

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

**IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE FÁRMACOS
HIPOGLICEMIANTE EM FORMULAÇÕES
FARMACÊUTICAS DE BASE VEGETAL USADAS NO
TRATAMENTO DO *Diabetes Mellitus*: VALIDAÇÃO DE UMA
METODOLOGIA ANALÍTICA**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Mariana Rocha Bortoluzzi

Santa Maria, RS, Brasil

2014

**IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE FÁRMACOS
HIPOGLICEMIANTE EM FORMULAÇÕES
FARMACÊUTICAS DE BASE VEGETAL USADAS NO
TRATAMENTO DO *Diabetes Mellitus*: VALIDAÇÃO DE UMA
METODOLOGIA ANALÍTICA**

Mariana Rocha Bortoluzzi

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

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Clarice Madalena Bueno Rolim
Co-orientador: Prof. Dr. Leandro Machado de Carvalho

Santa Maria, RS, Brasil

2014

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Bortoluzzi, Mariana Rocha
Identificação e quantificação de fármacos
hipoglicemiantes em formulações farmacêuticas de base
vegetal usadas no tratamento do Diabetes Mellitus:
validação de uma metodologia analítica. / Mariana Rocha
Bortoluzzi.-2014.
69 p. ; 30cm

Orientadora: Clarice Madalena Bueno Rolim
Coorientadora: Leandro Machado de Carvalho
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-
Graduação em Ciências Farmacêuticas, RS, 2014

1. Cromatografia 2. Hipoglicêmicos 3. Adulterantes
4. Diabetes Mellitus 5. Plantas medicinais I. Rolim,
Clarice Madalena Bueno II. Carvalho, Leandro Machado de
III. Título.

© 2014

Todos os direitos autorais reservados a Mariana Rocha Bortoluzzi. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser feita mediante a citação da fonte.

E-mail: marianarbotoluzzi@gmail.com

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

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

**IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE FÁRMACOS
HIPOGLICEMIANTE EM FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS DE
BASE VEGETAL USADAS NO TRATAMENTO DO *Diabetes Mellitus*:
VALIDAÇÃO DE UMA METODOLOGIA ANALÍTICA**

elaborada por
Mariana Rocha Bortoluzzi

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

COMISSÃO EXAMINADORA:

Profa. Dr. Clarice Madalena Bueno Rolim
(Presidente/Orientadora)

Prof. Dr. Leandro Machado de Carvalho
(Co-orientador)

Carine Viana Silva, Dra. (UFSM)

Cristiane Luchese, Dra. (UFPel)

Santa Maria, 23 de junho de 2014.

Dedico este trabalho aos meus pais, Paulo e Marga, e à minha vó Genita pelo amor incondicional, esforço e dedicação na minha educação desde o princípio, ao meu marido Guilherme, pois é juntos que traçamos o nosso futuro em busca da nossa felicidade.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pela vida, proteção, discernimento e orientação concedidos em todos os momentos.

Aos meus professores, Professora Clarice Madalena Bueno Rolim e, especialmente, ao Professor Leandro Machado de Carvalho pelo acolhimento, confiança, orientação e oportunidade. A todos os professores da Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, mas em especial às Professoras Andrea Adams e Carine Vianna que sempre se mostraram dispostas a me ajudar.

Agradeço também a minha família, à minha mãe Marga, ao meu pai Paulo, à minha irmã Fernanda e à minha vó Genita Bortoluzzi, pelo apoio, orientação e amor incondicional, ao meu cunhado André Pazzinato pela orientação, incentivo e força, à família do meu esposo pelo incentivo, torcida e apoio. Ao meu amigo, marido, amor e companheiro em todos os momentos Guilherme Marin, pelos incentivos tantos, pela compreensão, pela força, pela paciência, pela presença. Devo também as minhas honras às minhas amigas de toda hora, sempre juntas, me apoiando em tudo, Diana, Valéria, Marlise, Carolina, Patrícia e Márcia, amigadas que aqui fiz e quero levar pra sempre comigo, colegas e amigos do LACHEM, em especial à Gabriela, Géssica e Fernanda Lima, muito obrigada por tudo. À minha aluna de iniciação científica, Juliana Mozzaquatro, sempre muito dedicada, obrigada pelos ensinamentos que dividimos, pela amizade e companheirismo. À minha colega de pós e amiga Viviane Deuschle, pela ajuda, apoio e força em todos os momentos.

Amigos de perto, e de tão longe, amigos de todos os dias, e outros nem tanto, o que seria de nós sem eles?! Como diria o velho ditado “quem tem amigos tem tudo”, pois eu descobri que tenho muitos amigos e eu não sei como conseguiria concluir sem o apoio deles. Muito obrigada pela força Andressa Dias, Lisiane Luchese, Maria Anita Tarragó, Michaela Trindade, Tharise Naidon e outros tantos de muitas outras querências, que muitas vezes até sem querer, souberam me dizer aquela palavra que precisava ouvir e que me deu tanta motivação, especialmente nos últimos dias.

À amiga e tutora Cristiane Luchese, muito obrigada pela disposição, força e amizade.

À Universidade Federal de Santa Maria pela vaga no curso de mestrado.

"Desistir... eu já pensei seriamente nisso, mas nunca me levei realmente a sério, é que tem mais chão nos meus olhos do que cansaço nas minhas pernas, mais esperança nos meus passos do que tristeza nos meus ombros, mais estrada no meu coração do que medo na minha cabeça."

(Cora Coralina)

RESUMO

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

IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE FÁRMACOS HIPOGLICEMIANTES EM FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS DE BASE VEGETAL USADAS NO TRATAMENTO DO *Diabetes Mellitus*: VALIDAÇÃO DE UMA METODOLOGIA ANALÍTICA

AUTORA: MARIANA ROCHA BORTOLUZZI
ORIENTADORA: CLARICE MADALENA BUENO ROLIM
Local e Data da Defesa: Santa Maria, 23 de Junho de 2014.

Diabetes Mellitus (tipo II) é considerada uma doença em ascensão no mundo inteiro. No Brasil, o índice de diabéticos cresceu 40% em seis anos. O uso de plantas medicinais no tratamento desta patologia crônica tem grande relevância, por parecer inofensivo e ser de fácil acesso à população. A literatura destaca que é possível encontrar a presença de fármacos em formulações fitoterápicas utilizadas no tratamento do diabetes, podendo trazer consequências graves, como acidose metabólica e hipoglicemia grave. Na última década a Anvisa tem intensificado a fiscalização e a preocupação com o mercado de fitoterápicos no Brasil. Para tanto, se torna grande a procura por metodologias capazes de detectar fármacos hipoglicemiantes adicionados de forma ilegal em formulações de base vegetal utilizadas no tratamento do *Diabetes Mellitus* (tipo II). Neste sentido no presente trabalho foi desenvolvido e validado um método por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detecção ultravioleta (HPLC-UV) para determinação de adulterantes hipoglicemiantes. Foram definidas as seguintes condições: fase móvel ácido fosfórico 0,1% (pH 2,0) (90% a 0%) acetonitrila (10% a 100%); coluna C₁₈; 230 nm; e fluxo de 0,5 mL. min⁻¹ a 0,9 mL. min⁻¹, com menos de 20 minutos de análise. Outro método, através de Cromatografia Capilar de Eletrocinética Micelar (MEKC-UV) foi utilizado para análise destes hipoglicemiantes, porém não se obteve resultados aceitáveis. O método por HPLC-UV mostrou-se adequado para a determinação simultânea dos fármacos metformina, glipizida, clorpropamida, glicazida, glibenclamida e glimepirida, visto que apresentou baixos limites de detecção e quantificação, além de mostrar-se específico, preciso, exato e linear ($p < 0,01$), dentro do intervalo testado (2,5 – 15 mg. L⁻¹). Após a validação, o método HPLC-UV foi aplicado na análise de vinte amostras adquiridas no mercado nacional, dentre estas não foram detectados a presença dos adulterantes pesquisados.

Palavras-chave: Cromatografia. Eletroforese capilar. Hipoglicêmicos. Adulterantes. *Diabetes Mellitus*. Plantas medicinais. Formulações farmacêuticas.

ABSTRACT

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

IDENTIFICATION AND QUANTIFICATION OF HYPOGLYCEMIC DRUGS IN PHARMACEUTICAL PLANT FORMULATIONS USED TO TREATMENT OF DIABETES MELLITUS: VALIDATION OF ANALYTICAL METHODOLOGY

AUTHOR: MARIANA ROCHA BORTOLUZZI

ADVISOR: CLARICE MADALENA BUENO ROLIM

Place and Date of the defense: Santa Maria, June 23th, 2014

Diabetes Mellitus is considered a disease in ascension worldwide. In Brazil, the rate of diabetes increased by 40% in the last six years. The use of medicinal plants in the treatment of diabetes has great relevance, as a chronic treatment, by seem harmless and be easily accessible for the population. The literature highlights the presence of drugs in herbal formulations used in the treatment of diabetes, which can lead to serious consequences such as metabolic acidosis and severe hypoglycemia. In the last decade, the ANVISA has intensified the control and concern with the market for herbal medicines in Brazil. As a consequence, it is demanded the development of methodologies for detection of the hypoglycemic drugs added as contaminants in vegetable-based formulations used in the treatment of diabetes. In this sense the present study developed and validated a method by high performance liquid chromatography with ultraviolet detection for determination of some hypoglycemic adulterants. Mobile phase was composed of 0.1% phosphoric acid (pH 2.0) (90%:0%) and acetonitrile (10%:100%) The following conditions were defined; column C18; 230 nm; and flow rate of 0.5 mL. min⁻¹ to 0.9 ml. min⁻¹, 20 minutes of analysis. Another method based on capillary electrophoresis, MEKC–UV, was tested to analyse the same hypoglycemic agents. However, the conditions studied did not present acceptable results. The method based on HPLC–UV proved to be suitable for the simultaneous determination of metformin, glipizide, chlorpropamide, gliclazide, glibenclamide and glimepirida and it showed low limits of detection and quantification, besides to be specific, precise, exact and linear ($p < 0.01$), within the determined range (2.5 - 15mg L⁻¹). After validation, the HPLC–UV method was applied in the analysis of twenty samples acquired in the national market. Among the samples analyzed were not detected the presence of adulterants validated in this work.

Keywords: Chromatography. Capillary electrophoresis. Hypoglycemic. Adulterants. *Diabetes Mellitus*. Herbal dosage.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Eletroferograma dos adulterantes (100 mg. L⁻¹) (a) metformina, (b) glipizida, (c) clorpropamida, (d) gliclazida, (e) glibenclamida e (f) glimepirida. Condições: eletrólito borato 20mM contendo SDS 100mM e ACN 1% em pH 11,0; potencial de separação -15000V; capilar de sílica fundida 75 µm x 360 µm x 70 cm (48 cm até o detector); detecção UV em 230 nm, temperatura 25°C, injeção hidrodinâmica por gravidade de 20 cm durante 120s. 42
- Figura 2 – Estudo da absorção de radiações UV pelos adulterantes estudados em metanol na faixa de 200 a 400 nm. Adulterantes: clorpropamida, glimepirida, glibenclamida, glipizida, gliclazida e metformina (10mg. L⁻¹ em metanol), Fase móvel acetonitrila e ácido fosfórico 0,1%. 44
- Figura 3 – Cromatograma dos cinco adulterantes (10 mg. L⁻¹). Condições: fase móvel ácido fosfórico 0,1% (pH 2,0) (60:40) metanol; coluna C₁₈; 230 nm; e fluxo de 1 mL. min⁻¹. 45
- Figura 4 – Cromatograma dos cinco adulterantes (c) clorpropamida, (d) gliclazida, (e) glibenclamida, (f) glimepirida (7,5 mg. L⁻¹). Condições: fase móvel – gradiente linear em 20 min de análise: ácido fosfórico 0,1% (pH 2,0) (70 – 0%) e acetonitrila (30 - 100%); coluna C₁₈; 230 nm; e fluxo de 1 mL. min⁻¹ 45
- Figura 5 – Cromatograma dos cinco adulterantes (c) clorpropamida, (d) gliclazida, (e) glibenclamida, (f) glimepirida, metformina sem identificação (7,5 mg. L⁻¹). Condições: fase móvel - gradiente linear em 20 min de análise: ácido fosfórico 0,1% (pH 2,0) (65 – 0%), acetonitrila (30 – 100%), metanol (5% -até 4 min, 5 – 0%- até 8 min); coluna C₁₈; 230 nm; e fluxo de 1 mL. min⁻¹. 46
- Figura 6 – Ilustração do gradiente linear seguido pela concentração dos eluentes e a vazão durante a análise. 47
- Figura 7 – Cromatograma dos adulterantes (15 mg. L⁻¹) (a) metformina, (b) glipizida, (c) clorpropamida, (d) gliclazida, (e) glibenclamida e (f) glimepirida. Condições: fase móvel ácido fosfórico 0,1% (pH 2,0) (90-0%) acetonitrila (10-100%); coluna C₁₈; 230 nm; e fluxo de 0,5 mL. min⁻¹ a 0,9 mL. min⁻¹. 48
- Figura 8 – Cromatograma **amostra 02**. Composição: Alcachofra (*Cynara scolymus*) 400mg. Cromatograma **padrões** (a) metformina, (b) glipizida, (c) clorpropamida, (d) gliclazida, (e) glibenclamida e (f) glimepirida (15 mg. L⁻¹). Condições: fase móvel ácido fosfórico 0,1% (pH 2,0) (90-0%) acetonitrila (10-100%); coluna C₁₈; 230 nm; e fluxo de 0,5 mL. min⁻¹ a 0,9 mL. min⁻¹. 49
- Figura 9 – Cromatograma **amostra 10**. Composição: Pata de vaca (*Bauhinia forficata*) 500mg. Cromatograma **padrões** (a) metformina, (b) glipizida, (c) clorpropamida, (d) gliclazida, (e) glibenclamida e (f) glimepirida (15 mg. L⁻¹). Condições: fase móvel ácido fosfórico 0,1% (pH 2,0) (90-0%) acetonitrila (10-100%); coluna C₁₈; 230 nm; e fluxo de 0,5 mL. min⁻¹ a 0,9 mL. min⁻¹. 50

Figura 10 – Cromatograma da **amostra 03**. Composição: Pata de vaca (*Bauhinia forficata*), Jambolão (*Syzygium jambolanum*), Pedra ume caá (*Myrcia sphaerocarpa*). Cromatograma **padrões** (a) metformina, (b) glipizida, (c) clorpropamida, (d) gliclazida, (e) glibenclamida e (f) glimepirida (15 mg. L⁻¹). Condições: fase móvel ácido fosfórico 0,1% (pH 2,0) (90-0%) acetonitrila (10-100%); coluna C₁₈; 230 nm; e fluxo de 0,5 mL. min⁻¹ a 0,9 mL. min⁻¹. 50

Figura 11 – Cromatograma **amostra 19**. Composição: *Gymnema sylvestre*. Cromatograma **padrões** (a) metformina, (b) glipizida, (c) clorpropamida, (d) gliclazida, (e) glibenclamida e (f) glimepirida (15 mg. L⁻¹). Condições: fase móvel ácido fosfórico 0,1% (pH 2,0) (90-0%) acetonitrila (10-100%); coluna C₁₈; 230 nm; e fluxo de 0,5 mL. min⁻¹ a 0,9 mL. min⁻¹. 51

Figura 12 – Cromatograma da amostra 06. Composição: alcachofra (*Cynara scolymus*), carqueja (*Baccharis trimera*) e pata de vaca (*Bauhinia sp.*). Condições: fase móvel ácido fosfórico 0,1% (pH 2,0) (90-0%) acetonitrila (10-100%); coluna C₁₈; 230 nm; e fluxo de 0,5 mL. min⁻¹ a 0,9 mL. min⁻¹. 57

Figura 13 – Cromatograma da amostra 06 com adição de padrão. Composição: alcachofra (*Cynara scolymus*), carqueja (*Baccharis trimera*) e pata de vaca (*Bauhinia sp.*) (a) metformina, (b) glipizida, (c) clorpropamida, (d) gliclazida, (e) glibenclamida e (f) glimepirida (15 mg. L⁻¹). Condições: fase móvel ácido fosfórico 0,1% (pH 2,0) (90-0%) acetonitrila (10-100%); coluna C₁₈; 230 nm; e fluxo de 0,5 mL. min⁻¹ a 0,9 mL. min⁻¹. 57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Fármacos hipoglicêmicos encontrados como adulterantes em formulações de base vegetal.	23
Tabela 2 – Descrição dos reagentes e padrões utilizados no desenvolvimento deste estudo.	30
Tabela 3 – Hipoglicemiantes que serão pesquisados, como suas respectivas solubilidades, estruturas e pKa's.	31
Tabela 4 – Modo de preparo das soluções para a avaliação da linearidade e precisão do método por HPLC-DAD.	34
Tabela 5 – Modo de preparo das soluções para a avaliação da exatidão do método por HPLC-DAD.	36
Tabela 6 – Composição e origem das 20 amostras analisadas.	38
Tabela 7 – Condições otimizadas para o método analítico por HPLC-DAD.	47
Tabela 8 – Parâmetros de regressão, resultados da análise de variância e apresentação dos limites de quantificação e detecção para quantificação de metformina, glibenclamida, gliclazida, clorpropamida, glipizida e glimepirida por HPLC-DAD.	53
Tabela 9 – Ensaio de recuperação em produtos farmacêuticos e suplementos alimentares de base vegetal. Resultados obtidos por HPLC-DAD.	55

