

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA

CRISTINA LENHARDT KAEFER

**SINEFRINA: DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO INDICATIVO
DA ESTABILIDADE E AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE EM EXTRATO SECO DE
Citrus aurantium L.**

Uruguiana

2014

CRISTINA LENHARDT KAEFER

**SINEFRINA: DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO INDICATIVO
DA ESTABILIDADE E AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE EM EXTRATO SECO DE
Citrus aurantium L.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação *Stricto sensu* em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Donadel Malesuik

Uruguiana

2014

CRISTINA LENHARDT KAEFER

**SINEFRINA: DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO INDICATIVO
DA ESTABILIDADE E AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE EM EXTRATO SECO DE
*Citrus aurantium L.***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação *Stricto sensu* em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Área de concentração: Desenvolvimento e controle de qualidade de fármacos, medicamentos e cosméticos.

Dissertação defendida e aprovada em: 21 de julho de 2014
Banca examinadora:

Prof. Dr. Marcelo Donadel Malesuik
Orientador
UNIPAMPA

Prof. Dr^a. Carine Viana Silva
UFSM

Prof. Dr. Clésio Soldateli Paim
UNIPAMPA

Dedico este trabalho à minha família.

AGRADECIMENTO

A Deus pela vida e proteção.

A minha família pelo constante incentivo, apoio e exemplos de vida.

Ao professor Dr. Marcelo Donadel Malesuik pela valiosa orientação, confiança, incentivo e amizade, pelo crescimento intelectual, aprimoramento científico e exemplo de profissionalismo.

A professora Dr^a. Carine Viana Silva e professor Dr. Clésio Soldateli Paim pela participação como banca examinadora e contribuições durante a elaboração deste trabalho.

Aos professores do Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

Aos colegas de laboratório, pela convivência, amizade, colaboração e momentos de descontração, em especial a colega Fernanda Macke Hellwig e ao bolsista de iniciação científica Rafael Henrique Dias, pelo auxílio em diversas etapas desta dissertação.

Ao professor Dr. Michel Mansur Machado e a colega Camila Martins Güz pela disponibilidade e auxílio na realização dos estudos de toxicidade.

A CAPES pelo incentivo financeiro.

A todos que de alguma forma contribuíram na realização deste trabalho.

RESUMO

A incidência de sobrepeso e obesidade na população em geral vem revelando-se um grave problema de saúde pública. Este fato, aliado aos parâmetros atuais de beleza, que prezam pela magreza, geram uma busca desenfreada por formulações “naturais” que contenham substâncias ditas emagrecedoras. Nesse sentido, o *Citrus aurantium*, conhecido popularmente como laranja amarga, está sendo amplamente utilizado. No entanto, até o momento não existem métodos indicativos da estabilidade para o controle de qualidade desses produtos e estudos da estabilidade do seu marcador, a sinefrina. Portanto, o presente trabalho tem como objetivo desenvolver e validar método indicativo da estabilidade, realizar estudo preliminar da estabilidade e verificar a toxicidade da sinefrina na presença dos produtos de degradação formados em condições fotolíticas. O método indicativo de estabilidade foi desenvolvido por CLAE-DAD para determinação de sinefrina em extrato seco de *Citrus aurantium*. A separação cromatográfica utilizou coluna C18 (250 x 4,6 mm, 5 μ m), fase móvel composta por acetonitrila : ácido ortofosfórico 0,01% (pH 3,0) na proporção 15:85, vazão de 1 mL min⁻¹ e detecção em 220 nm. A resposta do detector foi linear, na faixa de 7,5 a 45 μ g mL⁻¹. A especificidade do método e a capacidade indicativa de estabilidade foram confirmadas utilizando degradação forçada, em condições ácidas, básicas, oxidativas e fotolíticas. Tanto a sinefrina como o extrato demonstraram ser susceptível a degradação em todas as condições testadas. A precisão intradia demonstrou valores de DPR menores que 1,77% e a precisão interdica DPR de 2,48%. A recuperação média, no teste de exatidão, foi de 102,03%. A cinética de fotodegradação foi calculada, para ambas as amostras, sinefrina e extrato, através da concentração do fármaco em função do tempo. A degradação da sinefrina SQR dissolvida em acetonitrila seguiu cinética de segunda ordem, enquanto que o extrato de *Citrus aurantium* demonstrou cinética de primeira ordem. O estudo toxicológico da sinefrina na presença dos produtos de degradação formados foi realizado. Os resultados indicam que as amostras não apresentaram efeito mutagênico, mas causaram dano ao DNA e diminuição da viabilidade celular. Os dados obtidos colaboram com os estudos na área e podem ser utilizados como subsídios para elaboração de preparações farmacêuticas ou suplementos alimentares a base dessa substância.

Palavras-chave: *Citrus aurantium*, sinefrina, degradação, validação, estabilidade, toxicidade.

ABSTRACT

Synephrine: Development and validation of a stability indicating method and preliminary stability study in *Citrus aurantium L.* dry extract

The incidence of overweight and obesity in the general population is proving to be a serious public health problem. This fact, coupled with existing parameters of beauty, which consider the thinness, generate an unbridled pursuit for "natural" formulations which contains substances called slimming. In this sense, *Citrus aurantium*, popularly known as bitter orange, it is being widely used. However, so far there are no methods for quality control of these products and stability studies of its marker, synephrine. Therefore, this study aims to develop and validate the stability indicating method, perform a stability preliminary study and the toxicity of synephrine and photolytic degradation products formed. Stability indicating method was developed by HPLC - PDA for determination of synephrine in *Citrus aurantium* dry extract. The chromatographic separation used C18 (250 x 4.6 mm, 5 μ m) column and a mobile phase consisting of acetonitrile: 0.01% orthophosphoric acid (pH 3.0) in the ratio 15:85, flow rate 1 mL min⁻¹ and detection at 220 nm. The detector response was linear in the range 7.5-45 mg mL⁻¹. The specificity and stability indicating capability were confirmed using forced degradation under conditions of acidic, basic, oxidative and photolytic. Both the extract and synephrine shown to be susceptible to degradation in all conditions tested. Intraday precision shown RSD values lower than 1.77% and interday precision of 2.48% RSD. The average recovery accuracy of the test was 102.03%. The photodegradation kinetics was calculated for both samples, through the concentration of the drug in function of time. The degradation of synephrine SQR diluted in acetonitrile followed second-order kinetics, while the extract of *Citrus aurantium* showed first-order kinetics. The toxicological study of synephrine in the presence of degradation products formed was performed. The results indicate that the samples showed no mutagenic effect, but its highest concentration showed DNA damage and decreased the cell viability. Data obtained collaborate with studies in the area and can be used as input for the preparation of pharmaceutical preparations or dietary supplements that the base substance.

Keywords: *Citrus aurantium*, synephrine, degradation, validation, stability, toxicity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Fruto verde (a) e maduro (b) de <i>Citrus aurantium</i> L.	16
Figura 2 – Estrutura química de componentes com estrutura similar à sinefrina	17
Figura 3 – Estrutura química da epinefrina e seus respectivos produtos de degradação	27
Figura 4 - Representação gráfica da curva padrão de sinefrina por CLAE	41
Figura 5 - (A) Cromatograma típico da solução padrão de sinefrina 30,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$; (B) degradação ácida ($\text{HCl } 1 \text{ mol L}^{-1}$, 4 h) e produto de degradação (PD1b); (C) degradação alcalina ($\text{NaOH } 5 \text{ mol L}^{-1}$, 6 h) e produtos de degradação (PD1c, PD2c, PD3c e PD4c); (D) degradação oxidativa (H_2O_2 10%, 48 h) e produtos de degradação (PD1d, PD2d e PD3d); (E) fodegradação (UVC-254 nm, 1 h) e produtos de degradação (PD1e, PD2e, PD3e, PD4e e PD5e)	43
Figura 6 - (A) Cromatograma típico da sinefrina 30,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ em extrato de <i>Citrus aurantium</i> ; (B) degradação ácida ($\text{HCl } 1 \text{ mol L}^{-1}$, 5 h) e produtos de degradação (PE1b e PE2b); (C) degradação alcalina ($\text{NaOH } 5 \text{ mol L}^{-1}$, 6 h) e produtos de degradação (PE1c, PE2c, PE3c e PE4c); (D) degradação oxidativa (H_2O_2 30%, 72 h) e produto de degradação (PE1d); (E) fotodegradação (UVC-254 nm, 20 h) e produtos de degradação (PE1e, PE2e e PE3e)	45
Figura 7 - Gráficos de concentração (reação de ordem zero - A), log de concentração (reação de primeira ordem - B) e inverso de concentração (reação de segunda ordem - C) de sinefrina (SQR) remanescente em função do tempo	50
Figura 8 - Gráficos de concentração (reação de ordem zero - A), log de concentração (reação de primeira ordem - B) e inverso de concentração (reação de segunda ordem - C) de sinefrina remanescente, no extrato de <i>Citrus aurantium</i> , em função do tempo	51
Figura 9 - Efeitos da sinefrina na proliferação celular de culturas de leucócitos	53
Figura 10 - Viabilidade celular de leucócitos medido pelo corante azul de Trypan, após exposição a diferentes concentrações de sinefrina.....	53
Figura 11 - Ensaio Cometa: índice de danos ao DNA de células expostas a diferentes concentrações de sinefrina	54
Figura 12 - Efeitos da sinefrina na produção de micronúcleos em culturas de células.....	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Condições analíticas utilizadas por alguns autores para determinação de sinefrina em espécies de <i>Citrus</i> , suplementos e amostras biológicas por cromatografia líquida	20
Tabela 2 - Condições cromatográficas definidas para identificação de sinefrina por CLAE..	40
Tabela 3 - Precisão intra e interdia da determinação de sinefrina em extrato seco	47
Tabela 4 - Resultados do teste de recuperação de sinefrina em extrato seco por CLAE	47
Tabela 5 - Resultados obtidos no teste de robustez da sinefrina	48
Tabela 6 - Cinética de fotodegradação da sinefrina e extrato seco de <i>Citrus aurantium</i> em solução exposta a lâmpada UVC 254 nm	49
Tabela 7 - Constante de velocidade de degradação (k), meia-vida ($t_{1/2}$) e t_{90} para sinefrina e extrato de <i>Citrus aurantium</i> submetidas à fotodegradação	52

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACN - Acetonitrila

APCI - Ionização química a pressão atmosférica

CG-MS - Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas

CLAE - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

DAD - detector de arranjo de diodos

DNA - Ácido desoxirribonucleico

DPR - Desvio Padrão Relativo

EC - Eletroforese capilar

ESI - Ionização por electrospray

ESI-MS - Espectrometria de massas com ionização por eletrospray

FDA - Food and Drug Administration

h - Hora

H₂O₂ - Peróxido de hidrogênio

H₃PO₄ - Ácido fosfórico

HCl - Ácido clorídrico

ICH - International Conference on Harmonisation

ID - Índice de Dano

LC-MS - Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas

min - Minutos

MS - Ministério da Saúde

NaH₂PO₄ - Fostato de sódio monobásico

NaOH - Hidróxido de sódio

nm - Nanômetro

PBS - Tampão fosfato salino

PD - Produto de degradação

PHA - Fitohemaglutinina

r - Coeficiente de correlação

RDC – Resolução da Diretoria Colegiada

RE - Resolução

RPM - Rotações por minuto

SC - Suspensão de células

SQR - Substância Química de Referência

SVS - Secretaria de Vigilância em Saúde

TFA - Ácido trifluoroacético

USP - United States Pharmacopeia

UV – Ultravioleta

v/v - Volume/volume

W - Watts

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 OBJETIVOS	15
2.1 Objetivo Geral	15
2.2 Objetivos Específicos	15
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
3.1 <i>Citrus aurantium</i> e sinefrina como adjuvante na perda de peso	16
3.2 Determinação quantitativa	18
3.3 Validação de métodos analíticos.....	22
3.4 Estabilidade de produtos farmacêuticos.....	23
3.5 Degradação forçada.....	25
3.6 Cinética química.....	27
3.7 Estudo de toxicidade	29
4 MATERIAL E MÉTODOS	31
4.1 Produtos químicos	31
4.1.1 Padrão	31
4.1.2 Amostra	31
4.2 Desenvolvimento de método cromatográfico	31
4.2.1 Preparo da solução padrão	31
4.2.2 Preparo da solução amostra	31
4.2.3 Preparo da fase móvel	32
4.3 Validação do método	32
4.3.1 Linearidade	32
4.3.2 Especificidade	33
4.3.2.1 Degradação da SQR de sinefrina	33
4.3.2.2 Degradação do extrato de <i>Citrus aurantium</i>	34
4.3.3 Precisão	34
4.3.4 Exatidão	35
4.3.5 Robustez	35
4.4 Estudo da cinética de fotodegradação	35
4.4.1 Preparo da solução padrão	35
4.4.2 Preparo da solução amostra	35
4.4.3 Determinação da cinética de degradação	36

4.5 Ensaio de toxicidade	36
4.5.1 Preparo das soluções de sinefrina	36
4.5.2 Preparo da suspensão de células (SC).....	37
4.5.3 Preparo dos grupos	37
4.5.4 Testes toxicológicos	38
4.5.5 Análise estatística	38
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
5.1 Desenvolvimento e otimização do método por CLAE.....	39
5.2 Validação do método	40
5.2.1 Linearidade	40
5.2.2 Especificidade	41
5.2.2.1 Degradação da SQR de sinefrina	41
5.2.2.2 Degradação do extrato de <i>Citrus aurantium</i>	44
5.2.3 Precisão	46
5.2.4 Exatidão	47
5.2.5 Robustez	47
5.3 Cinética de degradação	48
5.4 Ensaio de toxicidade	52
6 CONCLUSÃO	56
REFERÊNCIAS	57

1 INTRODUÇÃO

A incidência de sobrepeso e obesidade vem revelando-se um grave problema de saúde pública e, aliado ao culto social à magreza, gera uma busca desenfreada por formulações que contenham substâncias consideradas emagrecedoras (FLASO, 1999; SCHMITT, 2012; WHO, 2007).

Neste contexto, produtos comercializados como “naturais” são muito populares para o emagrecimento e esta escolha justifica-se por se acreditar que os mesmos não apresentam efeitos colaterais e ou danos à saúde. Essa crença contribui para o aumento da aquisição de suplementos alimentares e compostos emagrecedores a base de extratos vegetais (SCHMITT, 2012).

Os alcaloides da *Ephedra sp*, principalmente a efedrina, costumavam ser largamente utilizados em produtos dietéticos para a promoção do emagrecimento, porém em 2004 o Food and Drug Administration (FDA) proibiu a venda de suplementos alimentares contendo efedrina devido ao seu risco cardiovascular e cerebral (HALLER; BENOWITZ, 2000; ROSSATO et al., 2011). Desta forma, a sinefrina, uma amina adrenérgica presente em plantas do gênero *Citrus sp*, rapidamente se tornou o principal substituto da efedrina nestes produtos devido à similaridade estrutural química e, possivelmente, apresentar os mesmos efeitos emagrecedores (FUGH-BERMAN; MYERS, 2004; ROSSATO, 2009).

A grande maioria destes produtos é comercializada informalmente na forma de chás, produtos alimentícios isentos ou produtos manipulados. No entanto, o maior problema relacionado a estes produtos está na falta de padronização e no deficiente controle de qualidade, tanto do extrato utilizado, como do produto final. Fatos que comprometem diretamente a garantia da sua composição química, teor de princípio ativo, segurança e eficácia, refletindo em prejuízo terapêutico à população, além de potencial toxicológico (CALIXTO, 2000; HAAZ et al., 2006).

Apesar do crescente aumento do uso dos fitoterápicos em todo o mundo, são poucos os que foram validados cientificamente, visando à garantia da qualidade, a comprovação da eficácia clínica e à avaliação de sua segurança e, por consequência, inseridos em códigos oficiais (SIANI, 2003). Até o presente, o *Citrus aurantium* não possui monografia em nenhuma Farmacopéia. Alguns trabalhos já propuseram a determinação da sinefrina e aminas correlatas em amostras de *Citrus aurantium* e suplementos alimentares (ARBO et al., 2008; MARCHEI et al., 2006; PELLATI et al., 2002; PELLATI; BENVENUTI, 2007b; SLEZAK et al., 2007; UCKOO et al., 2011; VIANA et al., 2013). No entanto, até o momento, verificou-se

a inexistência de estudos publicados na literatura que contemplem o desenvolvimento de métodos indicativos da estabilidade, estudos que relatam a estabilidade da sinefrina em condições forçadas de armazenamento, sua cinética de reação, ou ainda, estudos de toxicidade dos produtos de degradação.

Considerando que os extratos de plantas medicinais podem ser empregados como matéria-prima para o desenvolvimento de diferentes preparações farmacêuticas e/ou suplementos alimentares, é de suma importância o desenvolvimento de métodos indicativos da estabilidade para o controle de qualidade desses produtos, a avaliação da estabilidade frente a diferentes condições de armazenamento e a toxicidade da sinefrina na presença dos prováveis produtos de degradação formados em condições fotolíticas. Esses estudos podem vir a contribuir para o desenvolvimento de preparações a base dessas substâncias, colaborando com a segurança e eficácia terapêutica destes produtos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

- Desenvolver e validar método indicativo da estabilidade da sinefrina em extrato seco de *Citrus aurantium* e avaliar perfil toxicológico da sinefrina.

