V.....64

Figura 20- Cromatograma dos adulterantes (5 mg L⁻¹) (a) hidroclorotiazida, (b) clortalidona e furosemida. Condições: fase móvel tampão fosfato 5 mmol L⁻¹ (pH 4,5) e metanol 50% (v/v); coluna C18; potencial de amostragem de +0,8 V; potenciais de limpeza de -0,2 V e +1,0 V; e fluxo de 0,5 mL/min.....65

Figura 21 - Cromatograma dos adulterantes (5 mg L⁻¹) (a) hidroclorotiazida, (b) clortalidona, (c) furosemida. Condições: fase móvel tampão fosfato 5 mmol L⁻¹ (pH 4,5) contendo SDS 0,3 mmol L⁻¹ e metanol 50% (v/v); coluna C18; potencial de amostragem de +0,8 V; potenciais de limpeza de -0,2 V e +1,0 V; e fluxo de 1,0 mL/min.....67

Figura 22 - Cromatograma dos adulterantes (5 mg L⁻¹) (a) hidroclorotiazida, (b) clortalidona, (c) furosemida, (d) bromazepam, (e) clonazepam, (f) lorazepam, (g) alprazolam. Condições: fase móvel tampão fosfato 5 mmol L⁻¹ (pH 4,5) contendo SDS 0,3 mmol L⁻¹ e metanol 50% (v/v); coluna C18; potencial de amostragem de +0,8 V; potenciais de limpeza de -0,2 V e +1,0 V; e fluxo de 1,0 mL/min.....68

Figura 23: Cromatograma da amostra fitoterápica A, na qual foi detectado o pico eletroforético da hidroclorotiazida. A amostra contém *Fucus vesiculosus* 80 mg, *Centella asiatica* 80 mg, *Spirulina maxima* 80 mg, *Passiflora* sp. 50 mg, *Rhamnus purshiana* 100 mg, cafeína 30 mg, hidroclorotiazida 10 mg. Condições: fase móvel tampão fosfato 5 mmol L⁻¹ (pH 4,5) contendo SDS 0,3 mmol L⁻¹ e metanol 50% (v/v); coluna C18; potencial de amostragem de +0,8 V; potenciais de limpeza de -0,2 V e +1,0 V; e fluxo de 1,0mL/min.....71

Figura 24: Cromatograma da amostra fitoterápica B, na qual foi detectado o pico eletroforético da furosemida. A amostra contém *Cassia augustifolia*, *Fucus vesiculosus*, furosemida, *Rhamnus purshiana*, *Garcinia cambogia*, *Cyamopsis* sp. Condições: fase móvel tampão fosfato 5 mmol L⁻¹ (pH 4,5) contendo SDS 0,3 mmol L⁻¹ e metanol 50% (v/v); coluna C18; potencial de amostragem de +0,8 V; potenciais de limpeza de -0,2 V e +1,0 V; e fluxo de 1,0 mL/min.....71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Diuréticos e laxante estudados.....	23
Tabela 2 – Algumas plantas medicinais com ação diurética e laxativa.....	26
Tabela 3 - Fármacos estudados como adulterantes e interferentes no desenvolvimento do trabalho.....	41
Tabela 4 - Composição e origem das 26 amostras analisadas.....	46
Tabela 5 - Dados de linearidade do método CZE-C ⁴ D.....	58
Tabela 6 - Limites de detecção (LD) e limites de quantificação (LQ) para os adulterantes estudados pelo método CZE-C ⁴ D.....	58
Tabela 7 - Precisão intra-dia e intermediária do método CZE-C ⁴ D.....	59
Tabela 8 - Amostras contendo fármacos sintéticos declarados e amostras adulteradas analisadas pelo método CZE-C ⁴ D com suas respectivas concentrações.....	62
Tabela 9 - Dados de linearidade do método IPC-PAD.....	69
Tabela 10 - Limites de detecção (LD) e limites de quantificação (LQ) para os adulterantes estudados pelo método IPC-PAD.....	69
Tabela 11 - Precisão intra-dia do método IPC-PAD.....	69
Tabela 12 - Amostras contendo fármacos sintéticos declarados e amostras adulteradas analisadas pelo método IPC-PAD com suas respectivas concentrações.....	72
Tabela 13 – Análise comparativa entre os métodos de separação desenvolvidos...73	
Tabela 14 – Comparação entre as concentrações encontradas para os adulterantes presentes nas amostras pelos métodos CZE-C ⁴ D e IPC-PAD.....	74

LISTA DE SIGLAS E ABREVIações

OMS	Organização Mundial da Saúde
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
FDA	Food and Drug Administration
EMA	European Medicines Agency
CE	Eletroforese Capilar
EOF	Fluxo Eletroosmótico
CZE	Eletroforese Capilar de Zona
C⁴D	Deteção por Condutividade sem Contato
UV	Ultravioleta
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
IPC	Cromatografia de Par Iônico
PAD	Deteção Amperométrica Pulsada
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
SOS	Octil Sulfato de Sódio
UV-VIS	Ultravioleta-Visível
LD	Limite de Deteção
LQ	Limite de Quantificação
DPR	Desvio Padrão Relativo
CV	Coeficiente de Variação
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
NaOH	Hidróxido de Sódio
H₃PO₄	Ácido Fosfórico
pH	Potencial Hidrogeniônico
RS	Rio Grande do Sul
SC	Santa Catarina
PR	Paraná
SP	São Paulo
RJ	Rio de Janeiro
MG	Minas Gerais
CE	Ceará
GO	Goiás
DF	Distrito Federal
pKa	Constante de dissociação ácida
DC	Corrente Contínua

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 OBJETIVOS	18
2.1 Objetivo Geral	18
2.2 Objetivos Específicos	18
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
3.1 Obesidade	20
3.2 Fármacos Coadjuvantes no Tratamento da Obesidade	21
3.2.1 Diuréticos	22
3.2.1 Laxantes	22
3.3 Formulações Farmacêuticas	24
3.4 A Prática da Adulteração de Formulações Herbáreas	25
3.5 Metodologias Analíticas para a Determinação de Adulterantes	26
3.6 Eletroforese Capilar (CE)	28
3.6.1 Eletroforese Capilar de Zona com Detecção por Condutividade sem Contato (CZE-C ⁴ D)	29
3.7 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)	31
3.7.1 Cromatografia de Par Iônico com Detecção Amperométrica Pulsada (IPC-PAD).....	32
3.8 Determinação de Diuréticos e Laxantes por CE e HPLC	35
3.9 Validação Analítica	36
4 MATERIAIS E MÉTODOS	40
4.1 Instrumentação	40
4.2 Reagentes e Soluções	40
4.3 Procedimentos Analíticos	42
4.3.1 Determinação por CE	42
4.3.2 Determinação por HPLC	43
4.3.3 Amostras de Formulações Fitoterápicas	45
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
5.1 Eletroforese Capilar de Zona	48
5.1.1 Otimização das Condições do Eletrólito de Trabalho	48

5.1.2 Otimização dos Parâmetros Operacionais	52
5.1.3 Validação do Método	56
5.1.4 Aplicação Analítica	60
5.2 Cromatografia de Par Iônico (IPC)	63
5.2.1 Otimização do Método	63
5.2.2 Validação do Método	67
5.2.3 Aplicação Analítica	70
5.3 Análise Comparativa dos Métodos de Separação.....	72
6 CONCLUSÃO	76
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	78

1 INTRODUÇÃO

A obesidade no mundo associada ao alto consumo de substâncias emagrecedoras tem sido considerada um problema de saúde pública. O aumento do consumo de produtos naturais como tratamento alternativo, bem como o desconhecimento dos seus reais benefícios a saúde, tem feito destes alvos de investigação e permitido a revelação de casos nos quais fármacos sintéticos são adicionados ilegalmente, como adulterantes, em algumas dessas formulações ditas naturais.

Os casos de adulteração infringem a lei de muitos países, uma vez que as formulações são registradas em desacordo com a sua real composição. Essas adulterações podem levar ao aparecimento de efeitos imprevisíveis a saúde do usuário tanto por seus efeitos isolados como pelo resultado da interação com as demais substâncias presentes na formulação.

As possibilidades de adulteração para formulações emagrecedores são vastas uma vez que existem diferentes classes de medicamentos que podem ser empregadas para esse fim, sejam elas específicas para perder peso ou com ação coadjuvante como é o caso de diuréticos e laxantes. Estes, apesar de não serem tão efetivos na redução de peso, merecem atenção especial em virtude dos riscos que podem causar a saúde.

A ocorrência de casos de adulteração em formulações naturais emagrecedoras comprova a necessidade de maiores informações sobre os possíveis riscos oferecidos por estes produtos para a população que faz uso dos mesmos. Além disso, mostra que é falha a fiscalização sobre a produção e liberação destes produtos no mercado. Este problema é muitas vezes consequência da falta de uma unificação na regulamentação dos produtos naturais no mundo todo, visto que, mesmo os importados são de fácil acesso. Por isso, tem-se a necessidade de um maior controle fiscal sobre a fabricação e comercialização destes produtos, bem como da divulgação desses casos que infringem a lei, como forma de alertar a sociedade sobre essa realidade e garantir aos consumidores o direito de fazer uso das formulações naturais com segurança.

O desenvolvimento de metodologias analíticas voltadas para a análise de adulterantes em formulações farmacêuticas naturais vem ao encontro deste problema e tem possibilitado a revelação dessas fraudes e permitido um melhor controle fiscal. Cromatografia líquida de alta eficiência e eletroforese capilar são técnicas de separação com alto poder de resolução e podem ser facilmente aplicadas em amostras complexas como as formulações a base de plantas. Além disso, métodos analíticos com detecção eletroquímica apresentam vantagens sobre os demais métodos, sobretudo, pela alta sensibilidade que proporcionam à análise, uma vez que, considerando-se a presença de adulterantes ou mesmo de outros contaminantes, é esperado encontrá-los em baixas concentrações.

Apesar de haver a disponibilidade de métodos cromatográficos para a análise dos fármacos em estudo neste trabalho, estes métodos empregam detectores de arranjo de diodos, ultravioleta ou espectrometria de massas, diferentes da detecção por amperometria pulsada que será empregada neste trabalho. Com relação aos métodos eletroforéticos, ainda não se tem um trabalhos priorizando a análise de diuréticos e laxantes na condição de adulterantes de formulações naturais. Portanto, ambos os métodos a serem desenvolvidos trazem algo de inédito para contribuir com as melhorias no controle de qualidade dos produtos naturais.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Desenvolver metodologias analíticas para o estudo de adulterantes da classe dos diuréticos e laxantes em formulações farmacêuticas naturais empregadas no tratamento da obesidade.

2.2 Objetivos Específicos

- Otimizar uma metodologia analítica para a determinação de diuréticos e laxantes por eletroforese capilar de zona com detecção por condutividade sem contato (CE- C⁴D).

- Otimizar uma metodologia analítica para a determinação de diuréticos e laxantes por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção amperométrica pulsada (HPLC-PAD).

- Estudar a aplicabilidade das metodologias a serem desenvolvidas na determinação seletiva dos seguintes fármacos diuréticos e laxantes como adulterantes em formulações farmacêuticas naturais: furosemida, hidroclorotiazida, clortalidona, amilorida e fenolftaleína.

- Estudar a interferência de outras classes farmacológicas que podem estar presentes como adulterantes em formulações emagrecedoras à base de plantas medicinais como os anorexígenos (anfepiramina, femproporex e sibutramina), antidepressivos (fluoxetina, paroxetina, sertralina e bupropiona) e ansiolíticos (diazepam, alprazolam, flurazepam, lorazepam, clonazepam, bromazepam e clordiazepóxido).

- Validar os métodos sob os parâmetros de especificidade, linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, precisão e exatidão e robustez do método.

- Aplicar as metodologias analíticas desenvolvidas na determinação dos adulterantes em formulações farmacêuticas naturais empregadas no tratamento da obesidade comercializadas em diferentes estados brasileiros.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Obesidade

A obesidade é considerada, hoje, pela Organização Mundial da Saúde (OMS) um dos dez principais problemas de saúde pública do mundo. A situação é tão alarmante que a doença passou a ser vista como epidêmica. No Brasil mais de 65 milhões de pessoas estão com excesso de peso, enquanto 10 milhões são consideradas obesas. Os números avançam rapidamente entre todas as idades e classes sociais e estima-se que até 2030 o índice da doença aumente 30% no país (WHO, 2012).

Além da obesidade e/ou sobrepeso propriamente ditos, algumas patologias estão diretamente associadas, entre elas as doenças cardiovasculares, hipertensão, diabetes mellitus tipo 2 e alguns tipos de câncer (DEWALD *et al.*, 2006).

Uma mudança global na dieta e uma tendência a não realização de exercícios físicos são considerados os principais fatores responsáveis pela realidade da obesidade no mundo de hoje, consequências do ambiente moderno no qual vivemos (AZEREDO *et al.*, 2005).

Por razões estéticas e para melhorar a qualidade de vida, as pessoas buscam tratamentos de redução de peso que devem ter como base a reeducação alimentar e mudanças no estilo de vida. Porém, o insucesso com esse tipo de tratamento ou mesmo o desejo em obter rápidos resultados leva a população a recorrer ao uso de medicamentos emagrecedores, como os anorexígenos (CUNHA *et al.*, 2002)

O uso destes medicamentos, no entanto, tem sido cuidadosamente revisto devido aos riscos a que expõe a saúde do usuário, como graves problemas cardiopulmonares e no sistema nervoso central, causando inclusive dependência e tolerância (MANCINI; HALPERN, 2006). Os anorexígenos têm sido também questionados quanto a sua efetividade em longo prazo. Estes fatos limitam seu emprego terapêutico, motivo que levou alguns países a

proibirem a sua utilização. Por essas razões, a legislação vigente tem tornado cada vez mais restrita a disponibilidade destes fármacos no mercado (BRASIL, 2011) com a proibição do uso e/ou maior controle fiscal sobre os mesmos.

Com isso, muitos pacientes procuram meios alternativos para perder peso. Um deles é o uso de fármacos coadjuvantes no tratamento da obesidade, como é o caso dos diuréticos e dos laxantes. Outro meio é a busca por tratamentos naturais, como a fitoterapia, que tem crescido consideravelmente nos últimos tempos, principalmente, sob o forte apelo de que por se tratar de produtos de origem natural não oferecem risco à saúde do usuário (SOMBRA *et al.*, 2005).

3.2 Fármacos Coadjuvantes no Tratamento da Obesidade

O tratamento da obesidade é um assunto que gera muitas controvérsias, principalmente em torno dos tratamentos farmacológicos disponíveis. Nenhum medicamento cura permanentemente a obesidade e, como a maioria das doenças crônicas, há reincidências quando o tratamento é interrompido. Uma vez que o acesso a fármacos emagrecedores, propriamente ditos, tem sido restringido, o abuso de fármacos coadjuvantes, como os diuréticos e laxantes, tem chamado atenção (RIVM, 2009).

Sérios problemas médicos podem decorrer do uso excessivo desses fármacos como, por exemplo, distúrbios eletrolíticos e metabólicos. Além disso, esses fármacos não reduzem a gordura corporal, mas sim o conteúdo de água do organismo podendo provocar ainda uma desidratação (AL-SAFI *et al.*, 2008).

Estes fármacos possuem grande potencial como adulterantes por serem de fácil acesso e de baixo custo. Os diuréticos, em especial, podem aparecer também como adulterantes em produtos naturais utilizados no tratamento da hipertensão, bem como, em suplementos utilizados por atletas, caracterizando *doping*.

3.2.1 Diuréticos

Os diuréticos são fármacos que tem a propriedade de causar aumento do volume urinário e cujo mecanismo básico é a inibição da reabsorção tubular de sódio e água. Os diuréticos podem ser classificados de acordo com suas estruturas químicas, eficácia, mecanismos e/ou local de ação (SILVA, 2006).

Os fármacos mais comumente utilizados pertencem à classe dos tiazídicos (hidroclorotiazida, clortalidona), diuréticos de alça (furosemida) e poupadores de potássio (amilorida) (SILVA, 2006).

Os diuréticos, principalmente os tiazídicos quando em doses elevadas, podem causar várias alterações eletrolíticas e metabólicas. Dentre estas alterações podemos citar o aumento do colesterol e dos triglicerídeos, oferecendo riscos cardiovasculares a longo prazo. Podem causar ainda diminuição da excreção tubular de ácido úrico não devendo ser usado por pacientes com hiperuricemia, bem como diminuição da excreção urinária de cálcio, não sendo recomendado para pacientes com hipercalemia ou hiperparatireoidismo. Outro efeito colateral comum dos diuréticos é a disfunção sexual masculina, sobretudo quando associados com os betabloqueadores adrenérgicos, combinação usual no tratamento da hipertensão (MORALES-OLIVAS, 2008; BATLOUNI, 2009).

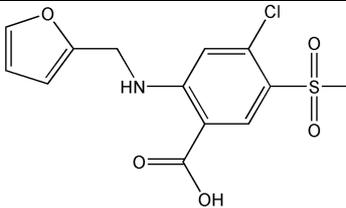
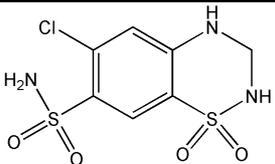
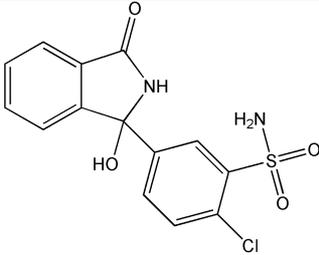
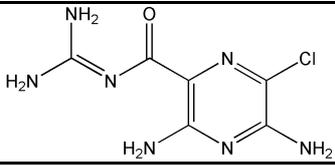
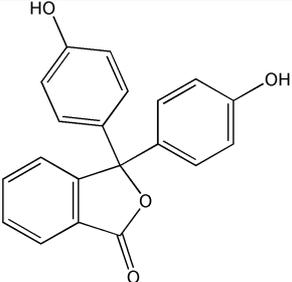
3.2.2 Laxantes

Os laxantes são medicamentos que promovem a defecação e melhoram a obstipação. São classificados de acordo com o mecanismo de ação e propriedades químicas dos fármacos. A importância desses fármacos deve-se mais a difusão do seu uso na automedicação do que pelo seu papel no tratamento médico da constipação (SILVA, 2006).

A fenolftaleína, bastante utilizada como laxante, foi retirada do mercado em 2002 por apresentar propriedades cancerígenas (BRASIL, 2002). O bisacodil, produto análogo à fenolftaleína, é atualmente o principal laxante

comercializado no Brasil e apresenta ação laxativa estimulante ou irritativa da mucosa. O abuso no uso de laxativos ocorre quando são administrados sem indicação médica ou em sobredoses, frequentemente em casos em que se deseja perder peso ou em pacientes com anorexia/bulimia nervosa.

Tabela 1 - Diuréticos e laxante estudados.

Fármaco sintético	Nome comercial	Estrutura molecular	Dose diária em mg	pKa
Furosemida	Lasix [®]		20-40	9,8
Hidroclorotiazida	Clorana [®]		12,5-25	9,2
Clortalidona	Higroton [®]		12,5-50	9,4
Amilorida	-		5-10	8,7
Fenolftaleína	-		-	9,6

3.3 Formulações Farmacêuticas

A utilização de plantas com fins medicinais para tratamento, cura e prevenção de doenças é prática comum na terapêutica desde os tempos mais remotos.