LISTA DE SIGLAS E ABREVIACOES

ANVISA	– Agência Nacional de Vigilância Sanitária
C⁴D	– Detecção por condutividade sem contato
CE	– <i>Capillary electrophoresis</i>
CV	– Coeficiente de Variação
CMD	– Concentração Média Determinada
DAD	– <i>Diode-Array Detection</i>
DM	– <i>Diabetes Mellitus</i>
DMT1	– <i>Diabetes Mellitus</i> tipo 1
DMT2	– <i>Diabetes Mellitus</i> tipo 2
DMG	– <i>Diabetes Mellitus</i> Gestacional
DOU	– Diário Oficial da União
DP	– Desvio Padrão
DPR	– Desvio Padrão Relativo
EOF	– <i>Electroosmotic flow</i>
HDL	– <i>High Density Lipoprotein</i>
HPLC	– <i>High Performance Liquide Chromatography</i>
HPLC-DAD	– <i>High Performance Liquide Chromatography- Diode-Array Detection</i>
ICH	– <i>International Conference on Harmonisation</i>
LD	– Limite de Detecção
LQ	– Limite de Quantificação
LC-MS-MS	– <i>Liquide Chromatography- Mass Spectrometry- Mass Spectrometry</i>
MEKC	– <i>Micellar Electrokinetic Chromatography</i>
MEKC-UV	– <i>Micellar Electrokinetic Chromatography-Ultraviolet</i>
ODS	– Octilssulfato de sdio
OMS	– Organizao Mundial da Saúde
RP	– <i>Reverse Phase</i>
SDS	– Dodecilssulfato de sdio
UPLC-MS/MS	– <i>Ultra Performance Liquid Chromatography- Mass Spectrometry/ Mass Spectrometry</i>
USP	– <i>United States Pharmacopeia</i>
UV	– Ultravioleta

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 OBJETIVOS	17
2.1 Objetivo Geral.....	17
2.2 Objetivos Específicos	17
3 REVISÃO DE LITERATURA	18
3.1 Diabetes Mellitus.....	18
3.2 Tratamento do DMT2	19
3.3 Tratamento à base de plantas medicinais.....	20
3.4 A adulteração de Produtos Naturais	22
3.5 Métodos analíticos para detecção de adulteração de Produtos Naturais	24
3.6 Validação de métodos analíticos	26
4 MATERIAS E MÉTODOS	28
4.1 Materiais	28
4.1.1 Equipamentos.....	28
4.1.2 Reagentes e soluções.....	28
4.2 Metodologia analítica	30
4.2.1 Desenvolvimento de metodologia analítica	30
4.2.1.1 CE	32
4.2.1.2 HPLC	32
4.2.1.3 Validação de método analítico por HPLC-DAD	33
4.2.1.3.1 Especificidade	33
4.2.1.3.2 Linearidade	34
4.2.1.3.3 Precisão	34
4.2.1.3.4 Exatidão	35
4.2.1.3.5 LQ e LD	36
4.3 Aplicação do método desenvolvido.....	36
4.3.1 Amostragem.....	37
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
5.1 Desenvolvimento e método analítico por MEKC-UV	39
5.1.1 Testes com ciclodextrina.....	40
5.1.2 Testes com SDS	40
5.1.3 Testes com ureia	40

5.1.4 Testes com solventes orgânicos	41
5.2 Desenvolvimento de método analítico por HPLC-DAD para fármacos hipoglicemiantes sintéticos como adulterantes.....	43
5.2.1 Escolha do método de análise	43
5.2.2 Estudos de otimização do método	43
5.3 Validação de método analítico por HPLC-DAD para fármacos hipoglicemiantes sintéticos como adulterantes	48
5.3.1 Especificidade	48
5.3.2 Linearidade	51
5.3.3 LD e LQ	52
5.3.4 Precisão	54
5.3.5 Exatidão	54
5.4 Aplicação analítica	56
6 HPLC-DAD e MEKC-UV uma análise comparativa	58
7 CONCLUSÕES	60
REFERÊNCIAS	61

1 INTRODUÇÃO

Diabetes Mellitus (DM) é considerada uma epidemia no mundo inteiro e continua em expansão. Segundo o *International Working Group on the Diabetic Foot*, em 2011 8,3 % da população mundial estava com diabetes, o que corresponde a 366 milhões de pessoas, sendo que cerca de 80% destas pessoas vivem em países desenvolvidos. Estima-se que em 2030, 552 milhões de pessoas adultas estejam acometidas. Infelizmente, o número de jovens com diabetes tem elevado em todo o mundo. Isto ocorre devido ao crescimento e ao envelhecimento populacional, à maior urbanização, a crescente prevalência de obesidade e sedentarismo, bem como à maior sobrevida do paciente com DM (WILD et al., 2004; SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2009).

Esta doença metabólica é caracterizada por alta concentração de glicose na circulação sanguínea, podendo ser do tipo I (pacientes insulino dependentes), do tipo II (pacientes insulino resistentes) e gestacional (LAMEIRA; PINTO, 2008; RANGE; DALE, 2008). O tratamento do diabetes se baseia na diminuição dos níveis de glicose no sangue e pode ser dado tanto pelo uso de insulina, quando caracterizado diabetes tipo I, quanto pela prática de exercícios físicos e dieta balanceada, quando caracterizado do tipo II. Contudo, o tratamento do diabetes tipo II costuma ser bastante dificultoso, devido à vida sedentária e má alimentação relacionada. Assim, o uso de medicamentos hipoglicemiantes costuma ser mais efetivo, provocando concomitantemente muitas reações adversas (FOWLER, 2007; RANGE; DALE, 2008; CHAWLA et al., 2013).

O uso de plantas medicinais no tratamento da diabetes tem grande relevância, por parecer inofensivo, e ser de fácil acesso à população (ALMEIDA; RIBEIRO; POLESE, 2000; SOMBRA et al., 2005; ALVES, 2007). As questões referentes à segurança do uso de fitoterápicos ainda são muito obscuras, devido à alta complexidade de sua composição química e potencial tóxico de seus constituintes. Além disso, a literatura destaca que é possível encontrar contaminantes como metais pesados, resíduos de pesticidas, provenientes do cultivo do solo e ainda, a presença de adulterantes, como fármacos sintéticos, podendo ocorrer interação deles com os constituintes da própria planta (BOGUSZ et al., 2006; CARVALHO et al., 2011). A adulteração com hipoglicemiantes sintéticos possibilitaria, em algumas vezes, um efeito inesperadamente rápido da ação terapêutica do fitoterápico, e

consequentemente, uma maior adesão ao tratamento, aumentando as vendas e ascendendo os lucros das indústrias afins.

Nas últimas décadas esta prática está cada vez mais frequente e vem preocupando a Organização Mundial da Saúde (OMS). A adulteração com hipoglicemiantes sintéticos viola o conceito de fitoterápico e pode trazer consequências como acidose metabólica e hipoglicemia grave, principalmente quando seu uso é associado com formulações farmacêuticas de base vegetal, o que geralmente ocorre (CARVALHO; DINIZ e MUKHERJEE, 2005; RANG et al., 2007; SILVA, 2010).

Tendo em vista a carência de métodos analíticos seletivos, que possam identificar e quantificar fármacos sintéticos em formulações vegetais, tem se intensificado a procura por metodologias capazes de detectar fármacos nestas amostras complexas, a fim de conseguir controlar este tipo de prática ilegal. Métodos de separação analítica como cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e eletroforese capilar (CE), estão bem inseridos neste contexto, visto que são métodos analíticos de grande eficiência na separação de misturas complexas (CARVALHO et al., 2011).

Metformina, glipizida, clorpropamida, gliclazida, glibenclamida e glimepirida são os fármacos mais comumente citados como adulterantes em formulações farmacêuticas de base vegetal. Assim, neste trabalho foram investigados métodos de separação por HPLC-DAD e MEKC-UV, com o propósito de determinar a presença destes fármacos em formulações comercializadas para o tratamento alternativo do diabetes no mercado brasileiro.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Desenvolver e validar métodos analíticos por HPLC-DAD e MEKC-UV para identificar e quantificar fármacos hipoglicêmicos adicionados às formulações farmacêuticas de base vegetal utilizadas no tratamento do DM comercializados no Brasil.

2.2 Objetivos específicos

- Desenvolver e validar um método analítico por MEKC-UV para determinação de fármacos hipoglicemiantes (glipizida, glibenclamida, glimepirida, metformina e clorpropamida) em formulações vegetais utilizadas no tratamento do DM;
- Desenvolver e validar um método analítico por HPLC-DAD para determinação de fármacos hipoglicemiantes (glipizida, glibenclamida, glimepirida, metformina e clorpropamida) em formulações vegetais utilizadas no tratamento do diabetes;
- Aplicar os métodos desenvolvidos na detecção destes fármacos hipoglicemiantes como adulterantes em formulações de base vegetal na forma de cápsulas, comercializados no Brasil e utilizados no controle da hiperglicemia.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 *Diabetes Mellitus*

É uma doença metabólica caracterizada por níveis séricos de glicose em jejum superiores a 126 mg/dL (LAMEIRA e PINTO, 2008; RANG e DALE, 2008), além disso a OMS mostra que é preciso mais ensaios, como testes de intolerância a glicose e doseamento da hemoglobina glicada para se concluir o diagnóstico desta patologia.

O DM pode se apresentar como sendo do tipo I (DMT1), tipo II (DMT2) ou gestacional (DMG). O DMT1, ou juvenil, é caracterizado pela falta de insulina, isto ocorre, quando as células β do pâncreas não produzem insulina suficiente para a metabolização da glicose disponível, que pode ser decorrente da destruição auto-imune destas células. Já o DMT2, ou ‘da maturidade’, é ocasionada pela resistência à insulina em alguns órgãos, principalmente no fígado, no músculo esquelético e nos adipócitos, fazendo com que o corpo não consiga utilizar efetivamente a insulina produzida (RANG e DALE, 2008). O DMG é definido como intolerância à glicose de graus variáveis com início ou primeiro diagnóstico durante o segundo ou terceiro trimestres da gestação (MAGANHA et al., 2003).

A prevalência do DMT2 vem aumentando nos países em desenvolvimento nas últimas décadas. Segundo a OMS, a população mundial de diabéticos é de 347 milhões, sendo que 4,8 milhões de pessoas foram a óbito devido ao diabetes em 2012. No Brasil, o índice de diabéticos cresceu 40% em seis anos no Brasil, passando de 5,3% em 2006, para 7,4% da população em 2012 (WHO, 2013). Apesar de o tratamento ser eficiente, o diabetes continua sendo a terceira causa principal de morte por doença, a segunda causa principal de cegueira e também a segunda causa principal de insuficiência renal (INTERNATIONAL WORKING GROUP ON THE DIABETIC FOOT, 2011).

Ao longo de 30 anos o estilo de vida sedentária e a má alimentação têm aumentado a nível mundial, isto tem refletido em problemas de saúde e agravamento de síndromes metabólicas, como o diabetes tipo II (LE MOS et al., 2012). A obesidade, especialmente a obesidade central ou abdominal, está associada com a resistência à insulina, desempenhando um papel importante no desenvolvimento e no prognóstico desta patologia. O acúmulo de

ácidos graxos livres em tecidos sensíveis à insulina contribui com um stress oxidativo, alterando a sinalização da mesma (GREENFIELD e CAMPBELL, 2004).

O DMT2 frequentemente coexiste com um conjunto de outros fatores de risco cardiovasculares e seus metabólicos, incluindo obesidade abdominal, baixas concentrações de colesterol HDL (High Density Lipoprotein), concentração de triglicerídeos e de pressão arterial elevada. Somado a isto, pessoas acometidas por diabetes muitas vezes têm mais dificuldade em perder peso e o seu ganho também pode estar associado com os medicamentos hipoglicemiantes, sendo de fundamental importância no tratamento dos fatores de risco cardiovasculares e seus metabólitos na gestão do DMT2 (SCHEEN et al., 2006).

Estudos têm mostrado que elevadas concentrações extra e intracelulares de glicose resultam em estresse oxidativo e contribuem para o desenvolvimento e progressão do DMT2, estando também vinculadas às complicações, como doenças cardiovasculares, relacionadas ao DMT2 (HEITZER et al., 2001; CERIELLO et al., 2002; CERIELLO, 2003; ZHANG et al., 2003; NIEDOWICZ e DALEKE, 2005; FRIDLYAND e PHILIPSON, 2006; MONNIER et al., 2006; CERIELLO et al., 2008; PITOCCO et al., 2009; SAYED; IMAN e DAWLAT, 2011; LEMOS et al., 2012)

3.2 Tratamento do DMT2

O tratamento do DMT2 tem como base fundamental uma dieta balanceada e a prática de exercícios físicos (CRAIG e STITZEL, 2005; LEMOS et al., 2012). O exercício físico regular melhora o estado metabólico e de sensibilidade à insulina, reduzindo o risco de doenças cardiovasculares. Além disso pode-se fazer o uso de insulina exógena ou fármacos hipoglicemiantes orais (CRAIG e STITZEL, 2005).

Medicamentos hipoglicemiantes orais, como as sulfoniluréias, representadas por: clorpropamida, glibenclamida, glimepirida, gliclazida e glipizida (SILVA, 2010), têm como principal efeito adverso a hipoglicemia, que pode ser grave e prolongada, o que acarretaria grandes danos, principalmente em idosos e em pacientes com insuficiência renal e hepática. Também podem ocorrer reações alérgicas, prurido, eritema, urticária, náuseas, vômitos e alterações hematológicas. Cabe ressaltar que estes fármacos são contra indicados na gravidez e no período de lactação (RANG et al., 2007, SILVA, 2010).

As biguanidas se fazem presentes com a metformina, cujos efeitos adversos mais comuns são anorexia, diarreia e náuseas, sempre correlacionados com a dose e nem sempre transitórios. O uso das biguanidas é contra indicado em pacientes com doença renal, hepática, pulmonar, hipóxia e insuficiência cardíaca ou choque, devido à predisposição a acidose láctica. (RANG et al., 2007; SILVA, 2010). A metformina não provoca a liberação de insulina, como as sulfoniluréias, seu mecanismo de ação baseia-se na diminuição da glicogenólise e gliconeogênese em até 75%, a sensibilização da insulina parece ser inversamente proporcional à diminuição de tais taxas, o que pode estar relacionado à ausência de efeitos hipoglicêmicos, mesmo em altas doses (FOWLER, 2007).

Em trabalho realizado por Hellmuth e colaboradores (2000), no qual se estudou comparativamente um grupo de gestantes tratadas com insulina, sulfoniluréias e metformina, verificou-se aumento significativo da mortalidade perinatal e incidência de pré-eclâmpsia. Entretanto, a utilização de sulfoniluréias como a glibenclamida e a glipizida, que são de uso comum, mudaram este panorama (LANGER et al., 2000). Diversas pesquisas laboratoriais demonstraram que a glibenclamida não atravessa a barreira placentária em quantidades significativas, diferentemente da metformina (LANGER et al., 2000; KOREN et al., 2001). O tratamento com hipoglicemiantes orais se torna de menor custo e com os mesmos riscos ao feto que o com insulina, porém a primeira opção para o controle da glicemia é sempre uma dieta equilibrada e a prática de exercícios físicos (GOETZL et al., 2002).

3.3 Tratamento à base de plantas medicinais

O uso de fármacos no tratamento do diabetes está provocando outras complicações, fazendo com que o paciente busque outras formas de tratamento (CHAWLA et al., 2013). O uso de plantas medicinais no tratamento de patologias crônicas tem se tornado uma prática comum no mundo todo. Este aumento expressivo está relacionado com a grande publicidade, o fácil acesso, o custo relativamente baixo e a fácil aquisição, pois pode ser comprado sem prescrição médica (TOLEDO et al., 2003, CARVALHO et al., 2011). Em muitos países subdesenvolvidos eles são muitas vezes o único recurso terapêutico por razões culturais e sociais e seu consumo é de domínio popular devido à grande vantagem econômica somada ao fato de ser um produto “natural” (ALVES, 2007).

De acordo com a OMS, entre 70 e 80% da população de países desenvolvidos, faz uso de pelo menos uma forma de medicina alternativa ou complementa. Em continentes em desenvolvimento como a Ásia e a África, aproximadamente 80% da população faz uso de formulações de base vegetal como única alternativa para o tratamento e prevenção de muitas doenças. Este uso excessivo de medicamentos a base de plantas, ou de origem natural, faz com que este mercado se torne altamente lucrativo (WHO, 2012).

O consumo de medicamentos de origem vegetal tem elevado na esfera mundial. A indústria de fitoterápicos movimenta 22 bilhões de dólares sendo o Brasil contemplado com 23% deste mercado. A Europa ocidental movimentou 5 bilhões de dólares nos anos de 2003 e 2004, a China produziu 14 bilhões de dólares em 2005, e, em 2007, o Brasil estava na marca de 160 milhões de dólares (WHO, 2012).