2.2 Objetivos Específicos

- Desenvolver e validar técnica cromatográfica indicativa da estabilidade por CLAE para determinação de sinefrina em extrato seco de *Citrus aurantium*;
- Avaliar a estabilidade da sinefrina, substância química de referência, e em extrato seco de *Citrus aurantium*, com estudo do perfil de degradação em diferentes condições de luz, pH e oxidação;
- Determinar a cinética de fotodegradação da sinefrina substância química de referência e em extrato seco de *Citrus aurantium*;
- Realizar estudo toxicológico da sinefrina na presença dos produtos de degradação formados, através da análise da viabilidade e proliferação celular, ensaio cometa e teste do micronúcleo.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 *Citrus aurantium* e sinefrina como adjuvante na perda de peso

Citrus aurantium L., conhecido popularmente como laranja amarga, é uma árvore de pequeno porte, com frutos do tipo baga, casca rugosa e muitas sementes (Figura 1). Pertencente à família Rutaceae, nativa do sudoeste asiático, é atualmente cultivada em pomares de todo o Brasil (FUGH-BERMAN; MYERS, 2004; HARRI; MATOS, 2002; MARCHEI et al., 2006).

Figura 1 – Fruto verde (a) e maduro (b) de *Citrus aurantium* L.



(a)



(b)

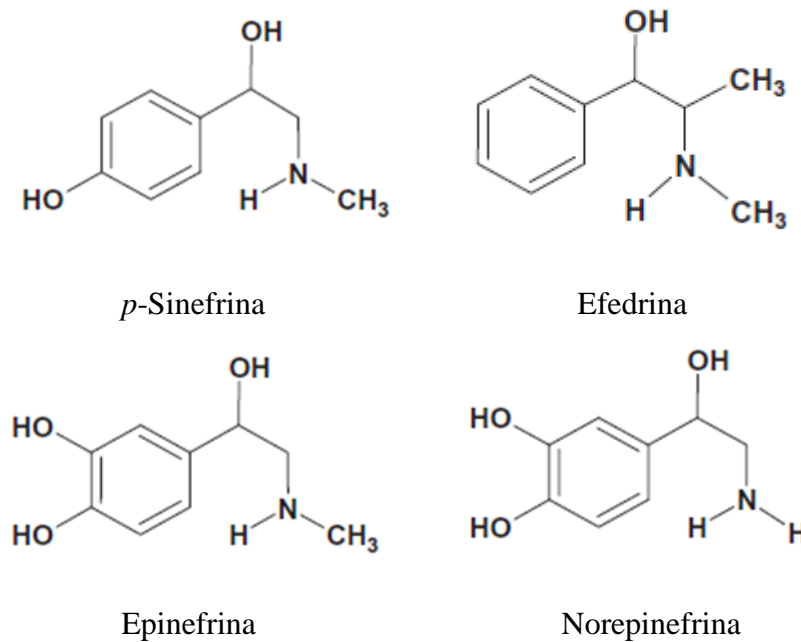
Fonte: ANDRADE, 2008

A sinefrina é obtida principalmente da casca do fruto do *Citrus aurantium*. Estudos mais recentes relatam que a mesma também pode ser encontrada nas folhas e flores, inclusive em sucos (ARBO et al., 2008). A presença desta amina em frutos imaturos de *Citrus aurantium* coletados na região de Porto Alegre varia de 0,041 a 0,048%, sendo que estas concentrações diminuem com o aumento do diâmetro do fruto. Este perfil pode ser atribuído ao nível mais elevado de sinefrina na casca, o que diminui com o amadurecimento dos frutos, enquanto que as folhas apresentaram cerca de 0,006% de sinefrina (ARBO et al., 2008). A casca contém, também, furanocumarinas e flavonoides como o limoneno, a hesperidina, neohesperidina, naringina e tangaretina (FUGH-BERMAN; MYERS, 2004).

Estruturalmente relacionada com os neurotransmissores endógenos epinefrina e norepinefrina, a sinefrina (Figura 2) ganhou popularidade no tratamento da obesidade, como

um alcaloide alternativo à efedrina, devido aos seus supostos efeitos lipofílicos. O uso popular da sinefrina em produtos emagrecedores teve início em 2004, quando o FDA proibiu o uso da efedrina em suplementos alimentares devido à associação clínica com problemas cardíacos, como palpitações, taquicardia e hipertensão, além de problemas no sistema nervoso central (FUGH-BERMAN; MYERS, 2004; HALLER; BENOWITZ, 2000).

Figura 2- Estrutura química de componentes com estrutura similar à sinefrina.



Fonte: ROSSATO et al., 2011

A *p*-sinefrina é uma substância de caráter básico ($pK_a = 10,2$), polar e solúvel em água (NIEMANN; GAY, 2003; PELLATI; BENVENUTI, 2007b). Devido ao seu interesse farmacológico também é comercializada como fármaco sintético (HAAZ et al., 2006). Conforme se pode observar (Figura 2), apenas duas substituições diferem a sinefrina da efedrina: um dos átomos de carbono do anel está hidroxilado (OH é substituído por H na estrutura química da efedrina), e um grupo metil da cadeia lateral (CH₃) da efedrina é substituído por um átomo de hidrogênio na estrutura da sinefrina (PELLATI; BENVENUTI, 2007a).

O interesse por produtos contendo sinefrina se deve a sua similaridade estrutural com a efedrina, a qual também apresenta atividade simpatomimética que tem sido associada ao aumento da lipólise através da promoção da termogênese presumivelmente por meio de adrenoreceptores β_3 . No entanto, também apresenta os mesmos efeitos nocivos ao sistema cardiovascular e sistema nervoso central. Estudos demonstram que essa amina age não só em adrenoreceptores β_3 , mas também em adrenoreceptores α , β_1 e β_2 , e seu uso indiscriminado

pode levar ao desenvolvimento de efeitos adversos graves, que podem ser agravados com a associação com outros estimulantes, elevando o risco de cardiotoxicidade da sinefrina (FUGH-BERMAN; MYERS, 2004; GROLLMAN, 2005; ROSSATO, 2009).

Muitos suplementos alimentares comercializados como “*Ephedra-free*” contêm concentrados de outras ervas, além do *Citrus aurantium*, ricas em cafeína, e esta ação sinérgica de estimulantes tem o mesmo potencial para induzir a arritmia, hipertensão, ataques cardíacos e acidentes vasculares cerebrais como a combinação de efedrina e cafeína (PELLATI; BENVENUTI, 2007a ; HALLER; BENOWITZ, 2000).

Essa preocupação já levou o *Health Canada* a suspender seu uso em produtos dietéticos (JORDAN; MURTY; PILON, 2004). No entanto a sinefrina está entre os cinco ingredientes mais vendidos em suplementos alimentares utilizados para o emagrecimento (HAAZ et al., 2006).

Não obstante, no *Citrus aurantium* além da sinefrina, estão presentes também aminas biogênicas como a tiramina, octopamina, N-metil-tiramina e hordenina as quais também agem sobre o sistema nervoso e cardiovascular através da estimulação adrenérgica (PELLATI; BENVENUTI, 2007a).

Por ser uma amina adrenérgica quiral, a sinefrina possui enantiômeros com atividades farmacológicas e toxicológicas distintas. Na natureza está presente apenas a forma dextrógera, porém observa-se que a sinefrina pode sofrer isomerização óptica quando submetida a procedimentos extrativos com temperaturas elevadas e longos períodos de refluxo (PELLATI; BENVENUTI, 2007a). Da mesma forma, embora a presença de *m*-sinefrina na natureza seja controversa esse isômero posicional está presente em produtos para perda de peso. Como a *m*-sinefrina é um estimulante adrenérgico mais potente que a *p*-sinefrina, este isômero é provavelmente adicionado intencionalmente, como adulterante, para potencializar o efeito do produto emagrecedor (ALLISON et al., 2005; SANTANA; SHARPLESS; NELSON, 2008).

Somado a isso, tem-se o fato que a maioria dos suplementos dietéticos afirma conter entre 4 a 6% de sinefrina, porém estudos apontam discrepâncias entre estes teores que variam de 0 a 120% do teor declarado (AVULA et al., 2005; DWYER; ALLISON; COATES, 2005; NIEMANN; GAY, 2003).

3.2 Determinação Quantitativa

A busca pela padronização dos fitoterápicos, pré-requisito para a constância dos efeitos terapêuticos e segurança do usuário é, hoje, objeto de discussão em todo o mundo.

Com vistas a este cenário, e a crescente expansão do arsenal terapêutico, cresce também a preocupação com as condições que assegurem a qualidade dos produtos e insumos fitoterápicos através de técnicas modernas e eficientes (SILVA, 1999).

Nesse sentido, a CLAE se destaca como uma importante ferramenta de controle de qualidade, apresentando inúmeras aplicações e vantagens, possibilitando alta eficiência de separação, detectabilidade, resolução, sensibilidade, seletividade e eficiência (BAKSHI; SINGH, 2002; SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2002). Permite a análise de teor, a determinação do conteúdo dos ingredientes ativos em produtos farmacêuticos, bem como a detecção e quantificação de quantidades mínimas de marcadores químicos, produtos de degradação e compostos oriundos de contaminação, adulteração e/ou falsificação. Também possibilita a detecção de alterações químicas de fármacos em função do tempo sob condições de armazenamento diversas, resultando em uma indicação sensivelmente confiável para estimar a estabilidade de produtos farmacêuticos (ANSEL; POPOVICH; ALLEN, 2007; ERMER; MILLER, 2005; GENNARO, 2000; GIL et al, 2005).

A literatura relata vários métodos para a quantificação de aminas adrenérgicas, principalmente sinefrina, em material vegetal e produtos a base de *Citrus*, suplementos e até mesmo amostras biológicas, utilizando CLAE com detector ultravioleta, técnica mais utilizada para a detecção destes compostos (ARBO et al., 2008; AVULA et al., 2005; HURLBUT et al., 1998; PELLATI et al., 2002; ROMAN; BETZ; HILDRETH, 2007; TANG et al., 2006). Outros métodos de detecção são o eletroquímico, fotodiodo, fluorescência e quimioluminescência (KUSU et al., 1996; NIEMANN; GAY, 2003; PELLATI; BENVENUTI; MELEGARI, 2005; SLEZAK et al., 2007; UCKOO et al., 2011; VIANA et al., 2013).

A comparação das condições analíticas de diferentes métodos utilizados para determinação destas aminas por cromatografia líquida pode ser visualizado na Tabela 1.

Tabela 1- Condições analíticas utilizadas por alguns autores para determinação de sinefrina em espécies de *Citrus*, suplementos e amostras biológicas por cromatografia líquida de alta eficiência.

Condição	KUSU et al., 1996	PELLATI et al., 2002	SLEZAK et al., 2007	ARBO et al., 2008	UCKOO et al., 2011
Componentes	<i>dl</i> -sinefrina	<i>dl</i> -octopamina <i>dl</i> -sinefrina tiramina	octopamina sinefrina tiramina hordenina	sinefrina	octopamina sinefrina tiramina ác. ascórbico ác cítrico
Amostra	frutos <i>Citrus unshiu</i> , sucos marmelada urina	frutos extrato seco e produtos à base de plantas de <i>C. aurantium</i>	suplementos contendo extrato de <i>C. aurantium</i>	folhas e frutos <i>C. aurantium</i> <i>C. sinensis</i> <i>C. deliciosa</i> <i>C. limon</i> <i>C. limonia</i>	<i>Citrus sinensis</i> <i>C. paradisi</i> <i>C. grandis</i> <i>C. limon</i> <i>C. reticulata</i>
Fase móvel	1 mM acetato de cobre (II) - 20 mM acetato amonio pH 6,4	0,02 M ác.cítrico - NaH ₂ PO ₄ 0,02 M (7:3 v/v), pH 3/ metanol- NaH ₂ PO ₄ 25 mM (20:80 v/v) pH 3,5 e sulfato de hidrogênio tetrabutilamônio 10 mM (30:70v/v)	30% metanol - 70% TFA pH 2,5	ACN – água – TFA (5:95:0,01 v/v/v) – A ACN - B	3 mM H ₃ PO ₄
Coluna	Sumichiral OA-6000 (150 x 4,6 mm)	RP-18 (125× 4 mm, 5µm) pré-coluna RP-18 (4× 4 mm, 5µm)/ β-ciclodextrina	RP-18 / coluna guarda 5 mm	C-18 (150 x 3,9 mm, 5 µm) guarda-coluna C-18 (10 x 4 mm, 10 µm)	C18 (3,5µm, 4,6 mm× 150 mm.) / C18 (5µm, 250 mm× 4,6 mm)
Vazão	1,5 mL min ⁻¹	1mL min ⁻¹ / 0,4 mL min ⁻¹	1mL min ⁻¹	0,6 mL min ⁻¹	1mL min ⁻¹
Eluição	-	isocrática	isocrática	gradiente 0–8 min: 100–59% A 8–10 min: 59–0% A 10–12 min: 0% A 12–13 min: 0–100% A 13–18 min: 100% A	isocrática
Deteção	eletroquímica	UV 220 nm	UV 280 nm/ quimiolumines- cência	UV 220 nm	DAD 223nm (aminas) 254nm (ácidos)

Uma variedade de técnicas de separação empregando o acoplamento de detector por espectrometria de massas à cromatografia líquida (LC-MS) e eletroforese capilar tem sido aplicada para a determinação qualitativa e quantitativa de constituintes da espécie *Citrus aurantium*. Estas técnicas tem ganhado posição de destaque no cenário da pesquisa, pois possuem vantagens como versatilidade, sensibilidade e alta eficiência de separação, permitindo a determinação de analitos na presença de outros compostos (PELLATI; BENVENUTI, 2007a; BAKSHI; SINGH, 2002).

He, Lian e Bernart (1997) desenvolveram um método por LC-MS com ionização por electrospray (ESI) para analisar os componentes fitoquímicos de frutas de *Citrus aurantium*, onde foram identificados oito flavonoides. Outro método por ESI-MS também é relatado para a determinação quantitativa de sinefrina em amostras de laranja amarga e laranja doce. A laranja doce é conhecida por conter um baixo nível de sinefrina, mas ao mesmo tempo, sendo uma das principais fontes de sinefrina em uma dieta humana normal. Nestas amostras, os níveis de sinefrina variaram de 0,00128 a 0,0349% (MATIOLLI et al., 2005).

Beyer e colaboradores (2007) validaram um método por ESI-MS/MS para detectar e quantificar alcalóides de efedrina e sinefrina em plasma. Outro trabalho, utilizando a mesma metodologia, foi descrito para confirmação da presença dos marcadores químicos da espécie *Citrus aurantium* em matérias-primas, extratos secos e formulações fitoterápicas. O conteúdo de sinefrina, nas amostras analisadas, variou de 0,005 a 4,0% (VIANA et al., 2013). Também foram encontrados estudos que relatam a utilização deste método analítico, com ionização química a pressão atmosférica (APCI) para a determinação de alcaloides de efedrina e sinefrina em suplementos dietéticos (GAY; NIEMANN; MUSSER, 2006).

Chen e colaboradores (2002) desenvolveram um método baseado na electroforese capilar (EC) com detecção electroquímica para a determinação de hesperidina e sinefrina, na casca de frutos maduros de *Citrus reticulata*. Outros métodos por EC foram propostos para análise simultânea de componentes de sucos de *Citrus*, em extratos de frutas de *Citrus aurantium* e suplementos alimentares (CANCALON, 1999; MERCOLINI et al., 2010). EC também foi aplicada para a determinação quantitativa e qualitativa das amins adrenérgicas (sinefrina, octopamina, octopamina, tiramina, n- metil-tiramina e hordenina) em suplementos dietéticos e em várias espécies de *Citrus*, incluindo *Citrus aurantium*, além de geléias e sucos. Sinefrina esteve presente em níveis que variaram de 0,02 a 0,17% nas várias espécies de *Citrus* testadas e de 0,42 a 69,28 mg em suplementos alimentares (AVULA; UPPARAPALLI; KHAN, 2005).

Devido à alta polaridade, baixa volatilidade e instabilidade térmica, a cromatografia a gás foi pouco usada para a determinação de alcalóides de *Citrus aurantium* em material vegetal e produtos à base dessa espécie (PELLATI; BENVENUTI, 2007a).

Um procedimento utilizando cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas (CG-MS) foi descrito para determinação de sinefrina em suplementos alimentares sólidos e líquidos contendo *Citrus aurantium*. A sinefrina presente nesses produtos variou de 3,1 $\mu\text{g mg}^{-1}$ do produto sólido a 480,2 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de produto líquido (MARCHEI et al., 2006).

3.3 Validação de métodos analíticos

É impossível falar em controle de qualidade sem mencionar a validação de metodologia. Para garantir que um método analítico novo gere informações confiáveis sobre a amostra, este deve ser submetido a um processo denominado validação (SILVA; SOARES SOBRINHO; ROLIM NETO, 2007). A validação tem como objetivo demonstrar que o método é apropriado para a finalidade pretendida, e, deve garantir, por meio de estudos experimentais, que o método atende às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados (BRASIL, 2003; KLEIN et al., 2009).

A validação representa, ainda, um conjunto de etapas que desafiam a metodologia a fim de garantir que os resultados fornecidos serão exatos, específicos, precisos e invariáveis frente a pequenas alterações possíveis do método (FRANCO, 2009). No Brasil, com a publicação da Portaria SVS/MS nº 6/1995, foi inserida pela primeira vez a exigência de validação dos métodos utilizados no controle de qualidade de produtos fitoterápicos para fins de registro (BRASIL, 1995). Um processo de validação bem definido e documentado oferece às agências reguladoras evidências objetivas de que os métodos e os sistemas são adequados para uso desejado (RIBANI et al., 2004).

Existe vasta literatura sobre validação de metodologias e recomendações publicadas por organizações nacionais e internacionais, como o ICH - Q2(R1) e a Farmacopeia Americana (USP 35). No Brasil, a Anvisa, por meio da RE nº 899 de 29 de maio de 2003, determina que, no caso de metodologia analítica não descrita em Farmacopéias ou formulários oficiais, devidamente reconhecidos, a metodologia será considerada validada, desde que sejam avaliados e observados os seguintes parâmetros: especificidade, linearidade, intervalo, repetibilidade, precisão intermediária, limite de detecção, limite de quantificação, exatidão e robustez (BRASIL, 2003; ICH, 2005; USP, 2012).

