

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA

CAROLINA SELBACH PEREIRA

**FOTODEGRADAÇÃO DA SINEFRINA: ESTUDOS EXPERIMENTAIS E
TEÓRICOS**

**Uruguiana
2018**

CAROLINA SELBACH PEREIRA

**FOTODEGRADAÇÃO DA SINEFRINA: ESTUDOS EXPERIMENTAIS E
TEÓRICOS**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Farmácia
da Universidade Federal do Pampa,
como requisito parcial para obtenção
do Título de Bacharel em Farmácia.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo
Donadel Malesuik

Coorientador: Prof. Dr. Fávero
Reisdorfer Paula

**Uruguiana
2018**

Carolina Selbach Pereira

**FOTODEGRADAÇÃO DA SILNEFRINA: ESTUDOS
EXPERIMENTAIS E TEÓRICOS**

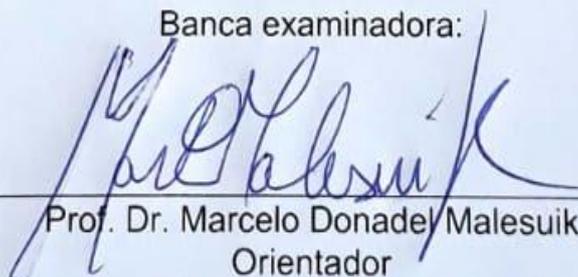
Trabalho de conclusão de curso apresentado ao curso de Farmácia da Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA), como requisito parcial para aprovação na disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso.

Orientador (a): Prof. Dr. Marcelo Donadel Malesuik

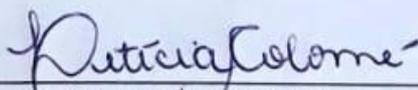
Área de concentração: Farmácia

Trabalho de conclusão de curso defendido e aprovado em: 04 / 07 / 2018

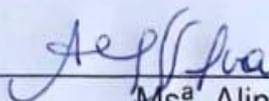
Banca examinadora:



Prof. Dr. Marcelo Donadel Malesuik
Orientador
Curso de Farmácia - UNIPAMPA



Prof.ª Dr.ª Leticia Marques Colme
Curso de Farmácia - UNIPAMPA



Ms.ª Aline Santos da Silva
Curso de Farmácia - UNIPAMPA

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela vida e proteção.

À minha família por sempre acreditar e me apoiar incondicionalmente.

Ao meu namorado Eduardo Castro Laguna por toda ajuda, companheirismo e compreensão nestes dias difíceis.

Ao Prof Marcelo Donadel Malesuik, pela orientação deste trabalho, por sua paciência, confiança e amizade. Ao Prof Fávero R. Paula pela contribuição com este trabalho, paciência e ensinamentos.

Aos colegas e amigos da graduação, e também as Farmacêutica Fernanda e Maria Fernanda pelos ensinamentos e compreensão durante esse período final da graduação.

Aos colegas de iniciação científica do Laboratório de Desenvolvimento e Controle de Qualidade de Medicamentos, pelas contribuições e convivência, especial à Mariana Sabo, pela amizade, conhecimento e paciência em ensinar.

E agradeço também a todos, que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

RESUMO

A obesidade representa um grave problema de saúde pública, aliada a cultura social que impõem certos padrões de beleza, associados à magreza, levam a uma busca desenfreada por formulações “naturais” que apresentem substâncias emagrecedoras ou supostamente emagrecedoras. Neste âmbito podemos destacar a sinefrina, encontrada no extrato da casca do fruto do *Citrus aurantium* L., que vem sendo amplamente utilizada para este propósito. O risco está no fato de que na maioria das vezes estes compostos não possuem nenhum respaldo científico em relação a sua eficácia e segurança. Estudos recentes relatam a instabilidade da sinefrina quando exposta à luz ultravioleta, formando produtos de degradação. Estudos toxicológicos comprovaram que a sinefrina fotodegradada apresenta potencial citotóxico, provavelmente devido à presença dos produtos formados. A partir desta problemática o presente trabalho tem por objetivo desenvolver método por LC-ESI-MS e estudo *in silico* para identificação dos principais produtos de fotodegradação, bem como suas rotas de degradação. Foi desenvolvido método por LC-ESI-MS seguindo os parâmetros tais como: coluna C₁₈ (250 x 4,6 mm, 5µm), fase móvel composta por metanol : água, na proporção 50:50, vazão de 0,4 mL/min, voltagem do capilar 2,5kV, temperatura da fonte 110° C, temperatura de dessolvatação 250° C, fluxo de nitrogênio na dessolvatação 900L/h, fluxo de nitrogênio no cone 90L/h e espectro de análise entre 50-900m/z. O estudo *in silico* foi realizado conforme metodologia computacional levando-se em consideração o cálculo de abstração dos átomos de hidrogênio da estrutura química da sinefrina na degradação fotolítica. A análise das massas e os resultados do estudo *in silico* sugerem a formação do produto 1metil-2,3-dihidro-1H-indole-3,6-diol, devido a maior reatividade do grupo amino da cadeia lateral da molécula, com a formação do grupamento amino cromano. Os dados obtidos colaboram com os estudos na área e podem ser empregados para auxílio na identificação e determinação das rotas de degradação da sinefrina.

Palavras-Chave: sinefrina, fotodegradação, *in silico*, LC-ESI-MS

ABSTRACT

Obesity represents a serious public health problem, coupled with social culture that impose certain beauty standards, associated with thinness, leads to an unbridled search for "natural" formulations that present weight loss or supposedly weight loss substances. In this context, we can highlight the synephrine, found in the *Citrus aurantium L.* fruit peel extract, which has been widely used for this purpose. The risk lies in the fact that most of the time these compounds have no scientific support for their efficacy and safety. Recent studies report the synephrine instability when exposed to ultraviolet light, forming degradation products. Toxicological studies have shown that photodegraded synephrine has cytotoxic potential, probably due to the presence of the formed products. The present work aims to develop a method by LC-ESI-MS and an *in silico* study to identify the main photodegradation products, as well as their degradation routes. The LC-ESI-MS method was developed following parameters such as: column C₁₈ (250 x 4.6 mm, 5µm), mobile phase composed of methanol:water (50:50, v/v), flow rate of 0.4 mL min⁻¹, capillary voltage 2.5 kV, source temperature 110° C, desolvation temperature 250° C, desolvation nitrogen flow 900L h⁻¹, cone nitrogen flow 90L h⁻¹ and analysis spectrum between *m/z* 50-900. The *in silico* study was carried out according to computational methodology taking into account the calculation of hydrogen atoms abstraction of the synephrine chemical structure in the photolytic degradation. MS analysis and the *in silico* study results suggest the formation of the product 1methyl-2,3-dihydro-1H-indole-3,6-diol, due to the higher reactivity of the side chain amino group of the molecule, with formation of the amino-chroman group. The obtained data collaborate with the studies in the area and can be used to aid in the identification and determination of the synephrine degradation routes.

