

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO POR CLAE-DAD E ESTUDO PRELIMINAR DA ESTABILIDADE DA SINEFRINA EM EXTRATO SECO DE *Citrus aurantium L.*

Cristina Lenhardt Kaefers^a, Fernanda Macke Hellwig^a, Rafael Henrique Dias Reis^a, Carine Viana Silva^b e Marcelo Donadel Malesuik^{a,*}

^aCurso de Farmácia, Universidade Federal do Pampa, 97508-000 Uruguaiana – RS, Brasil

^bCurso de Farmácia, Universidade Federal de Santa Maria, 97105-900 Santa Maria – RS, Brasil

Recebido em 12/09/2014; aceito em 28/01/2015; publicado na web em 01/04/2015

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF A HPLC-PDA METHOD AND PRELIMINARY STABILITY STUDY OF SYNEPHRINE IN *Citrus aurantium L.* DRY EXTRACT. A reversed-phase liquid chromatographic method was developed for the assay of synephrine in *Citrus aurantium* dry extract. The chromatographic separation used a C18 (250 × 4.6 mm, 5 μm) column and a mobile phase consisting of acetonitrile: 0.01% orthophosphoric acid (pH 3.0) at a 15:85 ratio, flow rate of 1 mL min⁻¹ and detection at 220 nm. The detector response was linear in the range 15 - 45 mg mL⁻¹. Specificity and stability, indicating suitability of the method, were confirmed using stress conditions (acid and basic hydrolysis, oxidation and photolysis). Intraday precision yielded RSD values of less than 1.77% and interday precision of 2.5%. The average recovery accuracy of the test was 102.03%. The method was validated according to international guidelines and can be used in routine quality control and stability studies of *Citrus aurantium* preparations. The preliminary stability study showed that synephrine is susceptible to hydrolysis, oxidation and photolysis.

Keywords: *Citrus aurantium*; synephrine; HPLC-PDA; stability.

INTRODUÇÃO

A sinefrina (Figura 1) é uma amina adrenérgica presente em plantas do gênero *Citrus sp.*, disponível atualmente em produtos dietéticos para o emagrecimento. Em 2004 o órgão americano *Food and Drug Administration* (FDA) proibiu para uso a efedrina (Figura 1) em suplementos alimentares devido à associação clínica com problemas cardíacos e o sistema nervoso central. Neste contexto, a sinefrina, que é um alcaloide alternativo à efedrina, ganhou popularidade no tratamento da obesidade e encontra-se presente na formulação de diversas preparações disponíveis comercialmente.^{1,2} O interesse por produtos contendo sinefrina se deve a sua similaridade estrutural com a efedrina e seus supostos efeitos lipofílicos, que têm sido associados ao aumento da lipólise por meio da promoção da termogênese, presumivelmente por meio de adrenoreceptores β₃. No entanto, estudos demonstram que essa amina age também em adrenoreceptores β₁ e β₂, e seu uso indiscriminado pode levar ao desenvolvimento de efeitos adversos graves, que podem ser piorados com a associação com outros estimulantes, elevando o risco de cardiotoxicidade.^{1,3,4} Essa preocupação já levou o *Health Canada* a suspender seu uso em produtos dietéticos.⁵ Entretanto, segundo alguns dados da literatura, a sinefrina está entre os cinco ingredientes mais vendidos em suplementos alimentares para o emagrecimento.⁶ Neste contexto, tornam-se imprescindíveis estudos para contribuir com o controle de qualidade de produtos à base dessas substâncias.

A sinefrina está presente no extrato seco de *Citrus aurantium*, conhecido no Brasil como laranja-amarga, laranja-azedada e laranja-cavalo, pertencente à família Rutaceae.⁷ Esse extrato é utilizado como matéria-prima no mercado nacional em diferentes produtos dietéticos, suplementos alimentares e compostos manipulados em farmácias magistrais, mas, até o momento, não possui monografia em códigos oficiais ou farmacopeia. Nesse intuito, 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, estabilidade, segurança e eficácia, refletindo em prejuízo terapêutico à população, além de potencial toxicológico.