As principais formas de comercialização de medicamentos a base de plantas no Brasil são através da manipulação de compostos, medicamentos fitoterápicos industrializados, suplementos dietéticos industrializados, medicamentos tradicionais fitoterápicos e droga vegetal a granel (chá). A regulamentação e a comercialização de princípios ativos de origem vegetal são regidas por um conjunto de normas estabelecidas em cada país, no Brasil, o órgão responsável pela fiscalização é a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (BRASIL, 2010).

São considerados medicamentos fitoterápicos, de acordo com a Resolução nº 26 de 13 de maio de 2014, todos os medicamentos obtidos com o emprego exclusivo de matérias primas ativas vegetais, cuja segurança e eficácia sejam baseadas em evidências clínicas e que sejam caracterizados pela constância de sua qualidade. Já os produtos tradicionais fitoterápicos são os obtidos com emprego exclusivo de matérias-primas ativas vegetais cuja segurança e efetividade sejam baseadas em dados de uso seguro e efetivo publicados na literatura técnico-científica e que sejam concebidos para serem utilizados sem a vigilância de um médico para fins de diagnóstico, de prescrição ou de monitorização. Os produtos tradicionais fitoterápicos não podem se referir a doenças, distúrbios, condições ou ações consideradas graves, não podem conter matérias-primas em concentração de risco tóxico conhecido e não devem ser administrados pelas vias injetável e oftálmica (BRASIL, 2014).

Não se considera medicamento fitoterápico e produto tradicional fitoterápico aquele que inclui na sua composição substâncias ativas isoladas, sintéticas ou naturais, nem as associações dessas com extratos vegetais ou de outras fontes, como a animal (BRASIL, 2014).

Na última década a Anvisa tem intensificado a fiscalização e a preocupação com o mercado de fitoterápicos no Brasil. Em 2011, a publicação da RDC nº 60/2011 que traz um Formulário Nacional de Fitoterápicos, a qual integra a Farmacopéia Brasileira, e apresenta 83 monografias de medicamentos, foram definidos padrões para fabricação dos medicamentos (BRASIL, 2011). Além disso, a Diretoria Colegiada da Anvisa publicou no DOU (Diário Oficial da União) do dia 07 de agosto de 2013, em consulta pública, a qual sugere o envio de comentários e sugestões à Instrução Normativa que estabelece o Guia de orientação para registro de medicamentos fitoterápicos e registro e notificação de produtos tradicionais fitoterápicos (BRASIL, 2013).

Atualmente, está em vigor a RDC nº 26 de 13 de maio de 2014, que dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos e o registro e a notificação de produtos tradicionais e a RDC nº 67 de 08 de outubro de 2007, que dispõe sobre Boas Práticas de Manipulação de Preparações Magistrais e Oficiais para Uso Humano em farmácias.

Cabe ressaltar que as normas exigidas para os fitoterápicos são as mesmas exigidas para os medicamentos sintéticos. Para produtos importados, devem ser cumpridos os requisitos da RDC nº 26/2014 referentes à fabricação nacional e apresentar documentação complementar caso for solicitado (BRASIL, 2014). Assim, o objetivo desta resolução é garantir a segurança, eficácia e qualidade quando medicamentos fitoterápicos entram no mercado brasileiro, atualizando os procedimentos de registro desta classe de medicamentos no país.

3.4 Adulteração de Produtos Naturais

Nas três últimas décadas, foram reportados casos de adulteração nas formulações vegetais, que se refere à presença não declarada de fármacos sintéticos em formulação fitoterápica (HUANG et al., 1997; ALMEIDA, et al., 2000; SOMBRA, et al., 2005; HANEEF, et al., 2013). São muitas as classes de fármacos utilizadas para este fim, assim como: anorexígenos, benzodiazepínicos, antidepressivos, hipoglicêmicos, estimulantes, antiinflamatórios, analgésicos e laxantes (HUANG et al., 1997;ALMEIDA et al., 2000; ERNEST, 2002; KAM e LEW, 2002; KU et al., 2003; LIANG, 2005; SOMBRA et al., 2005). Esta prática caracteriza-se como um problema sério de saúde pública na sociedade moderna, devido ao crescimento abusivo no uso de formulações fitoterápicas (ALMEIDA et al., 2000),

o que pode acarretar em uma overdose, principalmente se o paciente faz uso concomitante de medicamentos convencionais para tratamento da patologia em questão (SILVEIRA et al., 2008). Em um estudo de caso foram identificadas entre os efeitos adversos mais comuns a hipoglicemia e a acidose láctica, podendo estas ser de grau leve, moderado ou grave (CHING et al., 2012).

São crescentes os relatos de casos de adulteração de formulações de base vegetal com fármacos hipoglicemiantes, conforme demonstrado na Tabela 1. Os fármacos mais citados como adulterantes nestas formulações são a glibenclamida, glimepirida, glipizida, gliclazida, clorpropamida e metformina. A fenformina, mesmo sendo retirada do mercado na década de 70, devido às complicações adversas que pode acarretar, também é bastante citada como adulterante neste tipo de formulação (KOH; WOO, 2000; CHIN LIN; HUEI LIN; CHING WEN, 2001).

Tabela 1 – Fármacos hipoglicêmicos encontrados como adulterantes em formulações de base vegetal.

Adulterantes	Referências
Glibenclamida	HUANG; WEN e HSIAO, 1997
Fenformina	KOH e WOO, 2000
Glibenclamida	BOGUSZ et al., 2002
Glibenclamida	ERNEST, 2002
Glibenclamida	KU et al., 2003
Glibenclamida	BOGUSZ et al., 2006
Glibenclamida	LIM et al., 2009
Glibenclamida, gliclazida, glipizida e metformina	CHEN et al., 2009
Gliclazida, glimepirida, fenformina, glibenclamida, rosiglitazona e metformina	PANG et al., 2009
Glibenclamida, glimepirida e rosiglitazona	WANG et al., 2009
Glibenclamida	LOW et al., 2009
Glibenclamida	PADINJAKARA et al., 2009
Clorpropamida, glibenclamida, gliclazida, glimepirida, glipizida, gliclazida, metformina, mitoglinida, nateglinida, fenformina, pioglitazona, repaglinida, rosiglitazona e tolbutamida	LI et al., 2010

Clorpropamida, glibenclamida, gliclazida, glimepirida, glipizida, gliquidona, metformina, mitiglinida, nateglinida, fenformina, pioglitazona, repaglinida, rosiglitazona e tolbutamida	CUI et al., 2010
Metformina	ZHOU et al., 2011
Glibenclamida, fenformina, metformina, rosiglitazona, gliclazida, glimepirida, nateglinida e repaglinida	CHING et al., 2012
Glibenclamida, metformina, glimepirida, rosiglitazona, fenformina, pioglitazona, gliclazida e repaglinida	FENG et al., 2014

Em estudo recente, realizado por Ching e colaboradores (2012), em Hong Kong, foram analisadas 29 amostras de formulações farmacêuticas vegetais, sendo que todas estavam adulteradas. Foram identificados 8 diferentes fármacos hipoglicêmicos em 22 destas amostras, glibenclamida foi a mais encontrada, seguida por fenformina, metformina e rosiglitazona, também foram identificadas gliclazida, glimepirida, nateglinida e repaglinida. Além disso, em 5 amostras foram encontrados fármacos de outras classes terapêuticas, como, hidroclorotiazida, aminofenazona, cimetidina, diclofenaco, domperidona, piroxicam, acetato de prednisolona e tadalafil. Duas das amostras analisadas foram adulteradas com fármacos sem ação hipoglicêmica.

Medicamentos fitoterápicos podem apresentar contaminação, não somente com fármacos utilizados na terapia convencional, mas com metais pesados e agrotóxicos vindos do próprio cultivo da planta (BOGUSZ et al, 2006).

3.5 Métodos analíticos para detecção de adulteração de Produtos Naturais

Devido a uma preocupação da OMS na unificação da qualidade de alguns medicamentos fitoterápicos em todo o mundo, buscam-se novas metodologias de análise a fim de detectar adulterantes específicos para cada tipo de formulação farmacêutica de base vegetal. Estes métodos de análise devem constatar qualitativamente e quantitativamente a presença de possíveis adulterantes na amostra. Os métodos de análise mais utilizados para a determinação de possíveis adulterantes em formulações fitoterápicas são a CE (CHEN et al.,

2000; KU et al., 2003; SOMBRA et al., 2005; CARVALHO et al, 2011) e a HPLC (ALMEIDA et al., 2000; LIU et al., 2000; LAU et al., 2003; SOMBRA et al., 2005; BOGUSZ et al., 2006; CARVALHO et al, 2011).

Métodos cromatográficos, como HPLC, são amplamente utilizados na detecção e quantificação de adulterantes em amostras complexas, devido a sua grande capacidade de separação, amplo espectro de separação analítica combinado à alta sensibilidade e seletividade na detecção de compostos orgânicos (CARVALHO et al, 2011).

As análises de misturas complexas são preferencialmente realizadas por cromatografia por fase reversa, do inglês, *Reverse Phase* (RP), devido à grande aplicabilidade em moléculas orgânicas parcialmente hidrofóbicas e reagirem mais facilmente à fase estacionária apolar, característica desta fase (VOGEL, 2000). Este tipo de método é muito versátil e aplicável, visto que com poucos solventes e poucas colunas, consegue-se separar uma ampla quantidade de misturas complexas (PASSIAGLI, 2009).

O método analítico CE é bastante utilizado na pesquisa por adulterantes por apresentar alta eficiência de separação, baixo tempo de análise e baixo consumo de solventes e amostra (CARVALHO et al., 2011). A principal vantagem deste método em relação a outros métodos cromatográficos em fase líquida é o fluxo, que é radial e não parabólico, por não ter origem em uma fonte de pressão, e sim por diferença de potencial, contribuindo para o não alargamento das bandas, conferindo maior especificidade ao método (TAVARES, 1997), o que o torna mais adequado quando se trata de misturas complexas.

O CE tem como princípio de separação a relação carga/massa das partículas, quanto maior a carga e menor o tamanho maior sua mobilidade (HARRIS, 2011). A Cromatografia de eletrocinética Micelar, do inglês, *Micellar Electrokinetic Chromatography* (MEKC) se tornam importantes quando o analito não é, ou é fracamente dissociável, pois moléculas neutras não são diferenciadas em solução livre, esta análise difere-se das demais devido à presença de micelas iônicas, que podem ser formadas a partir de surfactantes, o tempo de fixação fica de acordo com a estabilidade entre a molécula neutra, a micela e o eletrólito de trabalho, quanto maior esta estabilidade, maior é o tempo em que ela fica dentro da micela e maior é o tempo de corrida (HARRIS, 2011).

Existem alguns relatos de métodos analíticos para detecção de fármacos hipoglicêmicos em matrizes complexas. Em 1995, Núñez e colaboradores desenvolveram um método por eletroforese capilar para detecção da glipizida e glibenclamida, e outro para separação de tolbutamida, clorpropramida, acetoexamida e tolazamida, além disso, sugeriram um método para separação de glipizida e glibenclamida por HPLC com aplicação na urina. Já

um método por eletroforese capilar foi otimizado para a análise de metformina, fenformina e gliburida para análise de plasma humano (LAI e FENG, 2006).

Outro estudo relatou o método por MEKC, para a detecção e quantificação de quatro fármacos hipoglicêmicos: acetoexamida, clorpropramida, glibenclamida e tolbutamida como adulterantes em formulações vegetais (KU et al., 2003).

Pang e colaboradores (2009) reportam na literatura um novo método por LC-MS-MS, do inglês, *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry-Mass Spectrometry*, para 10 fármacos hipoglicemiantes em formulações vegetais (gliquidona, glipizida, gliclazida, glibenclamida, glimepirida, fenformina, metformina, tolbutamida, rosiglitazona e repaglinida).

Viana e colaboradores (2013) desenvolveram um método analítico por CE utilizando a condutividade sem contato (C⁴D) como método de detecção. Mais recentemente, um método por UPLC-MS/MS foi elaborado por Zhu e colaboradores (2014) para 20 fármacos antidiabéticos.

3.6 Validação de métodos analíticos

O método desenvolvido deve demonstrar que é apropriado para a finalidade a qual se deseja, seja ela qualitativa, semi-quantitativa e/ou quantitativa de fármacos e outras substâncias em produtos farmacêuticos. A Anvisa dispõe da resolução 899 de 29 de maio de 2003, que trata de um guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos, para que isto ocorra os analistas devem ser devidamente treinados e os equipamentos utilizados cuidadosamente calibrados. Além disso, devem garantir, por meio de estudos experimentais, o atendimento às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados. Por isso, o método desenvolvido deve seguir um criterioso processo, que compreende a análise de: especificidade, linearidade, intervalo, precisão, sensibilidade, limite de quantificação, exatidão e robustez (BRASIL, 2003).

.A especificidade ou seletividade é a capacidade que o método possui de medir exatamente um composto em presença de outros componentes tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz. Já a linearidade representa 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 precisão e a exatidão muitas vezes são confundidas, porém em uma série de medidas de uma amostragem múltipla e de uma mesma amostra, a precisão se caracteriza na proximidade dos resultados obtidos, já a exatidão na proximidade dos resultados obtidos em relação ao valor verdadeiro.

Sendo o limite de detecção (LD) a 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 (LQ) nunca deve ser inferior ao LD, pois para se conseguir quantificar um analito com precisão e exatidão, primeiramente ele deve ser detectado com confiança pelo método analítico. O LQ é expresso como concentração do analito (por exemplo, porcentagem p/p ou p/V, partes por milhão) na amostra.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

4.1.1 Equipamentos

- Equipamento de eletroforese capilar com detecção ultravioleta (UV) desenvolvido e montado em laboratório;
- Cromatógrafo líquido de alta eficiência Knauer, bomba: Smartline pump 1000 acoplado a Smartline Manager 5000, detector: Smartline UV, software: ChromGate[®] version 3.3.1; coluna marca Phenomenex[®] C18 (250 x 4,6 mm) tamanho de partícula 5,00 $\mu\text{m} \pm 0,30$;
- Balança analítica Sartorius (Goettingen, Alemanha) com precisão de 0,0001g;
- pHmetro digital Digimed DM 20, São Paulo, Brasil, usando eletrodo de vidro combinado;
- Sistema de filtração a vácuo com filtro de acetato de celulose 0,45 μm (Sartorius, Alemanha);
- Processo de purificação da água: destilação, seguido de deionização e, após purificação em um sistema de Milli-Q com resistividade de 18,2 $\text{M}\Omega \text{ cm}^{-1}$;
- Sistema de ultrassom (Unique, São Paulo, Brasil).

4.1.2 Reagentes e soluções

As matérias-primas de grau farmacêutico, pesquisadas como adulterantes, foram obtidas junto a farmácias de manipulação ou fornecedores do segmento farmacêutico, acompanhadas de laudo analítico. Os fármacos escolhidos são a metformina, glibenclamida, glimepirida, gliclazida, glipizida e clorpropamida, foram escolhidos por serem

frequentemente encontrados como adulterantes em produtos vegetais, e por apresentarem baixo custo e maior acessibilidade.

As formulações a base de plantas utilizadas no tratamento da DM, foram adquiridas na forma de cápsulas, em farmácias de manipulação do Brasil através de busca pela internet.

As soluções padrão foram preparadas nas concentrações de 1 g.L^{-1} em metanol e nomeadas de “solução estoque”, armazenadas sob refrigeração, durante aproximadamente um mês, e a partir delas foram reproduzidas as “soluções de trabalho”, em metanol.

O processo de extração das amostras foi realizado pesando o equivalente ao peso médio de cada uma das amostras, diluindo o pó em 50 mL de metanol, seguido de filtração por membrana de acetato de celulose $0,45 \mu\text{m}$. O peso médio foi realizado conforme Farmacopéia Brasileira V edição.

Para o preparo da fase móvel, para o método por HPLC, a solução de ácido fosfórico 0,1% foi preparada a partir da adição de $1.180 \mu\text{L}$ de ácido fosfórico 85% (Merck) em 1L de água ultrapura, sendo o pH ajustado para 2,0. O metanol grau HPLC (Tedia) e a solução de ácido fosfórico 0,1% foram levados a sonicação.

O eletrólito de trabalho para eletroforese capilar foi preparado a partir das soluções estoque de dodecil sulfato de sódio, do inglês, Sodium Dodecil Sulfate (SDS), fosfato de sódio, borato de sódio e colato de sódio, sendo as mesmas diluídas a cada dia de análise. As soluções de ciclodextrina e uréia foram preparadas juntamente com o eletrólito, diariamente. Todas as soluções tiveram seu pH ajustado, submetidas a filtração com membrana de acetato de celulose $0,45 \mu\text{m}$ e, após, mantido por 30 minutos em sistema de ultrassom.

Os demais reagentes utilizados para o desenvolvimento deste trabalho seguem especificados na Tabela 2.

Tabela 2 – Descrição dos reagentes e padrões utilizados no desenvolvimento deste estudo.