Especialmente no caso de fitoterápicos e extratos vegetais, a validação deve seguir a metodologia analítica, no entanto, os resultados podem seguir os critérios de aceitação estipulados para métodos bioanalíticos, considerando-se a complexidade do extrato vegetal, permitindo limites de aceitação maiores em relação aos métodos analíticos (ANVISA, 2013; KLEIN, et al., 2009).

3.4 Estabilidade de produtos farmacêuticos

A estabilidade é definida como o tempo durante o qual o fármaco ou mesmo a matéria prima, mantém-se sob as mesmas condições e características quando da época de sua fabricação e durante todo o seu período de estocagem e uso, dentro dos limites especificados. Um produto estável pode ser definido também como aquele em que sua potência está reduzida a não mais do que 10%, desde que os produtos de alteração estejam todos seguramente identificados e previamente reconhecidos seus efeitos (STULZER; SILVA, 2006; TABORIANSKI, 2003; VEHABOVIC et al., 2003).

A estabilidade, mais especificamente, é um parâmetro fundamental para avaliar a qualidade, segurança e eficácia de produtos farmacêuticos ao longo do seu prazo de validade. Nesse sentido, a qualidade está diretamente relacionada às características físicas e químicas do medicamento, enquanto a eficácia e segurança estão relacionadas principalmente com a dosagem terapêutica e a formação de produtos de degradação (LEITE, 2005).

A estabilidade de produtos farmacêuticos pode ser afetada por diversos fatores como temperatura, umidade, oxigênio, pressão, pH, luz e condições ambientais durante o transporte. Outros fatores relacionados ao próprio produto como propriedades físicas e químicas de substâncias ativas e excipientes farmacêuticos, potencial de interação entre os componentes da formulação e sua forma farmacêutica, tipo e propriedades dos materiais de embalagem, bem como o período de tempo entre a fabricação e o uso pelo paciente também podem afetar a estabilidade de produtos farmacêuticos (BRASIL, 2005; GENNARO, 2000; NUDELMAN, 1975).

A degradação de um produto farmacêutico é capaz de originar inúmeras alterações em suas propriedades físico-químicas, microbiológicas, terapêuticas e toxicológicas, as quais irão incidir diretamente em sua qualidade, podendo ocasionar redução ou aumento da sua atividade, alteração da biodisponibilidade, perda da uniformidade de conteúdo, perda da qualidade microbiológica, formação de produtos de degradação tóxicos, dentre outros (CARSTENSEN; RHODES, 2000).

Embora sejam muitas as consequências oriundas da instabilidade dos produtos farmacêuticos, a redução da atividade da substância ativa, muitas vezes, é considerada a de menor importância (CARSTENSEN; RHODES, 2000). Kommanaboyina e Rhodes (1999) relatam que se os produtos de degradação formados são tóxicos, seu acúmulo é tão importante quanto, ou mais que, a diminuição da sua potência. Portanto, com a finalidade de garantir a integridade do fármaco e da forma farmacêutica, sob os aspectos químicos, físicos, microbiológicos, terapêuticos e toxicológicos, em função do tempo, são preconizados estudos de estabilidade (ANSEL; POPOVICH; ALLEN, 2007; LUCAS; BISHARA; SEEVERS, 2004; MATTHEWS, 1999).

No Brasil, os estudos de estabilidade são regulamentados pela Anvisa através da RE nº 1/2005, a qual define três tipos de estudos para o delineamento dos testes de estabilidade, estudo de estabilidade acelerada, de longa duração e de acompanhamento. Mais recentemente, a RDC nº 45/2012 veio complementar a anterior estabelecendo os requisitos para a realização de estudos de estabilidade de insumos farmacêuticos ativos.

O estudo de estabilidade acelerado tem por objetivo acelerar a degradação química e/ou física de um produto farmacêutico mediante a aplicação de condições forçadas de armazenamento. Os dados desse estudo podem ser usados para avaliar efeitos prolongados em condições não aceleradas, bem como o impacto de curtas exposições a condições fora daquelas estabelecidas no rótulo do produto, que podem ocorrer durante o transporte (BRASIL, 2005).

O estudo de estabilidade de longa duração tem em vista a verificação das características físicas, químicas, biológicas e microbiológicas do produto farmacêutico durante e, opcionalmente, depois do prazo de validade esperado. Logo, os resultados são usados para estabelecer o prazo de validade e recomendar as condições de armazenamento (BRASIL, 2005).

O estudo de acompanhamento é realizado após o início da comercialização do produto, para verificar a manutenção das características físicas, químicas, biológicas, e microbiológicas previstas nos estudos de estabilidade de longa duração (BRASIL, 2005).

Esses estudos são realizados em câmaras climáticas qualificadas de acordo com normas internacionais, que proporcionam o controle de temperatura e umidade em seu interior. Para a avaliação destes estudos, amostras são retiradas das câmaras em tempos determinados e realizadas as seguintes análises: doseamento, quantificação de produtos de degradação, dissolução e pH (BRASIL, 2005; ICH, 2003).

Para o acompanhamento de resultados provenientes de estudos de estabilidade de medicamentos, é altamente recomendado pela Anvisa o uso de métodos indicadores de estabilidade, seletivos aos princípios ativos e seus produtos de degradação. Pois estes são capazes de detectar, ao longo do tempo, mudanças nas propriedades físicas, químicas ou microbiológicas de uma substância, e que possam influenciar na qualidade, segurança e eficácia dos produtos farmacêuticos. Desta forma, são indispensáveis para mensurar com exatidão o teor da substância ativa e dos produtos de degradação oriundos de condições de degradação forçada, sem interferência (BAERTSCHI, 2006; BRASIL, 2003; BRASIL, 2005; BRASIL, 2012; KLINK et al., 2005).

A Anvisa através da RDC nº 58/2013 regulamenta a verificação de produtos de degradação em medicamentos e estabelece parâmetros para notificação, identificação e qualificação dos produtos de degradação formados ao longo do prazo de validade do medicamento. Dentre os mecanismos de degradação aos quais os fármacos e produtos farmacêuticos podem ser submetidos nos testes de degradação citam-se a degradação térmica, hidrolítica (ácida e básica), oxidativa e por fotólise. Adicionalmente a amostra deve ser submetida a condições forçadas de umidade e à presença de íons metálicos (BRASIL, 2013).

No entanto, deve-se considerar que a determinação de produtos de degradação de fitoterápicos é uma tarefa um pouco mais complexa, pois a matéria-prima destes medicamentos e extratos vegetais pode conter centenas de substâncias químicas, sendo muitas não identificadas (KLEIN et al., 2009).

3.5 Degradação forçada

Os testes de degradação forçada (testes de estresse) são realizados com o intuito de avaliar a estabilidade do insumo farmacêutico ativo, devendo este integrar parte da estratégia de desenvolvimento e ser conduzido sob condições extremas, que induzam a degradação hidrolítica, oxidativa, fotolítica e termolítica do fármaco. Este estudo permite o desenvolvimento de métodos indicativos de estabilidade com seletividade adequada, e também fornecem informações acerca das possíveis rotas de degradação de um determinado produto (BRASIL, 2012; BRASIL, 2013; SILVA et al., 2009). Segundo o *International Conference on Harmonisation (ICH)*, a substância deve ser submetida à degradação por aquecimento convencional em diferentes meios reacionais e à degradação frente à luz (ICH, 2003). Pois, de acordo com Pedro (2009), os reagentes não são instantaneamente convertidos

em produtos em uma reação química, a menos que uma certa quantidade de energia seja fornecida ao sistema.

A hidrólise é definida como um processo de solvólise em que as moléculas do fármaco interagem com moléculas de água, originando produtos de clivagem. O processo hidrolítico é diretamente proporcional a temperatura e o pH da solução, sendo catalisadas tanto pelo íon hidrônio quanto pela hidroxila. É uma das reações de degradação mais comumente observadas em produtos farmacêuticos, pois muitos fármacos possuem em sua estrutura grupos funcionais como éster, amidas, imidas, sulfamidas, compostos heterocíclicos, lactonas e lactamas, altamente suscetíveis à hidrólise (ANSEL; POPOVICH; ALLEN, 2007; GENNARO, 2000; NUDELMAN, 1975).

Outro processo de degradação é a oxidação, ou seja, a perda de elétrons de um átomo ou molécula. A maioria das reações de oxidação em preparações farmacêuticas ocorre espontaneamente pela influência inicial do oxigênio atmosférico evoluindo no decorrer do processo como uma reação em cadeia, que inicia com a união do oxigênio com uma molécula do fármaco e se propaga com o radical livre desta molécula oxidada, comprometendo outras moléculas do fármaco. Não obstante, a taxa de oxidação sofre influência da temperatura, radiação e a presença de catalisadores, como a luz, íons hidrônio, hidroxila, ou ainda traços de metais pesados. Este processo é responsável pela degradação de muitos fármacos, incluindo aldeídos, álcoois, fenóis, duplas e triplas ligações, açúcares, alcaloides e gorduras (ANSEL; POPOVICH; ALLEN, 2007; GENNARO, 2000; NUDELMAN, 1975).

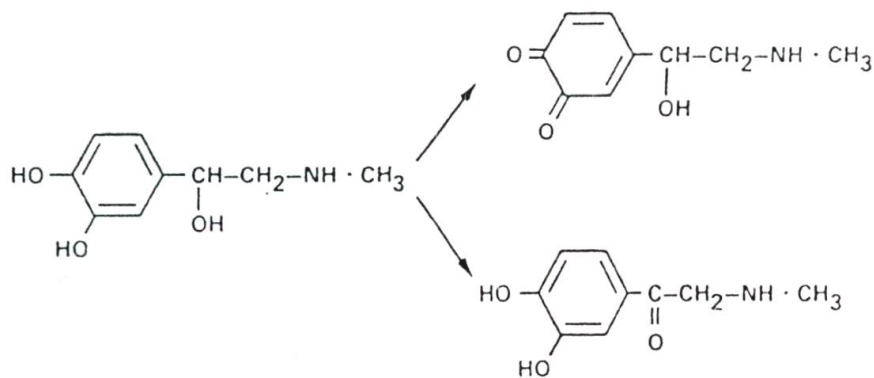
A radiação ultravioleta também pode promover a ativação de reações de degradação de fármacos se estes absorverem radiação em determinado comprimento de onda e a energia exceder um limiar. A velocidade destas reações pode ser afetada pela intensidade e o comprimento de onda da luz, bem como pelo tamanho, forma, composição e cor do recipiente (GENNARO, 2000). De acordo com Nudelman (1975), as substâncias cujos máximos de absorção se encontram mais próximos da luz visível serão mais fotolábeis, como por exemplo, fármacos que contêm oxigênio, nitrogênio ou enxofre em suas moléculas. Os compostos contendo grupos cromóforos tais como nitro, nitroso, cetona, sulfona, duplas e triplas ligações também são sensíveis a radiação luminosa, sendo que esta sensibilidade é diretamente proporcional ao número destes grupos cromóforos na molécula.

Dentre os fatores envolvidos na degradação de produtos farmacêuticos, a temperatura é sem dúvida o mais importante, pois, na maioria dos casos, o aumento da temperatura está diretamente relacionado com o aumento da velocidade de degradação química (AULTON, 2005; NUDELMAN, 1975).

Estruturalmente a sinefrina apresenta grupamentos suscetíveis à degradação, devido à presença de grupamento fenil com oxidrila em posição *para*, grupo alcoólico, duplas ligações e a presença do elemento nitrogênio. Pellati e Benvenuti (2007a) também relatam a instabilidade térmica da sinefrina, a qual pode sofrer isomerização óptica quando submetida a procedimentos extrativos com temperaturas elevadas e longos períodos de refluxo.

Estudos também demonstram a degradação oxidativa da epinefrina, análogo endógeno da sinefrina, a qual se oxida levando a formação de *o*-quinona e também oxidação do álcool secundário, como pode ser visualizado na Figura 3. A taxa de decomposição da epinefrina é mais rápida em solução neutra ou alcalina, apresentando estabilidade máxima em pH de 3,4. (GENNARO, 2000; NUDELMAN, 1975).

Figura 3- Estrutura química da epinefrina e seus respectivos produtos de degradação



Fonte: NUDELMAN, 1975

3.6 Cinética Química

As reações de degradação nos produtos farmacêuticos ocorrem a velocidades definidas e são, na maioria das vezes, de natureza química, podendo ser aceleradas através do aumento da temperatura. Este processo torna a avaliação da estabilidade química de um fármaco um experimento tão importante, pois através deste é possível propor o mecanismo de reação, bem como estabelecer as condições para auxiliar na obtenção de formulações mais estáveis (NUDELMAN, 1975).

Para se estudar a estabilidade devemos conhecer a ordem e a velocidade de reação. A expressão da velocidade da reação é uma descrição da concentração do fármaco com relação ao tempo. E a avaliação desta velocidade de alteração química e a forma através da qual a mesma é influenciada pelas condições de concentração do fármaco ou a presença de outras

substâncias químicas na formulação, além de fatores como solvente, pressão e temperatura é o objetivo dos estudos de cinética de reação (ANSEL; POPOVICH; ALLEN, 2007; GENNARO, 2000).

Em geral, as reações de degradação de produtos farmacêuticos são determinadas graficamente, e expressas como sendo de ordem zero, as quais relacionam a concentração do fármaco em função do tempo, de primeira ordem, relacionando o logaritmo da concentração em função do tempo e, mais raramente, de segunda ordem, contemplando o inverso da concentração em função do tempo. A representação que fornecer a melhor reta é a que define a ordem de reação (AULTON, 2005; ANSEL; POPOVICH; ALLEN, 2007; NUDELMAN, 1975).

Na cinética de ordem zero a taxa de degradação é independente da concentração dos reagentes e constante em relação ao tempo. Neste tipo de reação o fator limitante não é a concentração, pois somente uma fração do fármaco que se encontra em solução se degrada. Nas reações de primeira ordem, a degradação do fármaco é diretamente proporcional à concentração do reagente. Neste tipo de reação, uma substância decompõe-se em um ou mais produtos. As reações de segunda ordem ocorrem quando a velocidade de reação química é proporcional ao produto das concentrações de dois reagentes ou a segunda potência de um deles (LACHMAN; LIEBERMAN; KANIG, 2001; NUDELMAN, 1975; WATSON, 2005).

Na análise da estabilidade de medicamentos, é bastante frequente expressar os resultados dos estudos cinéticos em termos de constante da velocidade de reação (K), uma constante de proporcionalidade que relaciona velocidade e concentração, com dimensões que dependem da ordem de reação e tempo de meia vida ($t_{1/2}$), isto é, o tempo necessário para que a concentração do fármaco se reduza a metade do valor inicial. O $t_{90\%}$ tem significado mais expressivo nos estudos de estabilidade, indica o tempo necessário para que ocorra uma redução de 10% da concentração inicial do fármaco, isto representa o limite de degradação máxima que um fármaco pode sofrer, visando a sua utilização pelo paciente (GENNARO, 2000; NUDELMAN, 1975; SINKO, 2008).

Os modelos cinéticos, utilizados para expressão dos estudos cinéticos, são representados por:

$$\text{Zero ordem:} \quad C = C_0 - kt \quad t_{90\%} = 0,1 C_0 / k \quad t_{1/2} = C_0 / 2k \quad (1)$$

$$\text{Primeira ordem:} \quad \ln C = -kt + \ln C_0 \quad t_{90\%} = \ln 0,90 / k \quad t_{1/2} = \ln 2 / k \quad (2)$$

$$\text{Segunda ordem:} \quad 1 / C = 1 / C_0 + kt \quad t_{90\%} = 1 / 9k C_0 \quad t_{1/2} = 1 / k C_0 \quad (3)$$

Onde, (C_0) é a concentração dos regentes no tempo zero, (C) é a concentração após o tempo de reação (t) e (k) é a constante de velocidade de reação (GENNARO, 2000; AULTON, 2005).

3.7 Estudo de Toxicidade

Produtos naturais, utilizados na medicina tradicional, como alternativa aos fármacos convencionais estão cada vez mais populares e, não obstante a incerteza quanto à eficácia, muitos produtos naturais expõem os consumidores a vários efeitos adversos, uma vez que carecem de estudos científicos sobre suas propriedades farmacológicas e perfil toxicológico (CALIXTO, 2000; ROSSATO, 2009). Muitas plantas podem possuir propriedades farmacológicas e, simultaneamente, causar efeitos tóxicos, como danos ao DNA (MARQUES et al., 2003). Este conhecimento contradiz a falsa idéia de que drogas naturais, preparadas por produtos derivados de plantas, são seguras e isentas de efeitos adversos (CALIXTO, 2000).

Do ponto de vista toxicológico, deve-se considerar que produtos naturais não apresentam apenas efeitos imediatos, muitos se manifestam a longo prazo, até mesmo de forma assintomática, tais como os carcinogênicos, hepatotóxicos e nefróticos (LAPA et al., 2007). Além do mais, podem apresentar potencial mutagênico e citotóxico (FREITAS, 2007). Todavia, fazem-se necessários estudos que investiguem estes efeitos para a segurança do seu uso pela população. Neste sentido, testes que avaliam a genotoxicidade como o ensaio cometa e mutagenicidade como o teste do micronúcleo são de fundamental importância no que se refere ao estabelecimento de risco para o ser humano (AQUINO, 2010).

A avaliação deste potencial, genotóxico/mutagênico, é recomendado por órgãos reguladores nacionais e internacionais para avaliação e registro de novos produtos químicos e farmacêuticos, já que estes testes são capazes de detectarem compostos que induzem danos genéticos direta ou indiretamente por diversos mecanismos (AQUINO, 2010; RIBEIRO, 2003).

