

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Estabelecimento e validação de metodologia para quantificação de *p*-sinefrina em produtos derivados de *Citrus aurantium* por cromatografia a gás.

ADRIANA SANTOS ANDRADE

PORTO ALEGRE, 2008

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Estabelecimento e validação de metodologia para quantificação de *p*-sinefrina em produtos derivados de *Citrus aurantium* por cromatografia a gás.

Dissertação apresentada por
Adriana Santos Andrade para obtenção do
GRAU DE MESTRE em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Renata Pereira Limberger

Co-orientador: Prof^o. Dr. Dennis Russowsky

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Mestrado – Produção e Controle de Qualidade de Produtos Farmacêuticos da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 26.06.2008, pela Banca Examinadora constituída por:

Prof. Dr. José Ângelo Silveira Zuanazzi
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Pedro Eduardo Fröhlich
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dr. Adriana Mendes Aleixo
Universidade Metodista de Piracicaba

A553e	Andrade, Adriana Santos Estabelecimento e validação de metodologia para quantificação de <i>p</i> -sinefrina em produtos derivados de <i>Citrus aurantium</i> por cromatografia a gás / Adriana Santos Andrade – Porto Alegre : UFRGS, 2008. – xviii, 121 p. : il., tab., gráf. Dissertação (mestrado). UFRGS. Faculdade de Farmácia. Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas. 1. <i>Citrus aurantium</i> . 2. <i>p</i> -Sinefrina. 3. Rutaceae. I. Limberger, Renata Pereira. II. Russowsky, Dennis. III. Título. CDU: 615.9
-------	---

Bibliotecária responsável:
Margarida Maria Cordeiro Fonseca Ferreira – CRB10/480

Este trabalho foi desenvolvido sob a orientação da Prof^a. Dr^a. Renata Pereira Limberger, no Laboratório de Análises Toxicológicas do Departamento de Análises e na Central Analítica 2 da Faculdade de Farmácia da UFRGS e, sob a co-orientação do Prof^o. Dr. Dennis Russowsky, no Laboratório de Síntese Orgânica do Instituto de Química da UFRGS. As análises espectroscópicas foram realizadas com a cooperação técnica do Instituto de Química da UFRGS, do Laboratório de Análise de Emergência do Centro de Informação Toxicológica do RS e do Laboratório do Setor Técnico-Científico da Superintendência da Polícia Federal do RS, que disponibilizaram os demais equipamentos utilizados neste trabalho.

AGRADECIMENTOS

A elaboração deste trabalho envolveu a colaboração de várias pessoas sem as quais a sua realização não seria possível. Quero agradecer especialmente,

A Deus por guiar meus caminhos.

A minha família, pelo amor, dedicação e compreensão nos momentos difíceis.

A UFRGS pela oportunidade de estudar em uma instituição de ensino público e de qualidade.

Ao CAPES pelo apoio financeiro para desenvolver esta pesquisa.

À minha orientadora, professora e amiga, Dr^a. Renata Pereira Limberger, pelos ensinamentos, pela paciência, dedicação e amizade.

Ao Prof^o. Dr. Dennis Russowsky, pela disponibilidade de co-orientar este trabalho e pelo auxílio na interpretação das análises espectroscópicas.

A todos os professores do PPGCF pelos ensinamentos e, em especial, a Prof^a. Dr^a. Grace Gosmann e ao Prof^o. Dr. Jarbas Montanha pelo auxílio na interpretação dos espectros de ressonância magnética nuclear e de infravermelho.

À Mestre Viviane Sebben pela realização das análises de CG/EM e pela atenção dispensada.

À farmacêutica Daniele Zago Souza pela realização das análises de infravermelho.

As alunas de iniciação científica, Mariana e Perla, pelo auxílio na parte experimental.

Aos meus colegas do laboratório e aos meus amigos do PPGCF.