De acordo com a OMS, aproximadamente 80% da população de países em desenvolvimento utilizam plantas medicinais como alternativa para prevenir e tratar diversos problemas de saúde (CARVALHO *et al.*, 2011(b)). No Brasil, não se sabe com exatidão o número de pessoas que fazem uso das plantas medicinais, mas seguramente, segue a tendência mundial.

Quando as plantas medicinais são processadas a fim de se obter um medicamento, tem-se como resultado o medicamento fitoterápico. No Brasil, o órgão responsável pela regulamentação de produtos fitoterápicos é a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Segundo a ANVISA, fitoterápicos são, portanto, medicamentos obtidos a partir de plantas medicinais e assim como todos os medicamentos devem oferecer garantia de qualidade, ter efeitos terapêuticos comprovados, composição padronizada e segurança de uso para a população (BRASIL, 2010).

Da mesma forma outras agências no mundo também regulamentam o registro e a comercialização de produtos obtidos de plantas, como é o caso da Food and Drug Administration (FDA) nos Estados Unidos e da European Medicines Agency (EMA) na Europa. Estas agências, assim como a ANVISA, têm o objetivo de oferecer produtos de uso seguro para os consumidores, porém, nesses países, as normas para a certificação e o controle da qualidade de preparações vegetais são mais rígidas (JUNIOR *et al.*, 2005).

No entanto, o que se tem observado com o aumento da procura por produtos naturais é o crescente relato de casos nos quais os usuários apresentam sérias reações adversas decorrentes do uso destas formulações. Na maioria das vezes esses casos são consequências da toxicidade intrínseca das próprias plantas e/ou adulteração ou contaminação desses produtos com metais tóxicos, pesticidas, organismos patogênicos e fármacos sintéticos (BOGUSZ *et al.*, 2002; GERSHWIN *et al.*, 2010).

A adição intencional e não declarada de fármacos sintéticos em produtos ditos naturais, presumidamente para aumentar a eficácia do mesmo, consiste em uma prática ilegal já relatada em diversos países e que pode levar a efeitos adversos imprevisíveis, quer devido aos efeitos isolados do fármaco ou pela interação deste com outras substâncias presentes na formulação.

Portanto, a segurança dos medicamentos fitoterápicos tem sido considerada uma preocupação global. Prova disso são as recentes tentativas em sincronizar os regulamentos de diversos países através de algumas especificações farmacopeicas. O objetivo principal é unificar a qualidade e os aspectos de segurança das mesmas formulações à base de plantas, em diferentes países ao redor do mundo (CARVALHO *et al.*, 2011 (b)).

3.4 A Prática da Adulteração de Formulações Herbáreas

O problema associado com a presença de fármacos sintéticos não declarados em formulações à base de ervas foi primeiramente revelado nos Estados Unidos no início de 1970 (FRASER; WEN, 1998). No caso de fitoterápicos para o emagrecimento, as principais substâncias sintéticas já identificadas como adulterantes foram anorexígenos, antidepressivos e ansiolíticos. Além destes, diuréticos e laxantes, coadjuvantes no tratamento da obesidade e do sobrepeso, têm sido encontrados (FRASER; WEN, 1998; ERNST, 2002; RIVM, 2009; CARVALHO *et al.*, 2011 (a)).

De acordo com um recente trabalho de revisão publicado (CARVALHO *et al.*, 2011 (b)), diuréticos e laxantes estão entre as principais classes farmacológicas que tem sido identificadas na literatura como adulterantes. Este artigo relata inúmeros casos de adulteração, sendo que em quase 30% deles foi identificada a presença de algum diurético ou laxante. Estes fármacos apareceram na maioria das vezes na presença de outros, como os anorexígenos, ansiolíticos, estimulantes e anti-inflamatórios. Dentre os diuréticos, a hidroclorotiazida foi identificada mais vezes, seguida da furosemida, espironolactona, bumetanida, triantereno e indapamida. A fenolftaleína foi o único fármaco laxativo relatado entre os adulterantes.

Muitas plantas apresentam naturalmente propriedades diuréticas e laxativas (Tabela 2) e, aparentemente, um longo tempo de uso desses produtos podem causar efeitos adversos similares aos causados por diuréticos e laxantes convencionais (AL-SAFI *et al.*, 2008). Logo, a adição intencional de diuréticos e laxantes sintéticos em formulações naturais que possuem ação semelhante pode levar a uma potencialização tanto da ação farmacológica quanto das reações adversas. A situação se agrava ainda mais com a possibilidade de os pacientes estarem fazendo uso consciente destes fármacos, uma vez que são de baixo custo e de fácil acesso.

Tabela 2 – Algumas plantas medicinais com ação diurética e laxativa.

Uso terapêutico	Nome científico
Diurético	<i>Baccharis trimera</i> , <i>Camellia sinensis</i> , <i>Cynara scolymus</i> , <i>Equisetum giganteum</i> , <i>Fucus vesiculosus</i> , <i>Persea gratissima</i> , <i>Plantago major</i>
Laxativo	<i>Cassia angustifolia</i> , <i>Gelidium cartilagineum</i> , <i>Linum usitatissimum</i> , <i>Plantago psyllium</i> , <i>Rhamnus purshiana</i>

Fonte: Adaptação de CARVALHO *et al.*, 2011 (b)

3.5 Metodologias Analíticas para a Investigação de Adulterantes

Os produtos naturais são, em geral, misturas complexas de centenas de componentes químicos, mas apenas alguns deles são responsáveis pelos efeitos benéficos ou prejudiciais. Substâncias sintéticas adicionadas ilegalmente a estes produtos podem provocar um risco ainda maior à saúde do indivíduo que os utiliza, tanto do ponto de vista clínico quanto toxicológico. Estes fatores salientam a importância em detectar a presença de qualquer tipo de fármaco sintético em formulações fitoterápicas e para isso faz-se necessário um maior controle fiscal sobre a fabricação e a comercialização destes produtos (CARVALHO *et al.*, 2011 (a))

Por se tratarem de amostras complexas e de difícil análise, alguns cuidados devem ser levados em consideração. Primeiramente deve haver uma restrição da classe farmacológica a ser estudada, uma vez que, as possibilidades de adulteração são amplas. Depois de definida a classe principal, deve-se levar em conta todos os possíveis interferentes que podem estar presentes na formulação, ou seja, fármacos que podem ser utilizados em associação com os fármacos da classe principal. Isso requer o emprego de métodos analíticos altamente seletivos e, em muitos casos com grande poder de separação. Além disso, é necessário ainda assegurar a aplicabilidade do método para amostras reais (CARVALHO *et al.*, 2011 (b))

Outra questão crítica na análise de produtos naturais diz respeito ao processo de extração da amostra, o qual deve considerar tanto o tipo de amostra quanto os analitos de interesse. Uma avaliação crítica da polaridade do solvente (solubilidade), método de extração e estabilidade do analito deve ser realizada, pois influenciam diretamente na composição e na qualidade dos extratos.

Neste contexto, métodos analíticos vêm sendo desenvolvidos e aperfeiçoados, a fim de se tornarem cada vez mais sensíveis e específicos na identificação de substâncias que possam estar presentes como adulterantes em produtos ditos naturais. As metodologias mais recentemente descritas na literatura com essa finalidade para adulterantes emagrecedores compreendem métodos por cromatografia líquida (KU *et al.*, 1999; ALMEIDA; RIBEIRO, 1999; ALMEIDA *et al.*, 2000; LIU *et al.*, 2001; BOGUSZ *et al.*, 2002; MIKAMI *et al.*, 2005; LIANG *et al.*, 2006; WANG *et al.*, 2008; CHEN *et al.*, 2009; KIM *et al.*, 2009), eletroforese capilar (KU *et al.*, 1999; PIETTE; PARMENTIER, 2002; KU *et al.*, 1996; HANCU *et al.*, 2007; CIANCHINO *et al.*, 2008; CARVALHO *et al.*, 2010), voltametria (SANTOS *et al.*, 2002; CARVALHO *et al.*, 2007; CORREIA, 2008) e espectrometria UV/Vis (AURICCHIO *et al.*, 1991; CHAVES *et al.*, 1994; FENG *et al.*, 2007).

Portanto os métodos analíticos disponíveis oferecem a possibilidade de rastreio para a presença de um ou mais adulterantes e/ou de confirmação da sua presença, qualitativamente e quantitativamente. Os métodos diferem uns dos outros nos princípios de detecção envolvidos na medição. Especificamente, os métodos de separação empregam dispositivos universais,

tais como detectores ultravioleta e detectores de condutividade, que permitem a triagem dos picos suspeitos relacionados com uma classe farmacêutica definida. Assim, a confirmação dos adulterantes deve ser realizada usando a adição de um padrão de referência e de alta pureza, que devem apresentar comportamento semelhante na medição analítica (CARVALHO *et al.*, 2011 (b)).

Estas metodologias já desenvolvidas têm permitido revelar os casos de adulteração, principalmente em formulações para fim emagrecedor, além de divulgar essas falsificações que infringem a lei e alertar a sociedade sobre essa realidade. Logo, uma disponibilidade maior de métodos analíticos que visam identificar diferentes possíveis adulterantes permite uma fiscalização mais efetiva sobre a produção e comercialização de produtos naturais como os fitoterápicos.

3.6 Eletroforese Capilar (CE)

A eletroforese capilar (CE) tem sido muito empregada na determinação de uma variedade de amostra por ser um método de separação atraente na análise de misturas complexas devido às suas características de alta eficiência de separação, baixo consumo de reagentes e amostras, tempos de análise reduzidos, simplicidade do equipamento utilizado e alto grau de automação (CARVALHO *et al.*, 2009).

Um aspecto bastante importante da eletroforese capilar é a simplicidade da instrumentação. O sistema consiste de uma fonte de alta tensão, capilares, eletrodos e um detector apropriado (TAVARES, 1996), conforme ilustrado na Figura 1.

O princípio de separação da CE decorre basicamente da migração eletroforética, ou seja, a migração de espécies carregadas eletricamente, mediante a aplicação de um campo elétrico em uma coluna capilar contendo em seu interior uma solução de eletrólitos (CARVALHO *et al.*, 2009). Outro fenômeno, o fluxo eletroosmótico, o EOF (fluxo de solução induzido pelo campo elétrico), também afeta a migração dos compostos e confere à técnica parte de suas características de alta eficiência. A presença do EOF é muito

importante uma vez que diminui consideravelmente o tempo de análise de compostos que possuam mobilidade no mesmo sentido da mobilidade do fluxo e permite que moléculas neutras se movam no interior do capilar (SILVA, 2001).

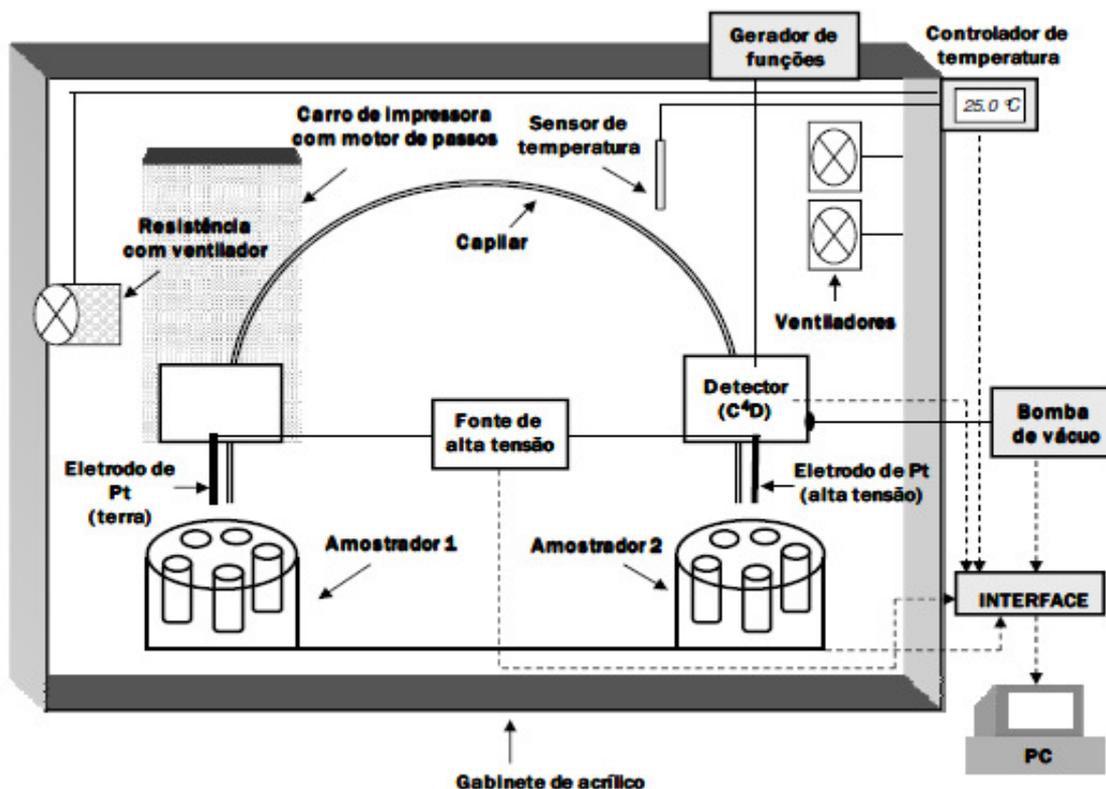


Figura 1 - Representação em diagrama de blocos do equipamento de eletroforese capilar construído em laboratório (CARVALHO *et al*, 2009).

3.6.1 Eletroforese Capilar de Zona com Detecção por Condutividade sem Contato (CZE-C⁴D)

A eletroforese capilar de zona (CZE) é um dos modos de separação da CE 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

(TAVARES, 1996). O mecanismo de separação é baseado nas diferenças na razão massa/carga dos solutos em um dado pH. A velocidade com que cada zona se desloca é constante e dependente do campo elétrico aplicado no capilar, das mobilidades dos analitos e do fluxo eletroosmótico.

Os sistemas de detecção para eletroforese capilar são basicamente classificados em métodos ópticos, eletroquímicos e outros métodos acoplados. Dentre as técnicas com detecção eletroquímica estão relacionadas às detecções amperométrica, condutométrica, potenciométrica e voltamétrica (SILVA, 2003).

A detecção de condutividade é uma técnica eletroquímica comumente usada, com capacidade de detectar qualquer espécie com elemento eletroativo, sendo universal para substâncias iônicas. Estes detectores são em geral simples e baratos. A detecção por condutividade pode ser realizada por um contato direto da solução com os eletrodos ou pelo método sem contato, o qual requer dispositivos de altas frequências capacitivamente acoplados. Estes detectores exibem uma resposta rápida e são razoavelmente sensíveis, desde que a condutividade dos analitos e do eletrólito sejam diferentes (WANG *et al.*, 2007)

Nos últimos tempos a detecção por condutividade sem contato (C⁴D) tem recebido atenção como alternativa à detecção condutométrica convencional. Neste tipo de detecção, um sinal alternado de alta frequência, da ordem de centenas de kHz a dezenas de MHz, é aplicado entre os dois eletrodos na célula de detecção, medindo-se a corrente elétrica resultante que é função da condutividade da solução. Os eletrodos da célula condutométrica constituem um capacitor, enquanto a solução atua como uma resistência cujo valor depende da sua condutividade elétrica. Como a reatância capacitiva diminui com o aumento da frequência, a impedância do capilar é reduzida, permitindo que as variações de condutividade da solução no interior do capilar sejam observadas mesmo com os eletrodos posicionados do lado externo do capilar (CARVALHO *et al.*, 2009). Assim a detecção C⁴D previne a contaminação e o desgaste dos eletrodos além da eliminação da interferência dos altos potenciais utilizados na separação (SILVA, 2003).

A sensibilidade do detector C⁴D está relacionada com a diferença de condutividade entre o eletrólito 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 eletrólito é de extrema importância em C⁴D (SILVA, 2001).

Segundo uma recente revisão, um número significativo de aplicações em CE-C⁴D na determinação de compostos farmacológicos tem sido reportado (KUBÁÑ; HAUSER, 2008). A maioria dos fármacos absorve fortemente na região ultravioleta e podem, portanto, serem facilmente determinados em sistemas convencionais de HPLC e CE com detectores ultravioletas, mas uma gama de espécies não é acessível por este meio. Em casos como esses a C⁴D pode ser utilizada como uma alternativa adequada.

Além disso, os detectores por condutividade sem contato são não destrutivos podendo ser combinados com outros detectores para análises simultâneas. Um exemplo é a combinação do C⁴D com um detector UV para a determinação de espécies absorptivas e não absorptivas concomitantemente (KUBÁÑ; HAUSER, 2008).

3.7 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)

A cromatografia é um método físico-químico de separação. Está fundamentada na migração diferencial dos componentes de uma mistura, que ocorre devido a diferentes interações, entre duas fases imiscíveis, a fase móvel e a fase estacionária. A grande variedade de combinações entre fases móveis e estacionárias a torna uma técnica extremamente versátil e de grande aplicação.

Dentre os vários métodos cromatográficos, a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) é o mais novo e mais importante membro de uma família inteira de técnicas de separação. O alto nível de desenvolvimento e expansão alcançado ao longo das últimas décadas deve-se principalmente a sua vasta aplicabilidade que engloba a indústria farmacêutica, alimentícia, agropecuárias e químicas e agências reguladoras que tratam do meio ambiente (MALDANER *et al.*, 2010). Hoje HPLC pode ser considerada uma técnica de análise

(separação, confirmação e quantificação) bem difundida e empregada em consequência das colunas cromatográficas e equipamentos de alta tecnologia que se encontram disponíveis. O seu emprego em vários laboratórios é considerado atualmente indispensável. Conhecer suas vantagens, limitações, componentes e os critérios de escolha entre as opções de equipamento é essencial para o emprego ideal da técnica, e assim explorar toda sua capacidade. A cromatografia de fase reversa consiste de uma fase estacionária de menor polaridade e uma fase móvel de maior polaridade, enquanto que a fase normal tem as polaridades invertidas. Estes métodos cromatográficos apresentam várias vantagens, tais como: uso de fases móveis menos tóxicas e de menor custo; fases estacionárias estáveis de muitos tipos diferentes; rápido equilíbrio da coluna após a mudança da fase móvel; facilidade de empregar eluição por gradiente; maior rapidez em análises e boa reprodutibilidade dos tempos de retenção. Além disso, são muito aplicadas à separação de solutos de diferentes polaridades, massas molares e funcionalidades químicas (TONHI *et al.*, 2002).

3.7.1 Cromatografia de Par Iônico com Detecção Amperométrica Pulsada (IPC-PAD)

A técnica cromatográfica mais frequentemente usada hoje é a cromatografia líquida de fase reversa. Nesta técnica a retenção do soluto é variável de acordo com a afinidade com a fase móvel, em geral, soluções aquosas na presença ou não de solventes orgânicos miscíveis em água. Para compostos iônicos, um modo adicional de retenção tem sido desenvolvido pela adição de íons anfifílicos na fase móvel. Nesta aplicação, a mudança na retenção do íon eluído quando a concentração do íon anfifílico varia é devido à distribuição de um par iônico entre duas fases líquidas (STAHLBERG, 1999). Os reagentes utilizados no pareamento iônico devem ter carga oposta à carga dos analitos, consistindo de surfactantes aniônicos e catiônicos. Na separação, por exemplo, de moléculas catiônicas, adiciona-se a fase móvel surfactantes aniônicos como octil sulfato de sódio (SOS) e dodecil sulfato de sódio (SDS)

(Figura 2). Juntamente com os íons do analito de carga oposta, os reagentes de par iônico formam um par de íons não carregado, o qual pode ser retardado na fase estacionária por interações hidrofóbicas. O surfactante se aloja na fase estacionária, transformando efetivamente a fase estacionária em um trocador de íons. O mecanismo de retenção é uma mistura das interações de fase reversa e troca iônica. A cromatografia de par iônico é mais complexa do que a cromatografia de fase reversa, pois, o equilíbrio entre o surfactante e a fase estacionária é lento, e a separação é mais sensível às variações de pH, de temperatura e a concentração do surfactante.