O teste do micronúcleo é um teste rápido e simples que detecta perdas e quebras cromossômicas, sendo, desta forma, indicado para avaliar efeito mutagênico (RIBEIRO, 2003). Este teste tem sido utilizado como ferramenta fundamental para a verificação de atividade mutagênica de muitos extratos vegetais (FIGUEIREDO, 2012).

Os micronúcleos são cromossomos inteiros ou fragmentos cromossômicos que não foram incorporados no núcleo da célula filha durante a divisão celular, em decorrência de danos induzidos nas células parenterais. Aparecem no citoplasma como um fragmento

redondo ou oval como um pequeno micro núcleo contendo DNA, no entanto, sem qualquer relação com o núcleo principal, mas que indica fortes evidências de genotoxicidade, ou seja, capacidade do agente testado de induzir danos cromossômicos estruturais e/ou numéricos, os quais estão associados com o surgimento e/ou progressão de tumores e com efeitos reprodutivos adversos (JACOBOWSKI, 2009; RIBEIRO, 2003).

O teste do micronúcleo difere do ensaio cometa no tipo de alteração detectada no DNA. O primeiro detecta lesões irreparáveis, enquanto o segundo detecta lesões primárias, que são passíveis de correção (VALENTIN-SEVERIN, et al., 2003).

O ensaio cometa é um método bastante simples, sensível, rápido e de baixo custo para detecção de quebras nas fitas de DNA e estudos de reparo do DNA. O princípio do método proposto por Östling e Johanson (1984), é que o DNA sendo organizado em grandes estruturas enoveladas quando separadas por quebras na dupla-fita de DNA, migram para o ânodo através da eletroforese. O termo cometa refere-se justamente a este procedimento, que envolve a aplicação de corrente elétrica nas células e resulta no transporte de fragmentos de DNA para fora dos núcleos, lembrando um cometa com uma cabeça e cauda. Resumindo, a técnica do cometa permite avaliar os danos no DNA de células individuais causados pela substância teste (AQUINO, 2010; FREITAS, 2007; TICE, et al., 2000).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Produtos Químicos

4.1.1 Padrão

Foi utilizado a substância química de referência (SQR) de sinefrina com teor declarado de 98% adquirido da empresa Sigma Aldrich (São Paulo, Brasil).

4.1.2 Amostra

Extrato seco de *Citrus aurantium* contendo 6,2% de sinefrina, conforme especificado pelo certificado de análise, adquirido da empresa DEG Importação de produtos Químicos Ltda (São Paulo, Brasil).

4.2 Desenvolvimento do método cromatográfico

As análises cromatográficas foram realizadas em cromatógrafo líquido Shimadzu (LC-20AT Prominence), com sistema dotado de bomba quaternária, amostrador automático, detector de arranjo de diodos (DAD), coluna, desgaseificador e controlador.

4.2.1 Preparo da solução padrão

A solução de sinefrina foi preparada em água destilada pela dissolução de 15,0 mg de sinefrina em balão volumétrico de 100 mL, posteriormente, foi sonicada por 30 min no ultrasson. Após, 2,0 mL foram transferidos para um balão volumétrico de 10 mL e o volume completado com água, de modo a obter a concentração de $30 \mu\text{g mL}^{-1}$. A solução foi homogeneizada e filtrada em membrana com diâmetro de poro de 0,45 μm .

4.2.2 Preparo da solução amostra

Cerca de 241,9 mg de extrato seco (equivalente a 15,0 mg de sinefrina) foram pesados, transferidos para balão volumétrico de 100 mL, ao qual foi adicionado cerca de 80 mL de água destilada. A amostra foi sonicada em ultrasson por 30 min, a temperatura ambiente para

extração da sinefrina. Completou-se o volume com o mesmo solvente e a solução foi transferida para tubos de ensaio para posterior centrifugação a 3000 RPM por 30 min. Uma alíquota de 2,0 mL foi transferida para um balão volumétrico de 10 mL e o volume completado com água, atingindo concentração final de $30 \mu\text{g mL}^{-1}$ de sinefrina. A solução foi homogeneizada e filtrada em membrana com diâmetro de poro de $0,45 \mu\text{m}$.

4.2.3 Preparo de fase móvel

Para o preparo da fase móvel foram utilizados solventes de grau analítico, adequados para a utilização em CLAE. A água ultrapura foi obtida em um sistema Mili-Q Milipore. O pH da fase aquosa foi ajustado com trietilamina.

Os componentes da fase móvel foram filtrados sob vácuo, através de uma membrana com diâmetro de poro de $0,45 \mu\text{m}$ e desgaseificados em banho de ultrassom por 20 min.

4.3 Validação do método

Para a validação do método proposto, ou seja, para demonstrar de uma forma documentada que o mesmo é adequado para o propósito pretendido foram avaliados os parâmetros de especificidade, linearidade, repetibilidade, precisão intermediária, exatidão e robustez, determinados pela Resolução RE nº 899/2003, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, USP 35 (2012) e ICH - Q2(R1) (2005).

4.3.1 Linearidade

A linearidade foi determinada pela construção de três curvas padrão com seis pontos cada. Para isso, uma solução estoque ($150 \mu\text{g mL}^{-1}$) de sinefrina foi preparada em água e alíquotas foram transferidas para balões volumétricos de 10 ml, obtendo a concentração final de 7,5; 15; 22,5; 30; 37,5 e $45 \mu\text{g mL}^{-1}$. As curvas padrão foram obtidas pela construção de gráficos de concentração versus área absoluta. A equação da reta foi determinada através do estudo de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados e a análise de variância (ANOVA) foi realizada para verificação da linearidade do método.

4.3.2 Especificidade

A especificidade, ou seja, a capacidade do método em determinar o fármaco, com pureza adequada, na presença dos produtos formados e a capacidade indicativa de estabilidade do método foram avaliadas utilizando condições forçadas de degradação da sinefrina e do extrato seco de *Citrus aurantium* em condições de oxidação, fotodegradação e hidrólise (ácida e básica), através da determinação da pureza do pico estabelecida pelo detector DAD.

Para avaliar o fármaco e o extrato frente às condições alcalinas, ácidas e oxidativas, utilizou-se os esquemas propostos por Singh e Bakshi (2000), os quais seguem um fluxograma de degradação, que inicia com condições mais brandas que vão se tornando mais drásticas à medida que se observa ausência ou insuficiência de degradação. A condição definida será aquela que atingir uma degradação suficiente para o experimento, que de acordo com Silva (2009) varia de 10 a 30%. Para a degradação fotolítica foi utilizada lâmpada UV 254 nm (DEL GROSSO; APRILE; GROSA, 2012; MALESUIK; CARDOSO; STEPPE, 2008; SILVA, 2009).

4.3.2.1 Degradação da SQR de sinefrina

A solução de sinefrina, para a hidrólise ácida, foi preparada pela dissolução de 15,0 mg do padrão em ácido clorídrico 1 mol L⁻¹, em balão volumétrico de 100 mL, submetida a sonicação por 10 minutos e posteriormente, submetida ao refluxo por 4 h. A hidrólise básica foi conduzida sob refluxo com hidróxido de sódio 5 mol L⁻¹ por 6 h. Após, as amostras foram arrefecidas a temperatura ambiente e neutralizadas. Uma alíquota de cada solução foi diluída em água até a concentração final de 30 µg mL⁻¹.

A degradação oxidativa foi realizada pela adição de uma alíquota de 2,0 mL de peróxido de hidrogênio 10% à solução de sinefrina, preparada conforme descrição de preparo da solução padrão. Esta solução foi mantida por 48 h protegida da luz, à temperatura ambiente. No momento da análise o volume foi completado com água destilada, a fim de alcançar a concentração de trabalho.

A fim de avaliar a fotodegradação do padrão de sinefrina, uma alíquota da solução de sinefrina foi diluída em acetonitrila e levada a câmara de fotoestabilidade (UVC – 254 nm) por 1 h. Em seguida foi diluída à concentração de trabalho, utilizando água como diluente.

Em todos os casos, após atingir a concentração de trabalho, as amostras foram filtradas em membrana com diâmetro de poro de 0,45 µm.

4.3.2.2 Degradação do extrato de *Citrus aurantium*

A degradação ácida do extrato ocorreu pela diluição de 1,2097 g do mesmo, (equivalente a 75,0 mg de sinefrina) em um balão volumétrico de 50 mL, ao qual foi adicionado cerca de 40,0 mL de água destilada. A amostra foi sonicada em ultrassom por 30 min para extração da sinefrina. Foi completado o volume com o mesmo solvente e a solução transferida para tubos de ensaio para posterior centrifugação a 3000 RPM por 30 min. Uma alíquota de 5,0 mL foi transferida para um balão volumétrico de 50 mL e o volume completado com ácido clorídrico 1 mol L⁻¹, atingindo uma concentração final de 150 µg mL⁻¹ de sinefrina. Esta solução foi submetida ao refluxo por 5 h. A hidrólise básica também foi conduzida sob refluxo com hidróxido de sódio 5 mol L⁻¹ por 6 h. Após, as amostras foram arrefecidas a temperatura ambiente e neutralizadas. Uma alíquota de cada solução foi diluída em água a concentração de 30 µg mL⁻¹.

A degradação oxidativa ocorreu com a adição de alíquota 4,0 mL de peróxido de hidrogênio 30% a uma alíquota de 2,0 mL de uma solução de extrato, preparada conforme procedimento de preparo da amostra, em um balão volumétrico de 10 mL. Esta solução foi armazenada a temperatura ambiente, protegida da luz, por 72 h. Logo após, o volume foi completado com água, atingindo uma concentração final de 30 µg mL⁻¹ de sinefrina.

Para avaliação da fotodegradação foi preparada uma solução estoque do extrato em água, equivalente a 1.500 µg mL⁻¹ de sinefrina. Após passar pelas etapas de sonicação e centrifugação, uma alíquota de 1,0 mL desta foi diluída em um balão volumétrico de 10 mL com acetonitrila e levada à câmara de fotoestabilidade (UVC – 254 nm) por 20 h, com temperatura controlada. Posteriormente, foi diluída à concentração de 30 µg mL⁻¹.

Em todos os casos, após atingir a concentração de trabalho, as amostras foram filtradas em membrana com diâmetro de poro de 0,45 µm.

4.3.3 Precisão

A precisão do método foi determinada pelo ensaio de repetibilidade (precisão intra-dia) e precisão intermediária (precisão inter-dia), sendo o resultado expresso como desvio padrão relativo (DPR) de uma série de medições. Para avaliação da precisão (ensaio de repetibilidade) foram analisadas seis replicatas da solução do extrato em uma concentração correspondente a 30 µg mL⁻¹. Os dados para a precisão intermediária foram coletados em dias diferentes e por analistas diferentes.

4.3.4 Exatidão

A exatidão foi determinada através de ensaio de recuperação de padrão, isto é, através da adição de quantidades conhecidas de padrão nas soluções amostra (extrato de *Citrus aurantium*). Alíquotas de 1,0; 2,0; e 3,0 mL de um padrão de sinefrina com concentração igual a $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ foram transferidos para balões volumétricos de 10 mL contendo uma solução amostra com concentração de $30 \mu\text{g mL}^{-1}$. Cada solução foi preparada em triplicata.

4.3.5 Robustez

A robustez do método foi avaliada através de pequenas e deliberadas modificações nas condições cromatográficas, tais como vazão da fase móvel (0,8 e $1,2 \text{ mL min}^{-1}$), pH (2,8 e 3,2), proporção da fase móvel (10:90 e 20:80) e tempo de extração (25 e 35 min).

4.4 Estudo da cinética de fotodegradação

4.4.1 Preparo da solução padrão

A solução de sinefrina foi preparada em água destilada pela dissolução de 37,5 mg de sinefrina em balão volumétrico de 25 mL, posteriormente, foi sonicada por 30 min no ultrassom. A seguir, uma alíquota de 6,0 mL foi transferida para um balão volumétrico de 50 mL e o volume completado com acetonitrila. A solução foi homogeneizada e filtrada em membrana com diâmetro de poro de $0,45 \mu\text{m}$ para as cubetas, as quais foram levadas à câmara de fotoestabilidade. Após o tempo requerido de exposição, alíquota de 1,0 mL foi transferida para um balão volumétrico de 10 mL e o volume completado com água.

4.4.2 Preparo da solução amostra

Foram pesados 290,3 mg de extrato seco (equivalente a 18,0 mg de sinefrina) e transferidos para balão volumétrico de 100 mL, ao qual foi adicionado cerca de 80,0 mL de água destilada. A amostra foi sonicada em ultrassom por 30 min a temperatura ambiente para extração da sinefrina. Foi completado o volume e a solução transferida para tubos de ensaio para posterior centrifugação a 3000 RPM por 30 min. Uma alíquota de 5,0 mL foi transferida para um balão volumétrico de 50 mL e o volume completado com acetonitrila. Esta solução foi filtrada em filtro de $0,45 \mu\text{m}$ direto nas cubetas, as quais foram levadas à câmara de fotoestabilidade.

4.4.3 Determinação da cinética de degradação

O efeito da luz foi avaliado através da exposição do fármaco (SQR) e do extrato em solução, em cubetas descartáveis de 1 cm. A fonte de luz utilizada foi uma lâmpada UVC - 254 nm 30 W (Philips, Holanda), fixa a uma câmara em posição horizontal, revestida internamente com espelhos (0,16 x 0,16 x 1m - largura x altura x comprimento), para a distribuição uniforme da luz. As amostras foram posicionadas horizontalmente, para proporcionar uma área máxima de exposição à fonte de luz.

As soluções de sinefrina foram expostas à radiação ultravioleta nos seguintes intervalos de tempo: 20, 40, 60, 80, 100, 120, 150, 180, 240 e 360 min. Já as soluções do extrato foram expostas a períodos de tempo maiores, 120, 180, 300, 420 e 540 min. Três amostras foram analisadas para cada intervalo de tempo, sendo que cada amostra foi injetada em duplicata. Teste de pureza de pico foi realizado por detector de arranjo de diodos.

A ordem de reação de degradação foi determinada a partir da obtenção de representações gráficas que relacionam: (a) os valores de concentração em função do tempo (reação zero ordem), (b) o log da concentração versus tempo (reação de primeira ordem) e (c) inverso da concentração versus tempo (reação de segunda ordem). Os coeficientes de correlação (r) foram obtidos, sendo que o mais próximo à unidade indica a ordem da reação.

A partir do conhecimento da ordem da reação foram efetuados cálculos que levaram à determinação de alguns parâmetros relacionados, como a constante média de velocidade de degradação (k), $t_{90\%}$ (90% da concentração inicial) do fármaco e tempo de meia vida ($t_{1/2}$).

4.5 Ensaio de toxicidade

4.5.1 Preparo das soluções

Cerca de 12,5 mg de sinefrina SQR foram transferidos para balão volumétrico de 25 mL e dissolvidos em água destilada. Posteriormente, transferiu-se alíquota de 1,0 mL dessa solução para balão volumétrico de 25 mL e completou-se o volume com acetonitrila, obtendo-se concentração final de $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ de sinefrina (solução estoque).

A partir da solução estoque foi preparada a solução teste de sinefrina, transferindo-se 1,0 mL para balão volumétrico de 10 ml e completando-se o volume com tampão fosfato salino (PBS), obtendo-se concentração final de $2 \mu\text{g mL}^{-1}$. Após, retirou-se alíquota de 1,0 mL

e transferiu-se para balão volumétrico de 10 mL e diluiu-se com PBS, atingindo-se a concentração final de $0,2 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Outra solução testada foi a de sinefrina degradada, para isso foi utilizada uma solução de sinefrina na concentração de $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ em acetonitrila, previamente submetida a degradação frente a luz (lâmpada UVC 254 nm). A solução permaneceu sob exposição da luz até atingir um percentual residual de aproximadamente 50% da sua concentração inicial. O restante do procedimento ocorreu conforme descrito no preparo da solução teste de sinefrina.

O controle negativo foi preparado com 1% de acetonitrila e PBS.

4.5.2 Preparo da suspensão de células (SC)

Culturas de leucócitos foram preparadas usando amostras coletadas de doadores humanos por punção venosa (pesquisa aprovada pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Santa Maria, Carta de aprovação nº 23.081). Para o preparo da suspensão de células (SC) 8,0 mL de sangue foi imediatamente transferido para um meio de cultura contendo 56,25 mL de RPMI 1640, 0,85 mL de fitohemaglutinina (PHA), suplementado com 21,25 mL de soro fetal bovino e 0,85 mL de estreptomicina (SANTOS MONTAGNER et al., 2010).

4.5.3 Preparo dos grupos

Para a realização do estudo de toxicidade foram designados quatro grupos nomeados de controle negativo, controle positivo, solução teste de sinefrina e degradado.

Para o controle negativo foi preparado uma solução de PBS e outra de acetonitrila, adicionadas de SC. Para o controle positivo foi realizada uma solução contendo SC adicionada de H_2O_2 30V e PBS.

Para as amostras referentes ao grupo teste de sinefrina, e degradado foram preparadas soluções adicionadas de SC nas concentrações de 1, 10, 25, 50 e 100 ng mL^{-1} . Estas concentrações foram determinadas com base em estudo de Haller (2005), que buscou caracterizar a farmacocinética e efeitos cardiovasculares, em humanos, de suplementos dietéticos contendo *Citrus aurantium*. Cada grupo foi composto por três amostras de cultura.

As amostras foram homogeneizadas e levadas à estufa por um período de 12 h a $37,5 \text{ }^\circ\text{C}$. Logo após, foram centrifugadas a 3.000 RPM por 10 min, o sobrenadante foi

descartado e o restante do meio foi resuspendido. Após crescimento, os parâmetros toxicológicos foram analisados utilizando as técnicas descritas a seguir.