Alguns trabalhos já propuseram a determinação da sinefrina e aminas correlatas em amostras de *Citrus aurantium* e suplementos alimentares.⁸⁻¹³ No entanto, verificou-se não haver estudos publicados na literatura que contemplem o desenvolvimento de métodos indicativos da estabilidade e, tampouco, estudos que relatam a estabilidade da sinefrina em condições forçadas de armazenamento.

Portanto, este trabalho teve como objetivo o desenvolvimento e validação de método analítico por CLAE-DAD, bem como a realização de estudo preliminar da estabilidade da sinefrina em extrato seco de *Citrus aurantium* utilizando condições forçadas de armazenamento.

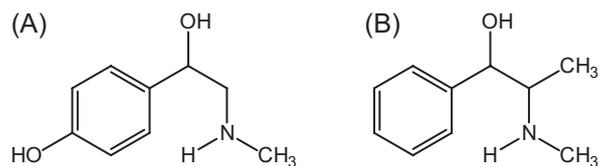


Figura 1. Estrutura química da sinefrina (A) e efedrina (B)

EXPERIMENTAL

Produtos químicos e reagentes

Sinefrina usada como substância química de referência, com teor declarado de 98%, foi adquirido da empresa Sigma-Aldrich. Extrato seco de *Citrus aurantium* contendo 6,2% de sinefrina, conforme especificado pelo certificado de análise, foi adquirido da empresa DEG Importação de produtos Químicos Ltda (São Paulo, Brasil). Os reagentes utilizados foram acetonitrila (grau CLAE, Tedia, Fairfield, EUA), ácido *o*-fosfórico (Merck, Darmstadt, Alemanha) e trietilamina (Merck, Darmstadt, Alemanha) e a água ultra-pura

*e-mail: marcelodonadel@gmail.com

foi obtida pelo sistema Direct-Q UV 3 Milli-Q® (Merck Millipore, Milford, MA, EUA).

Equipamento e condições cromatográficas

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

A coluna Thermo Scientific C18 ODS Hypersil (250 × 4,6 mm, 5 µm, Cheshire, Inglaterra) acoplada a uma pré-coluna Phenomenex SecurityGuard C18 (4,0 × 3,0 mm, 5 µm, Torrance, CA, EUA) foram utilizadas para as separações cromatográficas. A fase móvel foi composta por uma mistura binária de ácido *o*-fosfórico 0,01% (v/v) pH 3,0 ajustado com trietilamina: acetonitrila (85:15, v/v). Os componentes da fase móvel foram filtrados sob vácuo, através de uma membrana de nylon com diâmetro de 47 mm e poro de 0,45 µm (Millipore, Billerica, MA, EUA). A vazão da fase móvel foi de 1,0 mL min⁻¹ e o volume injetado de amostra foi 20 µL. A temperatura de análise foi de 25 °C, com detecção em 220 nm.

Preparo da solução padrão

A solução de sinefrina foi preparada em água destilada pela dissolução de 15 mg de sinefrina em balão volumétrico de 100 mL. Após, 2 mL foram transferidos para um balão volumétrico de 10 mL e o volume completado com água, obtendo concentração final de 30 µg mL⁻¹. A solução foi homogeneizada e filtrada em membrana de nylon com diâmetro de 13 mm e poro de 0,45 µm (Millipore, Billerica, MA, EUA).

Preparo da solução amostra

Cerca de 241,9 mg de extrato seco (equivalente a 15 mg de sinefrina) foram pesados e transferidos para balão volumétrico de 100 mL com o auxílio de 80 mL de água destilada. A amostra foi sonicada em ultrassom por 30 min para extração da sinefrina, à temperatura ambiente. 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 2 mL foi transferida para um balão volumétrico de 10 mL e o volume completado com água, atingindo concentração final de 30 µg mL⁻¹ de sinefrina. A solução foi homogeneizada e filtrada em membrana de nylon com diâmetro de 13 mm e poro de 0,45 µm (Millipore, Billerica, MA, EUA).