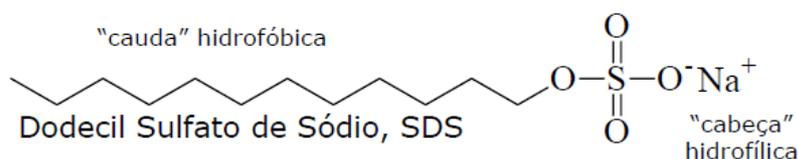


Figura 2 - Representação estrutural do surfactante aniônico Dodecil Sulfato de Sódio (SDS).

Os sistemas de par iônico têm várias propriedades que são de valor particular na cromatografia líquida. Eles são muito versáteis e podem ser facilmente adaptados a diferentes tipos de amostra, outra vantagem é a alta seletividade que pode ser obtida devido ao mecanismo secundário de troca iônica desenvolvido no sistema cromatográfico.

A detecção eletroquímica combinada à cromatografia líquida pode constituir-se numa ferramenta analítica potencialmente útil quando se deseja determinar compostos orgânicos em baixas concentrações ou em nível de traços em amostras de composição química altamente complexa como as de alimentos, ambientais e clínicas. A detecção eletroquímica oferece vantagens sobre a detecção espectrofotométrica quando as espécies de interesse não possuem um grupo cromóforo que absorve na região ultravioleta-visível (UV-VIS).

Os principais detectores eletroquímicos empregados em cromatografia são os amperométricos, coulométricos, potenciométricos e condutométricos. Dentre estes, o mais investigado e com aplicações na cromatografia líquida é, sem dúvida, o detector amperométrico (TROJANOWICZ, 2001). Muitos estudos

mostram que a detecção eletroquímica é mais sensível e seletiva que a detecção ultravioleta, a amperométrica em especial, por remover as interferências causadas por substâncias eletro-inativas. A detecção por amperometria tem se tornado cada vez mais importante na determinação de analitos em uma variedade de amostras biológicas e amplamente utilizado na análise farmacêutica (WANG *et al.*, 2007). A escolha do eletrodo de trabalho é o principal fator que afeta a qualidade e a sensibilidade da detecção amperométrica. Porém uma limitação na detecção amperométrica convencional (utilizando um único eletrodo) é a impossibilidade de detectar simultaneamente compostos eletroativos com potenciais redox distintos em determinadas condições experimentais.

A detecção amperométrica pulsada (PAD) é constituída de três passos: o potencial de detecção (E_1), o potencial de oxidação (E_2) e o potencial de redução (E_3). Geralmente E_2 apresenta potencial mais positivo que E_1 , suficiente para formar óxidos no eletrodo de ouro. O potencial de redução E_3 é um potencial mais negativo. Quando o analito passa através da célula eletroquímica os potenciais E_1 , E_2 e E_3 são constantemente aplicados no eletrodo de trabalho em ciclos de um ou dois segundos. (LEE; TEO, 2001). Esta técnica permite que a resposta do eletrodo apresente estabilidade por um período de tempo maior devido à limpeza eletroquímica realizada durante o experimento nos potenciais E_2 e E_3 , evitando ou diminuindo a contaminação da superfície do eletrodo. Embora os métodos de limpeza eletroquímica sejam muito úteis para se garantir a estabilidade da resposta dos detectores amperométricos durante o tempo de medida, estes procedimentos não eliminam a limpeza mecânica do eletrodo após certo período, especialmente quando as espécies analisadas adsorvem fortemente sobre a superfície desse eletrodo.

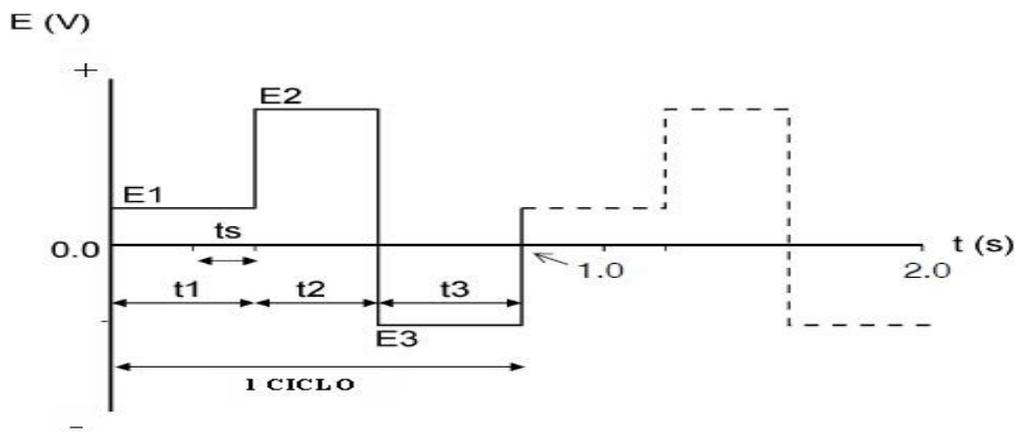


Figura 3 - Ciclo de potencial aplicado ao eletrodo permitindo o seu recondicionamento e regeneração. E_1 é o potencial de amostragem, enquanto E_2 é o potencial de oxidação e E_3 o potencial de redução.

3.8 Determinação de Diuréticos e Laxantes por CE e HPLC

A maioria dos estudos que relatam a adulteração de formulações fitoterápicas aplica métodos cromatográficos para determinar e identificar os adulterantes. Cromatografia líquida e cromatografia gasosa podem ambas ser aplicadas em misturas complexas porque possuem elevada capacidade de separação. Este é um importante recurso para a análise de formulações à base de plantas. Entretanto, a HPLC é uma técnica bem estabelecida e utilizada para análises de rotina em todo o mundo, enquanto a cromatografia gasosa é menos frequentemente utilizada para a determinação de adulterantes principalmente devido a dificuldades experimentais relacionadas com a determinação de compostos não voláteis, compostos termicamente lábeis, ou altamente polares (CARVALHO *et al.*, 2011(a)). A eletroforese capilar também vem se tornando importante entre as técnicas de separação disponíveis para a determinação de adulterantes em fitoterápicos. No entanto, CE ainda não tem sido aplicada para a análise de rotina de adulterantes nestas formulações.

Segundo um artigo de revisão atual (CARVALHO *et al.*, 2011(b)), pelo menos quarenta e sete trabalhos já foram publicados nas últimas quatro décadas empregando métodos cromatográficos para a determinação de fármacos sintéticos como adulterantes em produtos naturais. Oito deles

permitem identificar um ou mais adulterantes pertencente à classe dos diuréticos ou dos laxantes.

Bogusz e colaboradores (2006) desenvolveram procedimentos por cromatografia líquida e gasosa para a análise de oitenta fármacos, entre eles os diuréticos amilorida, espironolactona, clortiazida, hidroclortiazida, clortalidona, furosemida, acetazolamida e triantereno; e o laxante bisacodil. Liu e colaboradores (2001) alcançaram uma gama de 266 fármacos incluindo acetazolamida, amilorida, hidroclortiazida, clortiazida, clortalidona e furosemida como diuréticos; e fenolftaleína como laxante. Um terceiro trabalho incluiu os diuréticos furosemida e hidroclortiazida entre os adulterantes estudados (WANG *et al.*, 2010) e em outros três apenas a hidroclortiazida consta como diurético (KU *et al.*, 1995; TSENG, *et al.*, 1996; SNYMAN *et al.*, 2005). A fenolftaleína também aparece em dois trabalhos como laxante, junto de fármacos de outras classes (WANG *et al.*, 2008; CHEN *et al.*, 2009).

De acordo com esta mesma revisão, percebe-se um número bem menor de métodos empregando eletroforese. São onze trabalhos voltados para a determinação de adulterantes, dos quais, apenas um permite a determinação de um diurético, a furosemida, como possível adulterante (CIANCHINO *et al.*, 2008).

3.9 Validação Analítica

A necessidade de se mostrar a qualidade de medições químicas, através de sua comparabilidade, rastreabilidade e confiabilidade, está sendo cada vez mais reconhecida e exigida (RIBANI *et al.*, 2004). A validação de métodos analíticos comprova através de evidências objetivas que requisitos para uma determinada aplicação ou uso específico são atendidos assegurando a confiabilidade dos resultados.

O objetivo de uma validação, portanto, é demonstrar que o método é apropriado para a finalidade pretendida, ou seja, a determinação qualitativa, e/ou quantitativa de fármacos e outras substâncias em produtos farmacêuticos (BRASIL, 2003).

As técnicas de separação, tais como cromatografia líquida de alta eficiência e eletroforese capilar, vêm se destacando na química analítica pela capacidade de realizarem análises qualitativas e quantitativas em amostras ambientais, farmacêuticas, biológicas e em alimentos (RIBANI *et al.*, 2004). Para tanto, devem apresentar especificidade, linearidade, intervalo, precisão, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), exatidão, robustez, adequados à análise.

Especificidade: é a capacidade que o método possui de medir exatamente um composto em presença de outros componentes. Avalia o grau de interferência de espécies como outro ingrediente ativo, excipientes, impurezas e produtos de degradação, bem como outros componentes de propriedades similares, que possam estar presentes.

Linearidade: é a capacidade de uma metodologia analítica de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado. A linearidade é obtida por padronização interna ou externa e formulada como expressão matemática (equação da regressão linear) usada para o cálculo da concentração do analito a ser determinado na amostra real. O coeficiente de correlação linear (r) é frequentemente usado para indicar a adequabilidade da curva como modelo matemático. Um critério mínimo aceitável do coeficiente de correlação (r) deve ser = 0,99.

Intervalo: o intervalo especificado é a faixa entre os limites de quantificação superior e inferior de um método analítico. É estabelecido pela confirmação de que o método apresenta exatidão, precisão e linearidade adequados quando aplicados a amostras contendo quantidades de substâncias dentro do intervalo especificado.

Precisão: é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra. A precisão em validação de métodos é considerada em três níveis diferentes: repetitividade (expressa a precisão nas mesmas condições de operação em

pequeno espaço de tempo); precisão intermediária (expressa as variações no mesmo laboratório envolvendo diferentes dias, diferentes analistas e diferentes equipamentos, entre outros); reprodutibilidade (expressa a precisão entre laboratórios, mediante estudos colaborativos usualmente aplicados para padronização de metodologias). A precisão pode ser expressa como desvio padrão relativo (DPR) ou coeficiente de variação (CV%).

Limite de Detecção: é a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado, porém não necessariamente quantificado, sob as condições experimentais estabelecidas. O limite de detecção é estabelecido por meio da análise de soluções de concentrações conhecidas e decrescentes do analito, até o menor nível detectável. No caso de métodos instrumentais a estimativa do limite de detecção pode ser feita com base na relação de 3 vezes o ruído da linha de base.

Limite de Quantificação: menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas. O limite de quantificação é estabelecido por meio da análise de soluções contendo concentrações decrescentes do fármaco até o menor nível determinável com precisão e exatidão aceitáveis. Também pode ser determinado por meio do ruído. Neste caso, determina-se o ruído da linha de base e considera-se como limite de quantificação aquela concentração que produza relação sinal-ruído superior a 10:1.

Exatidão: é a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro. A exatidão é calculada como porcentagem de recuperação da quantidade conhecida do analito adicionado à amostra, ou como a diferença percentual entre as médias e o valor verdadeiro aceito, acrescida dos intervalos de confiança.

Robustez: é a medida da capacidade do método em resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos. Indica a confiança do método durante o uso normal.

A legislação brasileira, no que diz respeito à validação de metodologias, tem sido mais bem definida nos últimos dez anos através de resoluções e recomendações do INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial) e da ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) (RIBANI *et al.*, 2004).

Apesar dos esforços realizados para a harmonização das definições em torno da validação, a literatura disponível tem demonstrado haver diferentes interpretações, o que acaba ocasionando discordâncias entre os profissionais de controle de qualidade quanto à definição e execução dos parâmetros analíticos de validação. Por outro lado esta característica é um tanto intencional, pois, permite a adaptação para cada tipo de problema. Cabe ao analista identificar quais parâmetros devem ser avaliados durante o desenvolvimento do método analítico, de acordo com o tipo de método e sua respectiva aplicação (ERMER, 2001).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Instrumentação

- Equipamento de eletroforese capilar com detector por condutividade sem contato (CE-C⁴D) construído em laboratório (CARVALHO *et al*, 2009).
- Gerador de funções BK Precision, modelo 4013 DDS.
- Cromatógrafo líquido de alta eficiência com sistema de separação isocrático modelo 882 Compact IC Plus acoplado a detector por amperometria pulsada (HPLC-PAD) modelo 871 Advanced Bioscan e Interface 771 IC Compact Interface, Metrohm[®] (Suíça).
- Balança analítica Sartorius[®] (Alemanha) com quatro casas de precisão.
- pHmetro digital Metrohm[®] 827 pHlab (Suíça) usando eletrodo de vidro combinado.
- Sistema de purificação de água Milli-Q Millipore Synergy[®] UV (resistividade de 18,2 MΩ.cm@25 °C).
- Sistema de filtração a vácuo com filtro de acetato de celulose 0,45 µm Sartorius[®] (Alemanha).
- Banho de ultrassom Bandelin Sonorex[®] RK 510 H (Alemanha).
- Bomba de vácuo Primatec[®] 131/132 (Brasil).

4.2 Reagentes e soluções

Todos os reagentes utilizados neste trabalho foram de pureza grau-analítico. Como substâncias químicas de referência foram empregadas matérias-primas de grau farmacêutico obtidas junto a farmácias de manipulação ou fornecedores do segmento farmacêutico, acompanhadas de certificado de análise. Os fármacos estudados como adulterantes, bem como os fármacos estudados como interferentes na validação dos métodos encontram-se na Tabela 3.

Tabela 3 – Fármacos estudados como adulterantes e interferentes no desenvolvimento do trabalho.

Fármaco	Fornecedor	Pureza (%)
Amilorida	Deg	100,46
Clortalidona	Deg	98,5
Hidroclorotiazida	Deg	99,4
Furosemida	Galena	99,2
Fenolftaleína	Deg	-
Anfepramona	Genix Ind. Farm. Ltda	98,0
Femproporex	Genix Ind. Farm. Ltda	100,42
Sibutramina	Deg	99,30
Fluoxetina	Deg	100,5
Paroxetina	Genix Ind. Farm. Ltda	99,94
Sertralina	Deg	99,26
Bupropiona	Genix Ind. Farm. Ltda	100,0
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
Midazolam	Pharma Nostra	100,06
Clordiazepóxido	Opção Fênix Dist. Ins. Ltda	99,57

Metanol e acetonitrila grau HPLC Tedia[®], fosfato de sódio Nuclear[®], hidróxido de sódio (NaOH) Vetec[®], ácido fosfórico (H₃PO₄) (85%) e dodecil sulfato de sódio Merck[®] também foram utilizados.

As soluções-padrão dos fármacos estudados foram preparadas nas concentrações 1 g L⁻¹. As soluções foram mantidas refrigeradas. A partir das soluções em estoque foram preparadas as soluções de trabalho, por meio de

diluição em água ultrapura (eletroforese capilar) ou na fase móvel (cromatografia).

4.3 Procedimentos Analíticos

4.3.1 Determinações por CE

Todas as determinações eletroforéticas foram realizadas no aparelho de eletroforese capilar construído em laboratório (Figura 4). 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.

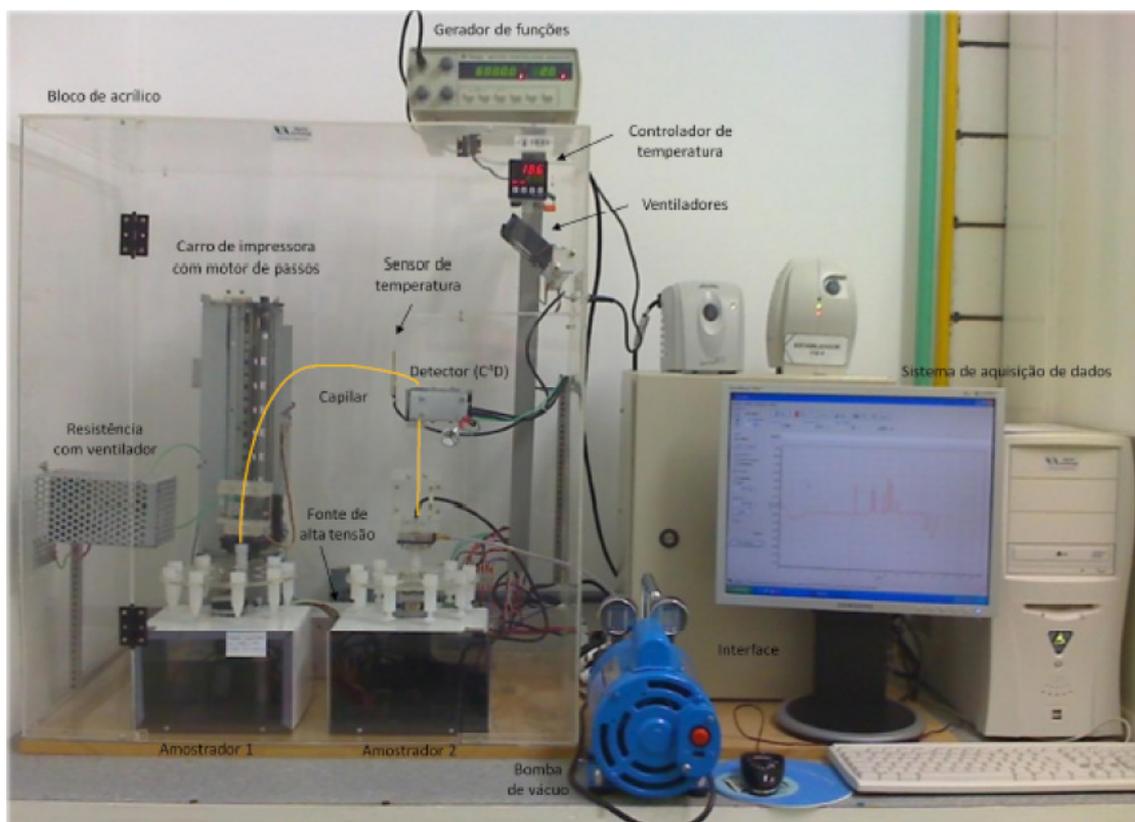


Figura 4 - Foto do equipamento CE-C⁴D construído em laboratório.

Utilizou-se capilar de sílica fundida (Polymicro, Phoenix /AZ, USA) com 68 cm de comprimento (46 cm até o detector), 75 μm de diâmetro interno e 360 μm de diâmetro externo. O capilar novo foi condicionado lavando-se com NaOH 1 mol L⁻¹, durante 40 minutos, água ultrapura, durante 15 minutos, e por fim eletrólito de trabalho durante 30 minutos empregando vácuo, em pressão constante de -600 mmHg. No início de cada dia o capilar foi lavado com NaOH 0,1 mol L⁻¹ e com água ultrapura, durante 15 minutos cada, e 30 minutos com o eletrólito. 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 com eletrólito de trabalho por 20 minutos e água ultrapura por 10 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), provocando, assim, a entrada de determinado volume de amostra. As análises foram realizadas em temperatura de 25 °C.