4.5.4 Testes toxicológicos

Para a avaliação dos parâmetros genotoxicológicos será utilizada a SC descrita no item 4.5.2. A viabilidade celular foi avaliada pela perda da integridade da membrana, utilizando o azul de Trypan (BUROW et al., 1998). A diferenciação de células mortas/vivas foi determinada microscopicamente e observada pela coloração azul das células mortas. Já a proliferação celular foi determinada por contagem em câmara de Neubauer, de acordo com técnica de YUNIS, 1996. A genotoxicidade foi avaliada através do teste do micronúcleo, segundo a técnica descrita por Schmid (1975) e do ensaio cometa (SINGH et al., 1995).

4.5.5 Análise estatística

Todas as análises de toxicidade foram realizadas em software estatístico específico. Os dados foram avaliados por análise de variância (ANOVA) seguida de teste *Post-Hoc* de Bonferroni. Foram considerados significativos os resultados com valor de $p < 0,05$.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Desenvolvimento e Otimização do método por CLAE

As condições cromatográficas que resultaram em adequados parâmetros analíticos foram definidas após teste de diferentes fases móvel, proporção da fase orgânica, pH da fase aquosa e fluxo da fase móvel.

Os testes iniciais foram baseados em trabalhos publicados na literatura e realizados com uma mistura binária de acetonitrila:água, numa proporção de 30:70, com pH na faixa de 2,5 à 3,5, ajustada com ácido fosfórico. Também foram avaliados os sistemas gradiente e isocrático, analisados na faixa de vazão de 0,5 mL min⁻¹ a 1,5 mL min⁻¹ (VIANA et al., 2013). Não obtendo êxito na separação cromatográfica, foi testada nova fase móvel, muito usual na literatura, sendo esta composta por acetonitrila:ácido fosfórico 0,1% na proporção 15:85 (v/v). Com esta fase móvel foram investigados o efeito do pH 2,5 e 3,0 e da vazão, que variou de 0,6 a 1,0 mL min⁻¹ (AREND et al., 2009; MALESUIK; CARDOSO; STEPPE, 2008; SILVA, 2009).

Na tentativa de otimizar as condições cromatográficas, outra mistura de solventes foi investigada, desta vez acetonitrila:ácido fosfórico 0,01% nas proporções 30:70, 25:75, 20:80 e 15:85 (v/v) com pH 2,8 e 3,0 e vazão que variou de 0,6 a 1,0 mL min⁻¹. Finalmente a fase móvel constituída por acetonitrila:ácido fosfórico 0,01% (v/v) pH 3,0 (ajustado com trietilamina), na proporção 15:85 (v/v) foi definida para dar prosseguimento aos experimentos, pois apresentou bons resultados nos parâmetros de adequabilidade do sistema, tais como, número de pratos teóricos ($N = 9600$), simetria de pico ($T = 1,19$), reprodutibilidade das injeções (DPR = 0,5; n = 5).

Esta fase móvel é de fácil e rápido preparo, o que permite ser usada rotineiramente nas análises de controle de qualidade. Além disso, não apresenta sais em sua composição, os quais poderiam ocasionar danos à coluna e ao sistema cromatográfico.

As condições cromatográficas definidas para quantificação da sinefrina por CLAE estão apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2 - Condições cromatográficas definidas para a quantificação de sinefrina por CLAE.

Parâmetro	Descrição
Fase móvel	Ácido fosfórico 0,01% (v/v) pH 3,0 com trietilamina: Acetonitrila (85:15, v/v)
Vazão	1,0 mL min ⁻¹
Coluna	Thermo Scientific C18 (250 x 4,6 mm, 5 µm)
Pré-coluna	C18 (4,0 x 3,0 mm)
Detecção	220 nm
Temperatura	25 °C
Volume injetado	20 µL

Os componentes da fase móvel foram filtrados sob vácuo, através de uma membrana com diâmetro de poro de 0,45 µm e desgaseificados em banho de ultrassom por 20 min.

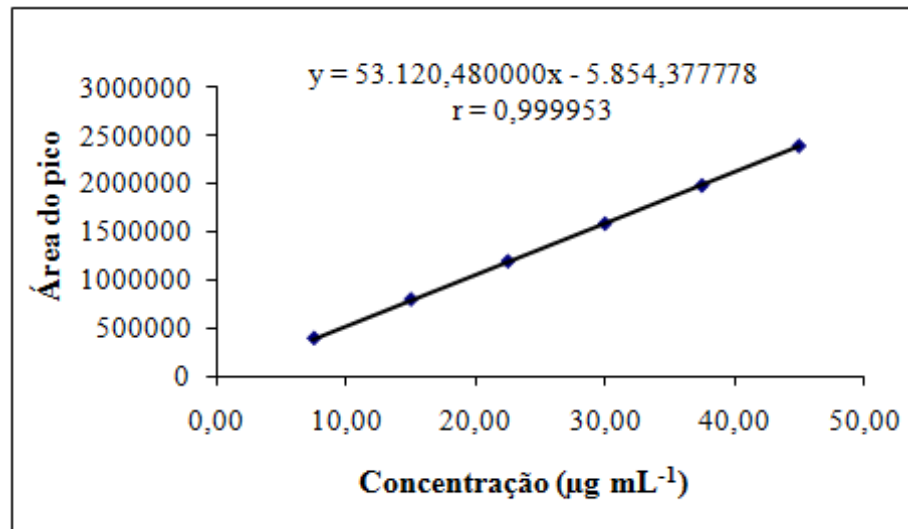
5.2 Validação do método

O método desenvolvido foi validado para demonstrar a conformidade com os requisitos nacionais e internacionais de métodos analíticos para o controle de qualidade de produtos farmacêuticos. A validação do método foi realizada com base na avaliação dos seguintes parâmetros: especificidade, linearidade, repetibilidade, precisão intermediária, exatidão e robustez (BRASIL, 2003). De acordo com Klein e colaboradores (2009) a validação deve seguir a metodologia analítica, no entanto, os resultados podem seguir os critérios de aceitação estipulados para métodos bioanalíticos, considerando-se a complexidade do extrato vegetal, permitindo, assim, limites de aceitação maiores em relação aos métodos analíticos.

5.2.1 Linearidade

A linearidade do método foi determinada por meio da construção de curvas padrão de sinefrina (concentração *versus* área do pico). O método mostrou-se linear na faixa de 7,5 a 45 µg mL⁻¹, sendo que a equação e o coeficiente de correlação (r) obtidos podem ser verificados na Figura 4.

Figura 4 - Representação gráfica da curva padrão de sinefrina por CLAE



O coeficiente de correlação demonstrou haver concordância entre as concentrações utilizadas e as áreas absolutas dos picos obtidas. A análise por **Anova** demonstrou haver regressão linear significativa (a) sem desvio da linearidade (b):

$$\text{a) } F_{\text{calculado}} = 38327 > F_{\text{crítico}} = 4,75; p < 0,05$$

$$\text{b) } F_{\text{calculado}} = 0,45 < F_{\text{crítico}} = 3,26; p < 0,05$$

5.2.2 Especificidade

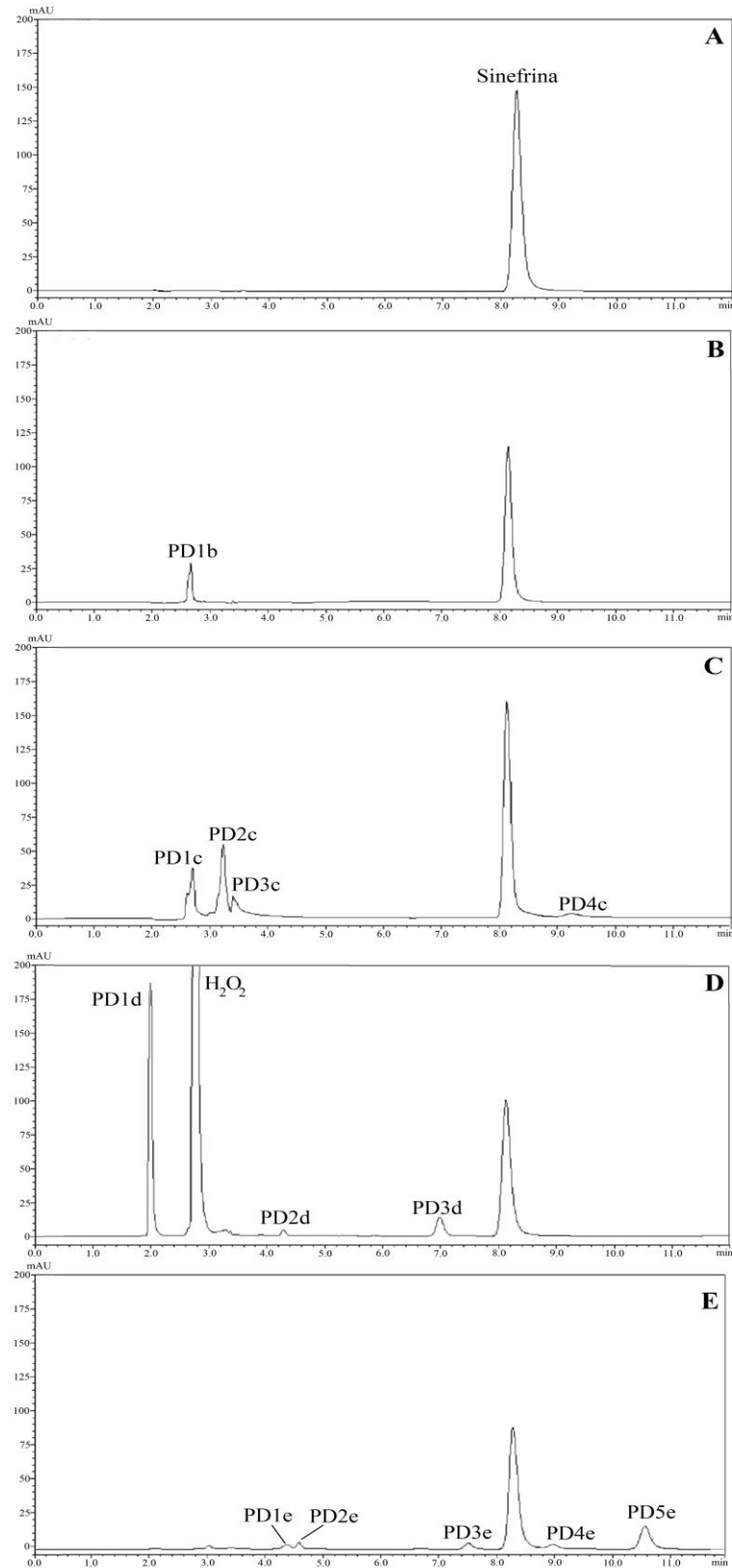
Os estudos de degradação forçada foram conduzidos com o intuito de avaliar a seletividade e a capacidade indicativa de estabilidade do método proposto utilizando sinefrina padrão e extrato seco de *Citrus aurantium*.

5.2.2.1 Degradação da SQR de sinefrina

Na Figura 5A, pode-se observar o cromatograma da sinefrina SQR na concentração de 30,0 µg mL⁻¹. Podemos observar no cromatograma da Figura 5B, que quando submetido a condições ácidas de degradação (HCl 1 mol L⁻¹ por 4 h), houve um decaimento de aproximadamente 36% na área do pico da sinefrina e o surgimento de um produto de degradação em aproximadamente 2,6 minutos de análise (PD1b). Quando submetido à degradação alcalina (NaOH 5 mol L⁻¹) por um período de 6 h o percentual de degradação foi de aproximadamente 5%, com o surgimento de quatro produtos de degradação (PD1c, PD2c,

PD3c e PD4c), como pode ser observado na Figura 5C. Também, alguns aspectos em relação às características físicas desta amostra devem ser considerados. Quando submetida ao refluxo, após período de 6 h, a amostra apresentou coloração levemente amarelada e uma espécie de precipitado, provavelmente devido a algum dos produtos de degradação formados. Na degradação oxidativa (H_2O_2 10%, por 48 h) o decaimento do pico referente à sinefrina foi de aproximadamente 30%, com a ocorrência de um expressivo produto de degradação com pequeno tempo de retenção, praticamente junto ao volume morto, em 2 minutos (PD1d) e outros dois produtos de menor intensidade (PD2d e PD3d), como pode ser observado na Figura 5D. Este dado confirma o fato de que fármacos que apresentam em sua estrutura química grupos fenólicos, álcoois e duplas ligações são altamente passíveis de sofrerem oxidação (NUDELMAN, 1975). Reação de degradação oxidativa também foi verificada com a epinefrina, análogo endógeno da sinefrina (NUDELMAN, 1975). Os resultados da degradação fotolítica estão demonstrados na Figura 5E. Nessa condição pode ser observada a ocorrência de picos adicionais de menor intensidade (PD1e, PD2e, PD3e, PD4e e PD5e), além do sinal relativo à sinefrina com decréscimo na área do pico de aproximadamente 35% após 1 h de exposição. Fato que demonstra a sensibilidade da sinefrina à radiação luminosa, pois de acordo com Nudelman (1975) esta sensibilidade é diretamente proporcional ao número de cromóforos presentes na molécula, sendo que serão mais fotolábeis fármacos que contêm, dentre outros elementos, o átomo de nitrogênio e duplas ligações em suas moléculas, como é o caso da sinefrina.

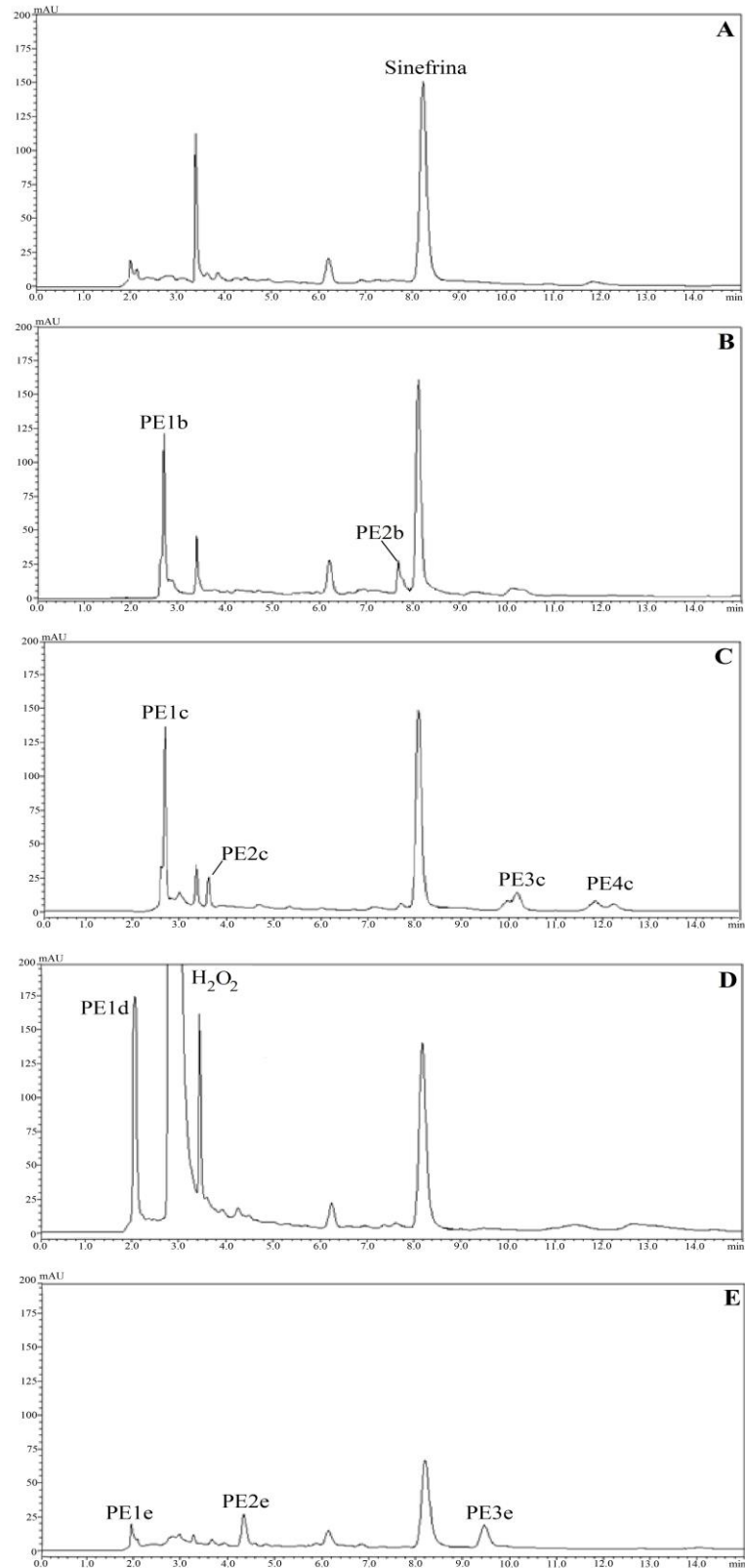
Figura 5 - (A) Cromatograma da solução padrão de sinefrina $30,0 \mu\text{g mL}^{-1}$; (B) degradação ácida ($\text{HCl } 1 \text{ mol L}^{-1}$, 4 h) e produto de degradação (PD1b); (C) degradação alcalina ($\text{NaOH } 5 \text{ mol L}^{-1}$, 6 h) e produtos de degradação (PD1c, PD2c, PD3c e PD4c); (D) degradação oxidativa (H_2O_2 10%, 48 h) e produtos de degradação (PD1d, PD2d e PD3d);(E) fodegradação (UVC-254 nm, 1 h) e produtos de degradação (PD1e, PD2e, PD3e, PD4e e PD5e).