Reagente/Padrão	Fabricante/Fornecedor	Pureza
Acetonitrila	Sigma Aldrich	≥ 99,9%
Ácido Fosfórico 85% (m/V)	Merk	-
Borato de sódio	Synth	99,5 – 105%
Clorpropamida	Deg	99,8%
Colato de sódio	Sigma Aldrich	≥ 99%
Fosfato bibásico de sódio heptahidratado	Synth	98,0 – 102%
Fosfato monobásico de sódio	Nuclear	98,0%
Glibenclamida	Genix	99,5%
Gliclazida	Farmacopéia Brasileira	-
Glipizida	Sigma Aldrich	-
Hidróxido de Sódio P.A.	Vetec	-
Hidroxipropil- β-ciclodextrina	Sigma Aldrich	-
Metanol	Tedia	99,9%
Metformina	Deg	100,8%
SDS (Dodecil Sulfato de Sódio)	Tedia	99,0%
Tetraborato de sódio decahidratado	Merk	99,5 – 103,0%
Uréia		
β-ciclodextrina	Sigma Aldrich	≥ 95,0%

4.2 Metodologia Analítica

4.2.1 Desenvolvimento de metodologia analítica

No desenvolvimento de um método analítico seja por HPLC-DAD ou por MEKC-UV é de fundamental importância ter conhecimento da constante de ionização ácida (pKa) e dos espectros de absorção na luz UV dos analitos. Na Tabela 3 se podem observar estas características físico-químicas dos fármacos envolvidos neste estudo.

Tabela 3 – Hipoglicemiantes que serão pesquisados, como suas respectivas solubilidades, estruturas e pK_a's.

Fármaco sintético	Solubilidade	Estrutura química	pK _a
Metformina	água		2,8
	metanol		12,4
Glibenclamida	metanol		5,3
	acetoneitrila		6,3
			13,72*
Gliclazida	metanol		5,8
	acetoneitrila		7,8
			14,13*
Clorpropamida	metanol		4,8-5,0
	acetoneitrila		17,07*
Glimepirida	metanol		14,12
	acetoneitrila		
Glipizida	metanol		5,9
	acetoneitrila		13,87

*Valores preditos (fonte: <http://www.drugbank.ca>)
Demais valores obtidos experimentalmente

4.2.1.1 CE

As medidas eletroforéticas foram realizadas em equipamento de eletroforese capilar, com detecção UV. O capilar utilizado foi de sílica fundida (Micro Tube, São Paulo - SP) com, aproximadamente 70 cm de comprimento sendo, até a janela de detecção 58 cm, 75 µm de diâmetro interno e 360 µm de diâmetro externo. O sistema de injeção utilizado foi o hidrodinâmico, que se baseia na elevação de uma das extremidades do capilar até uma determinada altura, provocando, assim, a entrada de determinado volume de padrão/ amostra.

Para o condicionamento do capilar novo foi feita uma lavagem com NaOH 1mol L⁻¹, durante 40 minutos empregando vácuo em pressão constante de -600 mmHg. Em seguida fez-se uma lavagem com água ultrapura, durante 15 minutos e, por fim, com eletrólito de trabalho por 30 minutos. Diariamente, fez-se a lavagem do capilar com NaOH 0,1mol L⁻¹ e com água ultrapura, durante 15 minutos cada, e 30 minutos com o eletrólito de trabalho. No final do dia o capilar foi lavado com NaOH 0,1mol L⁻¹ e água ultrapura por 30 minutos cada.

Inicialmente, a otimização do método envolveu a escolha do eletrólito de trabalho, avaliação do pH do eletrólito em função dos valores de pKa dos fármacos, adição de solventes orgânicos e surfactantes no eletrólito de trabalho. Após esta etapa, foi feita a análise dos parâmetros operacionais como potencial de separação e injeção da amostra.

4.2.1.2 HPLC

As medidas cromatográficas foram realizadas por cromatógrafo líquido de alta eficiência Knauer por fase reversa, em coluna marca Phenomenex ® C18 (250 x 4,6 mm) tamanho de partícula 5,00 µm ± 0,30, com eluição por gradiente. A detecção foi realizada por UV com arranjo de diodos (DAD).

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 de base. Após este intervalo de condicionamento, as soluções de trabalho foram injetadas de forma manual utilizando-se de alça de injeção de 20 µL. No final do dia a coluna era lavada com água ultrapura por uma hora, em fluxo de 0,5 mL/min e

solução de acetonitrila: água ultrapura (90:10) por 30 minutos também em fluxo de 0,5 mL/min, sendo esta última a solução de armazenamento da coluna.

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

4.2.1.3 Validação do método por HPLC-DAD

Tanto o ICH, do inglês, *International Conference on Harmonisation* (2005) quanto a USP, do inglês, *United States Pharmacopeia* (2014) reconhecem que não existe necessidade da avaliação de todos os parâmetros analíticos. É de responsabilidade do analista identificar quais deles devem ser avaliados durante o desenvolvimento do método, sendo que o tipo de método e seu respectivo uso definem quais parâmetros devem ser investigados.

A validação do método analítico desenvolvido foi realizada de acordo com a Resolução 899 (BRASIL, 2003) e ICH (2005). Os seguintes parâmetros foram avaliados a fim de se determinar a validade do método para as análises na qual ele foi dirigido: linearidade, precisão, exatidão, especificidade e limites de quantificação e detecção (BRASIL, 2003).

4.2.1.3.1 Especificidade

A especificidade foi avaliada através da investigação de interferentes, tais como; constituintes da plantas, como ativos naturais, na determinação dos hipoglicemiantes estudados. Como o trabalho abrange um grande número de produtos concorrentes à amostra, o mais conveniente foi utilizar a própria amostra como interferente, desde que certos que a mesma não apresenta tal adulteração. Todas as amostras foram submetidas ao mesmo processo de extração já padronizado.

4.2.1.3.2 Linearidade

Para a determinação da linearidade foi necessária a leitura de concentrações crescentes de cada padrão de referência, através do método otimizado. Foi observado o intervalo de linearidade de cada analito, destacando cinco pontos para apresentação da curva analítica, respeitando sempre os intervalos de análise.

Para este parâmetro as soluções foram preparadas em balão volumétrico de 25 mL a partir de uma solução mãe na concentração de 1000 µg/mL, conforme Tabela 4. O solvente utilizado foi o metanol.

Tabela 4 – Modo de preparo das soluções para a avaliação da linearidade e precisão do método por HPLC-DAD.

Concentração em 25 mL (µg/mL)	Alíquota retirada da solução mãe a 1000 µg/mL (µL)
2,5	62,5
5,0	125
7,5	187,5
10,0	250
12,5	312,5
15,0	375

4.2.1.3.3 Precisão

A precisão foi analisada por repetibilidade, ou intra-dia, onde o procedimento analítico é avaliado a partir de 9 (nove) determinações em 3 (três) níveis de concentração, baixa (2,5 µg/mL), média (7,5 µg/mL) e alta (15 µg/mL), quando se avalia a precisão intermediária, ou inter-dias, uma concentração deve ser avaliada em triplicada em no mínimo dois dias e com dois analistas diferentes. A análise deve corresponder a 100% da concentração teste. Este

parâmetro é expresso através do coeficiente de variação (CV%), ou desvio padrão relativo (DPR), seguindo a fórmula abaixo:

$$DPR = \frac{DP}{CMD} \times 100$$

onde DP é o desvio padrão e CMD (concentração média determinada), não se admitindo valores superiores a 5%, podendo também ser avaliadas através de teste F.

As soluções utilizadas para este parâmetro foram as mesmas utilizadas para a avaliação da linearidade e estão descritas na Tabela 4.

4.2.1.3.4 Exatidão

A exatidão foi determinada através do teste de recuperação, onde foi feita a adição de padrão na amostra em concentração conhecida. É calculada a partir da concentração média encontrada experimentalmente e a concentração teórica correspondente, multiplicado por 100 (cem), sendo expressa em percentual de recuperação.

O preparo das amostras se deu como no processo de extração da amostra, porém desta vez foi adicionado concentração conhecida de solução padrão.

Em um primeiro momento pesou-se o equivalente ao peso médio de cada amostra e adicionou-se a um balão de 50mL, logo foi adicionado o padrão conforme na Tabela 5. As concentrações de 2,5; 7,5 e 15 µg/mL, foram preparadas em triplicata.

Tabela 5 – Modo de preparo das soluções para a avaliação da exatidão do método por HPLC-DAD.

Concentração em 50 mL ($\mu\text{g/mL}$)	Alíquota retirada da solução mãe a 1000 $\mu\text{g/mL}$ (μL)
2,5	250
5,0	500
7,5	750
10,0	1000
12,5	1250
15,0	1500

Após a solução estar pronta, foi submetida a filtração em membrana de acetato de celulose (45 μm) e então diluída 1:1 para análise em HPLC-DAD.

4.2.1.3.5 LD e LQ

O LQ e o LD foram calculados, a partir do desvio padrão do branco (metanol). Para isso, foi injetado 5 vezes apenas o solvente utilizado, neste caso o metanol, e assim, calculados os LQ e LD. Onde:

$$LQ = \frac{10 \times DP}{a} \qquad LD = \frac{3 \times DP}{a}$$

4.3 Aplicação do método desenvolvido

Após a validação do método analítico por HPLC-DAD, o mesmo foi utilizado para avaliação das amostras, afim de comprovar a eficiência do método analítico quantitativo

desenvolvido, e, detectar ou não a presença de adulterantes hipoglicêmicos nas formulações vegetais e produtos naturais manipulados usadas no tratamento da DM.

4.3.1 Amostragem

Tendo em vista o grande crescimento do mercado virtual optou-se pela aquisição via internet visto ser um mercado de mais fácil acesso, onde, possivelmente, estaria o foco da adulteração. A pesquisa foi limitada ao território brasileiro, e a busca foi apenas por cápsulas de fitoterápicos utilizados no tratamento de diabetes, ela foi baseada em uma pesquisa já feita por Ferreira (2012), onde já havia citado os fitoterápicos de maior utilidade no território brasileiro. A aquisição foi feita normalmente, sem identificar pesquisa científica, e o envio feito via Sedex para endereço residencial.

Em um site de busca foram utilizadas as palavras chave: “fitoterápicos para o tratamento do diabetes”, “composto fitoterápico para o tratamento de diabetes”, “suplementos alimentares para diabéticos”, entre outros, a busca não foi engessada, dando sempre abertura para propagandas e demais *links* relacionados com o tratamento de diabetes vinculado a formulações de base vegetal na forma de cápsulas.

Na Tabela 6 estão discriminadas as amostras analisadas neste estudo, destacando a sua origem e a sua composição, conforme descrição do fabricante.

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, conforme descrito na Farmacopéia Brasileira V edição.

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 em membrana de acetato de celulose 0,45 μm .

Tabela 6 – Composição e origem das 20 amostras analisadas.

AMOSTRA	COMPOSIÇÃO	ORIGEM
01	Pata de vaca, carqueja, pedra ume caa	Santa Maria – RS
02	Alcachofra	Alegrete - RS
03	Pata de vaca, jambolão, pedra ume caa	Novo Hamburgo – RS
04	Berinjela 400mg	Alegrete – RS
05	Berinjela 400mg	Maringá – PR
06	Alcachofra 200mg, Carqueja 150mg, Pata de vaca 150mg	Porto Alegre - RS
07	<i>Solanum melongena</i> L.	Osório – RS
08	<i>Bauhinia forficata</i>	Curitiba – PR
09	<i>Annona muricata</i> L. 300mg	Hortolândia – SP
10	<i>Bauhinia forficata</i> 500mg	Núcleo Bandeirante - DF
11	Acerola, ácido ascórbico, graviola, ácido retinóico, tocoferol, Se, Zn, picolinato de cromo, gelatina, glicerina.	Xanxerê - SC
12	<i>Phyllanthus niruri</i> L.	São Paulo - SP
13	graviola, ácido ascórbico 45mg; qsp 500mg	Nova Venécia - ES
14	<i>Baccharis trimera</i>	Curitiba - PR
15	Pata de vaca	Hoetolândia – SP
16	<i>Baccharis trimera</i>	São Paulo –SP
17	<i>Syzygium jambolanum</i>	Ribeirão Preto – SP
18	<i>Bauhinia cadicans</i> Benth 330mg	São Paulo - SP
19	<i>Gymnema sylvestre</i> 200mg	Vitória – ES
20	<i>Gymnema sylvestre</i> 250mg	Vila Velha – ES

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Neste trabalho foram desenvolvidos dois métodos de separação analítica; HPLC-DAD e MEKC-UV, com o objetivo de detectar hipoglicêmicos sintéticos como adulterantes em formulações de base vegetal utilizadas no tratamento do diabetes. Metformina, gliclazida, clorpropamida, glipizida, glimepirida e glibenclamida compreendem as classes de fármacos em estudo, sendo utilizado como interferentes da análise os constituintes das próprias amostras livres de adulteração dos fármacos em questão.

No método por MEKC-UV não foi possível concluir a validação, devido a baixa solubilidade dos solutos em meio aquoso, o que proporcionou uma alta adsorção nas paredes do capilar, impedindo a estabilidade da corrente elétrica e a reprodutibilidade dos resultados. O HPLC-DAD mostrou-se mais adequado que o MEKC-UV para este tipo de análise, pela maior facilidade na utilização de solventes orgânicos, o que possibilita uma maior solubilização dos solutos de baixa polaridade em estudo.

Os capítulos a seguir tratam da otimização da separação destes fármacos por MEKC-UV e HPLC-DAD, bem como da validação e aplicação do método por HPLC-DAD para a determinação de metformina, gliclazida, clorpropamida, glipizida, glimepirida e glibenclamida como adulterantes em formulações fitoterápicas utilizadas no tratamento do diabetes.

5.1 Desenvolvimento e método analítico por MEKC-UV

Para o desenvolvimento efetivo do método analítico por MEKC-UV foram testados os eletrólitos fosfato e borato de sódio em diferentes pH's, tais sais, escolhidos de acordo com seus respectivos pKa's e capacidade tamponante no pH de análise (TAVARES, 1997). Também foram utilizados aditivos, com o objetivo de aumentar a solubilidade do soluto no meio, e efetivamente conseguir um método reprodutível e eficaz.

A associação diferenciada entre o soluto e a fase micelar é um requisito básico para a separação em MEKC. Dependendo da natureza do soluto e da micela a ligação dos mesmos é diferenciada, podendo o soluto ser incorporado ao núcleo ou a superfície da micela

através de ligações do tipo dipolo-dipolo ou dipolo induzido-dipolo induzido. A detecção somente ocorrerá quando o soluto se desprender da micela (TAVARES, 1997).

5.1.1 Testes com ciclodextrina

Os testes com β -ciclodextrina em um primeiro momento melhoraram a estabilidade da corrente elétrica, picos finos e com simetria aparente. Entretanto, não foi suficiente melhor a seletividade da análise, ocorrendo ainda algumas coeluições (RAWJEE et al., 1994a; OLIVEIRA, SANTOS, COELHO, 2009). Os testes foram encerrados pelo fato de já se estar utilizando uma concentração elevada, sendo 16mM seu ponto de saturação em água e estarmos utilizando 20 mM.

5.1.2 Testes com SDS

O SDS é um tensoativo aniônico muito utilizado em eletroforese capilar por formar micelas estáveis em pH alcalino (NUÑEZ et al., 1995; TAVARES, 1997). Neste caso, a separação mostrou-se mais eficiente em pH 11,0, embora alguns picos se mantinham largos. Foram testadas concentrações crescentes deste tensoativo 50, 100 e 150 mM. A concentração de 100 mM foi escolhida porque proporcionou a melhor separação em menor tempo de análise.

5.1.3 Teste com ureia

Na busca por concluir o método com êxito, encontrou-se na uréia uma alternativa, dado que Terabe e colaboradores (1991) utilizaram na análise de hidrocarbonetos, compostos altamente apolares, contribuindo na interação do eletrólito aquoso com o analito. Esta característica pode ser observada no aumento do sinal e na melhor separação à medida que aumenta a concentração de uréia no eletrólito. As concentrações de 1, 2, 3, 4, 5 e 6 M foram

analisada. O melhor eletroferograma foi obtido com a concentração de 5 M, porém os picos não foram reprodutíveis. Isto pode ter ocorrido devido a alta concentração de ureia no eletrólito, que pode ter adsorvido nas paredes do capilar.