A todos aqueles que, direta ou indiretamente, participaram da realização desta etapa da minha vida.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	v
LISTA DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE TABELAS.....	xi
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xiii
RESUMO.....	xv
ABSTRACT.....	xvii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	7
2.1. Objetivo Geral.....	9
2.2. Objetivos Específicos.....	9
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	11
3.1. Generalidades.....	13
3.2. Características químicas e biossíntese da <i>p</i> -sinefrina.....	15
3.3. Preparações comerciais contendo CA e/ou <i>p</i> -sinefrina.....	17
3.4. Atividades farmacológicas.....	19
3.5. Segurança e toxicidade de extratos contendo CA e/ou <i>p</i> -sinefrina.....	20
3.6. Métodos de extração e <i>clean-up</i> da <i>p</i> -sinefrina de extratos vegetais e preparações comerciais.....	21
3.7. Métodos de análise da <i>p</i> -sinefrina.....	25
3.8. Derivação da <i>p</i> -sinefrina.....	26
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	29
4.1. Padrões e reagentes.....	31
4.2. Amostras.....	31
4.3. Extração.....	32
4.3.1. Frutos.....	32
4.3.2. Extrato seco.....	32
4.3.3. Composto emagrecedor.....	32
4.4. Extração em fase sólida (SPE).....	33
4.5. Derivação.....	34
4.5.1. Preparação dos derivados.....	34
4.5.2. Derivação das amostras.....	35
4.6. Cromatografia a gás (CG).....	38
4.6.1. Cromatógrafo a gás com detector de ionização de chama (CG/DIC) Perkin- Elmer® XL GC Autosystem.....	38
4.6.2. Cromatógrafo a gás com detector de massas (CG/EM) Varian® Saturno 2000	39
4.6.3. Cromatógrafo a gás com detector de massas (CG/EM) Shimadzu CG17A/QP5000.....	39
4.7. Cromatografia em camada delgada (CCD).....	40
4.8. Infravermelho (IV).....	40
4.9. Ressonância magnética nuclear (RMN).....	40
4.10. Validação do método.....	41
4.10.1. Linearidade.....	41
4.10.2. Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ).....	42
4.10.3. Precisão.....	42
4.10.4. Exatidão.....	43
4.10.5. Especificidade e seletividade.....	44
4.10.6. Robustez.....	44
4.10.7. Aplicação do método.....	45

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
5.1. Reações de derivação.....	50
5.1.1. Derivados obtidos por acilação.....	50
5.1.2. Derivados obtidos por condensação com compostos carbonílicos.....	57
5.1.2.1. Oxazolidinas de <i>p</i> -sinefrina.....	59
5.1.2.2. Oxazolidina de efedrina.....	70
5.1.2.3. Oxazolidina de octopamina.....	74
5.2. Preparação da amostra.....	77
5.2.1. Extração.....	77
5.2.2. Extração em fase sólida (SPE).....	77
5.3. Validação do método.....	80
5.3.1. Linearidade.....	80
5.3.2. Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ).....	82
5.3.3. Precisão.....	83
5.3.4. Exatidão.....	85
5.3.5. Especificidade e seletividade.....	85
5.3.6. Robustez.....	87
5.3.7. Aplicação do Método.....	87
6. CONCLUSÕES	89
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	93
ANEXOS	105