5.2.2.2 Degradação do extrato de *Citrus aurantium*

Na Figura 6A, pode-se observar o cromatograma da sinefrina no extrato de *Citrus aurantium* na concentração de $30,0 \mu\text{g mL}^{-1}$. Quando o extrato foi submetido às condições de degradação ácida ($\text{HCl } 1 \text{ mol L}^{-1}$) por 5 h, ocorreu a formação de dois produtos de degradação (PE1b e PE2b), com decréscimo de 28,6% na área do pico da sinefrina (Fig. 6B). A degradação alcalina resultou no surgimento de novos produtos de degradação (PE1c, PE2c, PE3c e PE4c), além de um decréscimo na área do pico da sinefrina de aproximadamente 5% (Fig. 6C), praticamente o mesmo percentual de degradação apresentado na degradação alcalina do padrão de sinefrina. Todavia, também apresentou as mesmas características físicas, quando na degradação do padrão após 6 h de aquecimento. Ao contrário do que foi visualizado na degradação oxidativa do padrão, na degradação do extrato, houve pouco decaimento na área do pico da sinefrina, em torno de 5%, mas com o surgimento do produto de degradação majoritário em torno de 2 min, como ocorreu na degradação do padrão (Fig. 6D). Na análise dos cromatogramas da degradação oxidativa do padrão (H_2O_2 10% em 48 h) e do extrato (H_2O_2 30% em 72 h) percebe-se menor decaimento do pico da sinefrina no extrato, mesmo com o reagente mais concentrado e maior tempo de exposição. Sugere-se que essa diferença provavelmente ocorra devido à presença de compostos com características antioxidantes no extrato de *Citrus aurantium*, como mencionado na literatura (MUTHIAH, 2012, WANG et al., 2014). Quando submetido à degradação frente à luz por 20 h ocorreu redução de aproximadamente 42% na área do pico da sinefrina e a formação de alguns produtos de degradação (PE1e, PE2e e PE3e) que foram resolvidos do pico do fármaco, como pode ser observado na Figura 6E.

Figura 6 - (A) Cromatograma de sinefrina $30,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ em extrato de *Citrus aurantium*; (B) degradação ácida ($\text{HCl } 1 \text{ mol L}^{-1}$, 5 h) e produtos de degradação (PE1b e PE2b); (C) degradação alcalina ($\text{NaOH } 5 \text{ mol L}^{-1}$, 6 h) e produtos de degradação (PE1c, PE2c, PE3c e PE4c); (D) degradação oxidativa (H_2O_2 30%, 72 h) e produto de degradação (PE1d); (E) fotodegradação (UVC-254 nm, 20 h) e produtos de degradação (PE1e, PE2e e PE3e).



Pellati e Benvenuti (2007b) realizaram um teste de estabilidade com um extrato de *Citrus aurantium* armazenado em frasco âmbar a uma temperatura de 4 °C e a temperatura ambiente (25 °C), sendo as amostras analisadas a cada 12 h, de um período de 72 h. Nenhuma alteração, do analito em solução, foi observada no perfil cromatográfico, assim como também não houve a formação de produtos de degradação. Estes dados reforçam ainda mais a questão da fotodegradação, visto que, neste trabalho, quando submetido a 20 h de exposição à luz ultravioleta, além da formação de produto de degradação, uma redução na área do pico de cerca de 40% foi observada.

A partir da análise dos cromatogramas pode-se verificar que o método proposto conseguiu separar a sinefrina dos produtos de degradação, formados em condições de estresse. Além disso, permitiu a análise qualitativa e quantitativa da sinefrina na presença dos produtos de degradação e constituintes da matriz, portanto, pode-se dizer que o método é indicativo da estabilidade. Na análise utilizando a ferramenta do detector de arranjo de fotodiodos foi possível sugerir que o pico cromatográfico referente à sinefrina se manteve puro em todas as determinações. Esses resultados corroboram com a especificidade e seletividade do método no sentido de que não ocorreu co-eluição de produtos de degradação ou compostos constituintes da matriz no mesmo tempo de retenção da sinefrina, nas condições analisadas.

5.2.3 Precisão

Os resultados da precisão, obtidos para o método proposto, foram expressos como DPR e podem ser visualizados na Tabela 3. Foi observado, em todos os testes realizados, que o método, além de apresentar resultados coerentes com os limites estabelecidos pela legislação vigente (BRASIL, 2003), também apresentou baixos percentuais de DPR, indicando o elevado nível de precisão do método.

Tabela 3 - Precisão intra e interdia da determinação de sinefrina em extrato seco.

Precisão Intradia		
	Teor médio (%)	DPR (%)
Dia 1 (n=6)	101,53	1,77
Dia 2 (n=6)	104,94	1,05
Dia 3 (n=6)	99,82	0,96
Precisão Interdia (n=18)		
	Teor médio (%)	DPR (%)
	102,09	2,48

5.2.4 Exatidão

O teste de exatidão avaliou a porcentagem de recuperação obtida em cada nível de concentração de sinefrina, sendo que para cada concentração foram realizadas três determinações. A recuperação média foi de 102,03% (DPR = 0,79), como pode ser observado na Tabela 4. A recuperação é considerada satisfatória, quando comparada com trabalhos anteriores, que apresentaram resultados semelhantes (PELLATI; BENVENUTI, 2007a; ARBO et al., 2008).

Tabela 4 - Resultados do teste de recuperação de sinefrina em extrato seco por CLAE

Concentrações de SQR (µg/mL) adicionadas	Recuperação (%) ± DPR	Média (%) ± DPR
5	102,01 ± 0,66	
10	102,85 ± 1,42	102,03 ± 0,79
15	101,23 ± 1,35	

5.2.5 Robustez

A robustez do método revelou que pequenas e deliberadas modificações nas condições cromatográficas, não resultaram em problemas na quantificação da sinefrina, confirmando a robustez do método proposto. Os resultados deste teste podem ser visualizados na Tabela 5.

Tabela 5 - Resultados obtidos no teste de robustez da sinefrina

Condições	Concentração de sinefrina (%)
Fluxo 0,8 mL min ⁻¹	103,56
Fluxo 1,2 mL min ⁻¹	103,17
pH 2,8	99,56
pH 3,2	100,60
20% ACN	100,18
10% ACN	99,89
25 min extração	98,84
35 min extração	98,98
Condição normal	103,91

5.3 Cinética de degradação

A finalidade dos testes cinéticos é proporcionar subsídios a respeito da qualidade de um fármaco frente às condições de estresse. São avaliadas as variações do produto em função do tempo sob a influência de uma variedade de condições ambientais como temperatura, umidade, pH e luz. As informações obtidas podem ser utilizadas para colaborar com a determinação do prazo de validade ou com as condições de estocagem do produto acabado (HUYNH-BA, 2009; NUDELMAN, 1975).

De acordo com Nudelman (1975), para determinar a cinética os ensaios devem ser conduzidos até um estágio avançado de degradação (cerca de 50%), pois do contrário, os valores obtidos podem ser pouco precisos.

A cinética de fotodegradação foi calculada para a SQR e para o extrato, através da concentração do fármaco em função do tempo, sendo que os respectivos valores de concentração, log e parcelas de concentração estão apresentados na Tabela 6. A tabela também ilustra a progressiva degradação da sinefrina no decorrer do experimento. Os resultados indicam que a sinefrina SQR pode ser mais fotossensível comparada ao extrato. Sugere-se que este fato decorre do extrato ser composto por inúmeras substâncias e metabólitos secundários, e que alguns destes, possam estar exercendo algum tipo de efeito fotoprotetor no extrato, no entanto, não foram encontrados na literatura relatos que comprovem essa afirmativa.

Tabela 6 - Cinética de fotodegradação da sinefrina e extrato seco de *Citrus aurantium* em solução exposta a lâmpada UVC 254 nm.

Amostra	Tempo (min)	Concentração		Log da Concentração	1/Concentração
		(%)	$\mu\text{g mL}^{-1}$		
SQR	0	100	18,00	2,8904	0,0555
	20	89,24	16,06	2,7763	0,0623
	40	77,60	13,97	2,6369	0,0715
	60	73,09	13,16	2,5772	0,0759
	80	70,07	12,61	2,5345	0,0793
	100	65,15	11,73	2,4621	0,0852
	120	61,14	11,00	2,3979	0,0909
	150	58,12	10,46	2,3475	0,0956
	180	55,87	10,06	2,3086	0,0994
	240	54,38	9,79	2,2814	0,1021
	360	40,98	7,88	2,0643	0,1269
Extrato	0	100	18,00	2,8903	0,0555
	120	85,06	15,31	2,7285	0,0653
	180	79,18	14,25	2,6567	0,0701
	300	71,30	12,83	2,5517	0,0779
	420	58,84	10,59	2,3599	0,0944
	540	49,89	8,98	2,1950	0,1113

Na Figura 7 tem-se uma representação gráfica da concentração de sinefrina SQR remanescente em função do tempo para cada ordem de reação. Através da análise dos coeficientes de correlação, foi possível verificar que a fotodegradação da sinefrina SQR em solução de acetonitrila seguiu cinética de segunda ordem. Já a representação gráfica da concentração de sinefrina remanescente, no extrato de *Citrus aurantium*, em função do tempo, pode ser visualizada na Figura 8. Observando-se os coeficientes de correlação foi possível identificar que o mesmo analito presente no extrato de *Citrus aurantium* demonstrou uma cinética de primeira ordem. Sugere-se que essa variação entre as ordens de reação tenha ocorrido devido aos inúmeros constituintes presentes no extrato, visto que para obter o mesmo teor de degradação o extrato necessitou ficar por muito mais tempo exposto à radiação, em comparação com a sinefrina SQR.

Figura 7 - Gráficos de concentração (reação de ordem zero - A), log de concentração (reação de primeira ordem - B) e inverso de concentração (reação de segunda ordem - C) de sinefrina SQR remanescente em função do tempo.

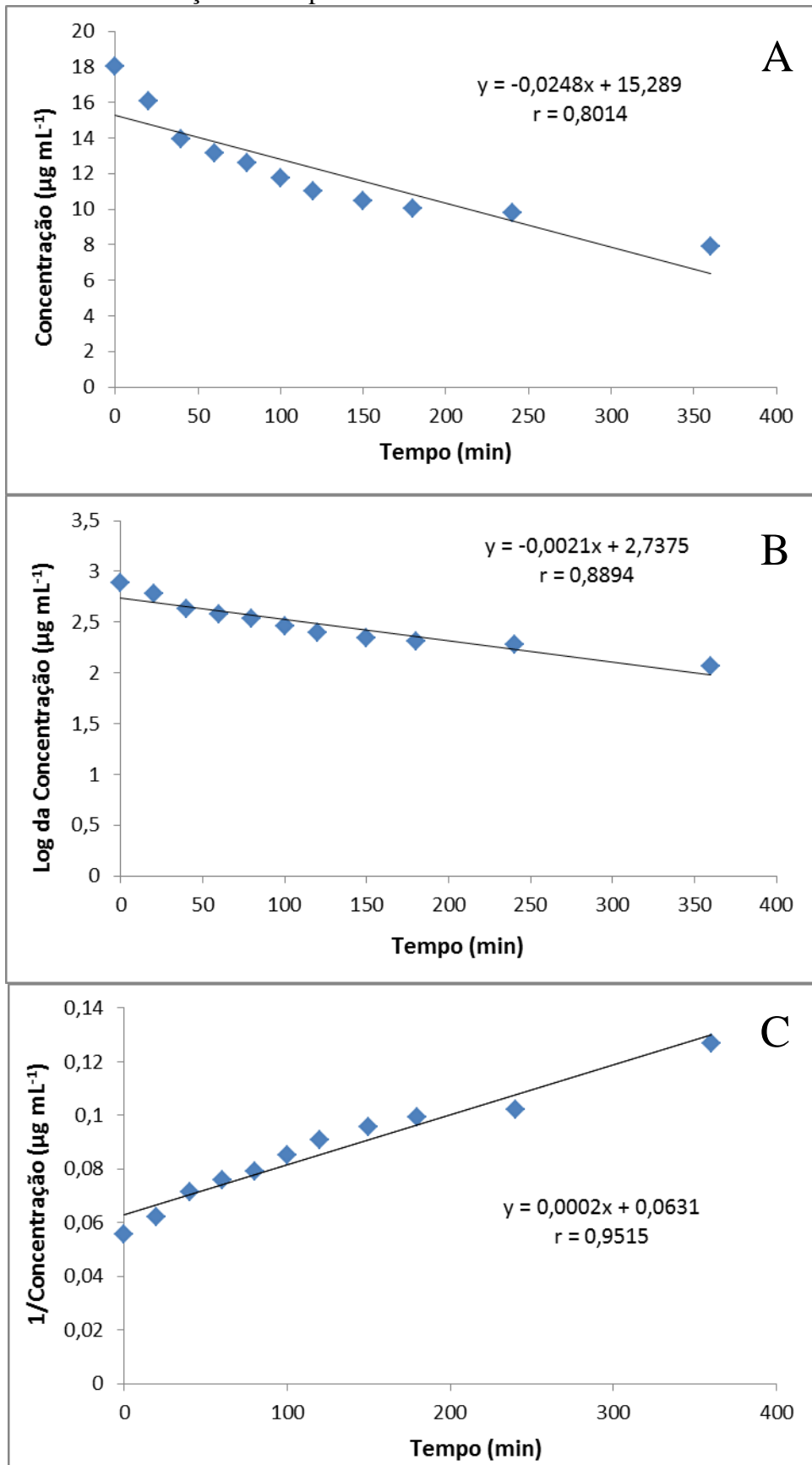
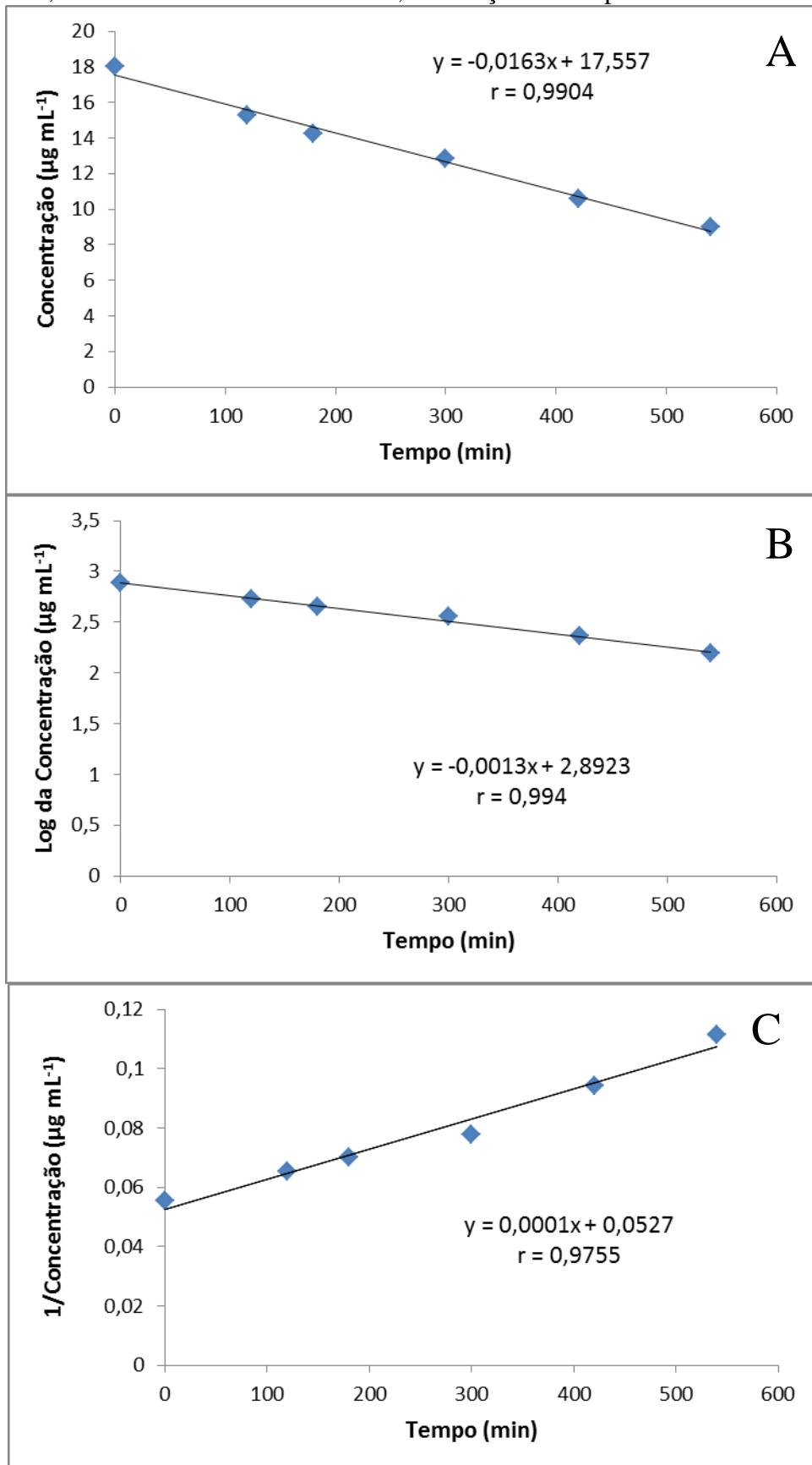


Figura 8 - Gráficos de concentração (reação de ordem zero - A), log de concentração (reação de primeira ordem - B) e inverso de concentração (reação de segunda ordem - C) de sinefrina remanescente, no extrato de *Citrus aurantium*, em função do tempo.



Dessa forma, com auxílio dos modelos cinéticos, foi possível calcular a constante da velocidade de degradação (k), o tempo que o fármaco leva para se reduzir a 50% da sua concentração inicial ($t_{1/2}$) e o tempo necessário para que ocorra redução de 10% da concentração inicial do fármaco (t_{90}). Estes valores podem ser visualizados na Tabela 7.

Tabela 7 - Constante de velocidade de degradação (k), meia-vida ($t_{1/2}$) e t_{90} para sinefrina e extrato de *Citrus aurantium* submetidas à fotodegradação.