Keywords: synephrine, photodegradation, *in silico*, LC-ESI-MS

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Fórmula estrutural da sinefrina (modificado de SANTOS ANDRADE, 2008)	14
Figura 2 - Similaridade estrutural entre (a) sinefrina e (b) efedrina (PELLATI, 2005)	14
Figura 3- Cromatograma por LC-ESI-MS modo positivo do produto de fotodegradação da sinefrina com 166 m/z.	24
Figura 4 - Visualização em 3D do sinefrina em modelo tubo e mapa dos orbitais moleculares HOMO (A) e LUMO (B), em superfície de isoestrutura de van der Waals 0,002 eV usando Spartan for Windows 08.	25
Figura 5 - Esquema de geração de produto de degradação da sinefrina em condições de fotodegradação. Adaptado de Hoellein e Holzgrabe et al. (2012).	27
Figura 6 - rota de degradação da epinefrina.	28
Figura 7- Estrutura química da sinefrina e epinefrina.	28

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Condições cromatográficas definidas para análise da sinefrina e seus produtos de degradação por LC-ESI-MS. 22

Tabela 2 - Resultados das massas encontradas na análise por LC-ESI-MS utilizando Scan por ESI positivo e ESI negativo, unidades de massa encontradas após 5h de degradação fotolítica da sinefrina. 23

Tabela 3- Energia de dissociação de ligação (abstração) do átomo de hidrogênio da estrutura química da obtidos com o uso de software Spartan for Windows 08 e aplicação de equação 1. 26

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CLAE - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

LC – Cromatografia Líquida

ESI - Ionização por electrospray

MS - Espectrometria de massas

UV – Ultravioleta

DFT - Teoria Funcional da Densidade

OMS – Organização Mundial da Saúde

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 OBJETIVOS.....	13
2.1 Específicos.....	13
2.1 Geral	13
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	14
3.1 Sinefrina	14
3.2 Estabilidade	15
3.3 Espectrometria de Massas	17
3.5 Ferramentas Computacionais.....	18
4 METODOLOGIA.....	19
4.1 Produtos Químicos	19
4.1.1 Amostra de Sinefrina.....	19
4.1.2 Preparo da amostra e fotodegradação.....	19
4.2 Método por LC-ESI-MS	19
4.3 Estudo de previsão <i>In silico</i> de reatividade molecular	20
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	21
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	30
7 REFERÊNCIAS.....	31

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).

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).

Neste âmbito podemos destacar a sinefrina encontrada principalmente no extrato da casca do fruto do *Citrus aurantium* L., popularmente conhecida como laranja amarga. Alguns estudos relatam que a mesma também pode ser encontrada nas folhas e flores, inclusive em sucos (ARBO et al., 2008). A comercialização e uso da sinefrina em suplementos alimentares teve um considerável aumento a partir da proibição da comercialização de produtos que continham alcaloides da *Ephedra* sp. em abril de 2004 pelo *Food and Drug Administration* (FDA) (BENT et al., 2004). Essa proibição ocorreu devido à associação do seu uso com problemas cardíacos, psiquiátricos, derrames cerebrais e hipertensão (HALLER e BENOWITZ, 2000; SAMENUK et al., 2002;). Tendo em vista à similaridade estrutural química e apresentar, possivelmente, os mesmos efeitos emagrecedores, a efedrina passou a ser substituída em formulações emagrecedoras pela sinefrina (FUGH-BERMAN; MYERS, 2004; ROSSATO, 2009).

O uso exponencial e indiscriminado de suplementos alimentares e compostos emagrecedores a base de sinefrina representa um grande problema de saúde pública, como também, de controle pelos órgãos regulatórios nacionais e internacionais (SCHMITT et al., 2012). Trabalhos recentes relatam que a sinefrina apresenta instabilidade quando exposta à luz ultravioleta, formando produtos de degradação. Além disso, estudos toxicológicos comprovaram que a sinefrina degradada apresenta potencial citotóxico, provavelmente devido à presença dos produtos formados (KAEFER, 2014).

Neste cenário, considerando-se a grande procura e a facilidade de acesso a diversidade de suplementos alimentares, aliada a escassez de dados conclusivos na literatura referente ao controle de qualidade desses compostos, tornam-se imprescindíveis estudos que venham a contribuir com a qualidade e segurança desses produtos, bem como estudos que possam colaborar com a elucidação das rotas de degradação e identificação dos principais produtos de degradação formados.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Realizar estudo preliminar para identificação dos principais produtos de fotodegradação da sinefrina, bem como, avaliar suas prováveis rotas de degradação.

2.2 Específicos

- Executar a fotodegradação da sinefrina em câmara de fotoestabilidade;
- Desenvolver e otimizar método por LC-ESI-MS para análise dos produtos de degradação da sinefrina;
- Verificar as unidades de massas dos principais produtos da fotodegradação da sinefrina;
- Realizar estudo *in silico* para estimar a estabilidade química da molécula de sinefrina, bem como, sugerir as possíveis quebras moleculares;
- Sugerir preliminarmente a estrutura molecular dos principais produtos formados.

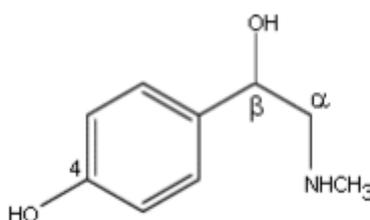
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Sinefrina

A sinefrina é uma amina comum em produtos derivados cítricos, sendo obtida, principalmente a partir da casca e do fruto da laranja-amarga, conhecido como *Citrus aurantium* L. (DHARMANANDA, 2002; GROLLMAN, 2005; PELLATI *et al.*, 2005; MATTOLI *et al.*, 2005).

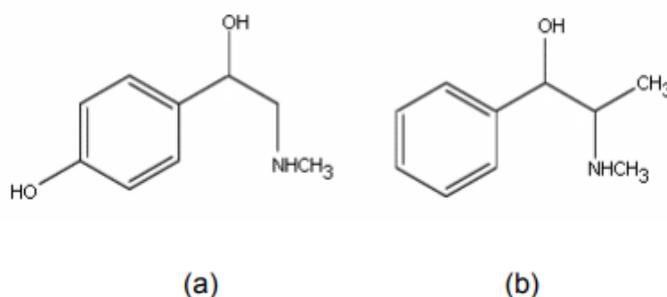
No aspecto estrutural, a sinefrina (Figura 1) é uma feniletilamina com substituições na posição 4 do anel aromático, no carbono β no átomo de nitrogênio da cadeia lateral.

Figura 1- Fórmula estrutural da sinefrina (modificado de SANTOS ANDRADE, 2008)



Como característica química a sinefrina apresenta caráter básico ($pK_a = 10,2$), polar e solúvel em água (NIEMANN e GAY, 2003; PELLATI E BENVENUTI, 2007). Apresenta grande similaridade estrutural quando comparada a outras aminas simpatomiméticas como a efedrina, divergindo apenas na presença de uma hidroxila no anel aromático a ausência de um grupo metila na cadeia lateral, como ilustrado na Figura 2.