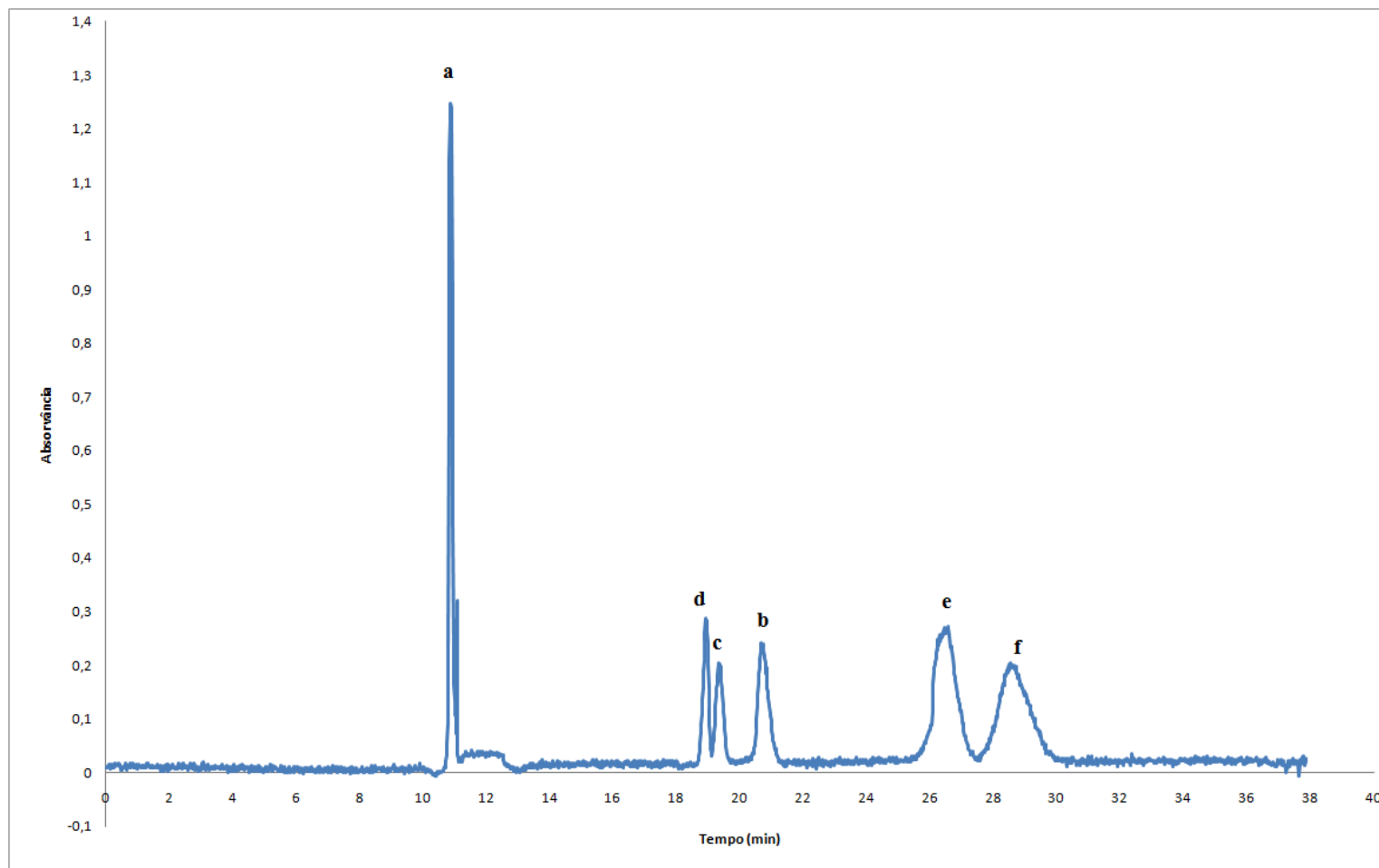
5.1.4 Teste com solventes orgânicos

Na tentativa de retardar a corrida e aumentar a solubilidade dos solutos do meio foi adicionado 1% de acetonitrila e 1% de metanol ao eletrólito com SDS 100 mM, os ensaios foram positivos. As análises também não foram reprodutíveis, o que pode ter ocorrido novamente devido à baixa solubilidade dos solutos no eletrólito de trabalho, alta adsorção nas paredes do capilar e dificuldades em manter a temperatura do sistema estável.

Na Figura 1, pode-se observar o eletroferograma que conferiu o melhor resultado obtido, a identificação dos adulterantes se deu a partir da similaridade dos picos, não podendo ser afirmado com certeza a identidade dos mesmos.

Conclui-se que o método por eletroforese capilar com detecção UV não é aplicável para este tipo de análise, devido à baixa sensibilidade deste detector, quando aplicado a esta metodologia analítica. Isto ocorre porque o caminho óptico, neste caso, é muito estreito, exigindo altas concentrações dos analitos, o que aumenta a adsorção dos mesmos nas paredes do capilar, diminuindo a capacidade de reprodução dos resultados (HARRIS, 2011).

Figura 1 – Eletroferograma dos adulterantes (100 mg. L^{-1}) (a) metformina, (b) glipizida, (c) clorpropamida, (d) gliclazida, (e) glibenclamida e (f) glimepirida. Condições: eletrólito borato 20mM contendo SDS 100mM e ACN 1% em pH 11,0; potencial de separação -15000V; capilar de sílica fundida $75 \mu\text{m} \times 360 \mu\text{m} \times 70 \text{ cm}$ (48 cm até o detector); detecção UV em 230 nm, temperatura 25°C , injeção hidrodinâmica por gravidade de 20 cm durante 120s.



5.2 Desenvolvimento de método analítico por HPLC-UV e DAD para fármacos hipoglicemiantes sintéticos como adulterantes

5.2.1 Escolha do método de análise

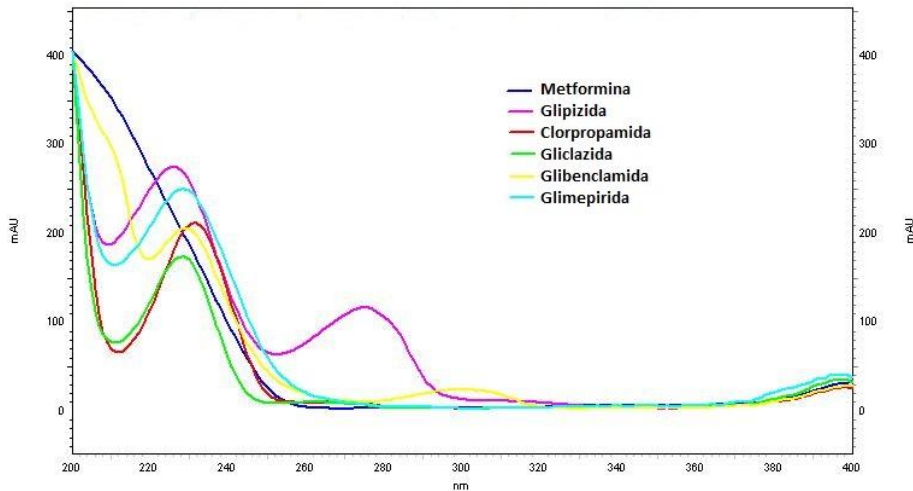
No presente estudo os fármacos em análise apresentam baixo peso molecular, inferior a 2000 g. mol^{-1} , visto que a metformina apresenta um peso molecular de $165,63 \text{ g. mol}^{-1}$, a clorpropamida $276,741 \text{ g. mol}^{-1}$, a glipizida $267,28 \text{ g. mol}^{-1}$, a glibenclamida $494,01 \text{ g. mol}^{-1}$, a glimepirida $490,617 \text{ g. mol}^{-1}$ e a gliclazida $323,41 \text{ g. mol}^{-1}$ (MERK INDEX). Métodos por fase reversa são adequados para separar misturas neutras de baixa massa molecular ou compostos orgânicos carregados. Além disso, este tipo de cromatografia é de grande aplicabilidade em laboratórios de análises químicas, pois com apenas uma coluna e com uma pequena variabilidade de solventes se consegue um grande número de separações químicas (HARRIS, 2011).

5.2.2 Estudos de otimização do método

Os estudos de otimização da separação compreendem a composição do eluente, o gradiente de eluição, bem como o pH do meio e comprimento de onda da análise.

Em um primeiro momento foi traçado o espectro de cada um dos fármacos a fim de escolher o comprimento de onda de melhor absorção entre todos os analitos obtendo uma menor interferência. Foi feita uma varredura entre 200 e 400 nm com todos os fármacos, em uma solução de concentração 15 ppm em metanol. Os máximos de absorção foram 200 nm para metformina, 232 nm para clorpropamida, 226 nm para glipizida, 230 nm para gliclazida, 230 nm para glibenclamida, desta forma 230 nm foi demonstrado o comprimento de onda ideal para realização da análise. Segue na Figura 2 os espectros de cada um dos hipoglicêmicos.

Figura 2 – Estudo da absorção de radiações UV pelos adulterantes estudados em metanol na faixa de 200 a 400 nm. Adulterantes: clorpropamida, glimepirida, glibenclamida, glipizida, gliclazida e metformina (10mg. L⁻¹ em metanol), Fase móvel acetonitrila e ácido fosfórico 0,1%.



Considerando a faixa de pK_a dos fármacos (2,8 a 5,9), o pH 2,0 foi escolhido pelo fato de neste pH todos os analitos estariam totalmente protonados, proporcionando a formação de picos simétricos. Somado a isto o pK_a do ácido fosfórico é 2,12, apresentando capacidade tamponante neste potencial de hidrogênio.

Tendo definido o comprimento de onda da análise (230 nm), o pH (2,0) e o processo de extração dos compostos e o solvente dos analitos (metanol), foi dado início à otimização da fase móvel. A primeira etapa, de acordo com Harris (2011), consiste em otimizar o método isocrático com acetonitrila e água, logo com metanol e água, seguido de tetrahydrofurano e água. O avanço da análise se dá nas misturas terciárias e quaternárias entre esses eluentes, de acordo com a força eluente que se quer.

Em um primeiro momento escolheu-se o metanol, devido a este ser o solvente dos analitos, porém o tempo de análise seria demasiadamente alto, não possibilitando a detecção de todos os fármacos em 30 (trinta) minutos de análise. Conforme pode-se observar na Figura 3, em uma análise isocrática utilizando metanol (40%) e ácido fosfórico 0,1% (60%) apenas 3 picos foram visíveis.

Devido à maior força eluente conferida a acetonitrila e a solubilidade dos fármacos neste solvente, com exceção da metformina, optou-se pela utilização da mesma como eluente da análise. Com isso, as análises com acetonitrila e ácido fosfórico 0,1% se mostraram mais eficientes. O próximo passo foi encontrar a concentração dos eluentes e a vazão da análise

mais pertinente. Para glibenclamida, glimepirida, gliclazida e clorpropamida, a melhor condição foi em um gradiente linear de 30 a 100% de acetonitrila e 70 a 0% de ácido fosfórico 0,1% em 15 minutos (Figura 4). Não foi possível identificar a metformina no cromatograma.

Figura 3 – Cromatograma dos cinco adulterantes (10 mg. L⁻¹). Condições: fase móvel ácido fosfórico 0,1% (pH 2,0) (60:40) metanol; coluna C₁₈; 230 nm; e fluxo de 1 mL. min⁻¹.

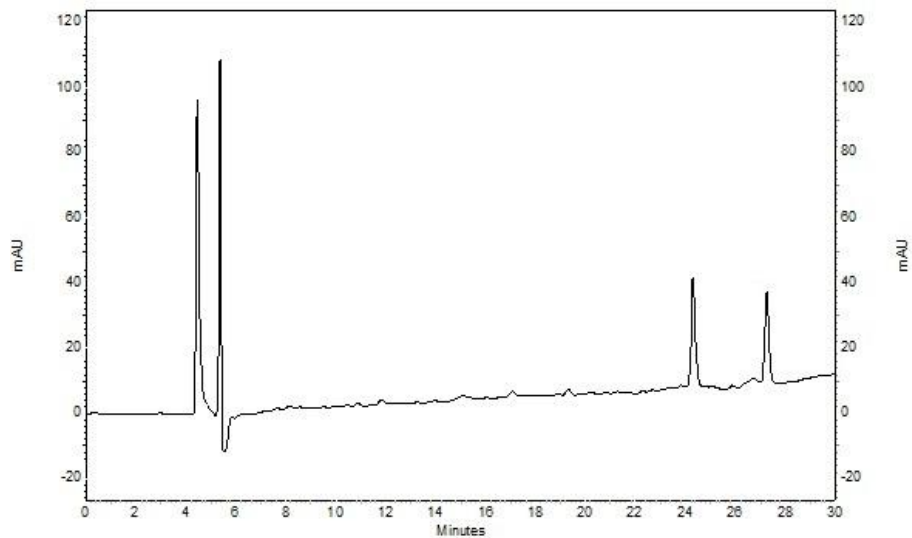
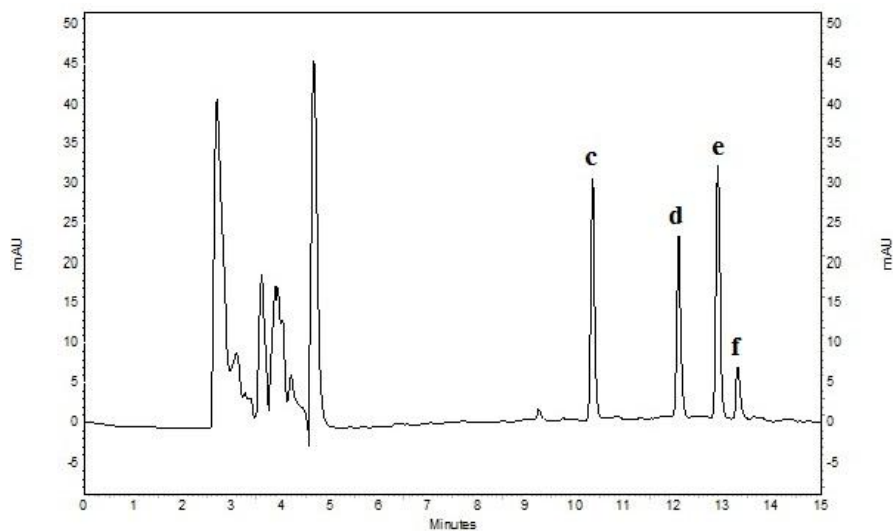


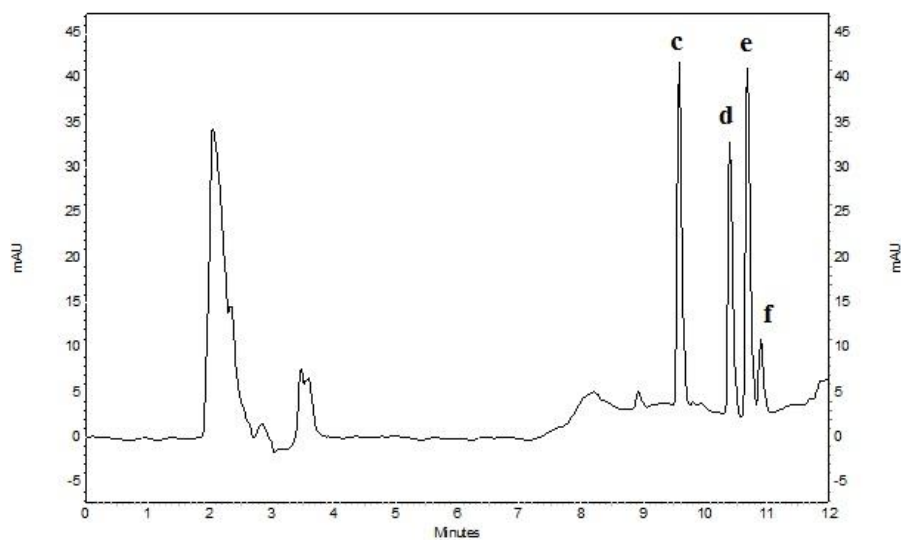
Figura 4 – Cromatograma dos cinco adulterantes (c) clorpropamida, (d) gliclazida, (e) glibenclamida, (f) glimepirida (7,5 mg. L⁻¹). Condições: fase móvel – gradiente linear em 20 min de análise: ácido fosfórico 0,1% (pH 2,0) (70 – 0%) e acetonitrila (30 - 100%); coluna C₁₈; 230 nm; e fluxo de 1 mL. min⁻¹.



A acetonitrila foi testada nas concentrações de 10, 20, 30, 40 e 50%, sendo a concentração de 10% a que se mostrou melhor, devido à baixa solubilidade da metformina em acetonitrila e alta afinidade da mesma em água. O formato do cromatograma ficou muito simétrico e os picos aparentemente bem resolvidos, porém a metformina por apresentar baixa solubilidade em acetonitrila e alta polaridade em relação aos demais analitos saiu muito próximo com o resíduo do solvente.

Buscando atrasar a análise, a fim de que a metformina fosse detectada em um ponto mais estável da eluição, foi adicionado concentração de 5% de metanol e 30% de acetonitrila. A operação não obteve sucesso devido ao aumento do ruído da linha base e a metformina acabou saindo junto com o ruído do solvente (Figura 5).

Figura 5 – Cromatograma dos cinco adulterantes (c) clorpropamida, (d) gliclazida, (e) glibenclamida, (f) glimepirida, metformina sem identificação ($7,5 \text{ mg. L}^{-1}$). Condições: fase móvel - gradiente linear em 20 min de análise: ácido fosfórico 0,1% (pH 2,0) (65 – 0%), acetonitrila (30 – 100%), metanol (5% -até 4 min, 5 – 0%- até 8 min); coluna C_{18} ; 230 nm; e fluxo de 1 mL. min^{-1} .



Logo, a determinação dos adulterantes investigados por HPLC-DAD ficou definida sob as condições apresentadas na Tabela 7, e ilustradas na Figura 6, resultando no cromatograma apresentado na Figura 7, com menos de 20 minutos de análise.

O aumento do fluxo durante a análise possibilitou um menor tempo de análise em que todos os fármacos estudados estivessem devidamente separados. Foram testados fluxos de 0,5

mL. min⁻¹ a 1mL. min⁻¹ e os melhores resultados foram conferidos em um gradiente linear de 0,5 a 0,9 mL. min⁻¹ em 20 minutos de análise.