Amostra	k	$t_{1/2}$ (min)	t_{90} (min)
SQR	0,000296	187,62	20,88
Extrato	0,001282	540,56	81,90

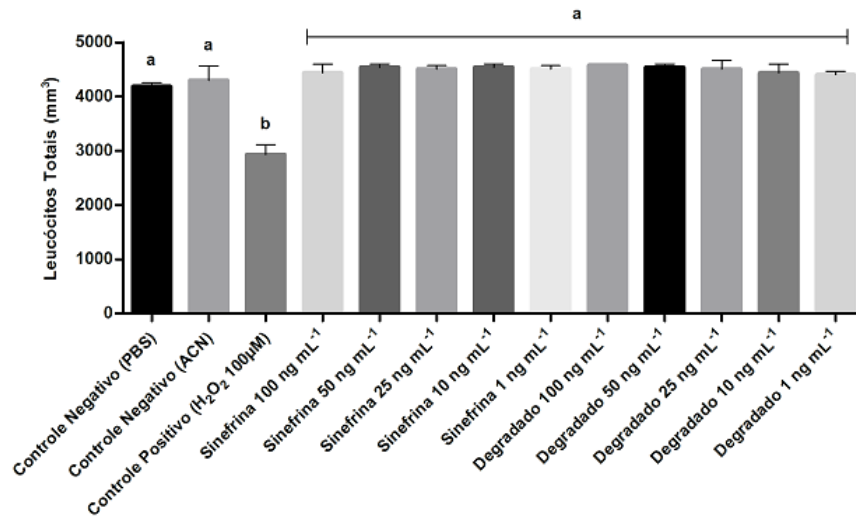
Embora a sinefrina presente no extrato seco de *Citrus aurantium* tenha apresentado um $t_{1/2}$ e t_{90} maiores do que o fármaco isolado, provavelmente pela presença de substâncias fotoprotetoras presentes no extrato, considerando a complexidade do extrato bruto, sugere-se que a mesma, nas condições testadas, é susceptível a degradação fotolítica e deve receber atenção especial quando na manipulação e armazenamento de preparações a base dessa substância, vindo a contribuir para a obtenção de formulações mais estáveis, mantendo sua segurança e eficácia.

5.4 Ensaio de Toxicidade

O uso milenar de plantas medicinais mostrou, ao longo dos anos, que determinadas plantas podem apresentar substâncias potencialmente tóxicas. Por isso, estudos que envolvam fitoterápicos tem sido motivo de preocupação nos meios científicos, pois além das constantes ocorrências de adulterações, deve-se considerar os riscos tóxicos, como os danos ao DNA. Estes podem se manifestar de forma aguda e até mesmo em longo prazo, trazendo complicações ainda maiores. Nesse sentido, técnicas que permitem detectar alterações/danos nas células dos indivíduos são de extrema importância (AQUINO, 2010; LAPA et al., 2004; MARIANO, 2012; MARQUES et al., 2003).

Os resultados da determinação do efeito da sinefrina sobre a proliferação de culturas de leucócitos são mostrados na Figura 9. Não se observou diferença estatisticamente significativa no número de leucócitos, comparando-se as cinco concentrações de sinefrina testadas, com o controle negativo.

Figura 9 – Efeitos da sinefrina na proliferação celular de culturas de leucócitos.

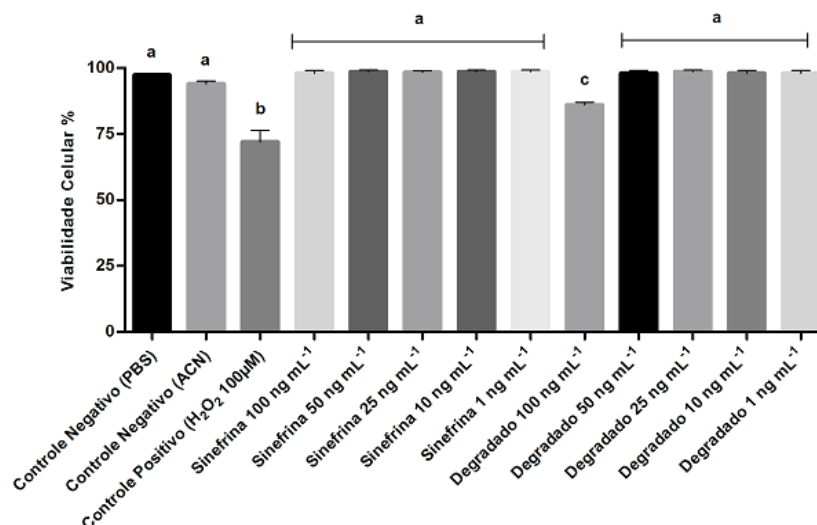


a = resultados sem diferença significativa

b = resultados com diferença significativa em relação a “a”

A Figura 10 mostra o percentual de células viáveis para os grupos controle (positivo e negativo) e teste, utilizando diferentes concentrações da sinefrina. Entre os métodos que avaliam a viabilidade celular utiliza-se o corante azul de Trypan. Este tem a capacidade de penetrar somente em células mortas, que tem suas membranas danificadas, por meio do fluxo de corante que ocorre para o interior da célula, fornecendo uma coloração azul. Assim, células vivas não permitem a passagem do corante e, logo, não adquirem nenhuma coloração (ALVES et al., 2010).

Figura 10 - Viabilidade celular de leucócitos medido pelo corante azul de Trypan, após exposição a diferentes concentrações de sinefrina.



a = resultados sem diferença significativa

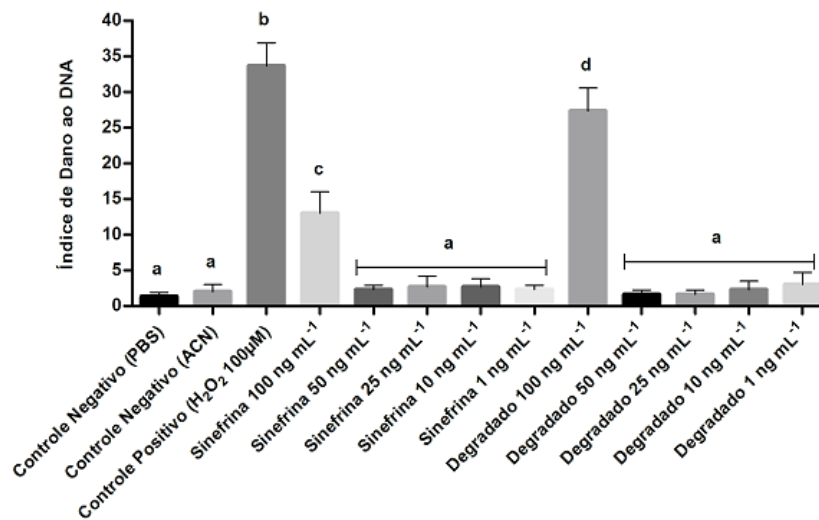
b = resultados com diferença significativa em relação a “a” e “c”

c = resultados com diferença significativa em relação a “a” e “b”

Todas as concentrações de sinefrina mantiveram as células viáveis, exceto a solução mais concentrada do degradado (100 ng mL⁻¹) que demonstrou redução no percentual de viabilidade celular, demonstrando comportamento semelhante ao controle positivo (H₂O₂).

Estes resultados refletiram diretamente nos dados obtidos no ensaio cometa (Figura 11). Pois este exige, como condição prévia, uma alta viabilidade celular (COLLINS et al. 2008). Índice de dano ao DNA foi observado em cultura de leucócitos adicionadas de H₂O₂. O mesmo foi utilizado com a finalidade de mimetizar um ambiente de estresse oxidativo. O H₂O₂ é uma das principais espécies reativas e está envolvido em importantes funções celulares. Porém, em situações de estresse oxidativo, pode oxidar biomoléculas como o DNA. Este efeito foi observado com a solução mais concentrada da sinefrina e do degradado, 100 ng mL⁻¹, embora este dano tenha sido inferior ao grupo controle positivo, sugere um possível efeito genotóxico. As demais concentrações não causaram danos ao DNA, visto que não diferiram estatisticamente do controle negativo.

Figura 11 – Ensaio Cometa: índice de danos ao DNA de células expostas a diferentes concentrações de sinefrina.



a = resultados sem diferença significativa

b = resultados com diferença significativa em relação a “a” e “c”

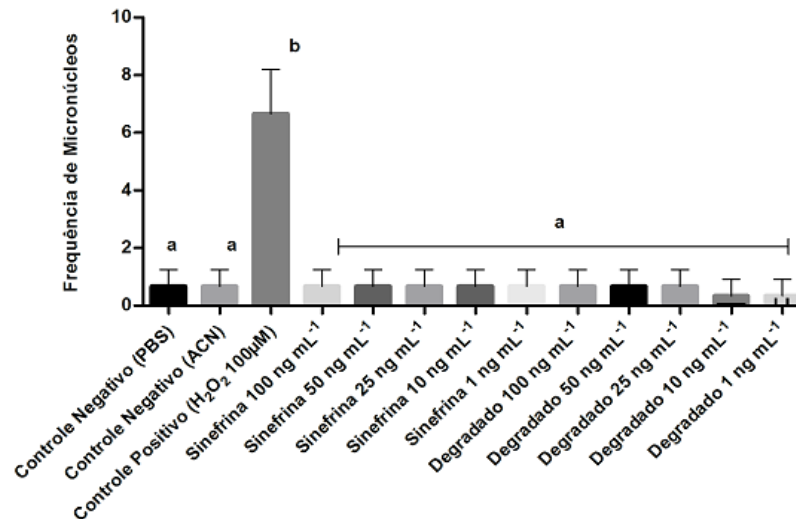
c = resultados com diferença significativa em relação a “a” e “b”

d = resultados com diferença significativa em relação a “a”, “b” e “c”

A produção de micronúcleos foi alta no tratamento com H₂O₂, e significativamente diferente dos demais tratamentos. As células expostas à sinefrina obtiveram baixa produção de micronúcleos, sendo que não houve diferença estatisticamente significativa destes tratamentos

com o controle negativo, portanto, pode-se sugerir que não houve qualquer efeito mutagênico nas concentrações de sinefrina testadas (Figura 12).

Figura 12 – Efeitos da sinefrina na produção de micronúcleos em culturas de células.



a = resultados sem diferença significativa

b = resultados com diferença significativa em relação a “a”

Vários estudos com extratos vegetais têm demonstrado resultados com ação genotóxica e mutagênica (ANDRADE, 2007; GINDRI et al., 2014). Tais estudos, assim como os que foram desenvolvidos nesse trabalho, mostram a importância de se avaliar cientificamente a segurança de produtos utilizados na medicina popular. Os resultados, nas condições testadas, sugerem que a sinefrina apesar de não apresentar efeito mutagênico, diminuiu a viabilidade celular e apresentou dano ao DNA na maior concentração estudada. Devido aos resultados obtidos, percebe-se a necessidade do desenvolvimento de maiores estudos nesta linha de pesquisa, com o intuito de colaborar com a segurança e eficácia terapêutica dos produtos e diminuição do risco à saúde humana.

CONCLUSÃO

- O método desenvolvido por CLAE é indicativo da estabilidade e provou ser simples, linear, preciso, exato e seletivo, demonstrando satisfatórios resultados frente aos parâmetros testados. Também se mostrou adequado para identificação e quantificação da sinefrina em extrato de *Citrus aurantium* podendo ser usado para análise da mesma e também de produtos de degradação em estudos de estabilidade.
- O estudo da cinética de fotodegradação da sinefrina em acetonitrila seguiu cinética de segunda ordem, enquanto o extrato seguiu reação de primeira ordem, nas condições de análise.
- Nos ensaios toxicológicos realizados foi possível verificar, nas condições testadas, que apesar de não apresentar efeito mutagênico, a sinefrina diminuiu a viabilidade celular e causou dano ao DNA na concentração de 100 ng mL^{-1} .
- Os resultados apresentados, até o momento, vêm contrituir com o controle de qualidade e segurança biológica da sinefrina e de extratos de *Citrus aurantium*. Estes dados podem ser utilizados como subsídios para elaboração de preparações farmacêuticas ou suplementos alimentares a base dessa substância, contribuindo com a segurança e eficácia destes produtos.

REFERÊNCIAS

- ALLISON, D. B.; CUTTER, G.; POEHLMAN, E. T.; MOORE, D. R.; BARNES, S. Exactly which synephrine alkaloids does *Citrus aurantium* (bitter orange) contain? **International Journal of Obesity**, v. 29, p. 443-446, 2005.
- ALVES, E. A.; GUIMARÃES, A. C. R. IN: MOLINARO, E. M.; CAPUTO, L. F. G.; AMENDOEIRA, M. R. R. **Conceitos e Métodos para a Formação de Profissionais em Laboratórios de Saúde**. v. 2, Rio de Janeiro: EPSJV; IOC, 2010.
- ANDRADE, C. U. B. **Mutagenicidade do extrato de casca de *Musa paradisíaca* (Musaceae) em células de sangue periférico de camundongos *in vivo***. Dissertação (Mestrado em Saúde) – Universidade José do Rosário Vellano, Alfenas, 2007.
- ANDRADE, A. S. **Estabelecimento e validação de metodologia para quantificação de p-sinefrina em produtos derivados de *Citrus aurantium* por cromatografia a gás**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.
- ANSEL, H. C.; POPOVICH, N. G.; ALLEN JR., L. V. **Formas Farmacêuticas e Sistemas de Liberação de Fármacos**. 8 ed. Porto Alegre: Artmed, 2007.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Consolidado de Normas da COFID (Versão IV). Brasília: Anvisa, 2013.
- AQUINO, I. **Efeito genotóxico da Artemisinina e do Artesunato em células de mamíferos**. Dissertação (Mestrado em Biologia Geral e Aplicada) – Instituto de Biociências (UNESP), Botucatu, São Paulo, 2010.
- ARBO, M. D.; LARENTIS, E. R.; LINCK, V. M.; ABOY, A. L.; PIMENTEL, A. L.; HENRIQUES, A. T.; DALLEGRAVE, E.; GARCIA, S. C.; LEAL, M. B.; LIMBERGER, R. P. Concentrations of p-synephrine in fruits and leaves of *Citrus* species (Rutaceae) and the acute toxicity testing of *Citrus aurantium* extract and p-synephrine. **Food and Chemical Toxicology**, v.46, p.2770–2775, 2008.
- AREND, M. Z.; CARDOSO, S. G.; HURTADO, F. K.; RAVANELLO, A.; LANZANOVA, F. A.; ROLIM, C. M. B. Development and validation of a stability-indicating LC method for determination of ebastine in tablet and syrup. **Chromatographia**, 2009.

AULTON, M.E. **Delineamento de formas farmacêuticas**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

AVULA, B.; UPPARAPALLI, S. K.; NAVARRETE, A.; KHAN, I. A. Simultaneous quantification of adrenergic amines and flavonoids in *C. aurantium*, various *Citrus* species, and dietary supplements by liquid chromatography. **Journal of AOAC International**, v. 88, p.1593-606, 2005.

AVULA, B.; UPPARAPALLI, S. K.; KHAN, I. A. Enantiomeric Separation of Adrenergic Amines in *Citrus* Species, Related Genera and Dietary Supplements by Capillary Electrophoresis. **Chromatographia**, v. 62, p. 151-157, 2005.

BAERTSCHI, S. W. Analytical methodologies for discovering and profiling degradation-related impurities. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 25, p. 758-767, 2006.

BAKSHI, M.; SINGH, S. Development of validated stability-indicating assay methods - critical review. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 28, p. 1011–1040, 2002.

BEYER, J.; PETERS, F. T.; KRAEMER, T.; MAURER, H. H. Detection and validated quantification of nine herbal phenalkylamines and methcathinone in human blood plasma by LC-MS/MS with electrospray ionization. **Journal of Mass Spectrometry**. v, 42, p.150-60, 2007.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria nº 6, de 31 de janeiro de 1995. Institui e normatiza o registro de produtos fitoterápicos junto ao Sistema de Vigilância Sanitária, 1995.

_____. RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 02 jun. 2003.

_____. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RE nº 01, de 29 de julho de 2005. Guia para a realização de estudos de estabilidade. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 01 ago. 2005.

_____. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC nº 45, de 9 de agosto de 2012. Dispõe sobre a realização de estudos de estabilidade de insumos farmacêuticos ativos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 10 ago. 2012.

_____. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC nº 58, de 20 de dezembro de 2013. Estabelece parâmetros para a notificação, identificação e qualificação de produtos de degradação em medicamentos com substâncias ativas sintéticas e semissintéticas, classificados como novos, genéricos e similares, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 23 dez. 2013.

BUROW, M.E.; WELDON, C.B.; TANG, Y.; NAVAR, G.L; KRAJEWSKY, S.; REED, J.C.; HAMMOND, T.G.; CLEJAN, S.; BECKMAN, B.S. Differences in Susceptibility to Tumor Necrosis Factor α -induced Apoptosis among MCF-7 Breast Cancer Cell Variants. **Cancer Research**, v. 58, p. 4940-4946, 1998.

CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Brasilian Journal of Medicine and Biological Research**, v.33, p.179-189, 2000.

CANCALON P. F. Analytical monitoring of *citrus* juices by using capillary electrophoresis. **Journal of AOAC International**, v. 82, nº 1, p. 95-106, 1999.

CARSTENSEN, J. T.; RHODES, C. T. **Drug Stability: Principles and Practice**. New York: Marcel Dekker, 2000.

CHEN, G., ZHANG, L.; ZHAO, J.; YE, J. Determination of hesperidin and synephrine in pericarpium citri reticulatae by capillary electrophoresis with electrochemical detection. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 373, p. 169-173, 2002.