Para as separações eletroforéticas, uma fonte de alta tensão 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. O gerador de funções 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.

O eletrólito de trabalho foi preparado diariamente. O pH do eletrólito foi ajustado com soluções de ácido fosfórico e hidróxido de sódio 0,1 mol L⁻¹ e em seguida, filtrado em membrana 0,45 μm .

4.3.2 Determinações por HPLC

As determinações cromatográficas foram realizadas em cromatógrafo líquido com sistema de eluição isocrática acoplado a detector por amperometria pulsada (Figura 5). Utilizou-se Coluna analítica C18 de dimensões 4,6 mm x 150 mm x 5 μm (Dionex) para a separação cromatográfica e eletrodo de ouro para a detecção amperométrica. Diariamente, a coluna cromatográfica (C18) foi condicionada com a fase móvel a ser utilizada nos experimentos por

aproximadamente 30 minutos, tempo suficiente para a estabilização da linha base. Após esse intervalo de condicionamento, as soluções de trabalho foram injetadas de forma manual utilizando-se alça de injeção de 20 μL . No final do dia a coluna era lavada com água ultra pura por uma hora, em fluxo de 0,5 mL/minuto e solução de acetonitrila:água ultrapura (90:10) por 30 minutos também em fluxo de 0,5 mL/minuto, sendo esta última a solução de armazenamento da coluna.

A preparação da fase móvel foi seguida do ajuste do pH com soluções de ácido fosfórico e hidróxido de sódio 0,1 mol L^{-1} e filtração em membrana 0,45 μm .

A limpeza do eletrodo de ouro Vario Cell para Bioscan (Metrohm[®]), com 8 mm de diâmetro e 2 mm de espessura, compreendeu a aplicação de ciclos de limpeza durante a medida e quando necessário polimento manual do eletrodo utilizando suspensão de diamante Metrohm[®].

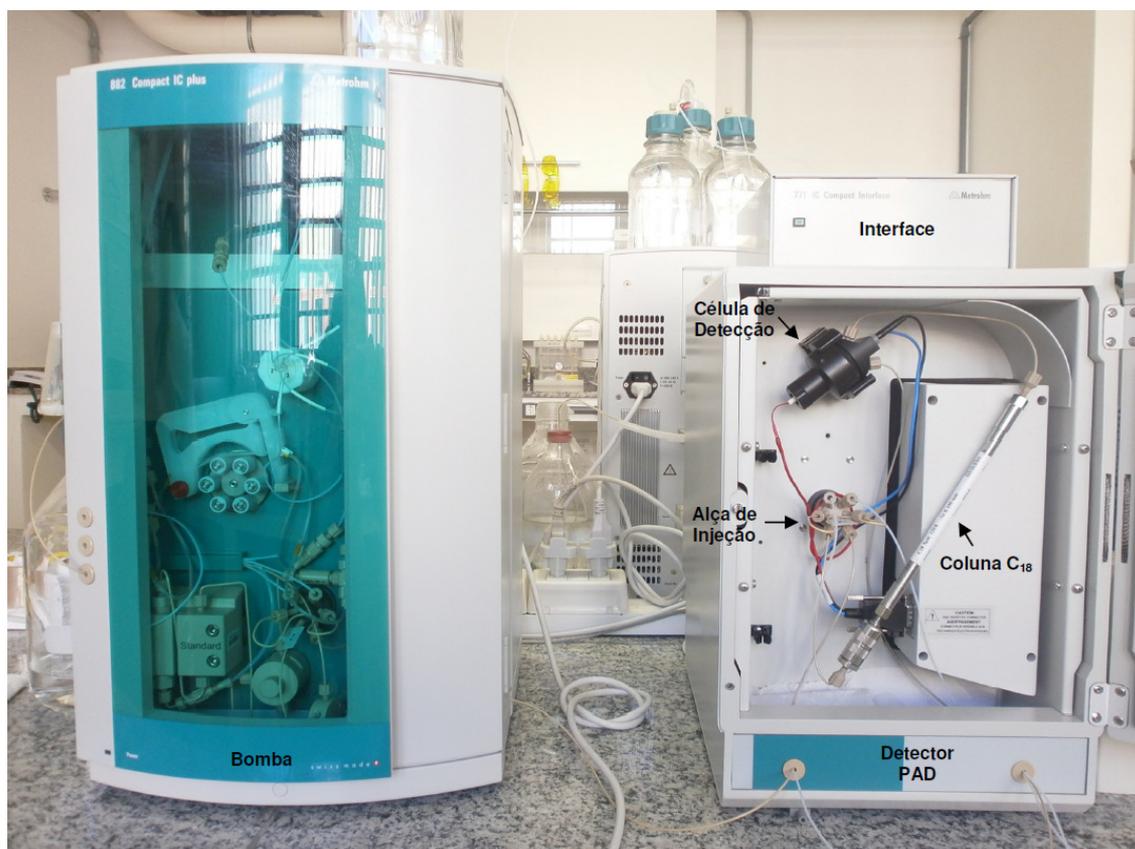


Figura 5 - Foto do equipamento HPLC-PAD (Metrohm[®], Suíça).

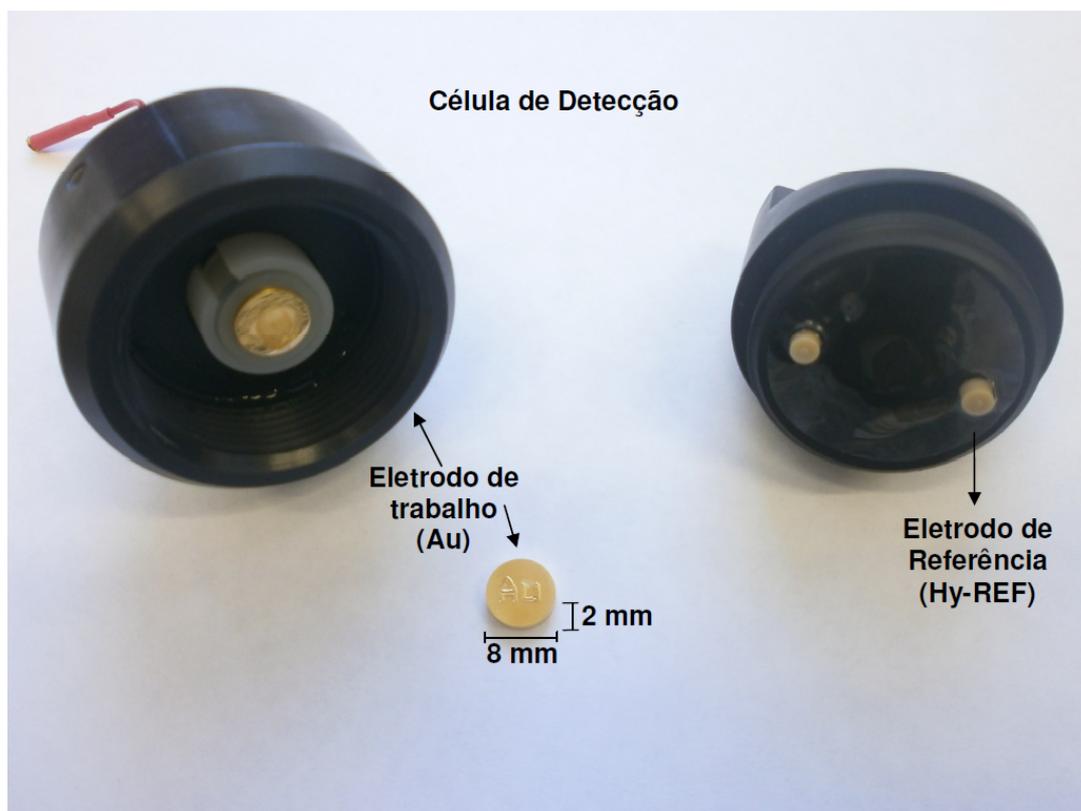


Figura 6 - Foto da célula de detecção aberta com o eletrodo de trabalho de ouro (Au) e o eletrodo de referência de hidrogênio (Hy-REF) empregado na detecção amperométrica (Metrohm®, Suíça).

4.3.3 Amostras de Formulações Fitoterápicas

As formulações farmacêuticas analisadas neste trabalho foram adquiridas em farmácias de manipulação de nove estados brasileiros: Rio Grande do Sul (RS), Santa Catarina (SC), Paraná (PR), São Paulo (SP), Rio de Janeiro (RJ), Minas Gerais (MG), Ceará (CE), Goiás (GO) e Distrito Federal (DF). Efetuou-se a compra dos produtos naturais emagrecedores mais comercializados em cada farmácia contatada. A Tabela 4 descreve as 26 amostras analisadas com suas respectivas composições.

Para a análise das amostras foram preparados *pools* com 20 cápsulas de cada amostra e calculado o peso médio das cápsulas para cada uma delas.

Os extratos foram obtidos a partir do peso médio de cada amostra que foi diluído em metanol até volume final de 25 mL. Após, o extrato metanólico foi filtrado com algodão seguido de filtração em membrana de acetato de celulose 0,45 μm .

Tabela 4 – Composição e origem das 26 amostras analisadas.

AMOSTRA	COMPOSIÇÃO	ORIGEM
A	<i>Fucus vesiculosus</i> 80mg, <i>Centella asiatica</i> 80mg, <i>Spirulina maxima</i> 80mg, <i>Passiflora</i> sp. 50mg, <i>Rhamnus purshiana</i> 100mg, cafeína 30mg, hidroclorotiazida 10mg	MG
B	<i>Cassia augustifolia</i> , <i>Fucus vesiculosus</i> , furosemida, <i>Rhamnus purshiana</i> , <i>Garcinia cambogia</i> , <i>Cyamopsis</i> sp	RS
C	Hidroclorotiazida, <i>Fucus vesiculosus</i> , <i>Rhamnus purshiana</i> , <i>Cassia augustifolia</i> , <i>Centella asiatica</i> , ranitidina, triptofano, <i>Cordia Ecalyculata</i>	DF
D	<i>Gelidium corneum</i> , vitamina C, vitamina E, <i>Phaseolus vulgaris</i> , <i>Chlorella pyrenoidosa</i> , gelatina, furosemida	MG
E	<i>Amorphophallus konjac</i> , <i>Cynara scolymus</i> , hidroclorotiazida, <i>Rhamnus purshiana</i> , <i>Centella asiatica</i> , <i>Ptychopetalum olacoides</i>	CE
F	<i>Rhamnus purshiana</i> , <i>Centella asiatica</i> , <i>Cynara scolymus</i> , <i>Baccharis trimera</i> , <i>Fucus vesiculosus</i> , <i>Equisentum</i> sp., <i>Cassia augustifolia</i> , <i>Spirulina maxima</i> , <i>Passiflora</i> sp	RS
G	Slendesta, <i>Caralluma fimbriata</i>	RS
H	<i>Caralluma fimbriata</i> 200mg, <i>Cassia nomame</i> 100mg, picolinato de cromo 10µg, <i>Camelia sinensis</i> (White tea) 100mg, <i>Phaseolus vulgaris</i> 200mg, <i>Plantago psyllium</i> L. 200mg, <i>Fucus vesiculosus</i> 100mg, <i>Equisentum</i> sp. 100mg	RS
I	Formulação não declarada	RS
J	<i>Centella asiatica</i> , <i>Cynara scolymus</i> , carboxemetilcelulose, <i>Rhamnus purshiana</i> , <i>Spirulina máxima</i>	RJ
K	<i>Cynara scolymus</i> , <i>Rhamnus purshiana</i> , <i>Garcinia</i>	SP

	<i>cambogia, Cyamopsis sp., Gymnema sylvestre, Passiflora sp., Cassia augustifolia</i>	
L	<i>Camelia sinensis</i> (Chá Vermelho)	SP
M	<i>Gymnema sylvestre, Phaseolus vulgaris, Camelia sinensis</i> (Chá Verde), <i>Citrus aurantium, Caralluma fimbriata</i> , quitosan	RS
N	<i>Rhamnus purshiana, Spirulina maxima</i> , estearato de magnésio, <i>Fucus vesiculosus</i> , carboxemetilcelulose, <i>Centella asiática</i>	RS
O	<i>Caralluma fimbriata, Citrus aurantium, Phaseolus vulgaris</i>	RS
P	<i>Garcinia cambogia</i> 250mg, <i>Citrus aurantium</i> 200mg, picolinato de cromo 100µg	RS
Q	<i>Caralluma fimbriata, Phaseolus vulgaris, Garcinia cambogia, Gymnema sylvestre, Citrus aurantium</i>	SP
R	<i>Garcinia cambogia, Rhamnus purshiana, Fucus vesiculosus, Cynara scolymus, Equisentum sp., Amorphophallus konjac, Cassia augustifolia, Centella asiatica, Ginkgo biloba L., Passiflora sp</i>	SP
S	<i>Cordia ecalyculata</i> Vell, <i>Garcinia cambogia, Camelia sinensis</i> (Chá Verde)	RS
T	<i>Citrus aurantium, Fucus vesiculosus, Centella asiatica, Camelia sinensis</i> (Chá Verde)	GO
U	Furmulação não declarada	SC
V	<i>Camelia sinensis</i> (Chá Verde) 250mg	SC
W	<i>Caralluma fimbriata</i>	GO
X	<i>Cordia ecalyculata</i> Vell	PR
Y	<i>Citrus aurantium</i> , carnitina, <i>Camelia sinensis</i> (Chá Verde), quitosan	SC
Z	<i>Cynara scolymus, Centella asiatica, Garcinia cambogia, Equisentum sp., Rhamnus purshiana, Fucus vesiculosus, Spirulina maxima, Gelidium corneum</i>	RS

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste trabalho dois métodos de separação, ambos com detecção eletroquímica, foram desenvolvidos com o objetivo de realizar uma investigação comparativa da presença de fármacos sintéticos como adulterantes em produtos naturais emagrecedores. Diuréticos (amilorida, clortalidona, hidroclorotiazida e furosemida) e laxantes (fenolftaleína), fármacos coadjuvantes na perda de peso, compreendem as classes principais deste estudo. Além destas classes foi investigada a interferência de outros fármacos também empregados no tratamento do excesso de peso. São eles anorexígenos, antidepressivos e benzodiazepínicos, fármacos já encontrados como adulterantes nestas formulações, inclusive em associação.

Os diuréticos e o laxante estudados foram escolhidos por serem os mais comumente usados nos dias de hoje. A fenolftaleína, embora proibida a sua comercialização como laxante no Brasil, continua sendo identificada como adulterante em outros países como na Holanda e nos Estados Unidos (CARVALHO *et al.*, 2011(b)).

Os capítulos a seguir tratam da otimização da separação destes fármacos por CZE-C⁴D e IPC-PAD, bem como da validação dos métodos para a determinação de amilorida, clortalidona, hidroclorotiazida, furosemida e fenolftaleína como adulterantes em formulações fitoterápicas emagrecedoras.

5.1 Eletroforese Capilar de Zona (CZE)

5.1.1 Otimização das Condições do Eletrólito de Trabalho

Em um primeiro momento, a otimização do método eletroforético envolveu a escolha do eletrólito de trabalho. Soluções de fosfato, borato e acetato foram testadas em concentrações de 10 a 50 mmol L⁻¹. Com os tampões borato e acetato não foi possível detectar o sinal dos cinco

adulterantes estudados, além disso, a estabilização da linha base não se mostrou satisfatória. Por outro lado, o tampão fosfato possibilitou a detecção dos fármacos em boa parte da faixa de concentração estudada (15-30 mmol L⁻¹) conforme mostra a Figura 7. Observou-se que com o aumento da concentração de fosfato obteve-se um pequeno aumento no tempo de migração dos fármacos. Logo, o tampão fosfato obtido a partir de soluções de ácido fosfórico na concentração de 20 mmol L⁻¹ foi escolhido, pois, permitiu a detecção dos adulterantes estudados em tempo satisfatório, além de proporcionar uma linha base bastante estável durante a corrida eletroforética.

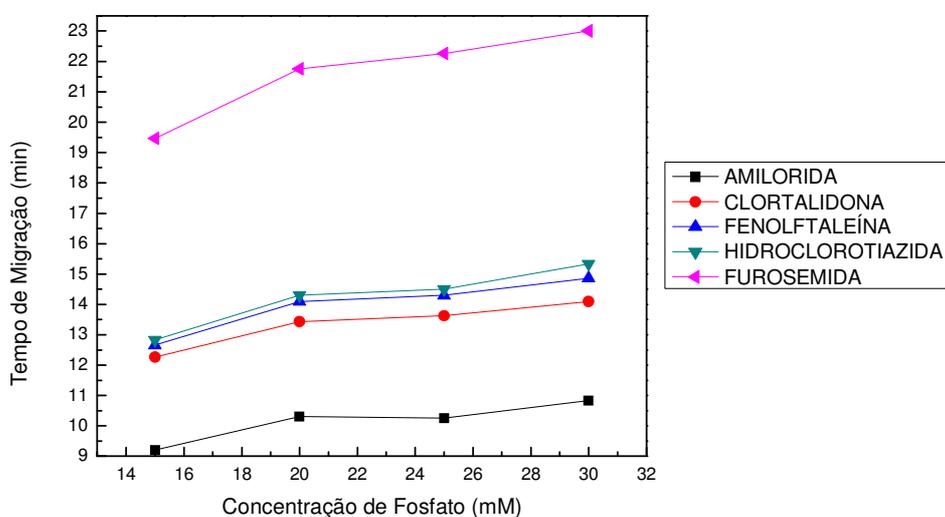


Figura 7 - Efeito da concentração do tampão fosfato no eletrólito de trabalho sob os tempos de migração dos fármacos sintéticos em concentrações de 100 mg L⁻¹. Condições: eletrólito de trabalho com metanol 30% (pH 9,2), potencial de separação -15 Kv, capilar de sílica fundida 75 µm × 360 µm × 68 cm (46 cm até o detector); detecção indireta por C⁴D operando em 400 kHz; temperatura 25 °C; injeção hidrodinâmica por gravidade de 20 cm durante 60 s.

Definido o melhor tampão a ser empregado, fez-se o estudo do pH a fim de melhorar a resolução dos sinais. Os fármacos estudados apresentam diferentes constantes de dissociação (pKa) que são afetadas diretamente pelo pH do sistema. Sabendo-se que o pH do eletrólito de trabalho é o parâmetro mais importante por influenciar na seletividade da análise e ser o principal determinante da ionização dos analitos, uma ampla faixa de pH (2,0–11,0) foi avaliada inicialmente. Do pH 2,0 ao pH 4,0 não foram obtidos sinais referentes aos fármacos em estudo. A partir de pH 5,0 foi possível identificar o aparecimento do sinal da amilorida conforme mostra a Figura 8. Em pH 8,0 já

foram também identificados os sinais da hidroclorotiazida e da furosemida. Do pH 8,5 ao pH 10,0 todos os fármacos foram identificados no eletroferograma. Do pH 10,0 em diante houve um aumento na corrente gerada que acabou por influenciar negativamente na estabilização da linha base. Assim, um ajuste fino de pH foi feito em torno do pH 9,0, pois este apresentou menor tempo de análise para os fármacos. O pH 9,2 foi escolhido como sendo o ideal para a análise de todos os fármacos em estudo.