Tabela 7 – Condições otimizadas para o método analítico por HPLC-DAD

Coluna	Knauer Coluna C18, 250 x 4,6 mm, 5 µm
Fluxo	0 min = 0,5 mL/min 0 - 20 min = 0,9 mL/min
Volume de injeção	20 µL
Temperatura da coluna	Ambiente
Fase móvel	A: Ácido Fosfórico 0.1% B: Acetonitrila
Tempo de corrida	20 min
Tempo de equilíbrio	10 min
Gradiente	0 min = 90 % A e 10 % B 0 – 20 min = 0 % A e 100 % B
Detecção	230 nm

Tempo (min)	Fluxo (ml/min)	% Eluente A	% Eluente B
0,00	0,500	90	10
20,00	0,900	0,00	100

Figura 6 – Ilustração do gradiente linear seguido pela concentração dos eluentes e a vazão durante a análise.

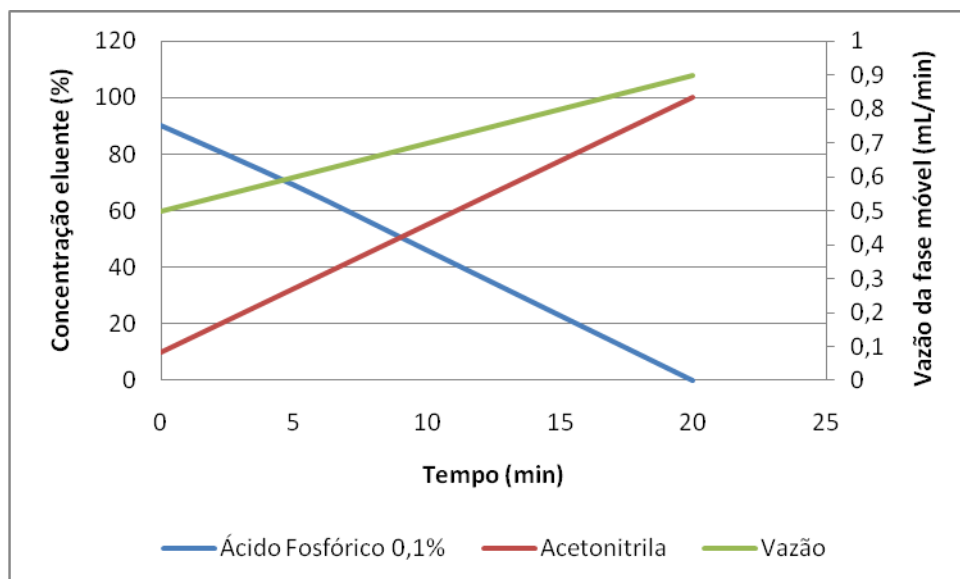
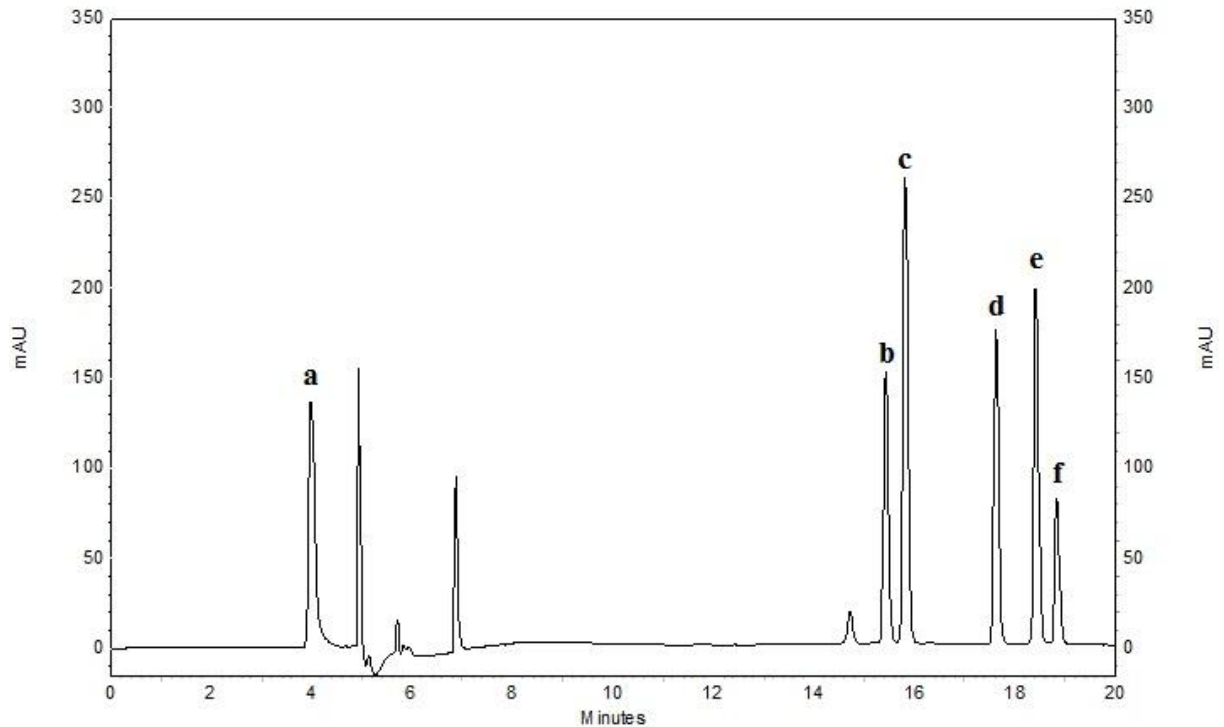


Figura 7 – Cromatograma dos adulterantes (15 mg. L⁻¹) (a) metformina, (b) glipizida, (c) clorpropamida, (d) gliclazida, (e) glibenclamida e (f) glimepirida. Condições: fase móvel ácido fosfórico 0,1% (pH 2,0) (90-0%) acetonitrila (10-100%); coluna C₁₈; 230 nm; e fluxo de 0,5 mL. min⁻¹ a 0,9 mL. min⁻¹.



5.3 Validação de método analítico por HPLC-DAD para fármacos hipoglicemiantes sintéticos como adulterantes

5.3.1 Especificidade

Estudos mostram que as principais espécies de plantas citadas na literatura para o controle da glicemia sérica são: alho (*Allium sativum*), cajueiro (*Anacardium occidentale*), graviola (*Annona muricata*), carambola (*Averrhoa carambola*), pata-de-vaca (*Bauhinia* sp.), pau-ferro (*Caesalpinia ferrea*) e gymnema silvestre (*Gymnema silvestre*) (DEY; ATTELE; YUAN, 2002; CARVALHO; DINIZ; MUKHERJEE, 2005; NEGRI, 2005; BORGES; BAUTISTA; GUILERA, 2008).

Porém, de acordo com estudo recente, realizado por Ferreira (2012) as plantas mais utilizadas, tradicionalmente, no tratamento do diabetes são: pata de vaca (*Bauhinia* sp.), insulina vegetal (*Cissus sicyoides*), berinjela (*Solanum melongena*), gymnema silvestre (*Gymnema silvestre*), farinha de banana verde (*Musa paradisiaca*), farinha de maracujá (*Passiflora edulis*), jambolão (*Syzygium jambolanum*), carqueja (*Baccharis trimera*) e garcínea (*Garcinia cambogia*).

Com isso, torna-se grande a variabilidade de interferentes no estudo de adulterantes nestas formulações. Para tanto, utilizou-se as próprias amostras adquiridas, certificando-se que as mesmas não estavam contaminadas com os fármacos em estudo. Dentre a composição das amostras analisadas pode-se citar: gymnema silvestre, pata de vaca, carqueja, pedra ume caá, alcachofra, jambolão, berinjela, graviola e quebra pedra.

Apenas a amostra 06 e a amostra 12 apresentaram picos passíveis de interferência com os fármacos avaliados como adulterantes no presente estudo, porém ao fazer a adição de padrão os mesmos foram deslocados, eliminando tal interferência. As Figuras de 8 a 11 mostram alguns cromatogramas de amostras que contêm em sua formulação algumas das plantas citadas como as principais, das possíveis matrizes.

Figura 8 – Cromatograma **amostra 02**. Composição: Alcachofra (*Cynara scolymus*) 400mg. Cromatograma **padrões** (a) metformina, (b) glipizida, (c) clorpropamida, (d) gliclazida, (e) glibenclamida e (f) glibepirida (15 mg. L^{-1}). Condições: fase móvel ácido fosfórico 0,1% (pH 2,0) (90-0%) acetonitrila (10-100%); coluna C₁₈; 230 nm; e fluxo de $0,5 \text{ mL. min}^{-1}$ a $0,9 \text{ mL. min}^{-1}$.

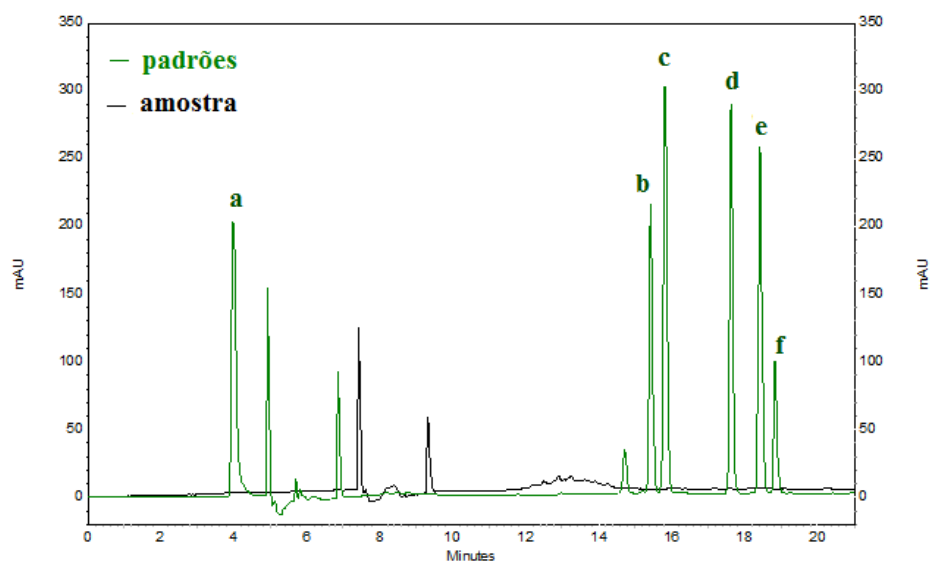


Figura 9 – Cromatograma **amostra 10**. Composição: Pata de vaca (*Bauhinia forficata*) 500mg. Cromatograma **padrões** (a) metformina, (b) glipizida, (c) clorpropamida, (d) gliclazida, (e) glibenclamida e (f) glimepirida (15 mg. L^{-1}). Condições: fase móvel ácido fosfórico 0,1% (pH 2,0) (90-0%) acetonitrila (10-100%); coluna C_{18} ; 230 nm; e fluxo de $0,5 \text{ mL. min}^{-1}$ a $0,9 \text{ mL. min}^{-1}$.

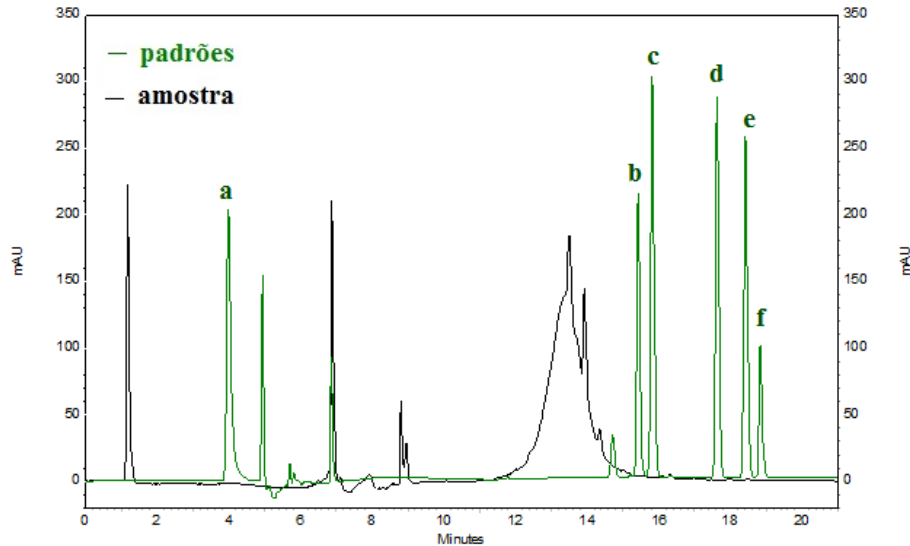


Figura 10 – Cromatograma da **amostra 03**. Composição: Pata de vaca (*Bauhinia forficata*), Jambolão (*Syzygium jambolanum*), Pedra uma caá (*Myrcia sphaerocarpa*). Cromatograma **padrões** (a) metformina, (b) glipizida, (c) clorpropamida, (d) gliclazida, (e) glibenclamida e (f) glimepirida (15 mg. L^{-1}). Condições: fase móvel ácido fosfórico 0,1% (pH 2,0) (90-0%) acetonitrila (10-100%); coluna C_{18} ; 230 nm; e fluxo de $0,5 \text{ mL. min}^{-1}$ a $0,9 \text{ mL. min}^{-1}$.

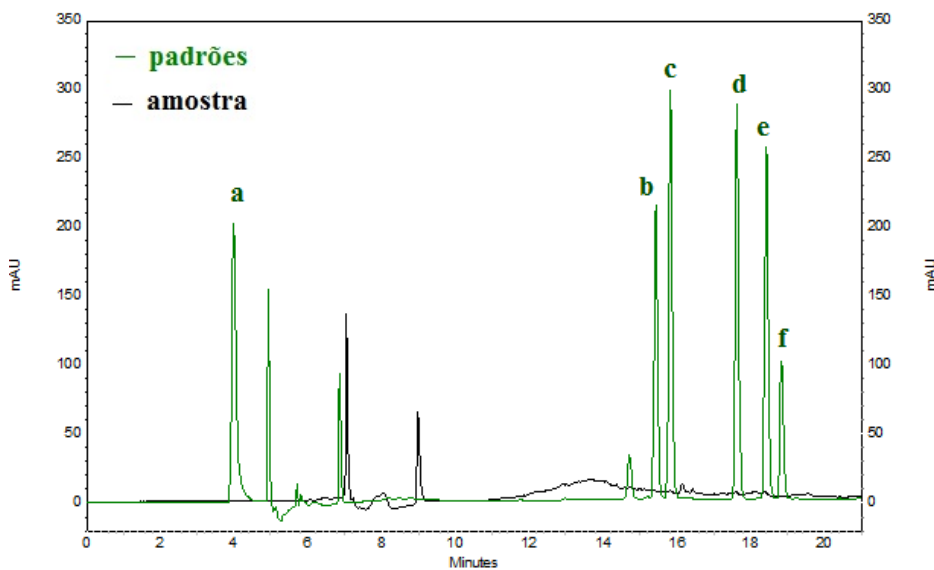
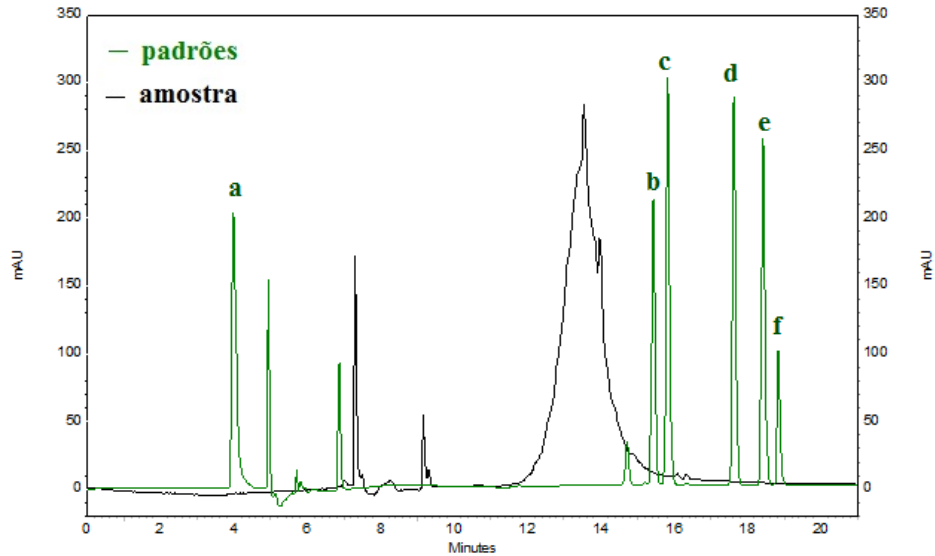


Figura 11 – Cromatograma **amostra 19**. Composição: *Gymnema sylvestre*. Cromatograma **padrões** (a) metformina, (b) glipizida, (c) clorpropamida, (d) gliclazida, (e) glibenclamida e (f) glimepirida (15 mg. L⁻¹). Condições: fase móvel ácido fosfórico 0,1% (pH 2,0) (90-0%) acetonitrila (10-100%); coluna C₁₈; 230 nm; e fluxo de 0,5 mL. min⁻¹ a 0,9 mL. min⁻¹.



5.3.2 Linearidade

A linearidade do método foi avaliada através da construção de curvas analíticas com os seguintes níveis de concentração (2,5; 5,0; 7,5; 10,0; 12,5 e 15,0 mg. L⁻¹), calculados em triplicatas.

