

VALIDAÇÃO DE TÉCNICA ANALÍTICA EM CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA COMPARATIVA PARA IDENTIFICAÇÃO DE FÁRMACOS ANOREXÍGENOS SINTÉTICOS EM PRODUTOS FITOTERÁPICOS

FLAUBERTT S. AZEREDO¹;
RENATO I. GUIMARÃES¹;
JOSÉ R. PAULA²
LUIZ C. CUNHA¹.

1. Laboratório de Análises Toxicológicas.
 2. Laboratório de Farmacognosia, – Faculdade de Farmácia / UFG – Goiânia – Goiás.
- Autor Responsável: L.C.Cunha, E-mail: lccunha@farmacia.ufg.br

INTRODUÇÃO

A obesidade, no sentido estrito, consiste num aumento das reservas lipídicas armazenadas sob a forma de triglicérides no tecido adiposo¹. Estima-se que 40 milhões de brasileiros são obesos, o que torna a obesidade um problema de saúde pública. Além disto, há uma cobrança social por uma silhueta perfeita, beirando ao insuportável, que deixa o indivíduo obeso com a auto-estima baixa e com disposição a fazer de tudo para perder peso². Dentre os vários tratamentos disponíveis, está o uso de fármacos sintéticos e produtos naturais.

Através da literatura^{3,4} e de observações pessoais, percebe-se que a automedicação com “produtos naturais” emagrecedores tem aumentado consideravelmente, nos últimos anos, visto que a população, em geral, acredita que estes medicamentos não trarão danos a saúde. Corrobora com esta crença, a existência de propaganda enganosa das indústrias que visam ao lucro sem se preocupar com a saúde pública. No entanto, conforme resultados obtidos por pesquisas, muitos produtos vendidos como “naturais” mostram a adição, não declarada nas formulações, de substâncias anorexígenas sintéticas e coadjuvantes (benzodiazepínicos, antidepressivos)^{5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15} acometendo, inclusive, produtos chineses tradicionais^{16,17}.

Dentre os grupos de fármacos antiobesidade comercializados, no Brasil, (cartáticos/laxantes, hormônios, produtos natu-

rais, anestésicos locais e aminas simpatomiméticas), este último (fármacos anorexígenos sintéticos) estão frequentemente envolvidas em abuso e, além de serem responsáveis pelos efeitos anorexígenos miraculosos das formulações para emagrecer, possuem restrições e contra-indicações de uso, podendo levar à tolerância, dependência química e síndrome de abstinência^{18,19}.

Há vários métodos e técnicas analíticas para identificação de substâncias, os quais são escolhidos avaliando desde fatores referentes à substância (propriedades químicas, físicas e biológicas) como também do método (disponibilidade, simplicidade, viabilidade financeira, adequação técnica, dentre outros).

O método preferido para estudar a adulteração de fitoterápicos emagrecedores por fármacos anorexígenos e coadjuvantes (benzodiazepínicos, diuréticos) é a cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC) por ser mais rápida, robusta, abrangente, de baixo custo e que vem auxiliando na identificação dos grupos de substâncias supracitados desde 1960¹⁴. Isto porque serve para triagem e, às vezes, para confirmação, já que os fármacos anorexígenos apresentam-se, geralmente, na ordem de miligramas.

Sabendo dos efeitos indesejados já descritos que tais adulterantes podem causar e da necessidade de alertar toda a sociedade sobre os perigos advindos do uso e abuso de substâncias psicoativas nas formulações para emagrecimento, resolveu-se padronizar técnica analítica em CCDC para possibilitar o estudo da inci-

dência da presença de adulterantes sintéticos em produtos fitoterápicos emagrecedores.

METODOLOGIA

A análise cromatográfica dos fármacos anorexígenos sintéticos e dos fitoterápicos baseou-se na metodologia clássica de CCDC descrita por MORAES, 1991²⁰ com adaptação. Para garantir a performance do método, realizaram-se análises cromatográficas do fármaco sintético, do fitofármaco de referência, da associação de fitofármacos e da associação de fármaco sintético com fitofármacos. Utilizaram-se, como parâmetros de avaliação, a comparação do Rf e da cor desenvolvida na seqüência de reveladores entre o fitoterápico e os padrões de fármacos sintéticos analisados concomitantemente.