Levando em conta que os fármacos em estudo possuem vários grupos receptores de prótons na sua estrutura, mesmo em pH 9,2 eles se encontram nas formas protonadas, logo, a detecção dos mesmos acontece no cátodo. Também é sabido que em pH acima de 9,0 o fluxo eletroosmótico (EOF) apresenta uma grande magnitude resultante da ionização dos grupos silanóis na parede do capilar de sílica. Como consequência, o EOF que é direcionado do ânodo para o cátodo, também foi responsável pelo carreamento dos cátions ao cátodo juntamente com o fluxo eletroforético das espécies catiônicas (TAVARES, 1996).

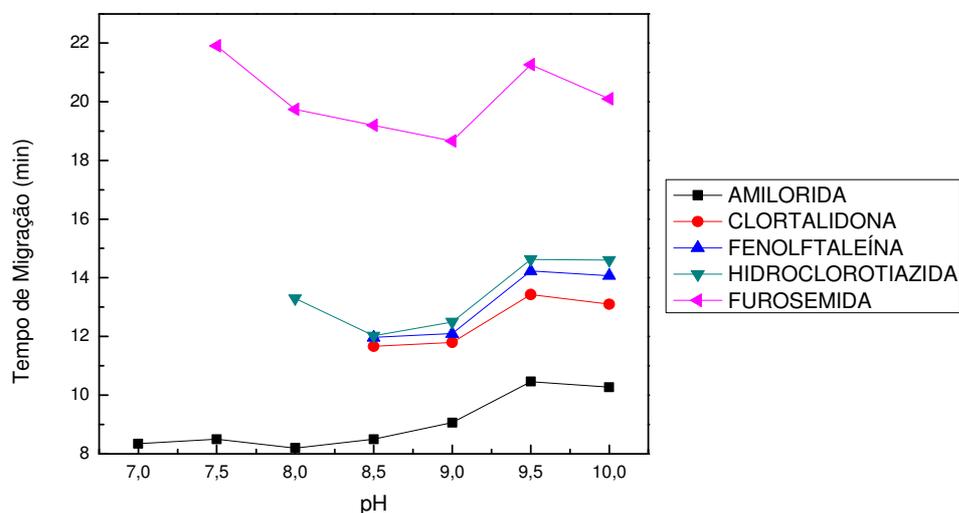


Figura 8 - Efeito da variação do pH no eletrólito de trabalho e nos tempos de migração dos fármacos sintéticos em concentrações de 100 mg L^{-1} , para valores de pH (7,0 a 10,0). Condições: eletrólito de trabalho tampão fosfato 20 mmol L^{-1} contendo metanol 30% (v/v), potencial de separação -15 Kv, capilar de sílica fundida $75 \mu\text{m} \times 360 \mu\text{m} \times 68 \text{ cm}$ (46 cm até o detector); detecção indireta por C^{4}D operando em 400 kHz; temperatura $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$; injeção hidrodinâmica por gravidade de 20 cm durante 60 s.

A fim de melhorar a resolução dos picos e diminuir o tempo de migração das espécies, verificou-se a influencia da adição dos solventes orgânicos, metanol e acetonitrila, no eletrólito de trabalho (JAGER; TAVARES, 2001). Metanol e acetonitrila foram adicionados ao tampão fosfato em concentrações de 5-50% (v/v). Observou-se que com o aumento da concentração de metanol houve consequentemente um aumento no tempo de retenção dos fármacos (Figura 9). Por outro lado, o aumento na concentração de acetonitrila levou a uma diminuição da viscosidade do eletrólito de trabalho, provocando uma mudança na mobilidade aparente dos analitos e, portanto, diminuindo o tempo migração destes. Esta diminuição no tempo de migração fez com que os fármacos fossem identificados muito próximos, prejudicando bastante a resolução dos sinais. Em concentrações acima de 30% resultou inclusive na co-migração da clortalidona, fenolftaleína e da hidroclorotiazida. Enquanto isso o metanol, apesar de acarretar um pequeno aumento no tempo de análise, auxiliou a separação dos fármacos, principalmente a partir da concentração de 20% (v/v). Porém, em concentrações mais altas de 40 e 50% (v/v) a presença de metanol provocou uma diminuição na sensibilidade dos sinais, muito provavelmente por diminuir a condutividade do eletrólito de trabalho. Devido a isso o solvente metanol na concentração de 30% foi a condição escolhida para a aditivação do eletrólito de trabalho.

Finalmente, chegou-se a um eletrólito ideal para a determinação de amilorida, clortalidona, fenolftaleína, hidroclorotiazida e furosemida nas seguintes condições: tampão fosfato 20 mmol L⁻¹ contendo metanol 30% (v/v) em pH 9,2.

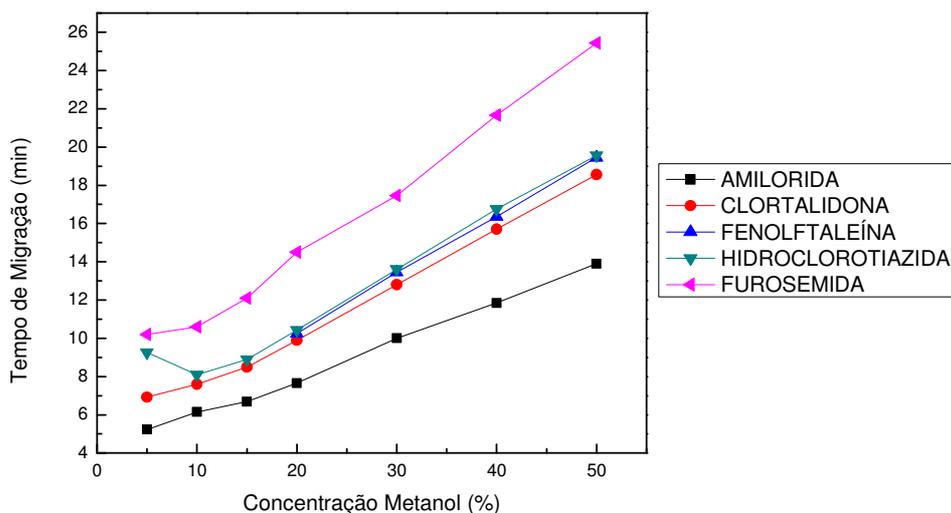


Figura 9 - Efeito da concentração solvente orgânico metanol nos tempos de migração dos fármacos sintéticos em concentrações de 100 mg L^{-1} , para concentrações de solvente de 5 a 50%. Condições: eletrólito de trabalho tampão fosfato 20 mmol L^{-1} (pH 9,2), potencial de separação -15 Kv , capilar de sílica fundida $75 \mu\text{m} \times 360 \mu\text{m} \times 68 \text{ cm}$ (46 cm até o detector); detecção indireta por C^4D operando em 400 kHz ; temperatura $25 \text{ }^\circ\text{C}$; injeção hidrodinâmica por gravidade de 20 cm durante 60 s .

5.1.2 Otimização dos Parâmetros Operacionais

Após otimizar o eletrólito de trabalho para os cinco fármacos em estudo, coube realizar a otimização dos parâmetros operacionais da CE- C^4D . Estes parâmetros compreendem potencial de separação, frequência de corrente alternada na detecção e injeção hidrodinâmica.

O potencial de separação avaliado para o método variou em uma faixa de $8\text{-}17 \text{ kV}$. Com o aumento do valor do potencial foi observado a diminuição no tempo de migração dos fármacos (Figura 10). O potencial de 15 kV proporcionou a melhor resolução dos picos além de baixo ruído na linha base em um tempo de migração satisfatório para os cinco adulterantes.

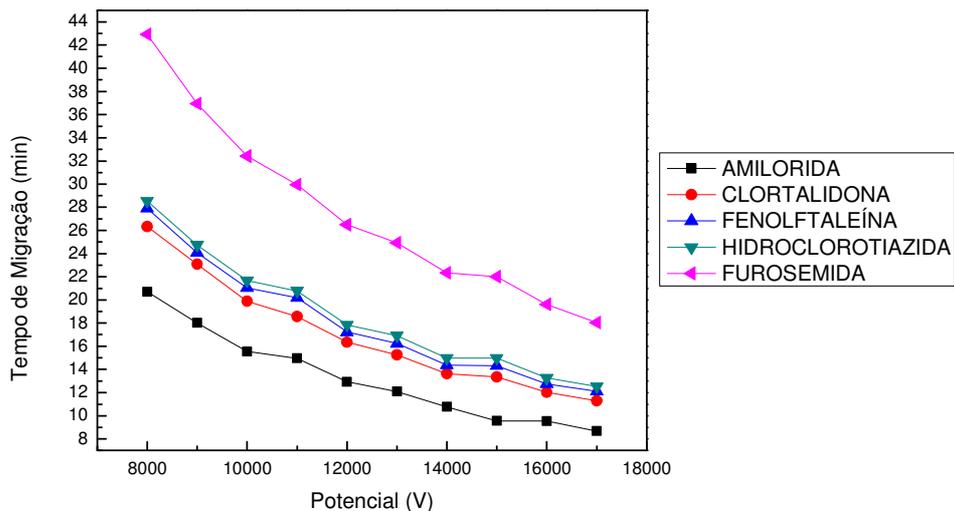


Figura 10 - Efeito do potencial de separação nos tempos de migração dos fármacos sintéticos em concentrações de 100 mg L^{-1} , para valores de 8-17 kV. Condições: eletrólito de trabalho tampão fosfato 20 mmol L^{-1} (pH 9,2) contendo metanol 30% (v/v), capilar de sílica fundida $75 \mu\text{m} \times 360 \mu\text{m} \times 68 \text{ cm}$ (46 cm até o detector); detecção indireta por C^{4}D operando em 400 kHz; temperatura $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$; injeção hidrodinâmica por gravidade de 20 cm durante 60 s.

O aparelho de eletroforese capilar utilizado neste trabalho é equipado com um sistema de injeção hidrodinâmico por gravidade (CARVALHO *et al.*, 2009). Assim os parâmetros de altura e tempo de injeção definem a quantidade de amostra que é introduzida no capilar. Os tempos de injeção estudados foram de 60 e 120 s (Figura 11), enquanto que a altura de injeção variou de 10 a 25 cm (Figura 12). Como esperado observou-se que quanto maior o tempo e a altura de injeção, maior a quantidade de amostra injetada, resultando diretamente no aumento da altura e área do pico. Avaliando esses fatores, a altura de 20 cm e o tempo de 60 s definiu a condição ideal de injeção, levando em conta a sensibilidade e a resolução dos picos. O tempo de 120 s em altura de 20 cm ou mais ocasionou a co-migração da hidroclorotiazida com a fenolftaleína em virtude do grande aumento na área dos sinais.

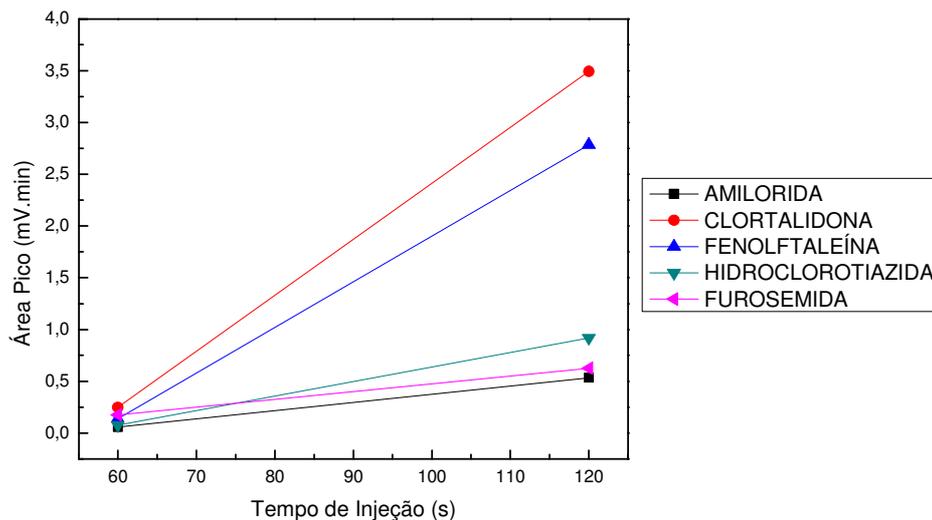


Figura 11 - Efeito do tempo de injeção na área dos picos dos fármacos sintéticos em concentrações de 100 mg L^{-1} , para valores de 60 e 120 s. Condições: eletrólito de trabalho tampão fosfato 20 mmol L^{-1} (pH 9,2) contendo metanol 30% (v/v), potencial de separação -15 Kv, capilar de sílica fundida $75 \mu\text{m} \times 360 \mu\text{m} \times 68 \text{ cm}$ (46 cm até o detector); detecção indireta por C^4D operando em 400 kHz; temperatura $25 \text{ }^\circ\text{C}$; injeção hidrodinâmica por gravidade de 20 cm.

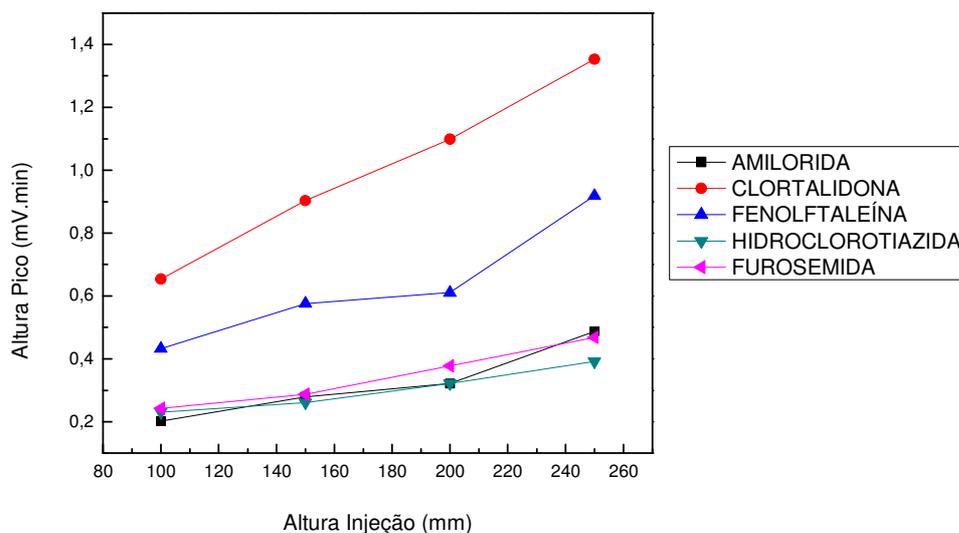


Figura 12 - Efeito da altura de injeção na altura dos picos dos fármacos sintéticos em concentrações de 100 mg L^{-1} , para valores de 10, 15, 20 e 25 cm. Condições: eletrólito de trabalho tampão fosfato 20 mmol L^{-1} (pH 9,2) contendo metanol 30% (v/v), potencial de separação -15 Kv, capilar de sílica fundida $75 \mu\text{m} \times 360 \mu\text{m} \times 68 \text{ cm}$ (46 cm até o detector); detecção: indireta C^4D operando em 400 kHz; temperatura $25 \text{ }^\circ\text{C}$; injeção hidrodinâmica por gravidade de 60 s.

A frequência de corrente alternada é um parâmetro de extrema importância na detecção por condutividade sem contato, pois, afeta diretamente a razão sinal/ruído nas corridas eletroforéticas (SILVA, 2003). A

faixa da frequência estudada foi de 200-1000 kHz. A frequência de 400 kHz apresentou a melhor condição para detecção indireta dos adulterantes na detecção por condutividade sem contato, resultando em picos com boa sensibilidade e ao mesmo tempo bem resolvidos (Figura 13).

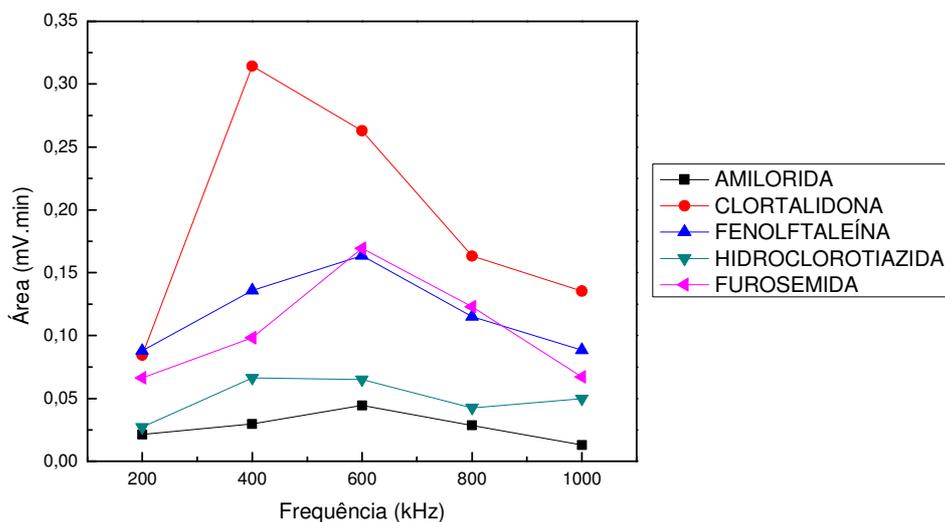


Figura 13 - Efeito da frequência de operação do detector na área dos picos dos fármacos sintéticos em concentrações de 100 mg L^{-1} , para valores de 200 a 1000 kHz. Condições: eletrólito de trabalho tampão fosfato 20 mmol L^{-1} (pH 9,2) contendo metanol 30% (v/v), potencial de separação -15 Kv, capilar de sílica fundida $75 \mu\text{m} \times 360 \mu\text{m} \times 68 \text{ cm}$ (46 cm até o detector); detecção indireta por C^4D ; temperatura $25 \text{ }^\circ\text{C}$; injeção hidrodinâmica por gravidade de 20 cm durante 60 s.

Finalmente, a determinação dos adulterantes investigados ficou defenida sob as seguintes condições: eletrólito de trabalho tampão fosfato 20 mmol L^{-1} (pH 9,2) contendo 30% de metanol (v/v); potencial de separação de 15kV; injeção por gravidade hidrodinâmica de 20 cm de altura durante 60 s; e frequência de operação do detector de 400 kHz. Estas condições resultaram no eletroferograma mostrado na Figura 14.