Figura 2 - Similaridade estrutural entre (a) sinefrina e (b) efedrina (PELLATI, 2005)



A Sinefrina é uma amina adrenérgica, de ação indireta que potencializa a liberação de noradrenalina (BOUCHARD, 2005). Estudos experimentais em ratos indicam que a Sinefrina possui atividade moderada sobre receptores α -adrenérgicos, com ação potencializada em α_1 (KIM *et al.*, 2001), bem como atividade agonista β_3 em camundongos (ARBO, 2008) e atividade parcial sobre a lipólise em adipócitos de mamíferos (CARPÉNÉ *et al.*, 1999).

3.2 Estabilidade

A Organização Mundial de Saúde (OMS) define estabilidade farmacêutica como a capacidade de um produto farmacêutico manter a suas propriedades químicas, físicas, microbiológicas e biofarmacêuticas dentro dos limites especificados durante todo o seu prazo de validade (WHO, 1996). Estudos de estabilidade de produtos farmacêuticos nos permitem a avaliação da manutenção das concentrações do fármaco, possibilitando a previsão da estabilidade de um insumo ativo em determinada condição (excipientes, embalagens, temperaturas, luz, etc.).

A estabilidade dos produtos farmacêuticos depende de fatores ambientais como temperatura, umidade, luz e de outros fatores relacionados ao próprio produto como propriedades físicas e químicas, de substâncias ativas e excipientes farmacêuticos, forma farmacêutica e sua composição, processo de fabricação, tipo e propriedades dos materiais de embalagens. Dentre os principais fatores que podem levar a degradação de um produto farmacêutico está a interferência da luz, que pode desencadear reações de degradações como: redução e oxidação. Reações de oxidação são catalisadas tanto pela luz como pela temperatura, gerando a degradação de fármacos. O efeito da luz (intensidade e comprimento de onda) sobre os produtos farmacêuticos podem afetar a velocidade destas reações (YOSHIOKA, S. e STELLA, 2000).

A avaliação da estabilidade de produtos farmacêuticos se torna importante para determinar a segurança de um fármaco uma vez que a perda da estabilidade pode estar diretamente relacionada com a perda do efeito terapêutico diminuindo sua concentração ou ainda a formação de produtos de degradação. A formação de produtos de degradação é mais preocupante que a

perda do efeito terapêutico, pois os mesmos podem apresentar elevada toxicidade. Uma vez que produtos de degradação podem estar presentes no produto acabado ou nos insumos ativos, é necessário a utilização de metodologias analíticas capazes identificar, separar e/ou determinar com eficiência o possível produto formado. (KOMMANABOYINA, B. e RHODES, 1999)

Nesse aspecto poucos estudos referentes à estabilidade da sinefrina estão presentes na literatura. Kaefer (2014) realizou estudo preliminar da estabilidade da sinefrina frente a condições forçadas de armazenamento, tais como: fotolítica, hidrolítica e oxidativa.

Na degradação da sinefrina pela luz ultravioleta (254 nm) a autora observou a ocorrência de picos adicionais de menor intensidade, além do sinal relativo ao fármaco com decréscimo na área do pico de aproximadamente 35% após 1 h de exposição. Fato que demonstra a sensibilidade da sinefrina à radiação luminosa, visto que possui em sua estrutura molecular elementos como nitrogênio e duplas ligações, que a tornam mais suscetível. (KAEFER, 2014)

Em condições ácidas (HCl 1 mol/L por 4 h) foi observado decaimento de aproximadamente 36% na área do pico da sinefrina e surgimento de um produto de degradação majoritário. Na degradação alcalina (NaOH 5 mol/L) o percentual de degradação foi em torno de 5% com surgimento de quatro produtos de degradação com pequena intensidade (KAEFER, 2014).

Na degradação oxidativa (H₂O₂ 10%, por 48 h) a sinefrina apresentou degradação de cerca de 30%. Ocorreu o surgimento de um produto de degradação majoritário com características mais polares devido ao menor tempo de retenção na análise cromatográfica, além de outros produtos de menor intensidade (KAEFER, 2014). Estes dados obtidos podem ser explicados devido às características estruturais da sinefrina, pois apresenta grupos fenólicos, álcoois e duplas ligações que são altamente passíveis à oxidação (CARSTEN, 2000).

Kaefer (2014) também realizou estudos toxicológicos com a sinefrina fotodegradada. Com base nos dados encontrados, sugeriu que a sinefrina, na presença dos seus produtos de degradação, apresenta toxicidade, ou seja, diminuição da viabilidade celular em culturas de leucócitos humanos, nas condições testadas.

3.3 Espectrometria de Massas

A espectrometria de massas é uma técnica instrumental amplamente utilizada em uma infinidade de campos do conhecimento. Isto se deve à sua versatilidade, dinamismo e enorme potencial, sua área de aplicação é constantemente ampliada. Trata-se de uma das principais técnicas instrumentais para a confirmação inequívoca da presença de uma substância em uma amostra ou para a investigação dos compostos que a constitui. Sendo amplamente empregada na indústria para pesquisa e controle de qualidade da matéria-prima e dos produtos acabados (SEGALIN, 2015). É uma técnica que fornece a razão massa/carga (m/z) de espécies químicas, entre os quais, átomos, moléculas e agregados, desde que apresentem carga elétrica líquida diferente de zero. Tem como principais características a alta sensibilidade, seletividade e exatidão (ARDREY, 2003; SIRTORI; LÓPES; RODRIGUEZ; 2010). Alguns equipamentos apresentam sensibilidade na ordem de zeptomols (10^{-21}), o que permite a detecção de analitos em amostras que contenham apenas algumas centenas dessas moléculas (KANDIAH.; URBAN.; 2013). A seletividade e o poder de resolução da técnica permitem diferenciar espécies químicas com diferença de massa inferior a massa de um elétron (McKENNA, 2014).

A Espectrometria de massas pode ser combinada com a cromatografia líquida de alta eficiência, sendo de extrema importância na análise de fármacos. Devido a sua alta sensibilidade e seletividade, a técnica por LC-MS pode ser aplicada em diversas etapas, desde o desenvolvimento de novos fármacos e formas farmacêuticas, até o controle de qualidade do produto final. A cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas é uma técnica bastante vantajosa para a análise e identificação de impurezas e produtos de degradação, pois devido à capacidade de separação da cromatografia líquida, não se faz necessário o isolamento e a purificação das impurezas. Além disso, mesmo que não ocorra a separação cromatográfica, pode-se avaliar qualitativamente e quantitativamente os constituintes de uma determinada amostra, pois o detector mantém a seletividade devido a capacidade de determinação da massa específica do analito (LEE et al., 1999).