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1: Fórmula estrutural da <i>p</i> -sinefrina.....	13
Figura 3.2: Fruto verde e maduro de <i>Citrus aurantium</i>	13
Figura 3.3: Similaridade estrutural entre <i>p</i> -sinefrina e efedrina.....	15
Figura 3.4: Relação biossintética da octopamina e <i>p</i> -sinefrina com as rotas metabólicas de produção de catecolaminas e fenolaminas a partir da <i>p</i> -tirosina.....	16
Figura 3.5: Enantiômeros da <i>p</i> -sinefrina.....	17
Figura 3.6: Cartuchos de extração em fase sólida (SPE)	23
Figura 3.7: Mecanismo de retenção por SPE de fase reversa.....	23
Figura 3.8: Mecanismo de retenção por SPE de fase normal.....	24
Figura 3.9: Mecanismo de retenção por SPE de troca iônica.....	24
Figura 3.10. Etapas de extração em fase sólida.....	25
Figura 4.1: Sistema coletor de amostra a vácuo para extração em fase sólida (SPE) Vertical®.....	33
Figura 4.2: Síntese de Oxazolidinas.....	35
Figura 4.3: Bloco de aquecimento com sistema de evaporação, Pierce®.....	35
Figura 5.1: Cromatograma dos derivados obtidos por acilação da <i>p</i> -sinefrina com PR-1 por CG/DIC Perkin-Elmer®.....	51
Figura 5.2: Cromatograma dos derivados obtidos por acilação da <i>p</i> -sinefrina com PR-2 por CG/DIC Perkin-Elmer®.....	51
Figura 5.3: Reação de acilação da <i>p</i> -sinefrina com anidrido trifluoroacético.....	52
Figura 5.4: Cromatograma do derivado trifluoroacetilado obtido por acilação da <i>p</i> -sinefrina com PR-3 por CG/DIC Perkin-Elmer®.....	52
Figura 5.5: Cromatograma/espectro de massas do derivado trifluoroacetilado de <i>p</i> -sinefrina obtido com PR-3 por CG/EM Shimadzu®.....	53
Figura 5.6: Proposta para a fragmentação do derivado trifluoroacetilado de <i>p</i> -sinefrina.....	54
Figura 5.7: Cromatograma/espectro de massas do derivado trifluoroacetilado de <i>p</i> -sinefrina obtido por CG/EM Varian®.....	55
Figura 5.8: Cromatograma/espectro de massas do derivado trifluoroacetilado de octopamina obtido com PR-4 por CG/EM Shimadzu®.....	56
Figura 5.9: Proposta para a fragmentação do derivado trifluoroacetilado de octopamina.....	56
Figura 5.10: Reação de amino-álcoois secundários com cicloexanona.....	58
Figura 5.11: Reação da octopamina com cicloexanona.....	59
Figura 5.12: Cromatograma da oxazolidina de <i>p</i> -sinefrina obtida com PR-5 por CG/DIC Perkin-Elmer®.....	59
Figura 5.13: Representação gráfica da programação de temperatura da coluna DB-1.....	60
Figura 5.14: Cromatograma/espectro de massas da oxazolidina de <i>p</i> -sinefrina obtida com PR-5 por CG/EM Shimadzu®	60
Figura 5.15: Cromatograma/espectro de massas da oxazolidina de <i>p</i> -sinefrina obtida com PR-5 por CG/EM Varian ®.....	61
Figura 5.16: Representação gráfica da programação de temperatura da coluna CPSIL-8C.....	62
Figura 5.17: Proposta de fragmentação da oxazolidina de <i>p</i> -sinefrina.....	62
Figura 5.18: Numeração dos átomos de hidrogênio da <i>p</i> -sinefrina.....	64