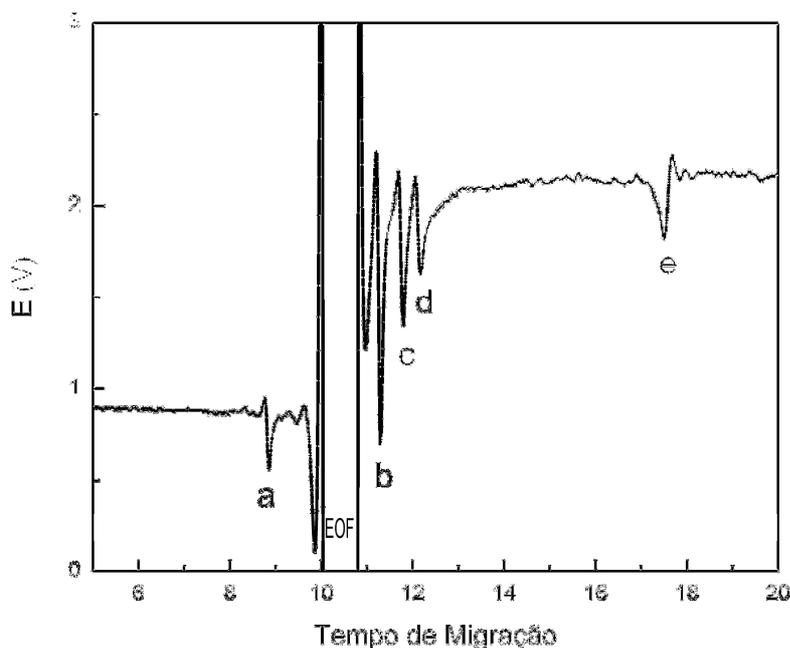


Figura 14 - Eletroferograma dos adulterantes (100 mg L^{-1}) (a) amilorida, (b) clortalidona, (c) fenolftaleína, (d) hidroclorotiazida, (e) furosemida. Condições: eletrólito de trabalho tampão fosfato 20 mmol L^{-1} (pH 9,2) contendo metanol 30% (v/v), potencial de separação -15 Kv, capilar de sílica fundida $75 \mu\text{m} \times 360 \mu\text{m} \times 68 \text{ cm}$ (46 cm até o detector); detecção indireta por C^{4}D operando em 400 kHz; temperatura $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$; injeção hidrodinâmica por gravidade de 20 cm durante 60 s.

5.1.3 Validação do Método

A validação de um método analítico é fundamental para implementar um controle de qualidade em qualquer laboratório de análises. Os resultados obtidos com a validação do método por CZE- C^{4}D seguem abaixo, bem como o modo como foram efetuados.

Fármacos pertencentes a diferentes classes farmacológicas podem ter ação direta ou indireta na perda de peso e, desse modo, se tornam possíveis adulterantes em formulações naturais emagrecedoras. A especificidade do método CZE- C^{4}D foi avaliada pela interferência de outros fármacos emagrecedores na determinação dos fármacos em estudos. Para isso foram analisados fármacos das classes dos anorexígenos (anfepramona, femproporex e sibutramina), antidepressivos (fluoxetina, paroxetina, sertralina e

bupropiona) e benzodiazepínicos (diazepam, alprazolam, flurazepam, lorazepam, clonazepam, bromazepam e clordiazepóxido), os quais foram denominados de interferentes. De todos os interferentes estudados, apenas a anfepramona, fluoxetina e paroxetina foram detectados nas condições previamente otimizadas. Porém estas espécies não interferiram de fato na determinação dos diuréticos e do laxante, pois, foram totalmente separadas destes, podendo inclusive ser analisadas junto dos demais na forma protonada. A Figura 15 mostra o eletroferograma dos adulterantes junto dos interferentes detectados. Os demais fármacos estudados como possíveis interferentes não foram detectados nas condições otimizadas, provavelmente por não estarem bem ionizados em pH 9,2, co-migrando com o EOF em suas formas neutras.

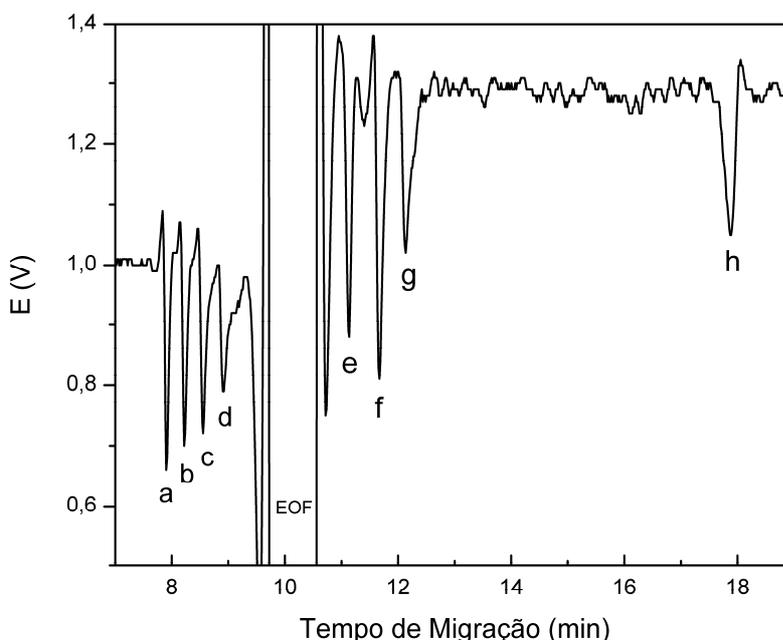


Figura 15 - Eletroferograma dos adulterantes e dos interferentes estudados (100 mg L^{-1}) (a) fluoxetina, (b) paroxetina, (c) amilorida, (d) anfepramona, (e) clortalidona, (f) fenoltaleína, (g) hidroclorotiazida, (h) furosemida. Condições: eletrólito de trabalho tampão fosfato 20 mmol L^{-1} (pH 9,2) contendo metanol 30% (v/v), potencial de separação -15 Kv, capilar de sílica fundida $75 \mu\text{m} \times 360 \mu\text{m} \times 68 \text{ cm}$ (46 cm até o detector); detecção indireta por C^{4}D operando em 400 kHz; temperatura $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$; injeção hidrodinâmica por gravidade de 20 cm durante 60 s.

A linearidade do método foi avaliada através da construção de curvas analíticas com os seguintes níveis de concentração cada (10, 50, 100, 200,

300, 400 e 500 mg L⁻¹), calculados em triplicatas. Os dados de linearidade estão expostos na Tabela 5.

Tabela 5 – Dados de linearidade do método CZE-C⁴D.

Adulterante	Faixa Linear (mg L ⁻¹)	Faixa de Trabalho (mg L ⁻¹)	Equação da Reta	r
Amilorida	10-500	10-100	$y = 0,000968x - 0,00615$	0,99
Clortalidona	10-500	10-100	$y = 0,00106x + 0,00601$	0,99
Hidroclorotiazida	10-500	10-100	$y = 0,00094x + 0,01364$	0,99
Furosemida	10-500	10-100	$y = 0,00102x + 0,00106$	0,99
Fenolftaleína	10-500	10-100	$y = 0,00136x - 0,01672$	0,99

(n=3)

Os limites de detecção e de quantificação foram calculados pela determinação do ruído da linha base de sete replicatas. A estimativa do limite de detecção teve por base a relação de três vezes o ruído de linha de base, enquanto que a do limite de quantificação foi considerada dez vezes o ruído da linha de base (Tabela 6).

Tabela 6 – Limites de detecção (LD) e limites de quantificação (LQ) para os adulterantes estudados pelo método CZE-C⁴D.

Adulterante	LD (mg L ⁻¹)	LQ (mg L ⁻¹)
Amilorida	1,22	4,06
Clortalidona	1,83	6,10
Hidroclorotiazida	1,60	5,36
Furosemida	2,52	8,42
Fenolftaleína	1,96	6,65

(n=7)

A precisão intra-dia do método (repetibilidade) foi analisada em três concentrações diferentes (baixa, média e alta), e determinada em função da média dos valores de área dos picos e estimativa do desvio padrão relativo de todas as injeções (triplicatas). A precisão intermediária foi calculada em triplicata na concentração de 50 mg L⁻¹ com dois dias de diferença. A precisão foi expressa através do coeficiente de variação percentual (CV%) conforme mostra a Tabela 7. Uma variabilidade de 15% foi aceita para os ensaios considerando-os como bioanalíticos uma vez que não existem limites especificados para ensaios com fitoterápicos (BRASIL, 2003).

Tabela 7 – Precisão intra-dia e intermediária do método CZE-C⁴D.

Adulterante	Precisão Intra-dia (CV%)			Precisão Intermediária (CV%)
	25 mg L ⁻¹	50 mg L ⁻¹	100 mg L ⁻¹	50 mg L ⁻¹
Amilorida	3,02	0,62	1,63	5,4
Clortalidona	2,33	5,3	2,5	3,6
Hidroclorotiazida	2,21	2,65	1,87	7,3
Furosemida	6,67	4,68	3,23	1,86
Fenolftaleína	1,93	4,47	2,81	9,1

(n=3)

A exatidão foi calculada pelo método da adição do padrão. O método da adição do padrão consiste na adição de uma concentração conhecida da substância de interesse (25 mg L⁻¹) que está sendo analisada à amostra antes da extração desta. Ao extrato final da amostra são adicionados três diferentes concentrações do mesmo analito, obtendo-se uma curva analítica na amostra (20, 40 e 60 mg L⁻¹). A concentração (x) encontrada pela equação da reta quando y = 0 corresponde a recuperação alcançada do valor inicialmente adicionado à amostra, neste caso 25 mg L⁻¹. O método da adição do padrão é

trabalhoso, mas é especialmente importante quando a amostra é muito complexa. Os resultados obtidos foram expressos em porcentagem de recuperação de cada analito. A recuperação (exatidão) encontrada para cada um dos analitos foi de 98,6% para a amilorida, 101,9% para a clortalidona, 101,0% para a hidroclorotizida e furosemida e 93,6% para a fenolftaleína.

O método mostrou-se robusto uma vez que não sofreu variações na reprodutibilidade quando submetido a pequenas variações de pH e à mudança no lote do metanol. Além disso, a análise foi reproduzida quando realizada por diferentes analistas.

5.1.4 Aplicação Analítica

Um total de vinte e seis amostras de formulações naturais emagrecedoras foi analisado pelo método CZE-C⁴D com o intuito de verificar a aplicabilidade do método em amostras reais e investigar a possível adulteração de algum destes produtos.

Embora comercializadas como produto natural, cinco amostras continham diurético sintético declarado no rótulo da embalagem. Três delas continham hidroclorotiazida (amostras A, C e E) e duas furosemida (amostras B e D). A análise destas amostras comprovou a presença destes fármacos com a detecção e confirmação dos picos. A Figura 16 mostra do eletroferograma obtido do *screening* da amostra A, contendo hidroclorotiazida, enquanto a Figura 17 mostra o *screening* da amostra B contendo furosemida. O doseamento da concentração do fármaco presente em cada uma das amostras foi calculado pelo método da adição do padrão.

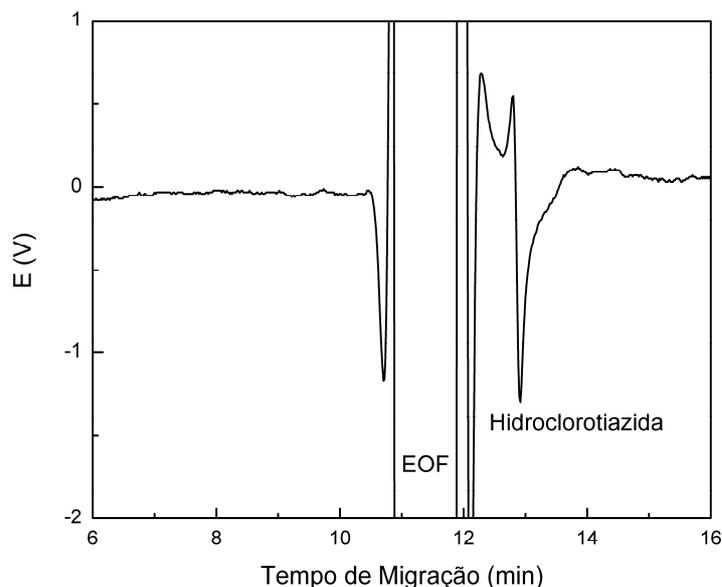


Figura 16 - Eletroferograma de amostra fitoterápica A, na qual foi detectado o pico eletroforético da hidroclorotiazida. A amostra contém *Fucus vesiculosus* 80mg, *Centella asiatica* 80mg, *Spirulina maxima* 80mg, *Passiflora* sp. 50mg, *Rhamnus purshiana* 100mg, cafeína 30mg, hidroclorotiazida 10mg. Condições: eletrólito de trabalho tampão fosfato 20 mmol L⁻¹ (pH 9,2) contendo metanol 30% (v/v), potencial de separação -15Kv, capilar de sílica fundida 75 µm × 360 µm × 68 cm (46 cm até o detector); detecção indireta por C⁴D operando em 400 kHz; temperatura 25°C; injeção hidrodinâmica por gravidade de 20cm durante 60 s.

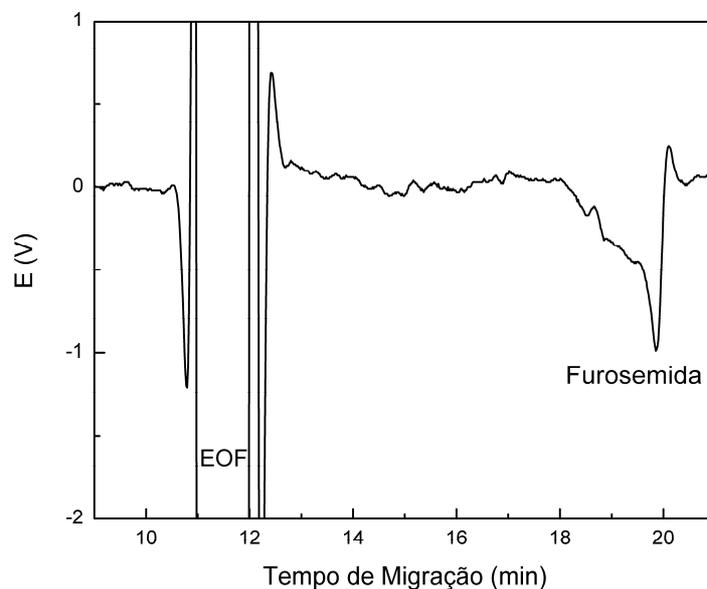


Figura 17 - Eletroferograma de amostra fitoterápica B, na qual foi detectado o pico eletroforético da furosemida. A amostra contém *Cassia augustifolia*, *Fucus vesiculosus*, furosemida, *Rhamnus purshiana*, *Garcinia cambogia*, *Cyamopsis* sp. Condições: eletrólito de trabalho tampão fosfato 20 mmol L⁻¹ (pH 9,2) contendo metanol 30% (v/v), potencial de separação -15Kv, capilar de sílica fundida 75 µm × 360 µm × 68 cm (46 cm até o detector); detecção indireta por C⁴D operando em 400 kHz; temperatura 25°C; injeção hidrodinâmica por gravidade de 20cm durante 60 s.

As demais amostras foram submetidas a um *screening* a fim de identificar o aparecimento de algum pico característico aos dos adulterantes estudados. Em sete amostras houve o aparecimento de sinal semelhante ao dos adulterantes estudados. Os picos foram confirmados com a adição individual dos fármacos (*spike*) na amostra. Em quatro destas amostras todos os analitos foram separados, indicando não se tratar de nenhum dos adulterantes estudados, porém, nas outras três foi confirmada a adulteração com hidroclorotiazida. A concentração dos fármacos nas amostras foi também calculada pelo método da adição do padrão, obtendo-se a recuperação do composto em cada uma das amostras da mesma forma que foi feito o ensaio da exatidão. As amostras contendo fármacos sintéticos declarados e as amostras adulteradas com a respectiva concentração encontrada estão na Tabela 8.

Tabela 8 – Amostras contendo fármacos sintéticos declarados e amostras adulteradas analisadas pelo método CZE-C⁴D com suas respectivas concentrações.

Amostra	Fármaco/Adulterante	Concentração (mg/cápsula)
A	Hidroclorotiazida	11,1
B	Furosemida	15,8
C	Hidroclorotiazida	22,5
D	Furosemida	28,7
E	Hidroclorotiazida	1,2
T	Hidroclorotiazida	2,1
X	Hidroclorotiazida	0,6
Y	Hidroclorotiazida	7,0

5.2 Cromatografia de Par Iônico (IPC)

5.2.1 Otimização do Método

A primeira etapa na otimização do método por IPC-PAD foi o estudo do potencial de oxidação-redução dos fármacos em estudo. Uma varredura na faixa de potenciais de -0,2 V a +1,1 V foi realizada no modo DC (corrente contínua, do inglês, *direct current*) do equipamento. No modo DC um potencial constante é aplicado no eletrodo de trabalho e as espécies analisadas são oxidadas ou reduzidas de acordo com as propriedades eletroquímicas. A faixa de potenciais analisada foi determinada em função do uso do eletrodo de ouro, para o qual se estabelece uma faixa ideal de trabalho de -0,35 V a +1,1 V quando em meio ácido e -1,25 V a +0,75 V quando em meio básico. Hidroclorotiazida, clortalidona e furosemida apresentaram comportamento semelhante de oxidação (entre os potenciais +0,8 V e +1,0 V), enquanto que, a amilorida, apresentou potencial de oxidação em torno de +0,5 V, dificultando a análise simultânea deste fármaco junto dos demais. Na Figura 18 pode-se observar o comportamento dos adulterantes nos diferentes potenciais estudados. Neste estudo, a fenolftaleína não apresentou um comportamento adequado por não possuir muitos grupamentos oxidantes ou redutores, dificultando a sua determinação. Sendo assim, o potencial de +0,8 V (E_1) por 0,4 segundos foi escolhido como potencial de amostragem do pulso, e os potenciais de oxidação de +1,0V (E_2) por 0,4 segundos e de redução de -0,2 V (E_3) por 1,2 segundos como potenciais de limpeza e regeneração do eletrodo de ouro, totalizando um ciclo de 2 segundos (Figura 19).

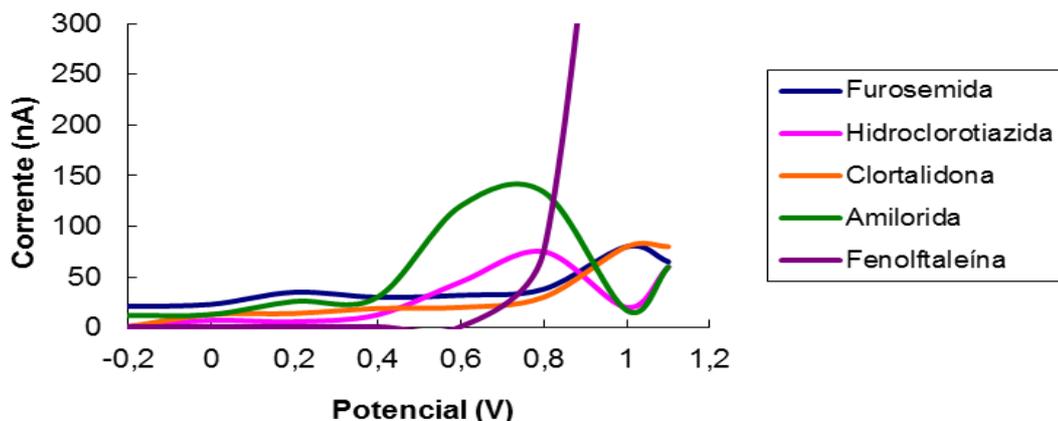


Figura 18 – Estudo do potencial dos adulterantes estudados na faixa de -0,2 V a +1,1 V pelo modo DC (corrente contínua, do inglês, *direct current*) do equipamento. Adulterantes: furosemida, hidroclorotiazida, clortalidona, amilorida e fenolftaleína (10 mg L⁻¹). Fase móvel: tampão fosfato 5 mmol L⁻¹ (pH 4,5) e metanol 50% (v/v).