COLLINS, A. R.; OSCOZ, A. A.; BRUNBORG, G.; GAIVÃO, I.; GIOVANNELLI, L.; KRUSZEWSKI, M.; SMITH, C. C.; STETINA, R. The comet assay: topical issues. **Mutagenesis**, v.23, n.3, p.143-151, 2008.

DEL GROSSO, E.; APRILE, S.; GROSA, G. Forced degradation study of thiocolchicoside: Characterization of its degradation products. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 61, p. 215-223, 2012.

DWYER, J. T.; ALLISON, D. B.; COATES, P. M. Dietary Supplements in Weight Reduction. **Journal of The American Dietetic Association**, v.105, p.S80-S86, 2005

ERMER, J.; MILLER, J. H. **Method Validation in Pharmaceutical Analysis – A Guide to Best Practice**. Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2005.

FIGUEIREDO, F. R. G. **Ensaio mutagênicos em decocto de *Cochlospermum regium* (Mart. et. Schr.) Pilger (Bixaceae) em *Poecilia reticulata* e linfócitos humanos.** Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais e Saúde) – Pontífca Universidade Católica de Goiás, Goiânia, 2012.

FLASO - Federação Latino-Americana de Sociedades de Obesidade. Consenso Latino-Americano de Obesidade. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia Metabólica**, v. 43, n.1, 1999.

FRANCO, L. **Desenvolvimento e Validação de Metodologias para o Controle de Qualidade de Derivados de *Pelargonium sidoides* d.c.** Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.

FREITAS, P.S. **Investigação do potencial mutagênico do extrato de frutos de *Vaccinium corybosum* (mirtilo) em células do sangue periférico de camundongos Swiss *in vivo*.** Dissertação (Mestrado). Universidade Jose do Rosário Vellano, Alfenas/Minas Gerais, 2007.

FUGH-BERMAN, A.; MYERS, A. *Citrus aurantium*, an ingredient of a dietary supplements marketed for weight loss: current status of clinical and basic research. **Experimental Biology and Medicine**, v.229, p.698-704, 2004.

GAY, M. L.; NIEMANN, R. A.; MUSSER, S. M. An isotopically labeled internal standard liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for determination of ephedrine alkaloids and synephrine in dietary supplements. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 285-91, 2006.

CHEN, G.; ZHANG, L.; ZHAO, J.; YE, J. Determination of hesperidin and synephrine in Pericarpium *Citri Reticulatae* by capillary electrophoresis with electrochemical detection. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 373, p. 169-173, 2002.

GENNARO, A. R. **Remington - A Ciência e a Prática da Farmácia.** 20 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S. A., 2000.

GIL, E. S.; ORLANDO, R. M.; MATIAS, R; SERRANO, S. H. P. **Controle físico-químico de controle de qualidade de medicamentos.** Campo Grande: Uniderp, 2005.

GINDRI, A. L.; SOUZA, L. B.; CRUZ, R. C.; BOLIGON, A. A.; MACHADO, M. M.; ATHAYDE, M. L. Genotoxic evaluation, secondary metabolites and antioxidant capacity of leaves and roots of *Urera baccifera* Gaudich (Urticaceae). **Taylor & Francis**, 2014.

GROLLMAN, A. P. Academic perspectives on dietary supplements use: The need for new guidelines. **Thrombosis Research**, v. 117, p. 185-192, 2005.

HAAZ, S.; FONTAINE, K. R.; CUTTER, G.; LIMDI, N.; PERUMEAN-CHANEY, S.; ALLISON, D. B. *Citrus aurantium* and synephrine alkaloids in the treatment of over weight and obesity: an update. **Obesity Reviews**, v.7, p.79-88, 2006.

HALLER, C. A.; BENOWITZ, N. L. Adverse cardiovascular and central nervous system events associated with dietary supplements containing ephedra alkaloids. **The New England Journal of Medicine**, v. 343, p.1833–1838, 2000.

HALLER, C. A.; BENOWITZ, N. L.; JACOB, P. Hemodynamic effects of ephedra-free weightloss supplements in humans. **The American Journal of Medicine**, v. 118, p. 998-1003, 2005.

HARRI, L.; MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais no Brasil nativas e exóticas**. São Paulo (SP): Instituto Plantarum, 2002.

HE, X.; LIAN, L.; BERNART, M. W. High-performance liquid chromatography–electrospray mass spectrometry in phytochemical analysis of sour orange (*Citrus aurantium* L.). **Journal of Chromatography A**, v. 12, p.127–134, 1997.

HURLBUT, J. A.; CARR, J. R.; SINGLETON, E. R.; FAUL, K. C.; MADSON, M. R.; STOREY, J. M.; THOMAS, T. L. Solid-phase extraction cleanup and liquid chromatography with ultraviolet detection of ephedrine alkaloids in herbal products. **Journal of AOAC International**, v. 81, p.1121-1127, 1998.

HUYNH-BA, Kim. **Handbook of stability testing in pharmaceutical development**. Springer, Nova Iorque, 2009.

ICH. International Conference on Harmonisation. **Q1A(R2): Stability testing of new drug substances and products**. ICH Steering Committee, 2003.

_____. International Conference on Harmonisation. **Q2B(R1): Guideline on Validation of Analytical Procedure–Methodology**, ICH Steering Committee 2005.

JACOBOWSKI, A. C. Avaliação do potencial efeito genotóxico de quelato de cobre nano e microencapsulado. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Católica Dom Bosco, Mato Grosso do Sul, 2009.

JORDAN, S.; MURTY, M.; PILON, K. Products containing bitter orange or synephrine: suspected cardiovascular adverse reactions. **Canadian Medical Association Journal**, v. 171, n. 8, p. 4-57, 2004.

KLEIN, T.; LONGHINI, R.; BRUSCHI, M.L.; MELLO, J.C.P. Fitoterápicos: um mercado promissor. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 30, n. 3, p. 241-248, 2009.

KLICK, S.; MUIJSELAAR, P. G.; WATERVAL, J.; EICHINGER, T.; KORN, C.; GERDING, T. K.; DEBETS, A. J.; GRIEND, C. S.; SOMSEN, G. W.; DE JONG, G. J. Towards a generic approach for stress testing of drug substances and drug products. **Pharmaceutical Technology**, v. 29, p. 48-66, 2005.

KOMMANABOYINA, B.; RHODES, C. T. Trends in stability testing, with emphasis on stability during distribution and storage. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 25, 1999.

KUSU, F.; MATSUMOTO, K.; ARAI, K.; TAKAMURA, K. Determination of Synephrine Enantiomers in Food and Conjugated Synephrine in Urine by High-Performance Liquid Chromatography with Electrochemical Detection. **Analytical Biochemistry**, v.235, p.191-194, 1996.

LACHMAN, L.; LIEBERMAN, H. A.; KANIG, J. L. **Teoria e Prática na Indústria Farmacêutica**. Lisboa: Calouste Gulbenkian, 2001.

LAPA, A. J.; SOUCCAR, C.; LIMA-LANDMAN, M. T. R.; GODINHO, R. O.; NOGUEIRA, T. C. M. L. **Farmacologia e toxicologia de produtos naturais**. In SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 5 ed. Porto Alegre: UFRGS, 2004.

LEITE, E. G. **Estabilidade: importante parâmetro para avaliar a qualidade, segurança e eficácia de fármacos e medicamentos**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

LUCAS, T. I.; BISHARA, R. H.; SEEVERS, R. H. A. Stability program for the distribution of drug products. **Pharmaceutical Technology**, nº 6, p. 68-73, 2004.

MALESUIK, M. D.; CARDOSO, S. G.; STEPPE, M. Development of a validated stability-indicating LC method for nitazoxanide in pharmaceutical formulations. **Chromatographia**, v. 67, p. 131-136, 2008.

MARCHEI, E.; PICHINI, S.; PACIFICI, R.; PELLEGRINI, M.; ZUCARO, P. A rapid and simple procedure for the determination of synephrine in dietary supplements by gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.41, n.4, p. 1468-1472, 2006.

MARIANO, G. R. C. **Avaliação da toxicidade pré-clínica aguda do extrato hidroalcoólico bruto das sementes de *Vatairea guianensis* (Aublet)** – Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Macapá, 2012.

MARQUES, R. C. P.; MEDEIROS, S. R. B.; DIAS, C. S.; FILHO, J. M. B.; LIMA, L. F. A. Evaluation of the mutagenic potential of yangambin and of the hydroalcoholic extract of *Ocotea duckei* by the Ames Test. **Mutation Research**, v. 536, p. 117-120, 2003.

MATTHEWS, B. R. Regulatory aspects of stability testing in Europe. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 27, n° 7, p. 56-831, 1999.

MATTOLI, L.; CANGI, F.; MAIDECCHI, A.; GHIARA, C.; TUBARO, M.; TRALDI, P. A rapid liquid chromatography electrospray ionization mass spectrometry method for evaluation of synephrine in *Citrus aurantium* L. samples. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 9860-9866, 2005.

MERCOLINI, L.; MANDRIOLI, R.; TRERÈ, T.; BUGAMELLI, F.; FERRANTI, A.; RAGGI, M. A. Fast CE analysis of adrenergic amines in different parts of *Citrus aurantium* fruit and dietary supplements. **Journal of Separation Science**, v. 33, n. 16, 2010.

MUTHIAH, P. L. *In vitro* antioxidant activities of leaves, fruits and peel extracts of *Citrus*. **International Journal of Phytotherapy**, v. 2, n. 1, p. 13-20, 2012.

NIEMANN, R.A.; GAY, M.L. Determination of ephedrine alkaloids and synephrine in dietary supplements by column-switching cation exchange high-performance liquid chromatography with scanning-wavelength. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 5630–5638, 2003.

NUDELMAN, N. S. **Estabilidad de medicamentos**. Buenos Aires: El Ateneu, 1975.

PEDRO, A. M. K. **Desenvolvimento do método multivariado acelerado para determinação do prazo de validade de produtos unindo quimiometria e cinética química**. Tese (Pós-graduação em Físico-Química) – Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, Campinas - São Paulo, 2009.

PELLATI, F.; BENVENUTTI, S.; MELEGARI, M.; FIRENZUOLI, F. Determination of adrenergics agonists from extracts and herbal products of *Citrus aurantium* L. var. amara by LC. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v.29, p. 1113-1119, 2002.

PELLATI, F.; BENVENUTI, S.; MELEGARI, M. Enantioselective LC analysis of synephrine in natural products on a protein-based chiral stationary phase. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 37, p. 839-49, 2005.

PELLATI, F.; BENVENUTI, S. Chromatographic and electrophoretic methods for the analysis of phenethylamine alkaloids in *Citrus aurantium*. **Journal of Chromatography A**, v.1161, p.71–88, 2007a.

_____. Fast high-performance liquid chromatography analysis of phenethylamine alkaloids in *Citrus* natural products on a pentafluorophenylpropyl stationary. **Journal of Chromatography A**, v.1165, p. 58–66, 2007b.

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**, São Paulo, v. 27, n. 5, set./out. 2004.

RIBEIRO, L. R. Teste do micronúcleo em medula óssea de roedores *in vivo*. In: RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. (Ed.) **Mutagênese Ambiental**. Canoas: Ulbra, 2003.

ROMAN M. C.; BETZ, J. M.; HILDRETH, J. Determination of synephrine in bitter orange raw materials, extracts, and dietary supplements by liquid chromatography with ultraviolet detection: single-laboratory validation. **Journal of AOAC International**, v. 90, p.68-81, 2007.

ROSSATO, L. G. **A sinefrina e o seu potencial cardiotoxico: O uso no emagrecimento e metodologias analíticas para detectar a sinefrina**. Dissertação (Mestrado em Toxicologia Analítica Clínica e Forense) - Universidade do Porto, Porto, 2009.

ROSSATO, L. G.; COSTA, V. M.; LIMBERGER, R. P.; BASTOS, M. L.; REMIÃO, F. Synephrine: From trace concentrations to massive consumption in weight-loss. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, p. 8-16, 2011.

SANTANA J.; SHARPLESS, K. E.; NELSON, B. C. Determination of para-synephrine and meta-synephrine positional isomers in bitter orange-containing dietary supplements by LC/UV and LC/MS/MS. **Food Chemistry**, v.109, p.675-682, 2008.

SANTOS MONTAGNER, G. F. F.; SAGRILLO, M.; MACHADO, M. M.; ALMEIDA, R. C.; MOSTARDEIRO, C. P.; DUARTE, M. M.M. F.; CRUZ, I. B. M. Toxicological effects of ultraviolet radiation on lymphocyte cells with different manganese superoxide dismutase Ala16Val polymorphism genotypes. **Toxicology In Vitro**, 2010.

SCHMID, W. The Micronucleus Test. **Mutation Research**, v.31, p.09-15, 1975.

SCHMITT, G. C. **Análise química e toxicológica de suplementos alimentares e compostos emagrecedores contendo *p*-sinefrina associada à efedrina, salicina e cafeína**. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2012.

SIANI, A. C. **Desenvolvimento tecnológico de fitoterápicos: plataforma metodológica**. Rio de Janeiro: Scriptorio, 2003.

SILVA, W. **Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para a material-prima e solução extrativa aquosa de partes aéreas de *Phyllanthus niruri* L.** Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1999.

SILVA, A. L. M. da; SOARES SOBRINHO, J. L.; ROLIM NETO, P. J. Desenvolvimento de Método Analítico por CLAE em Comprimidos de Benznidazol para a Doença de Chagas. **Química Nova**, v. 30, n. 5, p. 1163-1166, 2007.

SILVA, K. E. R.; ALVES, L. D. S.; SOARES, M. F. R.; PASSOS, R. C. S.; FARIA, A. R.; ROLIM NETO, P.J. Modelos de avaliação da estabilidade de fármacos e medicamentos para a indústria farmacêutica. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 30, n. 2, p.129-135, 2009.

SILVA, T. D. Desenvolvimento de métodos analíticos e de formulações para estatinas. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2009.

SINGH, N.; MCCOY, M.; TICE, R.; SCHNEIDER, E. A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individuals cells. **Experimental Cell Research**, v. 175, p. 184-191, 1995.

SINGH, S.; BAKSHI, M. Guidance on Conduct of Stress Tests to Determine Inherent Stability of Drugs. **Pharmaceutical Technology On-Line**, 2000.

SINKO, P. J. **Físico- Farmácia e Ciências farmacêuticas**. 5 ed. Porto Alegre: Artmed, 2008.
SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. **Princípios de Análise Instrumental**. 5 ed. Porto Alegre: Boockman, 2002.

SLEZAK, T.; FRANCIS, P. S.; ANASTOS, N.; BARNETT, N. W. Determination of synephrine in weight-loss products using high performance liquid chromatography with acidic potassium permanganate chemiluminescence detection. **Analytica Chimica Acta** v. 593 p. 98-102, 2007.

STULZER, H. K.; SILVA, M. A.; Estudo de estabilidade de grânulos revestidos e comprimidos contendo Captopril. **Acta Farmacéutica Bonaerense**, v. 25, n. 4, p. 497-504, 2006.

TABORIANSKI, A. M. **Validação de métodos para análise e estudos de estabilidade de anti-retrovirais em preparações farmacêuticas**. Dissertação – (Fármaco e Medicamentos) Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

TANG, F.; TAO, L.; LUO, X.; DING, L.; GUO, M.; NIE, L.; YAO, S. Determination of octopamine, synephrine and tyramine in Citrus herbs by ionic liquid improved ‘green’ chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1125, p. 182-188, 2006.

TICE, R. R.; AGURELL, E.; ANDERSON, D.; BURLINSON, B.; HARTMANN, A.; KOBAYASHI, H.; MIYAMAE, Y.; ROJAS, E.; RYU, J. C.; SASAKI, Y. F. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 35, p. 206-221, 2000.

UCKOO, R. M.; JAYAPRAKASHA, G. K.; NELSON, S. D.; PATIL, B. S. Rapid simultaneous determination of amines and organic acids in *Citrus* using high-performance liquid chromatography. **Talanta**, v. 83, p. 948-954, 2011.

United States Pharmacopeia: **USP 35/NF30**. Rockville: U.S. Pharmacopeial Convention, 2012.

VALENTIN-SEVERIN, I.; LE HEGARAT, L.; LHUGUENOT, J. C.; LE BON, A. M.; CHAGNON, M. C. Use of HepG2 cell line for direct and indirect mutagens screening: comparative investigation between comet and micronucleus assays. **Mutation Research**, v. 536, p. 79- 90, 2003.

YUNIS, J. J. High resolution of human chromosomes. **Science**, v. 1976, p. 1268–1270, 1996.

VEHABOVIC, M.; HADZOVIC, S.; STAMBOLIC, F.; HADZIC, A.; VRANJES, E.; HARACIC, E. Stability of ranitidine in injectable solutions. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 256, p. 109-115, 2003.

VIANA, C.; ZEMOLIN, G. M.; LIMA, F. O.; CARVALHO, L. M.; BOTTOLI, C. B.; LIMBERGER, R. P. High-performance liquid chromatographic analysis of biogenic amines in pharmaceutical products containing *Citrus aurantium*. **Food Additives & Contaminants**, v. 30, n.4, p. 634-642, 2013.

WANG, Q. H.; SHU, Z. P.; XU, B. Q.; XING, N.; JIAO, W. J.; YANG, B. Y.; KUANG, H. X. Structural characterization and antioxidant activities of polysaccharides from *Citrus aurantium* L. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 67, p. 112-123, 2014.

WATSON, D. G. **Pharmaceutical Analysis. A Textbook for Pharmacy Students and Pharmaceutical Chemists**. Elsevier Churchill Livingstone, 2005.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **The challenge of obesity in the WHO European Region and the strategies for response**. 2007. Disponível em: <
<http://www.euro.who.int/en/what-we-do/health-topics/diseaseprevention/physical-activity/publications/2007/challenge-of-obesity-in-the-who-european-region-and-the-strategies-for-response-the/>> Acesso em 10 nov. 2012.