3.4 Ferramentas Computacionais

O formalismo da Teoria Funcional da Densidade – DFT (Density Functional Theory) foi estabelecido a partir dos dois teoremas de Hohenberg & Kohn (1964). Eles demonstraram que em princípio a densidade eletrônica contém toda a informação que pode ser obtida da função de onda de muitos elétrons.

O conhecimento da densidade do estado fundamental de um sistema de muitos elétrons permite deduzir o potencial externo no qual os elétrons residem (Hohenberg e Kohn, 1964). Ao usar este teorema, e sabendo-se que o mesmo representa um conjunto múltiplo de elétrons, uma função (ou funcional) única da densidade eletrônica pode ser escrita para solucionar determinados sistemas eletrônicos para estruturas químicas. Enquanto a função de onda necessita de $3N$ variáveis (função de onda para cada elétron) para a sua descrição, a densidade é uma função real de 3 variáveis (densidade em três dimensões). A DFT é usada para estudar a estrutura eletrônica (principalmente o estado fundamental) de sistemas de átomos, moléculas ou sólidos. Com esta teoria, as propriedades de um sistema de muitos elétrons podem ser determinadas usando-se as funcionais, isto é, funções de densidade eletrônica. A DFT está entre os mais populares e versáteis métodos disponíveis para estudos de química computacional e física do estado sólido.

Cálculos com base em técnicas de modelagem molecular, como a teoria Funcional de densidade (DFT) são amplamente utilizados na indústria farmacêutica e ajudam a estimar a estabilidade química da molécula, permitem realizar uma previsão de onde ocorreria uma possível quebra molecular a partir de condições forçadas de degradação. (Lienard et al., 2015)

4 METODOLOGIA

4.1 Produtos Químicos

4.1.1 Amostra de sinefrina

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

4.1.2 Preparo da solução amostra e fotodegradação

Pesaram-se 37,5 mg e transferiram-se para balão volumétrico de 25 mL com auxílio de aproximadamente 15,0 mL de água destilada. Levou-se ao ultrassom por 30 min, completou-se o volume com o mesmo solvente e homogeneizou-se. Retirou-se alíquota de 6,0 mL dessa solução, transferiu-se para balão volumétrico de 50 mL, completou-se com acetonitrila e homogeneizou-se para obter a concentração final de 180,0 µg/mL. Alíquotas de 1,0 mL dessa solução foram transferidas para cubetas descartáveis e expostas à luz UVC (254 nm) em câmara de fotoestabilidade.

Após o tempo de exposição de 5h, o conteúdo de uma cubeta foi transferido para balão volumétrico de 10 mL e o volume completado com água para atingir a concentração final de 18,0 µg/mL. A degradação ocorreu até atingir 50% de fármaco residual e obtenção dos produtos de degradação. As amostras foram analisadas por CLAE conforme método desenvolvido e validado pelo grupo de pesquisa (KAEFER et al, 2015).

4.2 Método por LC-ESI-MS

O sistema LC-ESI-MS consistia de um instrumento Shimadzu® equipado com um detector MS. A separação foi realizada usando uma coluna Thermo Scientific® C₁₈ (250 x 4,6 mm, 5 µm) a 25° C, e eluído a uma taxa de fluxo de 0,4 mL/min com um volume de amostra de injeção de 10 µL. A fase móvel consistiu de metanol e água (50:50 v/v), utilizando um sistema isocrático. As soluções foram analisadas após 5h de degradação (degradação fotolítica). Espectros de

massa foram adquiridos com uma interface de ionização por electrospray em ionização positiva e ionização negativa e as seguintes condições: tensão capilar 2,5 kV; temperatura da fonte 110° C; temperatura de dessolvatação 250° C; fluxo de nitrogênio na dessolvatação 900 L/h; fluxo de nitrogênio no cone 90 L/h.

4.3 Estudo de previsão *in silico* de reatividade molecular

Será empregada ferramenta computacional utilizada para estimar energias de abstração de hidrogênio, a Teoria Funcional da Densidade (DFT).

As análises computacionais foram realizadas usando o Spartan 08 versão 116.2TM para Windows (Wavefunction, Inc., EUA) e todas as estruturas iniciais foram construídas usando átomos e fragmentos estruturais de seu editor molecular. A otimização de geometria foi realizada usando os métodos de Merck Molecular Force Field (MMFF94) seguido de Austin Model (AM1). A estrutura foi submetida à análise conformacional, o incremento do ângulo de torção foi ajustado para 30° no intervalo de 0-360°, usando algoritmo de busca sistemática, pelo método Density Functional Theory (DFT). Os conformeros de menor energia global foram submetidos a determinação de energia com o uso de DFT para a molécula neutra e para as cargas +1 e -1.

O mecanismo principal de auto-oxidação observado na reação das energias de abstração do átomo de hidrogênio da degradação fotolítica é calculado para um átomo de hidrogênio ligado a um átomo de carbono na molécula usando a equação 5 (SHARP, 2011; LIENARD et al., 2015). Este procedimento pode ser usado para auto-oxidação e também para previsões de degradação fotolítica (YAMANDA et al., 2008).

Equação 1: (BDE) $E_{H\text{abstração}} = E_{\text{radical}} + E_{H\text{radical}} - E_{\text{estado fundamental}}$

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Este trabalho foi desenvolvido para dar continuidade aos estudos realizados por Kaefer (2014). A autora demonstrou que a sinefrina degrada quando exposta a luz UVC forma produtos de degradação. Também verificou que o fármaco na presença dos produtos de degradação apresenta toxicidade, pois foi possível verificar a diminuição da viabilidade celular em cultura de leucócitos, nas condições testadas.

Neste contexto, percebe-se a importância da avaliação dos produtos de degradação da sinefrina, no intuito de elucidação dos mesmos e determinação da rota de degradação.

Para contribuir com essa problemática foi desenvolvido método por LC-ESI-MS para identificar e analisar as unidades de massa dos produtos de degradação formados a partir da fotodegradação da sinefrina. Também, realizou-se estudo *in silico* para auxílio na predição da reatividade estrutural, com intuito de propor as principais vias de degradação do fármaco.

Para o desenvolvimento e otimização do método por LC-ESI-MS diferentes condições cromatográficas foram testadas, entre as quais, diferentes fases móveis, proporção das fases, fluxo da fase móvel e volume de injeção.

Os testes foram baseados em estudos já desenvolvidos pelo grupo de pesquisa, além de outros publicados na literatura. Primeiramente foi testada mistura binária de acetonitrila:água, metanol:água, para escolha da fase móvel, com variação da proporção de 30:70, 50:50, 15:85. Também foram avaliados os sistemas gradiente e isocrático, analisados na faixa de vazão de 0,1 mL/min a 0,6 mL/min e volume de injeção de 1 a 10 µl (KAEFER 2014, AREND et al., 2009; MALESUIK; CARDOSO; STEPPE, 2008; SILVA, 2009). Também foram avaliadas diferentes voltagens do capilar, temperatura da fonte, fluxo de nitrogênio no cone, temperatura e fluxo de nitrogênio de dessolvatação.