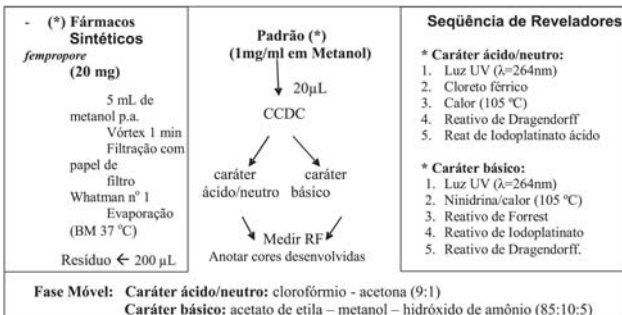


Figura 1: Cromatografia dos fármacos sintéticos (padrões).

Para a análise cromatográfica dos fármacos sintéticos (femproporex, mazindol, dietilpropiona, fenfluramina, furosemida, fluoxetina, benzocaína, diazepam, midazolam, flurazepam, bromazepam, nitrazepam, clordiazepóxido, cafeína), cedidos gentilmente por indústrias fabricantes com certificado de pureza, submeteu-se 20 µL da solução padrão de 1 mg/mL em metanol à CCDC para fármacos de caráter básico (anorexígenos sintéticos) e de caráter ácido/neuro (benzodiazepínicos), conforme Figura 1. A sibutramina (Plenty®, Medley e Reductil®, Abbott) não foi analisada por estar indisponível no mercado (indústrias e farmácias de manipulação) à época da pesquisa.

Os fitoterápicos de referência foram, primeiramente, extraídos com metanol (20 mg da substância com 5 mL de metanol). Após evaporação, adicionou 0,2 mL de metanol ao resíduo para realização da CCDC tanto para fármaco de caráter ácido/neuro quanto para de caráter básico, conforme a Figura 2.

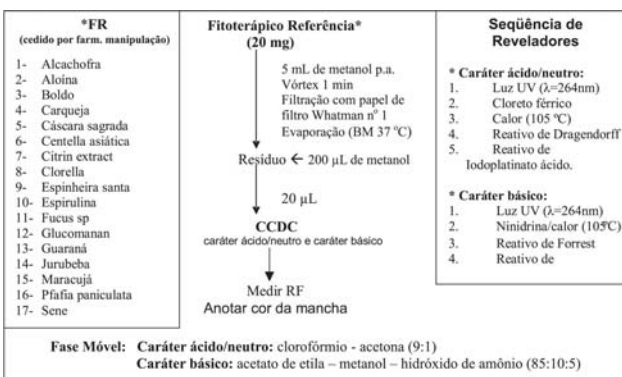


Figura 2: Cromatografia dos fitofármacos de referência.

Os fitoterápicos de referência utilizados foram cedidos por uma farmácia de manipulação, conceituada com ISO 9002 e s., eles: alcachofra (*Cynara scolymus*), aloína (*Aloe vera*), boldo (*Peumus boldus* Mol.), carqueja (*Baccharis* sp), cáscara sagrada (*Rhamnus purshiana*), *Centella asiatica*, citrin extract (*Garcinia* sp), clorella

(*Chorella pyrenoidosa*), espinheira santa (*Maytenus ilicifolia*), espirulina (*Spirulina maxima*), *Fucus* sp., guaraná (*Paullinia cupana*), ginseng falso (*Pfaffia paniculata*), glucomanan (*Amorphophallus konjac*), jurubeba (*Solanum paniculatum*), maracujá (*Passiflora alata*) e sene (*Cassia angustifolia*).

Os resultados (Rf e cores desenvolvidas) dos fitoterápicos de referência foram comparados com os dos padrões anorexígenos para verificar possíveis interferências (tais como sobreposição de substâncias com Rf's idênticos ou similares e alteração da cor da mancha) que podem ocorrer na análise dos produtos ditos naturais. Assim, foram analisados cromatograficamente, conforme procedimento já descrito, mistura contendo fitoterápicos de referência e fármacos sintéticos padrões cujos resultados pudessem sofrer interferência.

As placas cromatográficas utilizadas foram confeccionadas em suporte de vidro 20x20 cm, com espessura de 0,5mm de sílica gel G60 (Merck). Para tal, preparou-se uma emulsão com 40 g de sílica, 80 mL de água destilada e 0,5 mL de etanol 96 GL que foi aplicada sobre 6 placas de vidro. Estas foram secadas a temperatura ambiente e, antes do uso, foram ativadas por 1 hora a 110 °C. A corrida cromatográfica em cuba cromatográfica DESAGA[®] foi padronizada em 10 cm.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados cromatográficos (Rf e cor desenvolvida) dos fármacos, tanto para os de caráter ácido/neuro como para os de caráter básico, estão dispostos nas tabelas 1 e 2. Foram feitas repetições da CCDC para os fármacos sintéticos (n=10, para os de caráter básico e n=8, para os de caráter ácido/neuro) o que possibilitou a obtenção de Rf mediano e da cor desenvolvida

Tabela 1. Valores de Rf e cor desenvolvida por revelador dos fármacos de caráter básico (Mediana, N = 10).