Estudos de degradação

O estudo de degradação teve como intuito verificar a estabilidade da sinefrina e a capacidade indicativa de estabilidade do método, ou seja, a determinação do analito na presença de produtos formados. O padrão de sinefrina e o extrato seco de *Citrus aurantium* foram submetidos a condições forçadas de armazenamento, de modo a conduzir os estudos de degradação.¹⁴

Degradação do padrão de sinefrina

A solução de sinefrina, para a hidrólise ácida, foi preparada pela dissolução de 15 mg do padrão com ácido clorídrico 1 mol L⁻¹, em balão volumétrico de 100 mL (150 µg mL⁻¹ de sinefrina). Após, foi submetida à sonicação por 10 minutos e, posteriormente, ao refluxo (80 °C) por 4 h. A hidrólise básica seguiu os mesmos procedimentos, sendo conduzida ao refluxo (80 °C) com hidróxido de sódio 5 mol L⁻¹ por 6 h. Após o arrefecimento à temperatura ambiente as amostras foram neutralizadas. Uma alíquota de 2 mL de cada solução foi

transferida para respectivo balão volumétrico de 10 mL e diluída em água, obtendo-se concentração final de 30 µg mL⁻¹ de sinefrina.

Para a realização da degradação oxidativa foram transferidas para balão volumétrico de 10 mL alíquotas de 2 mL de peróxido de hidrogênio 10% e 2 mL de solução de sinefrina em água na concentração de 150 µg mL⁻¹. O balão foi mantido por 48 horas ao abrigo da luz, à temperatura ambiente. Após esse período o volume do balão foi completado com água, obtendo-se a concentração final de 30 µg mL⁻¹ de sinefrina e analisada imediatamente por CLAE.

Para avaliação da fotodegradação foi preparada uma solução estoque em água, equivalente a 1.500 µg mL⁻¹ de sinefrina. Uma alíquota de 1 mL dessa solução foi diluída em balão volumétrico de 10 mL com acetonitrila e exposta à luz UVC – 254 nm em cubetas descartáveis por 1 h, com temperatura controlada. Posteriormente, uma alíquota de 2 mL foi transferida para balão volumétrico de 10 mL e o volume completado com água, obtendo-se a concentração final de 30 µg mL⁻¹ de sinefrina.

Em todos os casos, após atingir a concentração de trabalho de 30 µg mL⁻¹ de sinefrina, as amostras foram filtradas em membrana de nylon com diâmetro de 13 mm e poro de 0,45 µm.

Degradação do extrato de *Citrus aurantium*

A degradação ácida do extrato ocorreu pela diluição de 1,2097 g do mesmo, (equivalente a 75 mg de sinefrina) em um balão volumétrico de 50 mL, ao qual foi adicionado cerca de 40 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 mL foi transferida para um balão volumétrico de 50 mL e o volume completado com ácido clorídrico 1 mol L⁻¹, atingindo concentração final de 150 µg mL⁻¹ de sinefrina. Esta solução foi submetida ao refluxo (80 °C) por 5 h. A hidrólise básica também foi conduzida sob refluxo (80 °C) com hidróxido de sódio 5 mol L⁻¹ por 6 h. Após, as amostras foram arrefecidas à temperatura ambiente e neutralizadas. Uma alíquota de 2 mL de cada solução foi transferida para respectivo balão volumétrico de 10 mL e diluída em água, obtendo-se concentração final de 30 µg mL⁻¹.

Para a realização da degradação oxidativa foram transferidas para balão volumétrico de 10 mL alíquotas de 4 mL de peróxido de hidrogênio 30% e 2 mL de solução de sinefrina em água na concentração de 150 µg mL⁻¹. Esta solução foi armazenada à temperatura ambiente e protegida da luz por 72 h. Após esse período, o volume do balão foi completado com água, obtendo-se a concentração final de 30 µg mL⁻¹ de sinefrina, e analisada imediatamente por CLAE. A condição da degradação oxidativa imposta ao extrato (H₂O₂ 30%, por 72 h) foi empregada devido a estudos preliminares que demonstraram que não ocorreu degradação da sinefrina em condições mais brandas, como as usadas com o padrão (H₂O₂ 10%, por 48 h).

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 mL desta foi diluída em balão volumétrico de 10 mL com acetonitrila e exposta à luz UVC – 254 nm em cubetas descartáveis por 20 h, com temperatura controlada. Posteriormente, uma alíquota de 2 mL foi transferida para balão volumétrico de 10 mL e o volume completado com água, obtendo-se a concentração final de 30 µg mL⁻¹ de sinefrina.