As condições cromatográficas definidas para quantificação da sinefrina por LC-ESI-MS estão apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1 - Condições cromatográficas definidas para análise da sinefrina e seus produtos de degradação por LC-ESI-MS.

	Parâmetro	Descrição
LC	Coluna	Thermo Scientific C ₁₈ (250 x 4,6mm, 5µm)
	Fase Móvel	Metanol: água (50:50, v/v)
	Vazão	0,4ml/min
	Temperatura de coluna	25°C
	Volume de injeção	10µL
MS	Modo de ionização	ESI + e ESI -
	Voltagem do capilar	2,5 kV
	Temperatura da fonte	110° C
	Temperatura de dessolvatação	250° C
	Fluxo de nitrogênio na dessolvatação	900 L/h
	Fluxo de nitrogênio no cone	90 L/h
	Espectro de análise	50-900 <i>m/z</i>

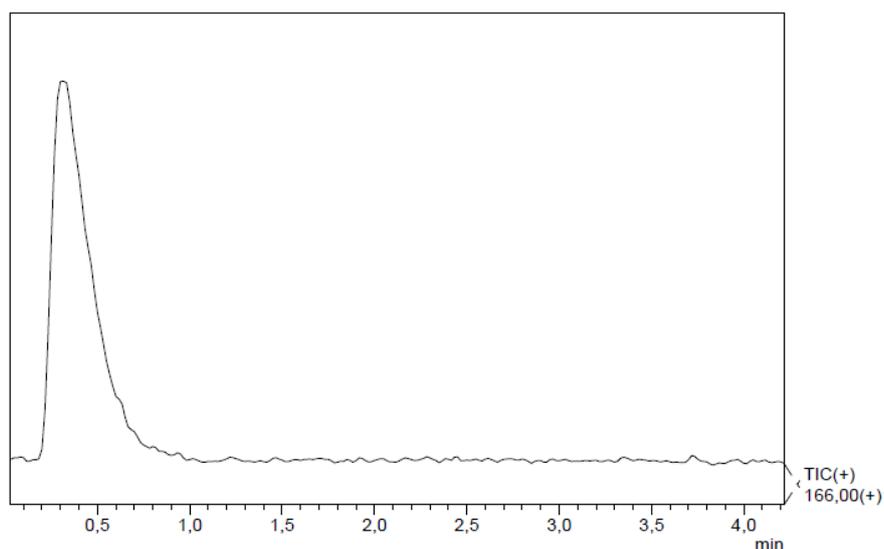
Após definição das melhores condições para a análise da amostra degradada de sinefrina procederam-se as análises por LC-ESI-MS. A amostra, depois de 5 horas de degradação em luz ultravioleta, apresentou seguintes resultados como pode ser observado na tabela 2, considerando-se análise por ESI modo positivo e modo negativo.

Tabela 2 - Resultados das massas encontradas na análise por LC-ESI-MS utilizando Scan por ESI positivo e ESI negativo, unidades de massa encontradas após 5h de degradação fotolítica da sinefrina.

Scan ESI +		Scan ESI -	
Produto 1	Massa 73 m/z	Produto 1	Massa 24 m/z
Produto 2	Massa 87 m/z	Produto 2	Massa 77 m/z
Produto 3	Massa 114 m/z	Produto 3	Massa 107 m/
Produto 4	Massa 143 m/z	Produto 4	Massa 121 m/z
Produto 5	Massa 161 m/z	Produto 5	Massa 167 m/z
Produto 6	Massa 166 m/z		
Produto 7	Massa 180 m/z		
Produto 8	Massa 207 m/z		
Produto 9	Massa 212 m/z		
Produto 10	Massa 221 m/z		
Produto 11	Massa 228 m/z		
Produto 12	Massa 237 m/z		
Produto 13	Massa 248 m/z		
Produto 14	Massa 262 m/z		
Produto 15	Massa 285 m/z		
Produto 16	Massa 292 m/z		
Produto 17	Massa 345 m/z		

Os picos de cada unidade de massa obtidos no cromatograma da análise da sinefrina degradada foram comparados com o cromatograma da sinefrina não degradada. Os picos presentes em ambos os cromatogramas foram descartados e não considerados como unidades de massa de produtos de degradação. Dentre as massas identificadas, verificamos as de maior intensidade: 87 m/z, 114 m/z, 161 m/z, 166 m/z, 180 m/z, 285 m/z, 345 m/z. O pico referente a massa de 166 m/z pode ser visualizado na figura 3.

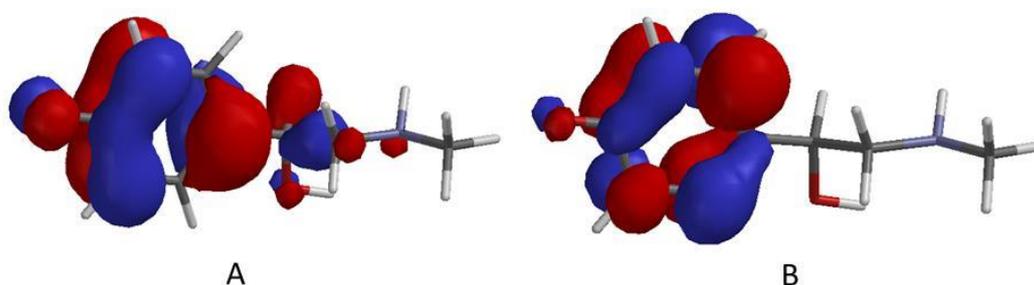
Figura 3- Cromatograma por LC-ESI-MS modo positivo do produto de fotodegradação da sinefrina com 166 m/z.



Após análise por LC-MS-ESI procedeu-se os estudos computacionais de reatividade molelucar. Os estudos computacionais foram realizados com o objetivo de auxiliar a compreensão da reatividade química pela predição da posição mais provável de quebra estrutural da sinefrina. O método computacional indicado para estudar as condições de degradação da sinefrina sob atuação fotolítica, observadas em estudos de degradação em condições de estresse, são ao cálculo de BDE e orbitais de fronteira moleculares (KIEFFER et al., 2010).

Os resultados da distribuição dos sítios de energia dos orbitais de fronteira HOMO e de LUMO da sinefrina molécula neutra estão expressas na figura 4. A energia de HOMO está distribuída principalmente no anel aromático com redução dos sítios de energia até o átomo de nitrogênio da cadeia lateral. A deslocalização eletrônica do orbital de HOMO do anel até a cadeia lateral indica que esta porção é responsável pela reatividade da molécula em condições de oxidação e hidrólise. Já os sítios de LUMO encontram-se distribuídos no anel aromático somente e tem indicativo de susceptibilidade de sofrer ataque nucleofílico quando submetido às estas condições.