Fármaco	Reveladores				
	Luz UV	Ninidrina/Calor	R. Forrest	R. Iodoplatinato	R. Dragendorff
furosemida	0,13 azul	0,11 rosa	0,11 vermelha	-	-
fluoxetina	-	0,51 roxa	-	0,51 branca	0,51 branca
fenfluramina	-	0,58 roxa	-	-	-
mazindol	-	0,77 vermelha	-	-	-
dietilpropiona	0,96 marrom	0,96 amarela	0,96 laranja	0,96 rosa	0,96 laranja
femproporex	-	0,95 roxa	-	-	-
benzocaína	0,96 amarela	0,96 vermelha	-	-	-

Tabela 2. Valores de Rf e cor desenvolvida por revelador de fármacos de caráter ácido/neutro (Mediana, N=8)

Fármaco	REVELADORES				
	Luz U.V.	Cloreto férrico	Calor	R. Dragendorff	R. Iodoplatinato ácido
bromazepam	0,20 azul	-	-	0,20 marrom	0,20 roxa
cafeína	-	-	-	0,45 marrom	0,45 roxa
clordiazepóxido	-	-	-	0,14 marrom	0,14 roxa
diazepam	0,75 incolor	-	-	0,75 marrom	0,75 roxa
furosemida	-	0,04 castanha	0,04 Cinza	0,04 cinza	0,04 cinza
flurazepam	-	-	-	0,10 marrom	0,10 marrom
midazolam	-	-	-	0,25 marrom	0,25 roxa
nitrazepam	0,54 marrom	-	-	0,54 marrom	0,54 roxa

Apesar de alguns valores de Rf serem iguais (anfepramona e benzocaína) ou bastante aproximados (anfepramona, benzocaína e mazindol), a identificação destas substâncias foi possível devido à diferença nas cores da mancha apresentada em cada revelador e/ou na seqüência de reveladores utilizados.

Para fazer a diferenciação de resultados, foram analisados os Rfs associados à coloração das manchas desenvolvidas nos respectivos reveladores, devendo haver coincidência de resultados em toda a seqüência de reveladores. Por isso, não se fez comparação específica entre produtos naturais e padrões sintéticos que apresentaram discrepância de resultados, ou que desenvolveram manchas de cores diferentes nos mesmos reveladores, mesmo que obtivessem o mesmo Rf.

Durante as comparações de resultados, levou-se em consideração apenas os fitoterápicos de referência que apresentaram resultados próximos aos dos padrões de fármacos sintéticos. Nestes casos, foram feitas novas aplicações comparativas visando à identificação precisa, procedimento não descrito por outros trabalhos que utilizaram a cromatografia em camada delgada^{10,14}. Apesar de alguns fitofármacos (carqueja, guaraná, espinheira santa, espirulina, aloína, cáscara sagrada) terem apresentados Rfs próximos aos de fármacos sintéticos (mazindol, dietilpropiona, furosemida, fluoxetina, midazolam, nitrazepam e bromazepam) não ocorreu interferência analítica apreciável, já que as manchas dos fitoterápicos não possuem comportamento igual a dos padrões sintéticos frente à seqüência de reveladores.

Por fim, primou-se por escolher técnica simples, rápida e de baixo custo que possa ser utilizada em outros laboratórios com o objetivo de auxiliar na triagem de adulteração de fitoterápicos emagrecedores, visto que a maioria dos outros trabalhos utilizou técnicas mais dispendiosas como espectrofotometria UV/Vis¹¹, cromatografia líquida de alta eficiência¹⁵, cromatografia gasosa^{8,17} e eletroforese capilar¹⁶.

A adaptação da técnica analítica para extração de padrões fitoterápicos e de "produtos naturais" com uso do metanol mostrou-se adequada, visto que o objetivo era analisar a interferência de substâncias presentes nestes produtos com os padrões de fármacos sintéticos solúveis em metanol.