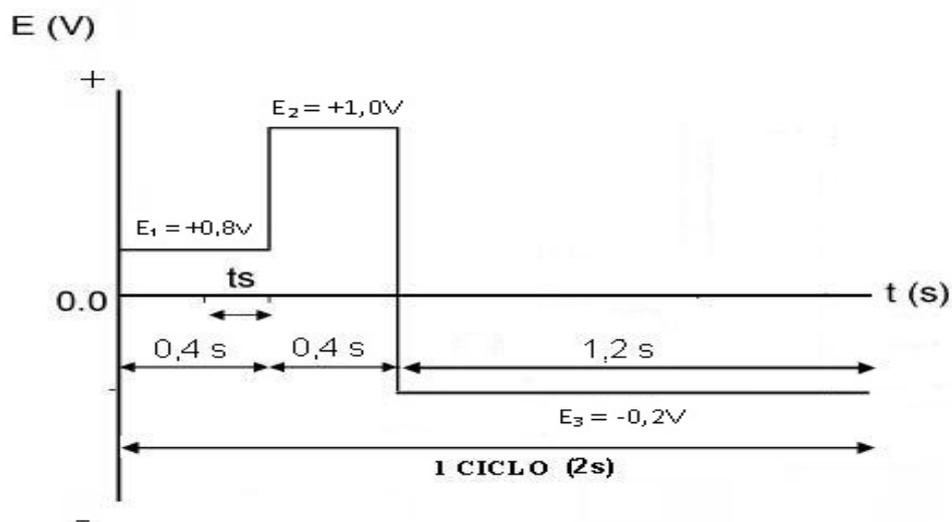


Figura 19 - Ciclo de potenciais escolhido para o acondicionamento e regeneração do eletrodo de ouro. O potencial de amostragem (E_1) escolhido foi +0,8V, enquanto que o potencial de oxidação e de redução (E_2 e E_3) foram de +1,0V e -0,2V respectivamente.

A fase móvel foi otimizada variando-se quatro componentes: fosfato de sódio, acetonitrila, metanol e dodecil sulfato de sódio. Partiu-se de uma solução de fosfato de sódio analisada nas concentrações de 1, 5, 10 e 15 mmol L⁻¹. Fosfato de sódio 5 mmol L⁻¹ proporcionou uma linha de base mais estável,

além de possibilitar a detecção dos três adulterantes. No entanto foi observada uma fraca separação entre clortalidona e a furosemida. Os testes foram efetuados em pH 5,0 (ácido) e pH 9,0 (básico), com o intuito de pré-determinar a faixa de pH ideal a ser avaliada posteriormente. A análise em pH 5,0 resultou em um cromatograma com menor interferência no ruído da linha de base.

A fim de melhorar a resolução dos picos buscou-se avaliar a influência da presença de solventes orgânicos na fase móvel. Concentrações de 10 e 25, 30 e 40% (v/v) de acetonitrila foram adicionadas ao eluente. 30% de acetonitrila mostrou-se ideal na separação dos picos cromatográficos apesar de estes estarem pouco resolvidos, entretanto, a linha de base se tornou bastante instável. Passou-se então para o estudo do solvente orgânico metanol. Metanol nas concentrações de 10 e 25, 30 e 40% (v/v) foi adicionado ao eluente. O metanol adicionado ao eluente levou a uma maior estabilização da linha de base, porém, voltou-se a questão da má separação da clortalidona da furosemida, além da fraca resolução dos picos. Mesmo assim a concentração de metanol 40% (v/v) foi a escolhida dentre as demais (Figura 20)

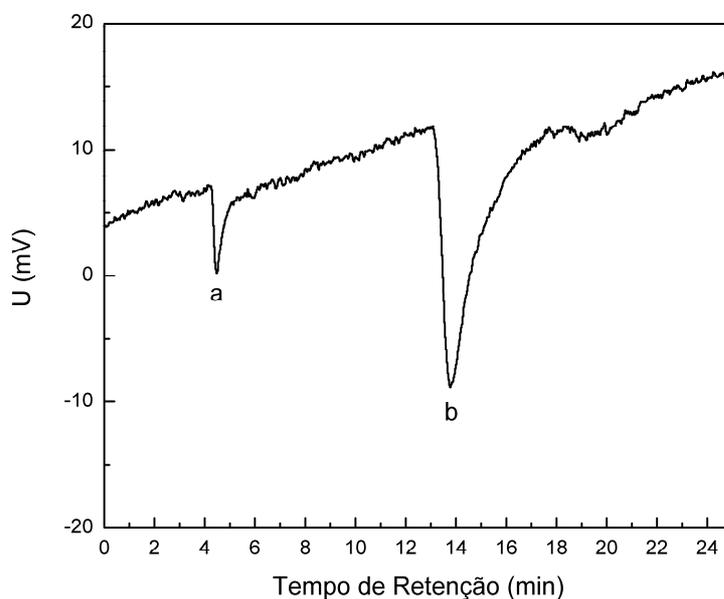


Figura 20- Cromatograma dos adulterantes (5 mg L^{-1}) (a) hidroclorotiazida, (b) clortalidona e furosemida. Condições: fase móvel tampão fosfato 5 mmol L^{-1} (pH 4,5) e metanol 50% (v/v); coluna C18; potencial de amostragem de +0,8 V; potenciais de limpeza de -0,2 V e +1,0 V; e fluxo de 0,5mL/min.

Por fim, optou-se por investigar a formação de par iônico, na tentativa de resolver o problema da separação dos picos. Para isso, foi adicionado dodecil sulfato de sódio (SDS) à fase móvel fosfato de sódio 5 mmol L^{-1} contendo metanol 40% (v/v). Partiu-se de uma concentração de $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ de SDS, que ocasionou a total separação dos três picos cromatográficos, porém estendeu para quase trinta minutos o tempo de análise que era de quinze minutos. Foi-se reduzindo, então, a concentração de SDS para 0,4, 0,3, 0,2 e $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$. A concentração de $0,3 \text{ mmol L}^{-1}$ foi a de escolha, uma vez que, 0,1 e $0,2 \text{ mmol L}^{-1}$ não foram suficientes para a separação e, portanto, $0,3 \text{ mmol L}^{-1}$ separou bem os sinais resultando em um pequeno aumento no tempo de retenção das espécies. Para diminuir o tempo de corrida sem interferir na boa separação dos sinais já alcançada, aumentou-se a concentração de metanol de 40 para 50% e aumentou-se a vazão do eluente para $1,0 \text{ mL/min}$.

Finalmente foi verificada a influência de pequenas mudanças no pH da fase móvel. Análises em pH 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5 e 6,0 foram avaliadas e 4,5 foi o pH de escolha. Logo, a determinação dos adulterantes investigados por IPC-PAD ficou definida sob as seguintes condições: fase móvel tampão fosfato 5 mmol L^{-1} (pH 4,5) contendo SDS $0,3 \text{ mmol L}^{-1}$ e metanol 50% (v/v); potencial de amostragem de $+0,8 \text{ V}$; potenciais de limpeza de $-0,2 \text{ V}$ e $+1,0 \text{ V}$; e fluxo de $1,0 \text{ mL/min}$. Estas condições resultaram no cromatograma apresentado na Figura 21, com menos de dez minutos de análise.

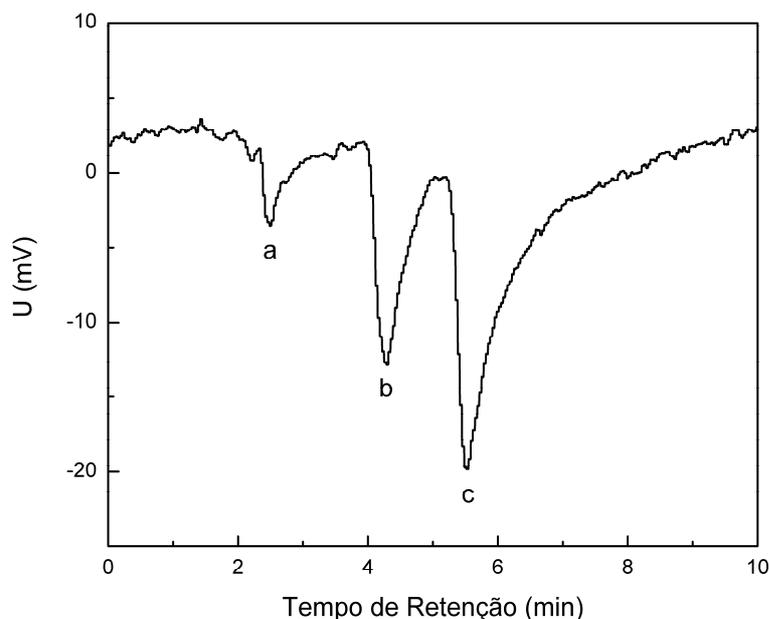


Figura 21- Cromatograma dos adulterantes (5 mg L^{-1}) (a) hidroclorotiazida, (b) clortalidona, (c) furosemina. Condições: fase móvel tampão fosfato 5 mmol L^{-1} (pH 4,5) contendo SDS $0,3 \text{ mmol L}^{-1}$ e metanol 50% (v/v); coluna C18; potencial de amostragem de $+0,8 \text{ V}$; potenciais de limpeza de $-0,2 \text{ V}$ e $+1,0 \text{ V}$; e fluxo de $1,0 \text{ mL/min}$.

5.2.2 Validação do Método

Assim como o método por CZE- C^4D passou por um processo de validação, também o método por IPC-PAD foi avaliado pelos mesmos parâmetros de validação que o método anterior.

A especificidade do método IPC-PAD foi avaliada pela interferência de outros fármacos emagrecedores na determinação dos fármacos em estudos. Os interferentes estudados foram os mesmo anorexígenos (anfepramona, femproporex e sibutramina), antidepressivos (fluoxetina, paroxetina, sertralina e bupropiona) e benzodiazepínicos (diazepam, alprazolam, flurazepam, lorazepam, clonazepam, bromazepam e clordiazepóxido). De todos os interferentes estudados, apenas os benzodiazepínicos bromazepam, clonazepam, lorazepam e alprazolam foram detectados nas condições previamente otimizadas, sendo que o lorazepam e o alprazolam não foram totalmente separados pelo método. De qualquer forma, estes fármacos não interferiram na determinação dos diuréticos, pois, saem da coluna em um

tempo superior ao dos adulterantes estudados. A Figura 22 mostra o cromatograma dos adulterantes junto dos interferentes detectados. Os demais fármacos estudados como possíveis interferentes não foram detectados nas condições otimizadas.

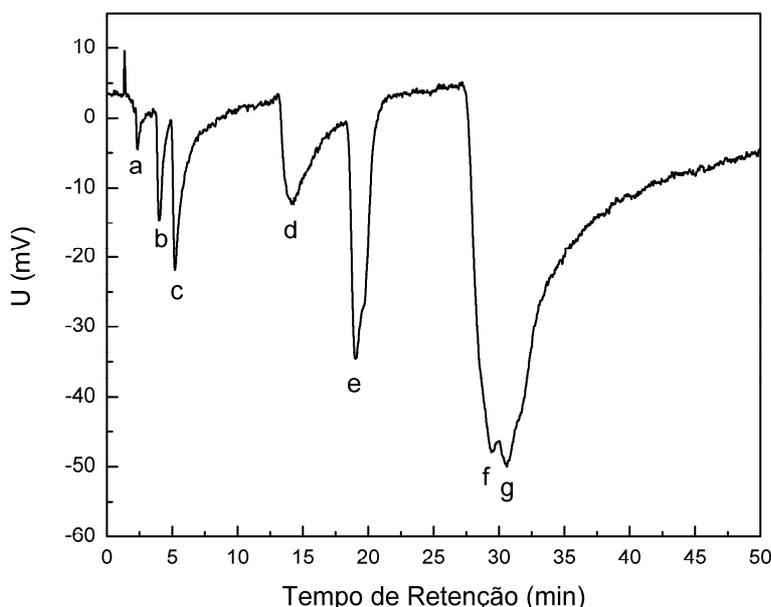


Figura 22 - Cromatograma dos adulterantes (5 mg L^{-1}) (a) hidroclorotiazida, (b) clortalidona, (c) furosemida, (d) bromazepam, (e) clonazepam, (f) lorazepam, (g) alprazolam. Condições: fase móvel tampão fosfato 5 mmol L^{-1} (pH 4,5) contendo SDS $0,3 \text{ mmol L}^{-1}$ e metanol 50% (v/v); coluna C18; potencial de amostragem de $+0,8 \text{ V}$; potenciais de limpeza de $-0,2 \text{ V}$ e $+1,0 \text{ V}$; e fluxo de $1,0 \text{ mL/min}$.

A linearidade do método foi avaliada através da construção de curvas analíticas com os seguintes níveis de concentração ($1, 5, 10, 20, 30, 40$ e 50 mg L^{-1}), calculados em triplicatas. Os dados de linearidade para o método IPC-PAD são mostrados na Tabela 9.

Os limites de detecção e de quantificação foram também calculados pela determinação do ruído da linha base de sete replicatas. A estimativa do limite de detecção teve por base a relação de três vezes o ruído de linha de base, enquanto que a do limite de quantificação foi considerada dez vezes o ruído da linha de base (Tabela 10).

Tabela 9 – Dados de linearidade do método IPC-PAD.

Adulterante	Faixa Linear (mg L ⁻¹)	Equação da Reta	r
Hidroclorotiazida	1-50	$y = 0,10935x - 0,25481$	0,99
Clortalidona	1-50	$y = 0,38245x - 0,28878$	0,99
Furosemida	1-50	$y = 1,07321x + 1,70671$	0,99

*(n=3)***Tabela 10** – Limites de detecção (LD) e limites de quantificação (LQ) para os adulterantes estudados pelo método IPC-PAD.

Adulterante	LD (mg L ⁻¹)	LQ (mg L ⁻¹)
Hidroclorotiazida	0,98	3,25
Clortalidona	0,15	0,51
Furosemida	0,08	0,28

(n=7)

A precisão intra-dia do método (repetibilidade) foi analisada em três concentrações diferentes (baixa, média e alta), e determinada em função da média dos valores de área dos picos e estimativa do desvio padrão relativo de todas as injeções (triplicatas), conforme mostra a Tabela11.

Tabela 11 – Precisão Intra-dia do método IPC-PAD.

Adulterante	Precisão Intra-dia (CV%)		
	15 mg L ⁻¹	25 mg L ⁻¹	50 mg L ⁻¹
Hidroclorotiazida	1,69	1,8	4,54
Clortalidona	1,52	1,51	3,53
Furosemida	5,45	0,79	1,56

(n=3)

A exatidão foi calculada pelo método da adição do padrão para o qual uma concentração conhecida do analito de interesse (10 mg L^{-1}) foi adicionado à amostra anteriormente à extração desta. Ao extrato final da amostra são adicionados três diferentes concentrações do mesmo analito, obtendo-se uma curva analítica na amostra ($10, 20$ e 30 mg L^{-1}). A concentração (x) encontrada pela equação da reta quando $y = 0$ corresponde a recuperação alcançada do valor inicialmente adicionado à amostra, neste caso 10 mg L^{-1} . Os resultados obtidos foram expressos em porcentagem de recuperação de cada analito. A recuperação (exatidão) encontrada para cada um dos analitos foi de 105,6% para hidroclorotiazida, 114,2% para clortalidona e 105,4% para furosemida.

O método mostrou-se robusto uma vez que não sofreu variações na reprodutibilidade quando submetido a pequenas variações de pH e à mudança no lote do metanol. Além disso, a análise foi reproduzida quando realizada por diferentes analistas.

5.2.3 Aplicação Analítica

As mesmas amostras analisadas pelo método CZE-C⁴D foram também analisadas pelo método IPC-PAD com o intuito de verificar a aplicabilidade do método em amostras reais e confirmar as formulações adulteradas, inclusive quanto à dose encontrada.

O *screening* das amostras A, B, C, D e E que continham fármacos declarados revelou a presença dos picos cromatográficos correspondentes a cada um dos fármacos: hidroclorotiazida ou furosemida. A Figura 23 mostra o eletroferograma da amostra A contendo hidroclorotiazida e, a Figura 24 corresponde ao eletroferograma do *screening* da amostra B contendo furosemida. Essas amostras tiveram de ser diluídas para a determinação da concentração devido à alta sensibilidade do método. A concentração destes diuréticos nestas amostras foi calculada pelo método da adição do padrão.

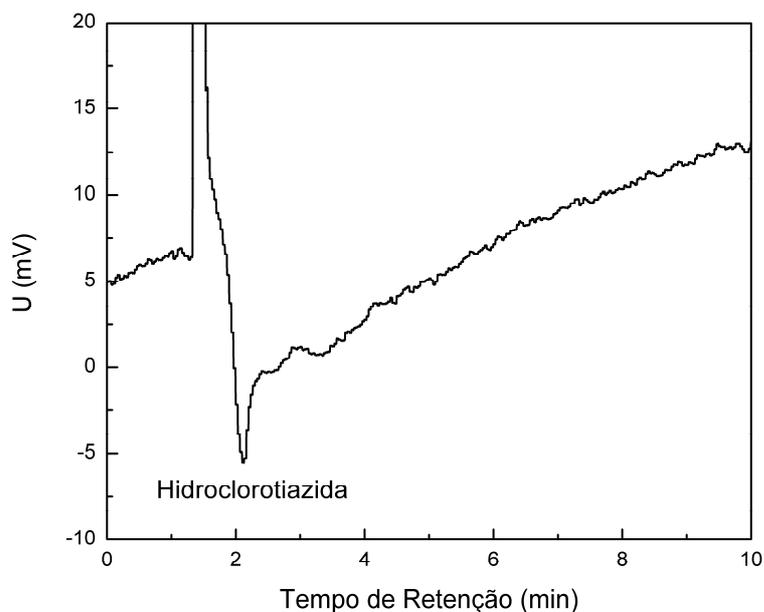


Figura 23: Cromatograma da amostra fitoterápica A, na qual foi detectado o pico eletroforético da hidroclorotiazida. A amostra contém *Fucus vesiculosus* 80mg, *Centella asiatica* 80mg, *Spirulina maxima* 80mg, *Passiflora* sp. 50mg, *Rhamnus purshiana* 100mg, cafeína 30mg, hidroclorotiazida 10mg. Condições: fase móvel tampão fosfato 5 mmol L⁻¹ (pH 4,5) contendo SDS 0,3 mmol L⁻¹ e metanol 50% (v/v); coluna C18; potencial de amostragem de +0,8 V; potenciais de limpeza de -0,2 V e +1,0 V; e fluxo de 1,0mL/min.

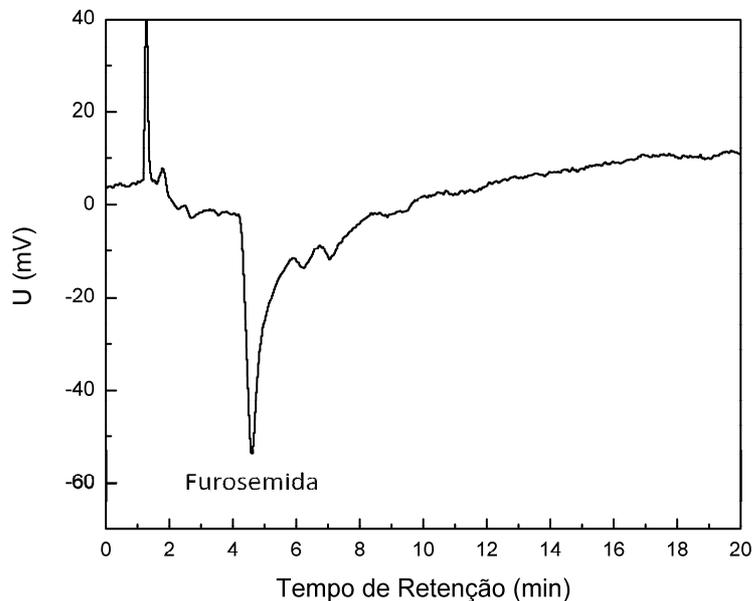


Figura 24: Cromatograma da amostra fitoterápica B, na qual foi detectado o pico eletroforético da furosemida. A amostra contém *Cassia augustifolia*, *Fucus vesiculosus*, furosemida, *Rhamnus purshiana*, *Garcinia cambogia*, *Cyamopsis* sp. Condições: fase móvel tampão fosfato 5 mmol L⁻¹ (pH 4,5) contendo SDS 0,3 mmol L⁻¹ e metanol 50% (v/v); coluna C18; potencial de amostragem de +0,8 V; potenciais de limpeza de -0,2 V e +1,0 V; e fluxo de 1,0mL/min.