Em todos os casos, após atingir a concentração de trabalho de 30 µg mL⁻¹ de sinefrina, as amostras foram filtradas em membrana de nylon com diâmetro de 13 mm e poro de 0,45 µm.

Validação do método analítico

A validação do método analítico foi conduzida conforme a *The*

United States Pharmacopoeia (USP 36),¹⁵ os guias do *International Conference on Harmonisation* (ICH)^{16,17} e artigos científicos especializados.^{18,19}

Linearidade

A linearidade foi determinada pela construção de três curvas de calibração com cinco pontos cada. A 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 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 por meio do estudo de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados e a análise de variância por ANOVA foi realizada para verificação da linearidade do método.

Limite de detecção e limite de quantificação

O limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ) foram calculados a partir das fórmulas descritas no ICH, baseadas no desvio padrão do intercepto e na inclinação da curva de calibração. Para confirmação dos valores teóricos calculados foram preparadas soluções de sinefrina em água e analisadas experimentalmente ($n = 6$).

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 degradação forçada do fármaco e do extrato, em condições de oxidação, fotodegradação e hidrólise ácida e básica, por meio da determinação da pureza do pico estabelecida pelo detector DAD. Este parâmetro de validação foi avaliado concomitantemente aos estudos de degradação citados anteriormente.

Precisão

A precisão do método foi determinada pelo ensaio de repetibilidade (precisão intradia) e precisão intermediária (precisão interdía), sendo o resultado expresso como estimativa do desvio padrão relativo (DPR), conforme o resultado obtido em seis medições intradia e dezoito medições interdía da solução do extrato na concentração correspondente a $30 \mu\text{g mL}^{-1}$. Os dados para a precisão intermediária foram coletados em dias diferentes e por analistas diferentes.

Exatidão

A exatidão foi determinada a partir de ensaio de recuperação de padrão, isto é, por meio da adição de quantidades conhecidas de padrão nas soluções amostra (extrato de *Citrus aurantium*). Alíquotas de 1, 2 e 3 mL de um padrão de sinefrina com concentração de $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ foram transferidas para balões volumétricos de 10 mL contendo solução amostra na concentração de $30 \mu\text{g mL}^{-1}$, visando avaliar a porcentagem de recuperação em cada nível de concentração. Cada solução foi preparada em triplicata.

Robustez

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

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Desenvolvimento e otimização do método

As condições cromatográficas que resultaram em adequados parâmetros analíticos foram definidas após teste de diferentes fases

móveis, proporção da fase orgânica, pH da fase aquosa e fluxo da fase móvel. Os testes iniciais foram realizados em mistura binária de acetonitrila:água na proporção de 30:70 (v/v), com pH na faixa de 2,5 a 3,5, ajustado com ácido fosfórico. Também foi avaliado o sistema de vazão gradiente e isocrático, na faixa de 0,6 a $1,5 \text{ mL min}^{-1}$. Não obtendo êxito na separação cromatográfica, nova fase móvel foi testada, sendo esta composta por acetonitrila:ácido fosfórico 0,1% na proporção 15:85 (v/v). Com essa fase móvel foram investigados o efeito do pH (2,5 e 3,0) e da vazão, que variou de 0,6 a $1,0 \text{ mL min}^{-1}$.

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 $1,0 \text{ mL min}^{-1}$. Finalmente, a fase móvel constituída por acetonitrila:ácido fosfórico 0,01% (v/v) pH 3,0 (ajustado com trietilamina), numa proporção 15:85 (v/v) e vazão de $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ foi definida para dar prosseguimento aos experimentos, pois apresentou bons resultados nos parâmetros de adequabilidade do sistema, tais como número de pratos teóricos ($N = 9000$), simetria de pico ($T = 1,19$) e reprodutibilidade das injeções ($\text{RSD} = 0,5$, $n = 5$). A fase móvel empregada é de fácil e rápido preparo, o que permite ser usada rotineiramente nas análises de controle de qualidade. Outra vantagem é o fato de não apresentar sais em sua composição, o que poderiam ocasionar danos à coluna e ao sistema cromatográfico.