CONCLUSÃO

A técnica em CCDC mostrou-se reprodutível, robusta,

abrangente, precisa e de fácil execução, sendo adequada para procedimentos de triagem de adulteração de produtos naturais por fármacos sintéticos. A interferência dos fitofármacos na análise dos fármacos sintéticos é desprezível e, uma vez suspeita, deve-se buscar confirmação por outras técnicas e/ou outros métodos de análise – incluindo cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e cromatografia gasosa (CG).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDREOLLI, R.S., CASTRO, R.C., MENDES, R.A. Obesidade. *Racine*, São Paulo, v.57, p. 38-47, 2000.
- ZACHÉ, J., CASTELLAN, L., BOCK, L. Medidas extremas. *ISTOÉ*. São Paulo : Três, ed. 1621, p. 116-122, 25 out. 2000.
- CFE A selva dos fitoterápicos. Brasília. *Infarma*. v. 6, n. 3/4, p. 17-19, 1997.
- VALLADÃO, M. L. F, LISBOA, S. M. Cápsulas para emagrecer: uma abordagem legal. *Infarma*, Brasília, v. 1, n. 1, p. 17-19, 1992.
- CUNHA *et al*, 1999
- ALMEIDA, A.E., RIBEIRO, M.L. Agentes anorexígenos: aspectos químico-farmacológicos e perspectivas. *Revista Brasileira de Farmácia*, Rio de Janeiro, v. 79, n. 3/4, p. 62-64, 1998.
- CHASIN, A.A.M. *et al*. Validação de métodos em análises toxicológicas: uma abordagem geral. *Revista Brasileira de Toxicologia*. São Paulo, v. 11, n. 1, p. 1-6, jul./1998.
- LUCAS, T.S., KOLBERG, K., THIESEN, F.V. Análise de Medicamentos não empregados sob prescrição média por cromatografia a gás com coluna megabore. *Rev. Bras. Toxicologia*. São Paulo : SBTOX, v. 10, n. 2, p. 104, 1997 (supl.).
- PERLINGEIRO, R., BINCOLETTO, C *et al*. Determinação de anorexígenos, benzodiazepínicos e diuréticos em formulações comercializadas como "naturais". *Rev. Bras. Toxicologia*. São Paulo : SBTOX, v. 10, n. 2, p. 98, 1997 (supl.).
- SANTOS, P.D., GALVÃO, J.F, LUCAS, A.C.S. Identificação de compostos anfetamínicos em preparações para emagrecer, à base de plantas, produzidas e/ou comercializadas na cidade de Manaus-AM. *Rev. Bras. Toxicologia*, São Paulo : SBTOX, v.10, n.2, p.91, 1997 (supl.).
- CHAVES, M.A., KATUKA, A.S., TRUJILLO, L.M. Dietilpropiona, femproporex, diazepam e fenflftaleína: determinação em formulações para emagrecimento. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*. Rio de Janeiro, v. 54, n. 1, p. 36-43, 1994
- NAPPO, S.A.; CARLINI, E.A. Revisão: Medicamentos anorexígenos. *Infarma*, Brasília: CFE, v. 2, p. 6-9, set./out. 1993.
- NAPPO, S.A. Consumo de anorexígenos tipo-anfetaminas (dietilpropiona, fenproporex, mazindol) e de fenfluramina no Brasil: prejuízo ou benefício para a Saúde. *Jornal Brasileiro de Psiquiatria*, São Paulo : ECN, v. 41, n. 8, p. 417-421, set. 1992.
- AURICCHIO, M.T, ATISTIC, M.A., MARKMAN, B.E.O. Detecção de anorexígenos e benzodiazepínicos em formulações "naturais" empregadas em regimes de emagrecimento. *Revista Instituto Adolfo Lutz*, Rio de Janeiro, v. 51, n. 1/2, p. 105-110, 1991.
- ALMEIDA, A.E., RIBEIRO, M.L. High-performance liquid chromatographic determination of amfepramone hydrochloride, mazindol, and diazepam in tablets. *Journal of Liquid Chromatography and related Technologies*, v.22, n.11, p. 1759-69, 1999.
- RAY, K.Y., Shiun, C.Y. *et al*. Analysis and confirmation of synthetic anorexics in adulterated traditional Chinese medicines by high-performance capillary eletroforesis. *Journal of Chromatography-A*. v. 848, n. 1-2, p. 537-5432, 1999.
- CHANG, T.M., JER, T.M. *et al*. GC/MS analysis on anorexics adulterated in traditional Chinese medicines. *Journal of Food and Drug Analysis*. V. 8, n. 4, p. 315-30, 2000.
- KOROLKOVAS, A., BURKHALTER, J.H. *Química Farmacêutica*. Rio de Janeiro: Guanabara Dois, 1982
- HARDMAN, J.G. & LIMBIRD, L.E. *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 9th ed., p. 1905, McGraw Hill, New York-USA, 1996.
- MORAES, E.C.F *et al*. *Manual de Toxicologia Analítica*. São Paulo : Roca, 1991. p. 229.