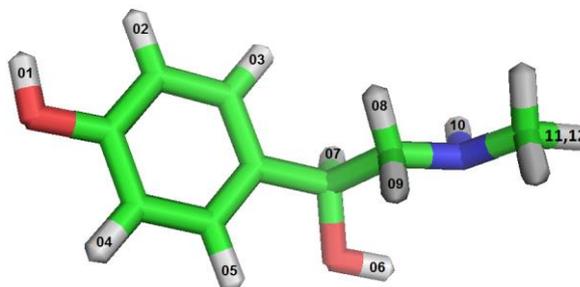
Figura 4 - Visualização em 3D do sinefrina em modelo tubo e mapa dos orbitais moleculares HOMO (A) e LUMO (B), em superfície de isoestrutura de van der Waals 0,002 eV usando Spartan for Windows 08.



A BDE é uma medida da força de ligação em uma ligação química e é definida como a energia padrão (a entalpia também pode ser usada) quando uma ligação é quebrada por uma reação, com reagentes e produtos da reação (BLANKSBY, ELLISON, 2003). Os valores de BDE foram obtidos conforme a equação 1 considerando os valores de energia do átomo de hidrogênio isolado de $-0,598150$ au e da sinefrina neutra $-555,959077$ au, respectivamente. Os valores de BDE são indicadores do(s) sitio(s) primário(s) de auto-oxidação de compostos orgânicos e fármacos (ANDERSSON et al., 2014, LIENARD et al., 2015). Concentrando-se nos baixos valores de BDE da estrutura da sinefrina (Tabela 3), as energias de átomos de hidrogênio de N10, O6, O1 e C7 indicaram a alta susceptibilidade oxidativa que caracteriza a instabilidade dessa região em ambiente oxidativo.

Três átomos de hidrogênio entre os quatro candidatos se apresentam na cadeia lateral da sinefrina e o átomo de nitrogênio tem valor negativo $-236,22$ Kcal.mole⁻¹, o que indica que a abstração deste átomo é termodinamicamente mais favorável à susceptibilidade oxidativa em relação aos outros. Os resultados calculados sugerem que a região molecular pode estar iniciando a degradação auto-oxidativa em comparação a outras posições da estrutura química. Desta forma, a degradação do fármaco pode ter iniciação nesta posição ou nas outras, o que pode ser utilizado para se compreender a geração de produtos de degradação observados nas condições estudadas.

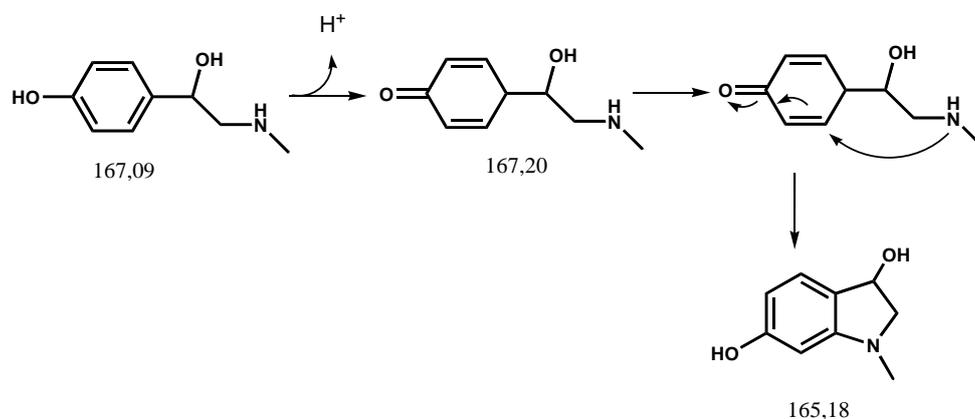
Tabela 3- Energia de dissociação de ligação (abstração) do átomo de hidrogênio da estrutura química da obtidos com o uso de software Spartan for Windows 08 e aplicação de equação 1.



Átomos de Hidrogênio	Energia e formação (ΔH_f a.u.)	Energia de dissociação de hidrogênio (BDE: EH abstraction Kcal.mole ⁻¹)
H1-O	-555,381386	12,83
H2-C	-555,288484	45,45
H3-C	-555,295719	40,91
H4-C	-555,288480	45,46
H5-C	-555,292946	42,65
H6-O	-555,352046	5,57
H7-C	-555,313200	29,94
H8-C	-555,289472	44,83
H9-C	-555,289472	44,83
H10-N	-555,737377	-236,22
H11-C	-555,273782	54,68
H12-C	-555,273783	54,68
H13-C	-555,273781	54,68

A metodologia *in silico* demonstra a maior reatividade do grupo amino da cadeia lateral, sugerindo a geração de amino cromano, como pode ser verificado na sugestão de quebra molecular proposta na figura 5. Para corroborar aos resultados, a massa de 166 m/z [165 +1H]⁺ foi encontrada entre os principais picos obtidos na análise por LC-ESI-MS da amostra degradada de sinefrina.

Figura 5 - Esquema de geração de produto de degradação da sinefrina em condições de fotodegradação. Adaptado de Hoellein e Holzgrabe et al. (2012).