Estudos de degradação

Os estudos de degradação forçada foram conduzidos com o intuito de desenvolver uma avaliação preliminar da estabilidade do fármaco frente a diferentes condições de armazenamento, bem como avaliar a seletividade e a capacidade indicativa de estabilidade do método proposto.

Degradação do padrão de sinefrina

Na Figura 2A, pode-se observar o cromatograma típico da sinefrina padrão na concentração de $30,0 \mu\text{g mL}^{-1}$. Quando submetido a condições ácidas de degradação ($\text{HCl } 1 \text{ mol L}^{-1}$ por 4 h), houve um decaimento de 36% na área do pico da sinefrina e o surgimento de um produto de degradação em aproximadamente 2,6 min de análise (PD1b), como pode ser observado no cromatograma da Figura 2B. Na degradação alcalina ($\text{NaOH } 5 \text{ mol L}^{-1}$) por um período de 6 h o percentual de degradação foi de aproximadamente de 10%, com o surgimento de quatro produtos de degradação (PD1c, PD2c, PD3c e PD1c), como pode ser observado na Figura 2C. Também, alguns aspectos em relação às características físicas desta amostra devem ser considerados, pois após o período de exposição da degradação alcalina 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 min (PD1d). Outros dois produtos de menor concentração (PD2d e PD3d), como pode ser observado na Figura 2D, também foram formados nas condições testadas. Os resultados da degradação fotolítica estão demonstrados na Figura 2E, na qual pode ser observado a ocorrência de picos adicionais de menor concentração (PD1e, PD2e, PD3e, PD4e e PD5e), além do sinal relativo à sinefrina com decréscimo na área do pico de, aproximadamente, 30% após 1 h de exposição.

Degradação do extrato de *Citrus aurantium*

Na Figura 3A pode-se observar o cromatograma típico da sinefrina no extrato de *Citrus aurantium* na concentração de $30,0 \mu\text{g mL}^{-1}$.