A estimativa dos coeficientes de uma curva analítica a partir de um conjunto de medições experimentais pode ser efetuada utilizando a regressão linear, onde se pode estimar os coeficientes de regressão a e b ($y = ax + b$), além do coeficiente de correlação r (RIBANI, et al., 2004). A Anvisa recomenda um coeficiente de correlação igual a 0,99 para mostrar boa correlação entre os resultados esperados com os obtidos experimentalmente, a partir da equação da reta (BRASIL, 2003).

A correlação representada pelo modelo matemático entre os valores numéricos de x e de y é representada pelo coeficiente de Pearson – ‘r’. O quadrado deste coeficiente é chamado de coeficiente de determinação ou simplesmente R². Vale ressaltar que o coeficiente de correlação – ‘r’ e o coeficiente de determinação – ‘R²’ não são adequados para prever a linearidade do método, tais coeficientes apenas indicam o grau de correlação entre os eixos x e y e não devem ser analisados isoladamente (THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2002).

Segundo Pimentel & Barros-Neto (1996) o modo correto de se avaliar a linearidade é a partir do teste F. Os estudos de regressão linear e desvio de linearidade, aplicados aos dados da curva permitem dizer se existe, ou não, relação linear entre as variáveis e a inclinação da reta e se a faixa de trabalho escolhida é adequada (CARDOSO et al., 2010).

Segue na Tabela 8 Os resultados para os ensaios referentes a linearidade do método por HPLC-RP-UV para adulterantes hipoglicêmicos sintéticos.

5.3.3 LD e LQ

Os LQ e LD calculados a partir da curva não foram totalmente satisfatórios, porém, como se adquiriu resultados positivos com concentrações até inferiores experimentalmente, optou-se por fazê-los a partir do desvio padrão do branco (metanol). Pode-se verificar na Tabela 8 os LQ e LD para cada fármaco obtidos pelas análises por HPLC-DAD.

O método desenvolvido apresentou baixos limites de detecção ($0,05$ a $0,17 \text{ mg. L}^{-1}$), assim como de quantificação ($0,18$ a $0,59 \text{ mg. L}^{-1}$), visto que se encontram muito abaixo da primeira concentração do intervalo de medida ($2,5 \text{ mg. L}^{-1}$), podendo desta forma ser facilmente quantificados e detectados nessas condições de análise.

Tabela 8 – Parâmetros de regressão, resultados da análise de variância e apresentação dos limites de quantificação e detecção para quantificação de metformina, glibenclamida, gliclazida, clorpropamida, glipizida e glimepirida por HPLC-DAD.

Parâmetros	Metformina ^a	Glibenclamida ^a	Gliclazida ^a	Clorpropamida ^a	Glipizida ^a	Glimepirida ^a
Faixa de concentração linear	2,5 – 15 (mg. L ⁻¹)	2,5 – 15 (mg. L ⁻¹)	2,5 – 15 (mg. L ⁻¹)	2,5 – 15 (mg. L ⁻¹)	2,5 – 15 (mg. L ⁻¹)	2,5 – 15 (mg. L ⁻¹)
Equação da reta	$y = 124191x - 2909,4$	$y = 109962x - 3874$	$y = 128733x - 1378,4$	$y = 133245x - 544,91$	$y = 90492x - 81230$	$y = 44179x - 26354$
Coeficiente de Correlação (r)	0,9988	0,9998	0,9996	0,9989	0,9991	0,9978
Coeficiente de determinação (R ²)	0,9967	0,9995	0,9991	0,9978	0,9982	0,9957
Análise da variância (ANOVA)						
Regressão linear ^b	5062,87 (9,33)	9768,27 (9,33)	13498,19 (9,33)	7375,43 (9,33)	9484,80 (9,33)	3322,85 (9,33)
Desvio da Linearidade ^b	2,97 (5,41)	1,12 (5,41)	3,03 (5,41)	4,13 (5,41)	4,38 (5,41)	3,60 (5,41)
Limites						
LD	0,06 (mg. L ⁻¹)	0,06 (mg. L ⁻¹)	0,05 (mg. L ⁻¹)	0,05 (mg. L ⁻¹)	0,08 (mg. L ⁻¹)	0,17 (mg. L ⁻¹)
LQ	0,20 (mg. L ⁻¹)	0,23 (mg. L ⁻¹)	0,19 (mg. L ⁻¹)	0,18 (mg. L ⁻¹)	0,29 (mg. L ⁻¹)	0,59 (mg. L ⁻¹)

^a Dados obtidos a partir de três curvas padrões

^b Valores em parênteses correspondem aos valores críticos de *F* para *P* = 0,01

5.3.4 Precisão

Este parâmetro representa a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, sob condições definidas. Ela pode ser inferida de três formas, intra-dia, inter-dia e inter-laboratorial (BRASIL, 2003).

Uma das formas de se estimar a precisão de um método é a partir do seu DPR, ou desvio padrão relativo, quando se tratam de macro quantidades este valor pode variar de 1 a 2%, porém em métodos de análise de traços ou impurezas o Desvio Padrão Relativo (DPR), pode chegar até 20%, dependendo da complexidade da amostra (RIBANI et al., 2004). De acordo com a Resolução 899 de 28 de maio de 2003, este desvio deve ser inferior a 5% da concentração teste (BRASIL, 2003).

A repetibilidade do método, ou precisão intra-dia conforme especificada pela ANVISA foi verificada a partir de nove determinações, onde foi especificado três níveis, ou três concentrações diferentes (baixa, média e alta), três repetições cada uma (BRASIL, 2003).

A partir do coeficiente de variação, inferior a 5%, o método mostrou-se preciso em análises realizadas em um mesmo dia, com mesmo equipamento e mesmo analista.

Precisão intermediária é a concordância entre os resultados do mesmo laboratório, mas obtidos em dias diferentes, com analistas diferentes e/ou equipamentos diferentes. Para a determinação da precisão intermediária recomenda-se um mínimo de 2 dias diferentes com analistas diferentes.

Os ensaios foram realizados em 5 dias, com 2 analistas diferentes. Não houve diferença significativa entre as análises realizadas, dado que os valores F calculados para todos os adulterantes hipoglicêmicos do presente estudo apresentaram seus valores inferiores aos valores de F tabelado 4,26 ($p < 0,05$). somado a isto o CV foi inferior a 5%.

5.3.5 Exatidão

Para a Anvisa a exatidão deve ser determinada por um mínimo de nove determinações em três diferentes níveis de concentração (BRASIL, 2003). Esta recomendação é também adotada pela ICH (2005).

Segundo Thompson e colaboradores (2002) este parâmetro pode ser investigado por recuperação de uma concentração conhecida de padrão adicionada na amostra. Estudos de recuperação apenas avaliam o viés que o analito pode vir a sofrer quando na amostra a ser analisada, ou seja, uma boa recuperação, não garante a verdade absoluta, nem o contrário, a falta da verdade.

O objetivo deste estudo foi verificar a presença de adulterantes hipoglicêmicos sintéticos em formulações de origem vegetal. Levando em consideração a vasta quantidade de matrizes que possam a vir interferir na análise, e na veracidade dos fatos., os ensaios de recuperação tornam-se de grande valia.

De acordo com a Anvisa, a análise pelo método de adição de padrão é bem aceito. Portanto, a exatidão foi verificada a partir de ensaios de recuperação, pelo método de adição de concentração conhecida de padrão na amostra durante o processo de extração e antes de qualquer etapa, simulando todo o processo de extração (2,5; 7,5 e 12,5 mg. L⁻¹), concentrações intermediárias (5,0; 10,0 e 15,0 mg. L⁻¹) também foram avaliadas a fim de obter a equação da reta.

A determinação quantitativa de contaminantes em matérias primas ou em formulações farmacêuticas pode alcançar de 80 a 120% da concentração teórica do teste. Conforme pode ser observado na Tabela 9, o método por HPLC-DAD mostrou-se aceitável para a determinação e quantificação dos adulterantes estudados, em produtos farmacêuticos e suplementos alimentares de base vegetal, visto que o teor de recuperação não ultrapassa o limite entre 86,15 a 107,66%.

Tabela 9 – Ensaio de recuperação em produtos farmacêuticos e suplementos alimentares de base vegetal. Resultados obtidos por HPLC-DAD.

Produto	Quantidade de fármaco		% Recuperação
	Adicionada µg/mL	Recuperada µg/mL*	
Metformina	2,5	2,39	95,54
	7,5	8,07	107,66
	12,5	11,89	95,14
Glipizida	2,5	2,15	86,15
	7,5	7,30	97,32
	12,5	11,00	88,04

Clorpropamida	2,5	2,32	93,03
	7,5	7,92	105,63
	12,5	13,00	104,03
Gliclazida	2,5	2,17	86,99
	7,5	7,56	100,85
	12,5	11,47	91,75
Glibenclamida	2,5	2,42	96,64
	7,5	8,01	106,75
	12,5	13,23	105,85
Glimepirida	2,5	2,73	109,07
	7,5	7,97	106,26
	12,5	12,07	96,53

*Cada valor é a média de três determinações

5.4 Aplicação analítica

Foram analisadas 20 amostras pelo método desenvolvido por HPLC-DAD, com o objetivo de verificar a presença de algum dos adulterantes avaliados no presente trabalho, além disso, buscou-se averiguar a aplicabilidade do método em amostras reais.

O *screening* das amostras não revelou a presença de metformina, glipizida, clorpropamida, gliclazida, glibenclamida ou glimepirida. Algumas amostras mostraram-se suspeitas e passaram por uma etapa de confirmação onde foi adicionado concentração conhecida de padrão a fim de observar o seu comportamento.

Na Figura 12 e 13 pode-se observar que o método estudado permite identificar e quantificar os adulterantes hipoglicêmicos sintéticos avaliados no presente trabalho. Quando se compara os dois cromatogramas, se percebe que a amostra apresenta dois picos que são suprimidos ou deslocados quando o padrão é adicionado. A quantificação dentro dos limites de 80 e 120% e a pureza do espectro, quando aplicado o DAD, confere a confiabilidade dos resultados e confirma a aplicabilidade do método para este tipo de análise.

Figura 12 – Cromatograma da amostra 06. Composição: alcachofra (*Cynara scolymus*), carqueja (*Baccharis trimera*) e pata de vaca (*Bauhinia sp.*). Condições: fase móvel ácido fosfórico 0,1% (pH 2,0) (90-0%) acetonitrila (10-100%); coluna C₁₈; 230 nm; e fluxo de 0,5 mL. min⁻¹ a 0,9 mL. min⁻¹.

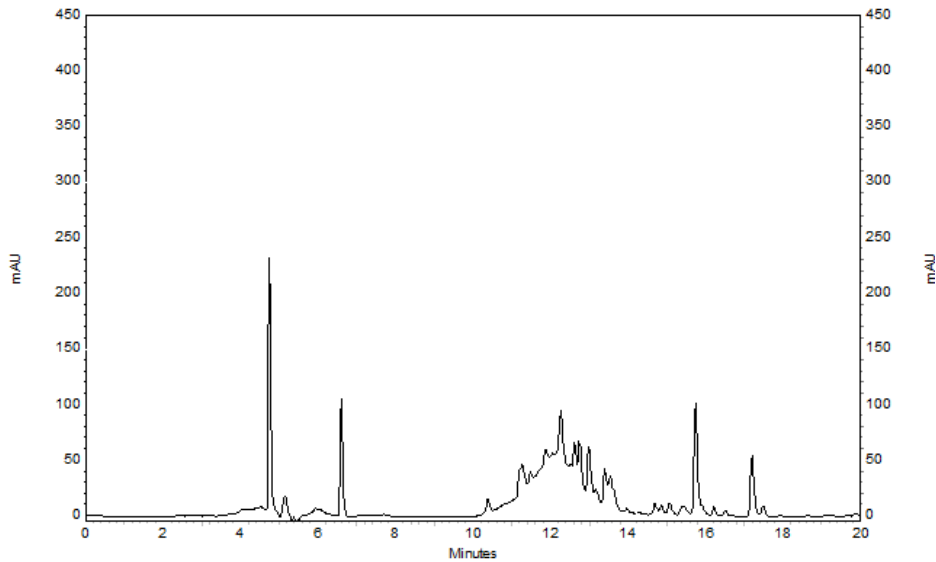
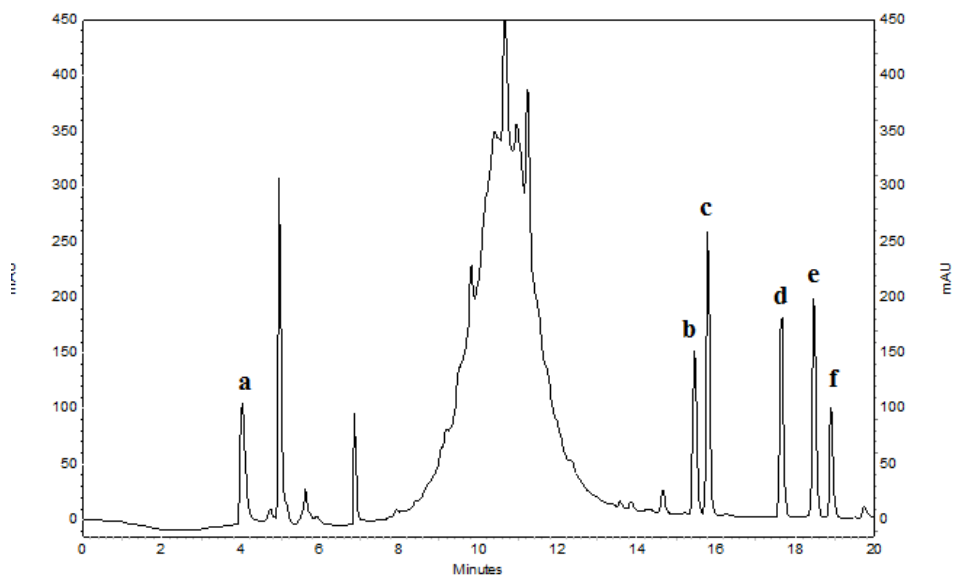


Figura 13 – Cromatograma da amostra 06 com adição de padrão. Composição: alcachofra (*Cynara scolymus*), carqueja (*Baccharis trimera*) e pata de vaca (*Bauhinia sp.*) (a) metformina, (b) glipizida, (c) clorpropamida, (d) gliclazida, (e) glibenclamida e (f) glimepirida (15 mg. L⁻¹). Condições: fase móvel ácido fosfórico 0,1% (pH 2,0) (90-0%) acetonitrila (10-100%); coluna C₁₈; 230 nm; e fluxo de 0,5 mL. min⁻¹ a 0,9 mL. min⁻¹.



6 HPLC-DAD e MEKC-UV uma análise comparativa

A MEKC-UV e a HPLC-DAD apresentam princípios de separação diferentes. A separação em eletroforese capilar é baseada na diferenciação das cargas efetivas em um fluxo denominado EOF, do inglês, *Electroosmotic flow*, que se caracteriza pelo movimento de um fluido com relação a uma superfície carregada sob ação de um campo elétrico. Já por HPLC-DAD a separação ocorre por diferença de partição entre a coluna, eluente e analito, onde o fluxo é dado por uma diferença de pressão. Porém quando se trata de moléculas neutras, ou fracamente ionizáveis, o método de escolha por eletroforese capilar é o MEKC-UV e, para isso, há a necessidade de formar micelas, que por sua vez tornam-se uma fase pseudoestacionária, tornando a separação muito semelhante ao HPLC-DAD, onde não ocorrerá somente pela carga efetiva, mas também pela diferença de partição entre micela, eletrólito e analito.

Na CE foi utilizado o SDS, tendo uma fórmula molecular muito semelhante a do octadecil sulfato de sódio (ODS), o qual está presente na coluna C₁₈.

Tanto na MEKC-UV, como na HPLC-DAD, a acetonitrila mostrou-se eficiente no desprendimento do soluto dos grupamentos silanóis, isto ocorre devido à forte atração deste solvente pela sílica, modificando o coeficiente de partição sílica-soluto, fazendo com que a separação ocorra de maneira eficiente.

Uma diferença importante destes métodos é o seu fundamento de análise, um utiliza uma bomba de pressão, outro faz uso de uma diferença de potencial. O que seria uma grande vantagem para MEKC-UV, frente à possibilidade de picos mais simétricos em um menor tempo de análise, tornou-se um vilão ao impedir a utilização de grande quantidade de solventes orgânicos.

A análise se torna mais reproduzível na HPLC-DAD devido a possibilidade e maior facilidade na utilização de solventes orgânicos, meio este onde os solutos são mais solúveis fazendo com que os picos sejam mais resolvidos. Solventes orgânicos em eletroforese capilar não são muito bem vindos, devido a sua dificuldade em conduzir energia.

Os métodos cromatográficos apresentam inúmeras desvantagens quando comparados a métodos por eletroforese capilar. Neste última, porém, não se conseguiu validar um método adequado com detecção UV por eletroforese capilar, devido à apolaridade dos compostos, e também grande semelhança entre os mesmos. Com isso deve-se adicionar uma grande

quantidade de surfactantes a fim de maximizar a separação e resolução dos picos. Logo o eletrólito torna-se muito concentrado, posto que pode estar dificultando a análise, aumentando a adsorção nas paredes do capilar e modificando a corrente a cada análise, o que dificulta a reprodução dos resultados.