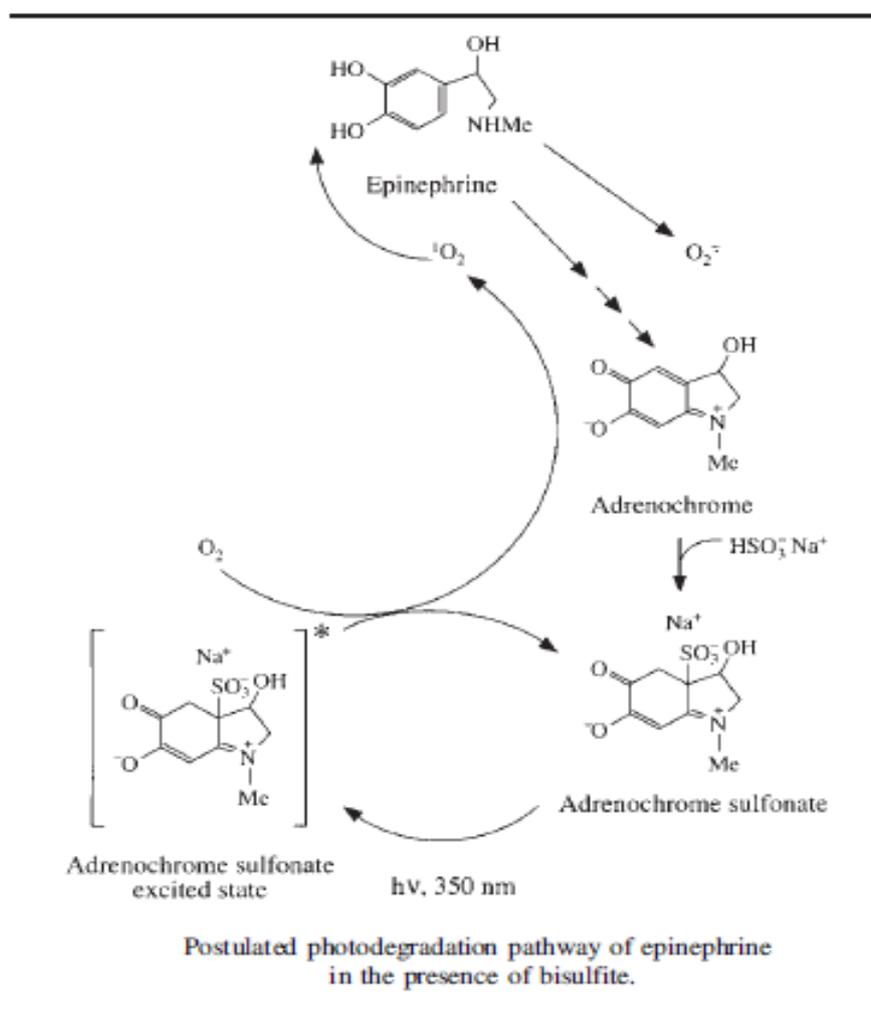


1metil-2,3-dihidro-1H-indole-3,6-diol

Para colaborar com a proposição sugerida para degradação da sinefrina podemos utilizar como exemplo o estudo realizado por Brustugun J. e colaboradores (2003), onde foi elucidado uma rota de degradação para epinefrina após degradação fotolítica, demonstrada na figura 6.

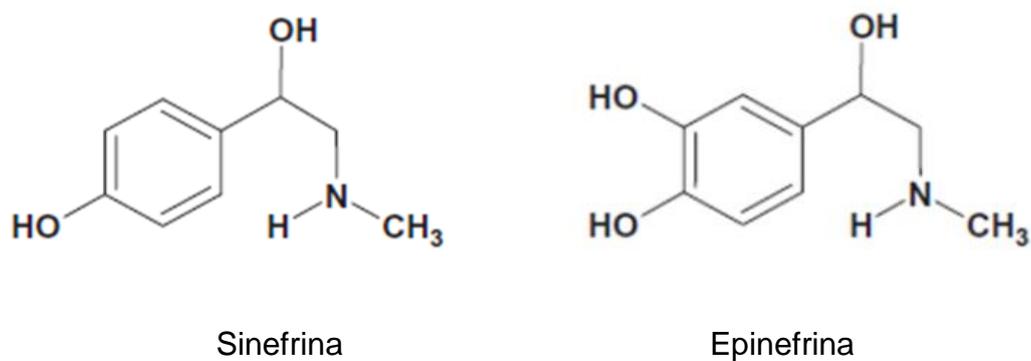
A similaridade estrutural da sinefrina e epinefrina (figura 7) nos sugere que a reatividade molecular ocorreria no átomo de nitrogênio como avaliado na reatividade molecular, acarretando então no fechamento do anel, explicando a formação do produto 1metil-2,3-dihidro-1H-indole-3,6-diol com massa de 165 m/z.

Figura 6 - rota de degradação da epinefrina.



Fonte: J. Brustugun, S. Kristensen, H. Hjorth Tonnesen, 2003

Figura 7- Estrutura química da sinefrina e epinefrina.



Fonte: ROSSATO et al., 2011

Para as demais massas encontradas na análise por LC-ESI-MS não foi possível atribuir sua provável rota de degradação, bem como, suas estruturas químicas até o momento, por se tratar de um número considerável de substâncias.

Devido aos resultados obtidos, percebe-se a necessidade do desenvolvimento de maiores estudos nesta linha de pesquisa, com o intuito de isolar cada produto obtido e realizar seus testes toxicológicos individuais. Esses estudos são necessários para determinar se a toxicidade da sinefrina encontrada por Kraefer (2014) é responsável pelo conjunto dos produtos formados ou de um produto específico.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- O método desenvolvido por LC-MS-ESI foi capaz de identificar as principais massas de diferentes produtos de degradação obtidos na fotólise da sinefrina;
- Os procedimentos computacionais ajudaram a compreender os sítios de susceptibilidade às reações auto-oxidativas da estrutura química da sinefrina e foi possível verificar que a maior reatividade ocorre no grupo amino da cadeia lateral;
- Levando em consideração as massas encontradas e o estudo *in silico* da provável reatividade da molécula, sugere-se que um dos principais produtos de degradação possui massa de 166 m/z e foi atribuído como sendo 1-metil-2,3-dihidro-1H-indole-3,6-diol;
- Devido ao grande número de massas encontradas sugere-se a continuidade dos estudos para identificação dos demais principais produtos de degradação, bem como, posterior isolamento e estudo toxicológico dos mesmos;
- Os dados obtidos colaboram com os estudos na área e podem ser utilizados como subsídios para os cuidados na elaboração de preparações farmacêuticas ou suplementos alimentares à base de sinefrina.

7 REFERÊNCIAS

ANDERSSO, T.; BROO, A.; EVERTSSON, E. Prediction of Drug Candidates' Sensitivity Toward Autoxidation: Computational Estimation of C–H Dissociation Energies of Carbon-Centered Radicals. **J. Pharm. Sci.** 103, 1949-1955, 2014.

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.

ARDREY, B.; **Liquid Chromatography – Mass Spectrometry: An Introduction**, John Wiley: England, 2003.

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.

BARCELÓ, D., E. ELJARRAT e M. PETROVIC. Environmental Applications. **Mass Spectrometry**, p.8. 2005.

BLANKSBY, S. J.; ELLISON, G. B. **Bond Dissociation Energies of Organic Molecules**. Acc. Chem. Res. 36 (4), 255-263, 2003. doi:10.1021/ar020230d.

BENT, S.; PADULA, A.; NEUHAUS, J. Safety and efficacy of *Citrus aurantium* for weight loss. **The American Journal of Cardiology**, v.94, p.1359-1361, 2004.

BOUCHARD, N.C.; HOWLAND, M.A.; GRELLER, H.A.; HOFFMAN, R.S.; NELSON, L.S. Ischemic stroke associated with use of an ephedra-free dietary supplement containing synephrine. **Mayo Clinic Proceedings**, v.80, n.4, p.541-545, 2005.

BRUGSTUGUN, J.; KRISTENSEN, S.; HJORTH, H.; Photostability of epinephrine – the influence of bisulfite and degradation PRODUCTS, **Pharmazie** 59: 457–463 2004

CARPÉNÉ, C.; GALITZKY, J.; FONTANA, E.; ATGIE, C.; LAFONTAN, M.; BERLAN, M. Selective activation of beta3-adrenoceptors by octopamine: comparative studies in mammalian fat cells. **Naunyn Schimiedebergs Archives of Pharmacology**, v.359, n. 4, p.310-321, 1999.

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

DALMÁZIO, I., L. S. SANTOS, R. P. LOPES, M. N. EBERLIN e R. AUGUSTI. Advanced Oxidation of Caffeine in Water: On-Line and Real-Time Monitoring by Electrospray Ionization Mass Spectrometry. **Environ. Sci. Technol**, v.35, p.7. 2005.