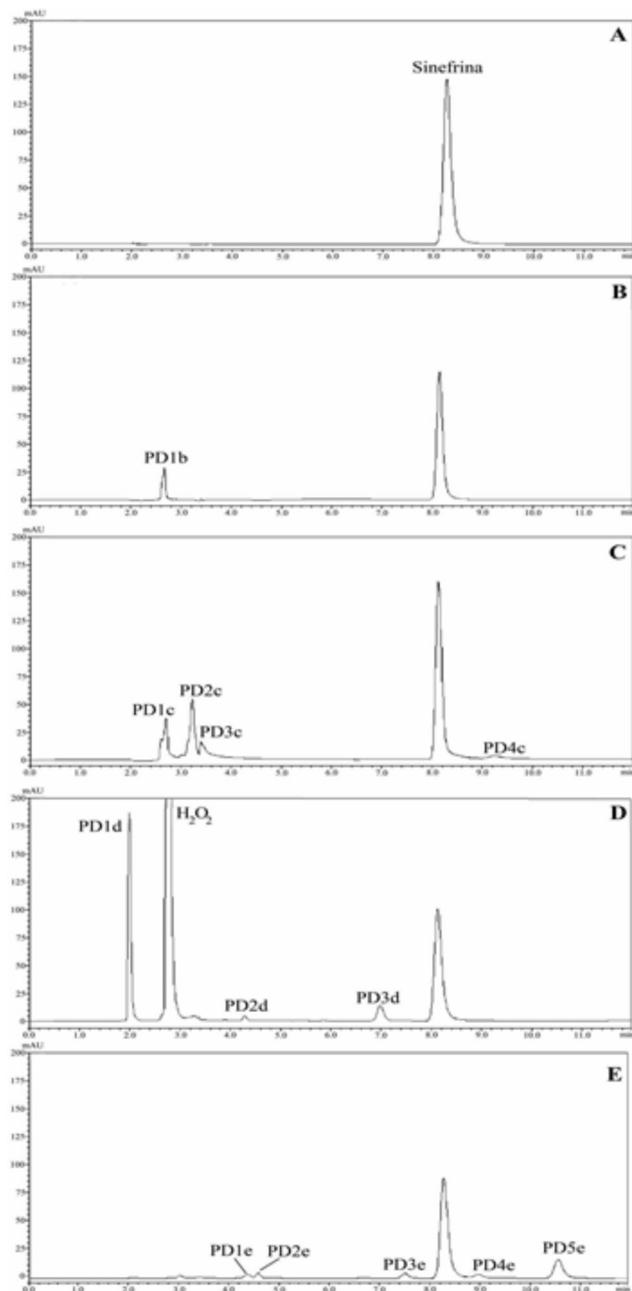


Figura 2. (A) Cromatograma típico da solução padrão de sinefrina $30,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ por CLAE com detecção em 220 nm ; (B) degradação ácida ($\text{HCl } 1 \text{ mol L}^{-1}$, 4 h) e produto de degradação (PD1b); (C) degradação alcalina ($\text{NaOH } 5 \text{ mol L}^{-1}$, 6 h) e produtos de degradação (PD1c, PD2c, PD3c e PD4c); (D) degradação oxidativa (H_2O_2 10%, 48 h) e produtos de degradação (PD1d, PD2d e PD3d); (E) fotodegradação (UVC-254 nm, 1 h) e produtos de degradação (PD1e, PD2e, PD3e, PD4e e PD5e)

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 (Figura 3B). 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 10%, praticamente o mesmo percentual de degradação apresentado na degradação alcalina do padrão de sinefrina (Figura 3C). Todavia, também apresentou as mesmas características físicas, quando na degradação do padrão após 6 h de aquecimento. Na degradação oxidativa foram realizadas algumas análises do extrato nas

mesmas condições impostas ao padrão (H_2O_2 10% em 48 h), mas os resultados obtidos não demonstraram degradação da sinefrina. Devido a essas características específicas do extrato optou-se por aumentar a concentração do peróxido de hidrogênio e também o tempo de exposição (H_2O_2 30% em 72 h). 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 (Figura 3D). Na análise dos cromatogramas da degradação oxidativa do padrão e do extrato percebe-se menor decaimento do pico da sinefrina no extrato,