A MEKC-UV mostrou-se muito melhor que o HPLC-DAD quanto a seletividade, porém devido ao caminho óptico ser bem inferior a 1cm, perde muito em sensibilidade, o que facilita como forma de confirmação do adulterante presente, devido aos muito interferentes da própria planta, facilmente detectáveis por HPLC-DAD.

Com este trabalho percebe-se que o método por MEKC-UV pode ser utilizado de maneira qualitativa na detecção de adulterantes hipoglicêmicos, precisando ser sempre confirmado por HPLC-DAD.

7 CONCLUSÕES

O método por HPLC-DAD desenvolvido mostrou-se adequado para a determinação simultânea dos fármacos metformina, glipizida, clorpropamida, glicazida, glibenclamida e glimepirida, visto que apresentou um baixo tempo de análise (20 min), baixos limites de detecção e quantificação, além de mostrar-se específico, preciso, exato e linear ($p < 0,01$), dentro do intervalo testado (2,5 – 15 mg. L⁻¹).

Já por MEKC-UV a análise não conferiu bons resultados, devido grande adsorção dos fármacos e do tensoativo nas paredes do capilar, dificultando a reprodução da análise. O caminho óptico estreito, e a semelhança entre os analitos também podem ter contribuído com a falta de reprodutibilidade do método. A análise não foi eficiente por MEKC-UV, tornando o método por HPLC-DAD o mais adequado.

Vinte amostras foram submetidas à análise pelo método HPLC-DAD. Nenhuma delas apresentou adulteração com os fármacos hipoglicêmicos estudados.

Buscando solucionar um anseio da OMS junto a Anvisa na procura por métodos analíticos capazes de detectar e quantificar possíveis fármacos adicionados ilegalmente a fitoterápicos e suplementos alimentares a base de plantas medicinais, o método proposto é eficaz e aplicável na determinação e quantificação simultânea de hipoglicêmicos (metformina, glipizida, clorpropamida, gliclazida, glibenclamida e glimepirida) em produtos de base vegetal utilizados no tratamento do diabetes.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, A. E.; RIBEIRO, M. L.; POLESE, L. Determination of anfepramone hydrochloride, fenproporex, and diazepam in so-called “natural” capsules used in treatment of obesity; **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**. v. 23, n. 1109, 2000.

ALVES, N. M. **Estudo farmacognóstico e da toxicidade experimental (aguda e subaguda) do Guatambu (*Aspidosprema subincanum* Mart.)**. 2007. 73 f. Dissertação (mestrado em ciências da saúde) - Universidade de Brasília, Brasília, 2007.

ASBAHR, A.C.C. **Obtenção e caracterização de complexos binários e ternários de finasterida**. 2008. Dissertação (mestrado em ciências farmacêuticas) – Universidade Federal do Paraná, 2008.

BOGUSZ, M.J.; TUFAIL, M.A.; HASSAN, H. How natural are “natural herbal remedies”? A Saudi perspective. **Adverse Drug Reactions and Toxicological Reviews**, v. 21, n. 219, p. 219 – 229, 2002.

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

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

BRASIL. Ministério da saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada. **RE nº 899 de 29 de maio de 2003 - Guia para validação de métodos Analíticos e Bioanalíticos**, Diário Oficial da União, 2003.

BRASIL, Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada. **RDC nº 14 de 31 de março de 2010 que dispõe sobre registro de medicamento fitoterápico**. Diário Oficial da União, 2010.

BRASIL, Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada. **RDC nº 60 de 10 de novembro de 2011 que dispõe sobre Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira, primeira edição e dá outras providências**. Diário Oficial da União, 2011.

CARDOSO, M.H.W.M.; GOUVÊA, A.V.; NÓBREGA, A.W.; ABRANTES, S.M.P. Validação de método para determinação de resíduos de agrotóxicos em tomate: uma experiência laboratorial. *Ciência e tecnologia de alimentos*, v. 30 (1), p. 63-72, 2008.

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

CARVALHO, L. M.; 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, 2011.

CERIELLO, A.; QUAGLIARO, L.; D'AMICO, M. et al. Acute hyperglycemia induces nitrotyrosine formation and apoptosis in perfused heart from rat. **Diabetes**, v. 51, n. 4, p. 1076-1082, 2002.

CERIELLO, A. New insights on oxidative stress and diabetic complications may lead to a “causal” antioxidant therapy. **Diabetes Care**, v. 26, n. 5, p. 1589-1596, 2003.

CERIELLO, A.; ESPOSITO, K.; PICONI, L. Oscillating glucose is more deleterious to endothelial function and oxidative stress than mean glucose in normal and type 2 diabetic patients. **Diabetes**, v. 57, n. 5, p. 1349 – 1354, 2008.

CHAWLA, R.; THAKURI, P.; CHOWDHRY, A.; JAISWAL, S.; SHARMA, A.; GOELI, R.; SHARMA, J.; PRIYADARSHI, S.S.; KUMAR, SMRUTI SAGAR .; SHARMA, R.K.; ARORA, R. Evidence based herbal drug standardization approach in coping with challenges of holistic management of diabetes: a dreadful lifestyle disorder of 21st century. **Journal of Diabetes & Metabolic Disorders**, v. 12, n. 35, p. 2251-6581, 2013.

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 & Contaminants: Part A**, v. 26, n. 5, p. 595-603, 2009.

CHIN LIN, M.; HEUI LIN, J.; CHING WEN, K. Detection and determination of phenphormin in Chinese medicinal capsules by GC-MS and HPLC. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 9, n. 3, 2001

CHING et al. Adulteration of herbal antidiabetic products with undeclared pharmaceuticals: a case series in Hong Kong. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 73, n. 5, p. 795-800, 2012.

CRAIG, C. R.; STITZEL, R. E. **Farmacologia moderna com aplicações clínicas**, 6ª ed., Guanabara Koogan, Rio de Janeiro – RJ, 2005.

CUI, M.; LI, N.; QIN, F.; LI, F.; XIONG, Z. Simultaneous Determination of 14 Illegal Adulterants in Chinese Proprietary Medicines Using Reversed-Phase Ion-Pair LC; **Chromatographia**, 72:1189; 2010.

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

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

ERNEST, E. Toxic heavy metals and undeclared drugs in Asian herbal medicines. **Trend in pharmacology sciences**, v. 23, n. 3, p. 136 – 139, 2002.

FARMACOPÉIA brasileira. 5. ed. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2010.

FENG, Y.; LEI, D.; HU, C. Rapid identification of illegal synthetic adulterants in herbal anti-diabetic medicines using near infrared spectroscopy. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 125, n. 5, p. 363-374, 2014.

FERREIRA, M. **Eletroforese capilar um método para determinação de hipoglicêmicos como adulterantes em formulações fitoterápicas usadas no tratamento do diabetes**. 2012. Dissertação (mestrado em ciências farmacêuticas) – Universidade Federal de Santa Maria, 2012

FOWLER, M. J. Diabetes treatment, part 2: Oral agents for glycemic management. **Diabetes Foundation**. v. 25, n. 4, p. 131 – 134, 2007.

FRIDLAND, L.E., PHILIPSON, L.H. Reactive species and early manifestation of insulin resistance in type 2 diabetes. **Diabetes, Obesity and Metabolism**, v. 8, n. 2, p. 136-145, 2006.

GOETZL L, WILKINS I. Glyburide compared to insulin for the treatment of gestational diabetes mellitus: a cost analysis. **J Perinatol**, v.22, p. 403-406, 2002.

GREBOGI, I.H. **Obtenção e Caracterização de complexos binários e ternários de dapsona**. 2009. Dissertação (mestrado em ciências farmacêuticas) – Universidade Federal do Paraná, 2009.

HANEEF, J.; SHAHARYAR, M.; HUSAIN, A.; RASHID, M.; MISHRA, R.; SIDDIQUE, N.A.; PAL, M. Analytical methods for the detection of undeclared synthetic drugs in traditionalherbal medicines as adulterants. *Drug testing and Analysis*, v. 5, p. 607 – 6013, 2013.

HARRIS, D. C. **Análise química quantitativa**, 7^a ed. LTC, Rio de Janeiro – RJ, 2011.

HEITZER, T.; SCHLINZIG, T.; KROHN, K.; MEINERTZ, T.; MÜNDEL, T. Endothelial dysfunction, oxidative stress, and risk of cardiovascular events in patients with coronary artery disease. *Circulation*, v. 104, n. 22, p. 2673-2678, 2001.

HELLMUTH E, DAMM P, MOLSTED-PEDERSEN L. Oral hypoglycaemic agents in 118 diabetic pregnancies. *Diabetes Med*, v. 17, p. 507-511, 2000.

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

ICH - International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. **Guideline on Validation of Analytical Procedure Q2B: Methodology**, 2005.

INTERNATIONAL WORKING GROUP ON THE DIABETIC Foot 2011. Disponível em: <http://www.iwgdf.org/index.php?option=com_content&task=view&id=16&Itemid=26>, acessado em: 18 out 2012

KAM, P. C. A.; LEW, S. Traditional Chinese herbal medicine and anaesthesia. *Anaesthesia*, v. 57, n. 1083, 2002.

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

KOREN G. Glyburide and fetal safety; transplacental pharmacokinetic considerations. *Reprod Toxicol*, v.15, p. 227-229, 2001.

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

LAI, E. P. C.; FENG, S.Y. Solid phase extraction – non-aqueous capillary electrophoresis for determination of metformin, phenformin and glyburide in human plasma. **Journal of Chromatography B**, v. 843, p.94 – 99, 2006

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

LANGER O, CONWAY DL, BERKUS MD, XENAKIS EM, GONZALES O. A comparison of glyburide and insulin in women with gestational diabetes mellitus. **N Engl J Med**, v. 343, p.1134-1138, 2000.

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

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

LIM, C.C.; GAN, R.; CHAN, C.L.; TAN, A.W.; KHOO, L.L.; CHIA, S.Y.; KAO, S.L.; ABISHEGANADEN, J.; SITO, Y.Y. Severe Hypoglycemia Associated with an Illegal Sexual Enhancement Product Adulterated with Glibenclamide: MR Imaging Findings. **Original Research Neuroradiology**, v. 250, n. 1, p.193 – 201.

LOW, M.Y.; ZENG, Y.; LI, L.; GE, X.W.; LEE, R.; BLOODWORTH, B.C.; KOH, H.L. Safety and quality assessment of 175 illegal sexual enhancement products seized in red-light districts in Singapore. **Drugs safety**, v. 32, n. 12, p. 1141 – 1146, 2009.

MAGANHA, C.A.; VANNI, D.G.B.S.; BERNARDINI, M.A.; ZUGAIB, M. Tratamento do diabetes melito gestacional. *Revista de Associação Médica Brasileira*, v. 49, n. 3, p. 330-334, 2003.

MARTINI, M. **Desenvolvimento de metodologia para determinação de fármacos sintéticos em formulações fitoterápicas emagrecedoras empregando eletroforese capilar**. 2010. Dissertação (mestrado em química) – Universidade Federal de Santa Maria, 2010

MERK INDEX, Merck Sharp & Dohme Corp. Whitehouse Station, N.J., U.S.A., and is licensed to The Royal Society of Chemistry for use in the U.S.A. and Canada. (acesso em 12 de agosto de 2014).

MONNIER, L.; MAS, E.; GINET, C. et al. Activation of oxidative stress by acute glucose fluctuations compared with sustained chronic hyperglycemia in patients with type 2 diabetes. **Journal of the American Medical Association**, v. 295, n. 14, p. 1681-1687, 2006.

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

NIEDOWICZ, D.M.; DALEKE, D.L. The role of oxidative stress in diabetic complications. **Cell Biochemistry and Biophysics**, v. 43, n. 2, p. 289-330, 2005.

NUÑEZ, M.; FERGUSON, J. E.; MACHACEK, D.; JACOB, G.; ODA, r. P.; LAWSON, G. M.; LANDERS, J. P. Detection of hypoglycemic drugs in human urine using micellar electrokinetic chromatography. **Analytical Chemistry**, v. 67, n. 20, 1995.

OLIVEIRA, R.; SANTOS, D.; COELHO, P. Ciclodextrinas: formação de complexos e sua aplicação farmacêutica. *Revista da faculdade de ciências da saúde*, v. 6, p. 70-83, 2009.

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

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

PASSIAGLI, M. **Toxicologia forense: teoria e prática**, 2ª ed. Millenium, Campinas – SP, 2009.

PIMENTEL, M.F.; BARROS NETO, B. Calibração: uma revisão para químicos analíticos. **Química nova**, v. 19, n. 3, p. 268-277, 1996.

PITOCCO, D.; ZACCARDI, F.; DI STASIO, E. et al. Role of asymmetric-dimethyl-l-arginine (ADMA) and nitrite/nitrate (NOx) in the pathogenesis of oxidative stress in female subjects with uncomplicated type 1 diabetes mellitus. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 86, n. 3, p. 173-176, 2009.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; MOORE, P. K. (Trad. do NASCIMENTO, A. P.); **Farmacologia**, 6^a ed., Elsevier: Rio de Janeiro, 2007.

RANG, H. P.; DALE, M. M. **Farmacologia**, 7^a ed., Elsevier: Rio de Janeiro, 2008.

RAWJEE, Y.Y.; WILLIAMS, R.L.; BUCKINGHAM, L.A.; VIGH, G. Effects of pH and hydroxypropyl (β -cyclodextrin concentration on peak resolution in the capillary electrophoretic separation of the enantiomers of weak bases. **Journal of Chromatography A**, v. 6, p. 273-282, 1994. (a)

RAWJEE, Y.Y.; WILLIAMS, R.L.; VIGH, G. Capillary electrophoretic chiral separations additives using cyclodextrin III. Peak resolution surfaces for ibuprofen and homatropine as a function of the pH and the concentration of β -cyclodextrin. **Journal of Chromatography A**, v. 680, p. 599-607, 1994. (b)

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.

SAYED, M.R.; IMAN, M.M.; DAWLAT, A.S. Biochemical changes in experimental diabetes before and after treatment with mangifera indica and psidium guava extracts. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Sciences**, v. 2, p. 29-41, 2011.

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

SILVEIRA, P. F.; BANDEIRA, M. A. M., ARRAIS, P. S. D. Farmacovigilância e reações adversas às plantas medicinais e fitoterápicas: uma realidade. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 618, 2008.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. **Epidemiologia do Diabetes**. Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes 2009. Disponível em: <http://www.diabetes.org.br/attachments/diretrizes09_final.pdf> Acesso em: 15 out 2012

SOMBRA, L. L.; GÓMEZ, M. R.; OLSINA, R.; MARTINEZ, 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, n. 989, 2005.

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

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

TAVARES, M. F. M. Mecanismos de separação em eletroforese capilar. **Química Nova**, v. 20, n. 5, p. 493-511, 1997.

THOMPSON, M.; ELLISON, S. L. R.; WOOD, R. Harmonized Guidelines for Single Laboratory Validation of Methods of Analysis (IUPAC Technical Report). *Pure and Applied Chemistry*, v. 74, n. 5, p. 835-855, 2002.

TOLEDO, A. C. O.; HIRATA, L. L.; BUFFON, M. C. M.; MIGUEL, M. D.; MIGUEL, O. G. Fitoterápicos: uma abordagem farmacotécnica. *Revista Lecta, Bragança Paulista*, v. 21, n. 1/2, 2003.

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

VIANA, C.; FERREIRA, M.; ROMERO, C.S.; BORTOLUZZI, M.R.; LIMA, F.O.; ROLIM, C.M.B.; CARVALHO, L.M. A capillary zone electrophoretic method for the determination of hypoglycemics as adulterants in herbal formulations used for the treatment of diabetes. **Analytical methods**, v. 5, p. 2126-2133, 2013.

VOGEL, A. I. **Análise química quantitativa**. 6ª ed., LTC, Rio de Janeiro, 2000.

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

WILD, S. et al. Estimates for the year 2000 and projections for 2030. **Diabetes care**. v. 27, n. 5, p. 1047-1053, 2004.

WORLD HEALTH ORGANIZATION 2012. **Traditional medicine**. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs134/en/>>, Acessado em: 10 out 2012.

YUNES, R. A.; PEDROSA, R. C. & CECHINEL FILHO, V. Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. **Química nova**, v. 24, n. 1, 2001.

ZHANG, L.; ZALEWSKI, A.; LIU, Y. et al. Diabetes-induced oxidative stress and low-grade inflammation in porcine coronary arteries. **Circulation**, v. 108, n. 4, p. 472-478, 2003.

ZHOU, Z.; ZHANG J.; ZHANG, W.; BAI, Y.; LIU, H. Rapid screening for synthetic antidiabetic drug adulteration in herbal dietary supplements using direct analysis in real time mass spectrometry. **Analyst**, n 136, p. 2613-2618, 2011.

ZHU, F.; RUAN, L.; MA, Y.; JI, W.; LIU, L. Simultaneous determination of 20 illegally added anti-diabetic chemical components in hypoglycemic and weight-reducing health foods by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Chinese Journal of Chromatography**, v. 32, n. 1, p. 13 – 20, 2014.