DHARMANANDA, S. **Is Chih-Shih (Zhishi) Toxic?** Institute for Tradicional Medicine, Portland, Oregon, 2002. Disponível em <http://www.itmonline.org/arts/syneph.thm> Acesso em 24.5.2018.

DIAS REIS, Rafael Henrique et al. Stability Study of Finasteride: Stability-Indicating LC Method, In Silico and LC-ESI-MS Analysis of Major Degradation Product, and an In Vitro Biological Safety Study. **Journal of Chromatographic Science**, Universidade Federal do Pampa - Uruguaiana, p. 2-3, mar. 2018. Acesso em: 13 abr. 2018.

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

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.

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

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.

HOHENBERG, P.; KOHN, W. Inhomogeneous Electron Gas. **Phys. Rev. B**, v. 864, p. 136, 1964.

ICH. International Conference on Harmonisation. **Q1B(R2): Stability testing of new drug substances and products**. ICH Steering Committee, 2003.

KAEFER, L, C; Sinefrina: **Desenvolvimento e Validação de método indicativo de estabilidade e avaliação da toxicidade em extrato seco de *Citrus aurantium* L.** Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Pampa, Uruguai, 2014

KAEFER, L, C; Desenvolvimento e Validação de método indicativo de estabilidade e avaliação da toxicidade em extrato seco de *Citrus aurantium* L. **Quim. Nova**, Vol. Xy, No. 00, 1-7, 2015.

KANDIAH, M.; URBAN, P. L.; Advances in ultrasensitive mass spectrometry of organic molecules; **Chem. Soc. Rev.**, 2013, 42, pp 5299.

KASPRZYK-HORDERN, B., R. M. DINSDALE e A. J. GUWY. The effect of signal suppression and mobile phase composition on the simultaneous analysis of multiple classes of acidic/neutral pharmaceuticals and personal care products in surface water by solid-phase extraction and ultra performance liquid chromatography-negative electrospray tandem mass spectrometry. **Talanta**, v.74, n.5, Feb 15, p.1299-312. 2008.

KIEFFER, J.; BRÉMOND, E.; LIENARD, P.; BOCCARDI G. **In silico assessment of drug substances chemical stability**. J. Mol. Struct. THEOCHEM, 954, 75–79, 2010.

KIM, K.W.; KIM, H.D.; JUNG, J.S.; WOO, R.S.; KIM, H.S.; SUH, H.W.; KIM, Y.H.; SONG, D.K. Characterization of antidepressant-like effects of *p*-synephrine stereoisomers. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives in Pharmacology**, v.364, p.21-26, 2001.

KOMMANABOYINA, B. e RHODES C.T. **Trends in stability testing, with Emphasis on stability during distribution and storage**. Drug Development and Industrial Pharmacy, v.25, n.7, 857 – 868, 1999.

- LEE, M.S.; KERNS, E.H. LC/MS applications in drug development. **Mass Spectrometry Reviews**. v. 18, p. 187± 279, 1999.
- LIENARD, P.; GAVARTIN, J.; BOCCARDI, G.; MEUNIER, M. **Predicting drugs substances autoxidation**. *Pharm. Res*, 32, 300-310, 2015. DOI: 10.1007/s11095-014-1463-7.
- LUDWIG, H; ULRIKE, H; Ficts and facts of epinephrine and norepinephrine stability in injectable solutions. **International Journal of Pharmaceutics**. p. 468–480, 2012.
- 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.
- MATTOLI, L.; CANGI, F.; MAIDECCHI, A.; GHIARA, C.; TUBARO, M.; TRALDI, P. A rapid liquid chromatography eletrospray 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.
- McKENNA, A. M. et al; Unprecedented Ultrahigh Resolution FT-ICR Mass Spectrometry and Parts-Per-Billion Mass Accuracy Enable Direct Characterization of Nickel and Vanadyl Porphyrins in Petroleum from Natural Seeps; **Energy Fuels**, 28, 4, pp 2454, 2014.
- NUDELMAN, N. S. **Estabilidad de medicamentos**. Buenos Aires: El Ateneu, 1975.
- 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.
- 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.839-849, 2005.
- PELLATI, F.; BENVENUTI, S. Cromatographic and eletrophoretic methods for the analysis of phenetylamine alkaloids in *Citrus aurantium*. **Journal of Cromatography A**, v.1161, p. 71-88, 2007.

PELLATI, F.; BENVENUTI, S. Fast high-performance liquid chromatography analysis of phenethylamine alkaloids in *Citrus* natural products on a pentafluorophenylpropyl stationary phase. **Journal of Chromatography A**, v.1165, p. 58-66, 2007b.

ROSSATO, L.G.; COSTA, V.M.; PINHO, P.G.; CARVALHO, F.; BASTOS, M.L.; REMIÃO, F. Structural isomerization of synephrine influences its uptake and ensuing glutathione depletion in rat isolated cardiomyocytes. **Archives of Toxicology**, v. 85, n.8, p. 929-939, 2011.

SAMENUK, D.; LINK, M.S.; HOMOUD, M.K.; CONTRERAS, R.; THEOHARIDES, T.C.; WANG, P.J.; ESTES, N.A. Adverse cardiovascular events temporally associated with ma huang, an herbal source of ephedrine. **Mayo Clinic Proceedings**, v.77, p.12-16, 2002.

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.

SEGALIN, Jéferson. **Utilização da Espectrometria de Massas no Estudo de Produtos de Transformação/Degradação de Fármacos de uso Humano e Veterinário**. 2015. 193 f. Tese (Doutorado) - Curso de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2015

SHARP, TR. Calculated carbon-hydrogen bond dissociation enthalpies for predicting oxidative susceptibility of drug substance molecules. **Intern. J. Pharmac.** 418, 304-307, 2011.doi: 10.1016/j-jpharm.2011.04.063.

SONG, D-K. Characterization of antidepressant-like effects of *p*-synephrine stereoisomers. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 364, p.21-26, 2001.

SIRTORI, C.; LÓPEZ, A. M. A.; RODRÍGUEZ, S. M.; Evaluación Analítica de Procesos de Transformación Biológica Fotoquímica y Fotocatalítica de Fármacos em Agua, **Editorial Ciemat**: Madrid, 2010.

YOSHIOKA, S. e STELLA, V. S. Stability of Drugs and Dosage Forms. New York: **Kluwer Academic / Plenum Publishers**, 268p. 2000.

Yamada, S.; Naito, Y.; Takada, M.; Nakai, S.; Hosomi, M. Photodegradation of hexachlorobenzene and theoretical prediction of its degradation pathways using quantum chemical calculation. **Chemosphere** **70** 731–736 2008

WHO. Internacional Stability Testing: guidelines for stability testing of pharmaceutical products containing well established drug substances in conventional dosage forms. Anex 5, **Technical Report Series**. 863, 1996.

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 23 abr. 2018.