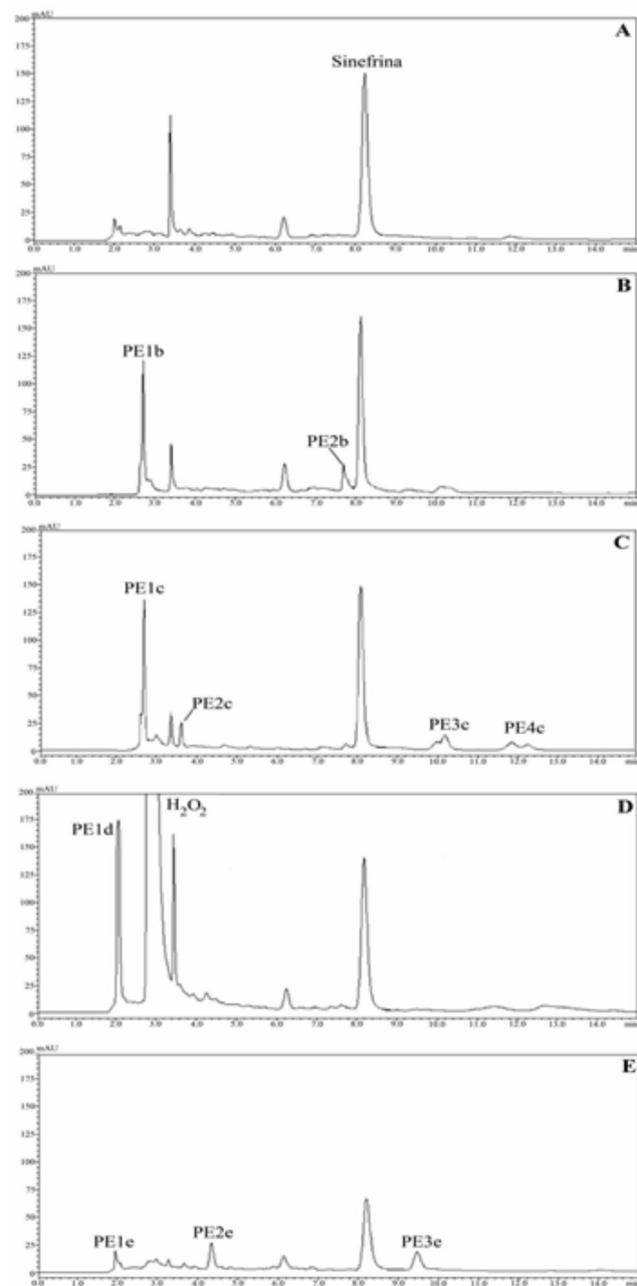


Figura 3. (A) Cromatograma típico da sinefrina $30,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ em extrato de *Citrus aurantium*, por CLAE com detecção em 220 nm ; (B) degradação ácida ($\text{HCl } 1 \text{ mol L}^{-1}$, 5 h) e produtos de degradação (PE1b e PE2b); (C) degradação alcalina ($\text{NaOH } 5 \text{ mol L}^{-1}$, 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)

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.^{20,21}

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 3E.

A partir da análise dos cromatogramas, nos estudos de degradação do padrão e do extrato, pode-se verificar que o método proposto teve êxito na separação da sinefrina dos produtos de degradação formados. Além disso, permitiu a análise quantitativa da sinefrina na presença dos produtos de degradação e constituintes da matriz, portanto, pode-se afirmar que o método pode ser empregado como indicativo da estabilidade. Nas condições testadas, os resultados também demonstram a susceptibilidade da sinefrina quanto à degradação ácida, básica, oxidativa e fotolítica, indicando a necessidade de um maior cuidado quando na manipulação ou armazenamento de formas farmacêuticas ou suplementos alimentares à base de extrato seco de *Citrus aurantium*.

Validação do método

A validação do método foi realizada com base na avaliação dos seguintes parâmetros analíticos: especificidade, linearidade, repetibilidade, precisão intermediária, exatidão e robustez. De acordo com alguns autores e o ICH 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.^{17,22}

A linearidade do método foi verificada por meio da construção de curvas padrão de sinefrina (concentração *versus* área do pico). O método mostrou-se linear na faixa de 15 a 45 µg mL⁻¹ e o estudo de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados forneceu uma equação da reta $y = 47.808,23x - 34.115,19$. O coeficiente de correlação (r) de 0,9996 demonstrou 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):

a) $F_{\text{calculado}} = 7691 > F_{\text{crítico}} = 4,96$; $p < 0,05$

b) $F_{\text{calculado}} = 1,109 < F_{\text{crítico}} = 3,71$; $p < 0,05$

Na determinação do limite de quantificação o valor teórico encontrado foi de 0,25 µg mL⁻¹, o qual correspondeu ao obtido experimentalmente, com DPR de 1,50 ($n = 6$). Para o limite de detecção o valor teórico encontrado foi de 0,08 µg mL⁻¹, o qual correspondeu ao obtido experimentalmente, com DPR de 2,20 ($n = 6$). Os resultados obtidos demonstram boa sensibilidade do método proposto.

A especificidade e a capacidade indicativa de estabilidade foram confirmadas pela capacidade do método em determinar o fármaco na presença de produtos de degradação e dos constituintes presentes no extrato de *Citrus aurantium*, considerado uma matriz complexa. Na análise utilizando o detector de arranjo de fotodiodos foram feitas varreduras espectrais dos picos de sinefrina e os resultados obtidos sugerem elevada pureza (> 99,9%) em todas as determinações realizadas. Esses resultados, apesar de não serem confirmatórios, corroboram com a especificidade e seletividade do método no sentido de um indicativo da não co-eluição de produtos de degradação ou compostos constituintes da matriz com a sinefrina, nas condições analisadas.

Os resultados da precisão, obtidos para o método proposto, foram expressos como DPR e podem ser visualizados na Tabela 1. Em todos os testes realizados foi observado que o método, além de apresentar

resultados coerentes com os limites estabelecidos pela legislação vigente, também apresentou baixos DPR, indicando o elevado nível de precisão do método.

Tabela 1. 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

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 2.

Tabela 2. Resultados do teste de recuperação de sinefrina em extrato seco por CLAE

Concentrações de padrão adicionado (µg mL ⁻¹)	Recuperação (%)	Média (%) ± DPR%
5	102,01	
10	102,85	102,03 ± 0,79
15	101,23	

Os testes revelaram 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 3.