As demais amostras foram submetidas a um *screening* a fim de identificar o aparecimento de algum pico característico aos dos adulterantes estudados. As amostras encontradas como adulteradas pelo método CZE-C⁴D também foram confirmadas no método IPC-PAD. A concentração dos fármacos nas amostras foi também calculada pelo método da adição do padrão. Outra comparação que pode ser feita é com relação às concentrações dos fármacos encontradas que é compatível entre os métodos. A Tabela 12 mostra as amostras contendo fármacos sintéticos declarados e as amostras adulteradas com a respectiva concentração encontrada.

Tabela 12 – Amostras contendo fármacos sintéticos declarados e amostras adulteradas analisadas pelo método IPC-PAD com suas respectivas concentrações.

Amostra	Fármaco/Adulterante	Concentração (mg/cápsula)
A	Hidroclorotiazida	10,9
B	Furosemida	16,4
C	Hidroclorotiazida	22,9
D	Furosemida	29,6
E	Hidroclorotiazida	1,17
T	Hidroclorotiazida	2,2
X	Hidroclorotiazida	0,7
Y	Hidroclorotiazida	7,1

5.3 Análise Comparativa dos Métodos de Separação

De acordo com os resultados expostos até aqui é possível realizar uma avaliação comparativa dos métodos de separação desenvolvidos nesta

pesquisa. As duas metodologias atingiram o objetivo inicial, mostrando-se aptas para a determinação dos adulterantes de escolha em amostras reais de produtos naturais emagrecedores. Conseguiu-se também alcançar uma alta sensibilidade em ambos os métodos, condição essencial para este tipo de aplicação. A Tabela 13 mostra que a sensibilidade do método por IPC-PAD foi ainda maior que a do método por CZE-C⁴D, sendo que, este último sofre influência direta da condutividade do eletrólito de trabalho enquanto que o primeiro é dependente do potencial aplicado no eletrodo.

Tabela 13 – Análise comparativa entre os métodos de separação desenvolvidos.

Método	Adulterantes Separados	LD (mg L ⁻¹)	LQ (mg L ⁻¹)	Interferentes Separados
CZE-C ⁴ D	Amilorida	1,22	4,06	Fluoxetina
	Clortalidona	1,83	6,10	Paroxetina
	Hidroclorotiazida	1,60	5,36	Anfepramona
	Furosemida	2,52	8,42	
	Fenolftaleína	1,96	6,65	
IPC-PAD	Hidroclorotiazida	0,98	3,25	Bromazepam
	Clortalidona	0,15	0,51	Clonazepam
	Furosemida	0,08	0,28	Lorazepam
				Alprazolam

Considerando os limites de quantificação alcançados para todos os adulterantes, o método eletroforético é apto para quantificar concentrações de até 0,10 mg/cápsula de amilorida, 0,15 mg/cápsula de clortalidona, 0,13 mg/cápsula de hidroclorotiazida, 0,21 mg/cápsula de furosemida e 0,15 mg/cápsula de fenolftaleína enquanto o método cromatográfico permite quantificar concentrações de até 0,08 mg/cápsula de hidroclorotiazida, 0,01

mg/cápsula de clortalidona e 0,007 mg/cápsula de furosemida. Estes valores são consideravelmente menores que os valores correspondentes às doses mínimas indicadas para cada um destes fármacos que são de 5 mg/cápsula para amilorida, 12,5 mg/cápsula para clortalidona e hidroclorotiazida e 20,0 mg/cápsula para furosemida. Logo, mesmo estando estes fármacos presentes como adulterantes e em concentrações bastante baixas, ambos os métodos possuem uma alta capacidade de detectá-los.

De todos os resultados obtidos, certamente o que mais chamou a atenção foi a proximidade dos valores encontrados pelos dois métodos, para a concentração dos adulterantes presentes nas amostras fitoterápicas. Estes valores levaram a confirmação da exatidão de um método pelo outro (Tabela 14).

Tabela 14 – Comparação entre as concentrações encontradas para os adulterantes presentes nas amostras pelos métodos CZE-C⁴D e IPC-PAD.

Amostra	Fármaco/Adulterante	Concentração (mg/cápsula)	
		CZE-C ⁴ D	IPC-PAD
A	Hidroclorotiazida	11,1	10,9
B	Furosemida	15,8	16,4
C	Hidroclorotiazida	22,5	22,9
D	Furosemida	28,7	29,6
E	Hidroclorotiazida	1,2	1,17
T	Hidroclorotiazida	2,1	2,2
X	Hidroclorotiazida	0,6	0,7
Y	Hidroclorotiazida	7,0	7,1

Os métodos apresentaram ainda boa seletividade. Fármacos pertencentes às principais classes que podem estar presentes, concomitantemente, em produtos emagrecedores não interferiram diretamente na análise dos adulterantes estudados. Mais que isso, três destes fármacos

ditos interferentes foram detectados no método CZE-C⁴D (fluoxetina, paroxetina e anfepramona) e quatro no método IPC-PAD (bromazepam, clonazepam, lorazepam e alprazolam) sendo possível, portanto, a identificação deles nas amostras, embora os métodos não tenham sido validados para os mesmos.

Em muitos casos de adulteração de produtos naturais se tem a necessidade de empregar métodos que certifiquem a identificação do adulterante, como a espectrometria de massas, por exemplo. Porém equipamentos desse tipo costumam despende altos valores para aquisição e manutenção dos mesmos, não sendo uma realidade na análise de rotina da maioria dos laboratórios. A disponibilidade de dois métodos diferentes, porém equivalentes, pode ser a solução nestes casos. Os métodos desenvolvidos nesta pesquisa fazem uso de técnicas de separação bastante acessíveis e que podem, quando empregadas juntas, fornecer a confirmação requerida na identificação dos adulterantes.

CONCLUSÃO

O consumo de substâncias emagrecedoras tem aumentado nos últimos anos como consequência dos padrões culturais de beleza impostos pela sociedade atual. Parte deste consumo é representado por fármacos de origem sintética, mas o que tem chamado a atenção é a procura por produtos de origem natural. Acompanhando o aumento da procura por estas formulações tem crescido também os relatos de casos nos quais estas formulações são encontradas adulteradas com fármacos de origem sintética.

Neste contexto, tem se buscado identificar cada vez mais essas fraudes, uma vez que estão em desacordo com a legislação de muitos países e, para isso se faz necessário a disponibilidade de metodologias analíticas que permitam investigar adulterantes pertencentes a diferentes classes farmacológicas, tendo em vista que as possibilidades de adulteração são bastante amplas.

Este trabalho desenvolveu duas metodologias analíticas empregando técnicas com alto poder de separação e seletividade. Os métodos foram ainda acoplados a detectores de caráter eletroquímico que oferecem alta sensibilidade na medida. Portanto ambas as metodologias mostram-se aptas para serem aplicadas na investigação de adulterantes em formulações ditas naturais.

O método por CZE-C⁴D permite a determinação simultânea dos diuréticos amilorida, clortalidona, hidroclorotiazida e furosemida e do laxante fenolftaléina como adulterantes em formulações fitoterápicas. Além disso, possibilitou a detecção dos antidepressivos fluoxetina e paroxetina e do anorexígeno anfepramona como possíveis interferentes.

O método por IPC-PAD permite determinar os diuréticos hidroclorotiazida, clortalidona, furosemida, além de identificar os benzodiazepínicos bromazepam, clonazepam, lorazepam e alprazolam.

Ainda não havia na literatura metodologias analíticas que priorizavam a determinação de diuréticos e laxantes na condição de adulterantes de formulações farmacêuticas naturais. Os métodos desenvolvidos foram

validados sob os parâmetros de especificidade, linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção e de quantificação e robustez, apresentando resultados dentro dos limites preconizados para a aplicação dos mesmos.

Os métodos foram ainda aplicados na investigação de 26 amostras reais de produtos naturais para emagrecer. Em três destes produtos foi identificada a presença ilegal do diurético hidroclorotiazida em concentrações que variaram de 0,6 a 7,0 mg/cápsula. Além disso, outras cinco amostras ditas naturais continham declarado no rótulo das embalagens a presença dos diuréticos sintéticos hidroclorotiazida ou furosemida.

Ainda não existe uma regulamentação unificada estabelecida pelos órgãos governamentais para o controle de produtos fitoterápicos. Cada país tem a sua legislação, porém a comercialização destes produtos é globalizada. Talvez por isso a adulteração de produtos naturais vem sendo uma prática recorrente em diversas partes do mundo. Logo, uma regulamentação efetiva para os produtos de origem natural, pode resultar na redução destas infrações, ou punição dos infratores, garantindo assim os direitos dos consumidores de realizar um tratamento de qualidade, seguro e eficaz, sem prejuízo à saúde.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, A. E.; RIBEIRO, M. L. Highperformance liquid chromatography determination of amfepramone hydrochloride, mazindol, and diazepam in tablets. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 22, n. 11, p. 1759-1769, 1999.

ALMEIDA, A. E.; RIBEIRO, M. L.; POLESE, L. Determination of anfepramone 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.

AL-SAFI, S. A.; AYOUB, N. M.; AYOUB, A. M.; AL-MOMANY, E.; AL-DOGHIM, I.; AL-BALAS, M.; ALKOFABI, A.S.; ABOUL-ENEIM, F. H.; ABOUL-ENEIM, B. H. Public awareness of the abuse of herbs and drugs to decrease body weight: a novel national survey in Jordan. **Journal of Public Health**, v. 16, p. 205-213, 2008.

AURICCHIO, M. T.; BATISTIC, M. A.; MARKMAN, B. E. O. Detecção de anorexígenos e benzodiazepínicos em formulações "naturais" empregadas em regimes de emagrecimento. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 51 (1/2), 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.

BATLOUNI, M. Diuréticos. **Revista Brasileira de Hipertensão**, v. 16, n. 4, p. 211-214, 2009.

BOGUSZ, M. J.; AL TUFAIL, M.; HASSAN, H. How natural are 'natural herbal remedies'? A saudi perspective. **Adverse Drug Reactions and Toxicological Reviews**, v. 21, n. 4, p. 219-229, 2002.

BOGUSZ, M. J.; HASSAN, H.; AL- ENAZI, E.; IBRAHIM, Z.; AL-TUFAIL, M. Application of LC-ESI-MS-MS for detection of synthetic adulterants in herbal remedies. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 41, p. 554-564, 2006.

BRASIL. Agência Nacional da Vigilância Sanitária. **Resolução 571 de 2002**. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2002/571_02re.htm. Acesso em, 09 maio 2011.

BRASIL. Agência Nacional da Vigilância Sanitária. **Resolução 899 de 2003**. Guia para validação de métodos Analíticos. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03re.htm. Acesso em 09 maio 2011.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução **RDC nº 14 de 31 de março de 2010**. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/portal/anvisa/home/medicamentos>. Acesso em 09 maio 2011.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC nº 52, de 06 de outubro de 2011**. Dispõe sobre a proibição do uso das substâncias anfepramona, femproporex e mazindol, seus sais e isômeros, bem como intermediários e medidas de controle da prescrição e dispensação de medicamentos que contenham a substância sibutramina, seus sais e isômeros, bem como intermediários e dá outras providências. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/hotsite/anorexigenos/pdf/RDC%2052-2011%20DOU%2010%20de%20outubro%20de%202011.pdf>. Acesso em 02 jun 2012.

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.; 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.

CARVALHO, L. M. de; MARTINI, M.; MOREIRA, A. P.; GARCIA, S. C.; NASCIMENTO, P. C.; BOHRER, D. Determination of synthetic pharmaceuticals in phytotherapeutics by capillary zone electrophoresis with contactless conductivity detection (CZE-C⁴D). **Microchemical Journal**, v. 96, p. 114-119, 2010.

CARVALHO, L. M. de; MARTINI, M.; MOREIRA, A. P. L.; LIMA, A. P. S.; CORREIA, D.; FALCÃO, T.; GARCIA, S. C.; BAIRROS, A. V.; NASCIMENTO, P. C.; BOHRER, D. Presence of synthetic pharmaceuticals as adulterants in slimming phytotherapeutic formulations and their analytical determination. **Forensic Science International**, v. 204, p. 6-12, 2011 (a).

CARVALHO, L. M. de; MOREIRA, A. P.; MARTINI, M.; FALCÃO, T. The Illegal Use of Synthetic Pharmaceuticals in Herbal Formulations: An Overview of Adulteration Practices and Analytical Investigations. **Forensic Science Review**, v. 23, n. 2, p. 73-90, 2011(b).

CIANCHINO, V.; ACOSTA, 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 Instituto Adolfo Lutz**, v. 54, n. 1, p. 36-43, 1994.

CHEN, Y.; ZHAO, L.; LU, F.; YU, Y.; CHAI, Y.; WU, Y. Determination of synthetic drugs used to adulterate botanical dietary supplements using QTRAP LC-MS/MS. **Food Additives and Contaminants**, v. 26, n. 5, p. 595-603, 2009.

CORREIA, D. **Determinação voltamétrica de 1,4-benzodiazepínicos e dietilpropiona como adulterantes em fitoterápicos para emagrecimento.** Dissertação de mestrado, Departamento de Pós Graduação em Química, Universidade Federal de Santa Maria, 2008.

CUNHA, L. C.; AZEREDO, F. S.; GUIMARÃES, R. I.; PAULA, J. R. Análise e avaliação crítica da incidência de fármacos anorexígenos sintéticos em “produtos naturais” para o emagrecimento em Goiânia-GO. **Revista Brasileira de Toxicologia**, v. 15, n. 2, p. 69-73, 2002.

DEWALD, T.; KHAODHIAR, L.; DONAHUE, M. P.; BLACKBURN, G. Pharmacological and surgical treatments for obesity. **American Heart Journal**, v. 151, n. 3, p. 604-624, 2006.

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

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

FRASER, D. B.; WEN, K. -C. Chinese herbal medicines – Manufacturing flaws and misuse. **Forensic Science Review**, v 10, n. 67, p. 68-80, 1998.

GERSHWIN, M. E.; BORCHERS, A. T.; KEEN, C. L.; HENDLER, S.; HAGIE, F.; GREENWOOD, M. R. C. Public safety and dietary supplementation. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1190, p. 104-117, 2010.

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

JUNIOR, V. F. V.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: cura segura? **Química Nova**, v.28, n. 3, p. 519-528, 2005.

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

KIM, S. H.; LEE, J.; YOON, T.; CHOI, J.; KIM, D.; KNOW, S. W. Simultaneous determination of anti-diabetes/anti-obesity drugs by LC/PDA, and targeted analysis of sibutramine analog in dietary supplements by LC/MS/MS. **Biomedical Chromatography**, v. 23, n. 12, p. 1259-1265, 2009.

KU, Y-R.; TSAI, M-J.; LIN, J-H; WEN, K-C.; Micellar electrokinetic capillary chromatography of clobenzorex HCl and diazepam adulterated in anorexiant traditional Chinese medicine. **Chinese Pharmaceutical Journal**, v. 48, n. 2, p. 157-165, 1996.

KU, T.-R.; TSAI, M.-J.; WEN, K.-C. Screening Chemical Drugs Used to Adulterate in Rheumatic and Analgesic Traditional Chinese Medicine by HPLC-DAD. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 3, n. 1, p. 51-56, 1995.

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.

KUBÁŇ, 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.

LEE, J.-W.; TEO, I.-H. Integrated pulsed amperometry for the analysis of organic compounds. **Microchemical Journal**, n. 70, p. 173-177, 2001.

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.

LIU, S.-Y.; WOO, S.-O.; KOW, H.-L. HPLC and GC-MS screening of Chinese proprietary medicine for undeclared therapeutic substances. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 24, p. 983-992, 2001.

MANCINI, M. C.; HALPERN, A. Pharmacological treatment of obesity. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 50, n. 2, p. 377-389, 2006.

MALDANER, L.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. Fases estacionárias modernas para cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa. **Química Nova**, v. 33, n. 7, p. 1559-1568, 2010.

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.

MORALES-OLIVAS, F. J. Papel actual de los diuréticos en el tratamiento de la hipertensión arterial. **Hipertensión**, v. 25, n. 5, p. 198-204, 2008.

PIETTE, V.; PARMENTIER, F. Analysis of illicit amphetamine seizures by capillary zone electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v. 979, p. 345-352, 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.

RIVM Report 370030002/2009. Trends in drug substances detected in illegal weight-loss medicines and dietary supplements. A 2002-2007 survey and health risk analysis. Disponível em: <http://rivm.nl/bilbiotheek/rapporten/370030002.pdf>. Acesso em 16 mai. 2011.

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. **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. Detecção eletroquímica em eletroforese capilar. **Química Nova**, v. 26, n. 1, p. 56-64, 2003.

SILVA, P. **Farmacologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

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 'guarana' based phytopharmaceuticals. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 36, p. 989-994, 2005.

SNYMAN, T.; STEWART, M. J.; GROVE, A.; STEENKAMP, V. Adulteration of South African Traditional Herbal Remedies. **Therapeutic Drug Monitoring**, v. 27, n. 1, p. 86-89, 2005.

STAHLBERG, J. Retention models for ions in chromatography. **Journal of Chromatography A**, n. 855, p. 3-55, 1999.

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.

TONHI, E.; COLLINS, K. E.; JARDIM, I. C. S. F.; COLLINS, C. H. Fases estacionárias para cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE-FR) baseadas em superfícies de óxidos inorgânicos funcionalizados. **Química Nova**, v. 25, n. 4, p. 616-623, 2002.

TROJANOWICZ, M. Recent developments in electrochemical flow detections—A review Part II. Liquid chromatography. **Analytica Chimica Acta**, v. 638, p. 8-35, 2011.

TSENG, M.-C.; TSAI, M.-J.; WEN, K.-C. Quantitative analysis of acetaminophen, ethoxybenzamide, piroxicam, hydrochlorothiazide, caffeine, chlorzoxazone and nicotinamide illegally adulterated in Chinese medicinal pills. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 4, n. 1, p. 54-56, 1996.

WANG, C.; XU, J.; ZHOU, G.; QU, Q.; YANG, G.; HU, X. Electrochemical Detection Coupled with High-Performance Liquid Chromatography in Pharmaceutical and Biomedical Analysis: A Mini Review. **Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening**, v. 10, p. 547-554, 2007.

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.

WANG, Y.; ZHANG, W.-T.; LI, S.-T.; LI, T.; SUN, C.-J. Simultaneous determination of five illegal drugs in weight control foods with solid phase extraction-high performance liquid chromatography. **Journal of Sichuan University**, v. 41, n. 5, p. 873-876, 2010.

WHO, World Health Organization. Disponível em: http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2012/world_health_statistics_20120516/en/index.html. Acessado em: 02 Junho 2012.