Tabela 3. Resultados obtidos no teste de robustez da sinefrina

Condições	Teor de sinefrina (%)
Vazão 0,8 mL min ⁻¹	103,56
Vazão 1,2 mL min ⁻¹	103,17
pH 2,8	99,56
pH 3,2	100,60
80% ACN	100,18
90% ACN	99,89
25 min Extração	98,84
35 min Extração	98,98
Condição normal	101,91

CONCLUSÃO

O método desenvolvido por CLAE-DAD comprovou ser simples, linear, preciso, exato e específico, demonstrando satisfatórios resultados frente aos parâmetros testados. Também mostrou-se adequado para 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. Nas condições testadas, os resultados demonstram a susceptibilidade da sinefrina frente à degradação forçada, indicando a necessidade de cuidados na manipulação e/ou armazenamento de produtos à base de extrato seco de *Citrus aurantium*.

AGRADECIMENTOS

À CAPES pelo suporte financeiro.

REFERÊNCIAS

1. Fugh-berman, A.; Myers, A.; *Exp. Biol. Med.* **2004**, *229*, 698.
2. Haller, C. A.; Benowitz, N. L.; *New Eng. J. Med.* **2000**, *343*, 1833.
3. Grollman, A. P.; *Thromb. Res.* **2005**, *117*, 185.
4. Rossato, L. G.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade do Porto, Portugal, 2009.
5. Jordan, S.; Murty, M.; Pilon, K.; *Can. Med. Assoc. J.* **2004**, *171*, 4.
6. Haaz, S.; Fontaine, K. R.; Cutter, G.; Limdi, N.; Perumean-chaney, S.; Allison, D. B.; *Obes. Rev.* **2006**, *7*, 79.
7. Linck, V. M.; Thiesen, F. V.; Leal, M. B.; *Rev. Bras. Toxicol.* **2006**, *19*, 89.
8. Arbo, M. D.; Larentis, E. R.; Linck, V. M.; Aboy, A. L.; Pimentel, A. L.; Henriques, A. T.; Dallegre, E.; Garcia, S. C.; Leal, M. B.; Limberger, R. P.; *Food Chem. Toxicol.* **2008**, *46*, 2770.
9. Pellati, F.; Benvenuti, S.; Melegari, M.; Firenzuoli, F.; *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2002**, *29*, 1113.
10. Marchei, E.; Pichini, S.; Pacifici, R.; Pellegrini, M.; Zucaro, P.; *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2006**, *41*, 1468.
11. Slezak, T.; Francis, P. S.; Anastos, N.; Barnett, N. W.; *Anal. Chim. Acta.* **2007**, *593*, 98.
12. Uckoo, R. M.; Jayaprakasha, G. K.; Nelson, S. D.; Patil, B. S.; *Talanta* **2011**, *83*, 948.
13. Viana, C.; Zemolin, G. M.; Lima, F. O.; Carvalho, L. M.; Bottoli, C. B. G.; Limberger, R. P.; *Food. Addit. Contam.* **2013**, *30*, 634.
14. Bakshi, M.; Singh, S.; *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2002**, *28*, 1011.
15. USP; *The United States Pharmacopoeia*, 36th ed., United States Pharmacopoeia Convention: Rockville, 2013.
16. ICH; *Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q1A(R2)*; International Conference on Harmonisation (ICH) of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, Geneva, 2005.
17. ICH; *Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2B*; International Conference on Harmonisation (ICH) of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, Geneva, 2005.
18. Ribani, M.; Bottoli, C. B. G.; Collins, C. H.; Jardim, I. C. S. F.; Melo, L. F. C.; *Quim. Nova.* **2004**, *27*, 771.
19. Razaq, S. N.; Khan, I. U.; Ashfaq, M.; Mariam, I.; *Quim. Nova* **2012**, *35*, 1216.
20. Muthiah, P. L.; *Int. J. Phytopharm.* **2012**, *2*, 13.
21. Wang, Q. H.; Shu, Z. P.; Xu, B. Q.; Xing, N.; Jiao, W. J.; Yang, B. Y.; Kuang, H. X.; *Int. J. Biol. Macromol.* **2014**, *67*, 112.
22. Klein, T.; Longhini, R.; Bruschi, M. L.; Mello, J. C. P.; *Rev. Cienc. Farm. Basica Apl.* **2009**, *30*, 241.