Figura 5.19: Numeração dos átomos de carbono da <i>p</i> -sinefrina.....	66
Figura 5.20: Numeração dos átomos de hidrogênio da oxazolidina de <i>p</i> -sinefrina	67
Figura 5.21: Numeração dos átomos de carbono da oxazolidina de <i>p</i> -sinefrina....	68
Figura 5.22: Cromatograma da oxazolidina de efedrina obtido com PR-6 por CG/ DIC Perkin-Elmer.....	71
Figura 5.23: Cromatograma/espectro de massas da oxazolidina de efedrina obtido com PR-6 por CG/EM Shimadzu®.....	72
Figura 5.24: Cromatograma/espectro de massas da oxazolidina de efedrina obtido com PR-6 por CG/EM Varian®.....	72
Figura 5.25: Proposta para a fragmentação da oxazolidina de efedrina.....	73
Figura 5.26: Cromatograma do derivado de octopamina obtido com PR-7 por CG/DIC Perkin-Elmer®.....	74
Figura 5.27: Cromatograma/espectro de massas do derivado de octopamina obtido com PR-7 por CG/EM Shimadzu®.....	75
Figura 5.28: Derivado de octopamina após condensação com cicloexanona.....	75
Figura 5.29: Cromatograma/espectro de massas do derivado de octopamina obtido com PR-7 por CG/EM Varian®.....	76
Figura 5.30: Cromatografia em camada delgada do extrato de <i>Citrus aurantium</i> (CA) e das bases livres de aminas.....	78
Figura 5.31: Cromatograma/espectro de massa do extrato de <i>Citrus aurantium</i> obtido após <i>clean-up</i> por SPE, derivação com cicloexanona e análise por CG/DIC Perkin-Elmer®.....	79
Figura 5.32: Representação gráfica da curva padrão do derivado oxazolidina de <i>p</i> -sinefrina obtida por análise em CG/DIC PerkinElmer®.....	80
Figura 5.33: Cromatograma da oxazolidina de <i>p</i> -sinefrina após reação com cicloexanona e análise por CG/DIC Perkin-Elmer®.....	82
Figura 5.34: Cromatograma do extrato de CA submetido à extração, <i>clean-up</i> por SPE, derivação com cicloexanona e análise por CG/DIC Perkin-Elmer®.....	84
Figura 5.35: Cromatograma do extrato de CA antes da fortificação com o padrão de <i>p</i> -sinefrina após extração, <i>clean-up</i> por SPE, derivação com cicloexanona e análise por CG/DIC Perkin-Elmer®.....	85
Figura 5.36: Cromatograma do branco de reagentes após a derivação com cicloexanona e análise por CG/DIC Perkin- Elmer®.....	86
Figura 5.37: Cromatograma obtido após a análise do padrão de cafeína em metanol por CG/DIC Perkin-Elmer®.....	86
Figura 5.38: Cromatograma do fruto verde de CA após extração, <i>clean-up</i> por SPE e derivação com cicloexanona e análise por CG/DIC Perkin-Elmer®.....	88
Figura 5.39: Cromatograma do composto emagrecedor contendo extrato de CA, extrato de guaraná e <i>Salix alba</i> após extração, <i>clean-up</i> por SPE e derivação com cicloexanona e análise por CG/DIC Perkin-Elmer®..	88

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1: Condições experimentais para as reações de acilação com anidrido trifluoroacético (ATFA).....	36
Tabela 4.2: Condições experimentais para as reações de condensação com compostos carbonílicos.....	37
Tabela 5.1: Principais íons do espectro de massa do derivado trifluoroacetilado de <i>p</i> -sinefrina com as respectivas abundâncias.....	54
Tabela 5.2: Principais íons do espectro de massas do derivado trifluoroacetilado de octopamina com as respectivas abundâncias.....	57
Tabela 5.3: Proposta de fragmentação para a oxazolidina de <i>p</i> -sinefrina.....	63
Tabela 5.4: Interpretação das principais bandas de absorção do espectro de infravermelho (IV) da (\pm)- <i>p</i> -sinefrina.....	65
Tabela 5.5: Interpretação do espectro de ressonância magnética nuclear (RMN) de ^1H de (\pm)- <i>p</i> -sinefrina.....	65
Tabela 5.6: Interpretação do espectro de ressonância magnética nuclear (RMN) de ^{13}C de (\pm)- <i>p</i> -sinefrina.....	66
Tabela 5.7: Interpretação do espectro de ressonância magnética nuclear (RMN) de ^1H da oxazolidina de (\pm)- <i>p</i> -sinefrina.....	67
Tabela 5.8: Interpretação do espectro de ressonância magnética nuclear (RMN) de ^{13}C da oxazolidina de (\pm)- <i>p</i> -sinefrina.....	69
Tabela 5.9: Interpretação das principais bandas de absorção dos espectros de infravermelho (IV) da efedrina base livre e do cloridrato de efedrina .	71
Tabela 5.10: Proposta para a fragmentação da oxazolidina de efedrina.....	73
Tabela 5.11: Interpretação das principais bandas do espectro de infravermelho (IV) da octopamina base livre e do cloridrato de octopamina.....	74
Tabela 5.12: Principais íons do espectro de massas do derivado de octopamina com CH com as respectivas abundâncias.....	76
Tabela 5.13. Valores experimentais obtidos na elaboração da curva padrão da oxazolidina de <i>p</i> -sinefrina por CG/DIC Perkin-Elmer®.....	81
Tabela 5.14: Análise de variância (ANOVA) das áreas absolutas determinadas para obtenção da curva padrão da oxazolidina de <i>p</i> -sinefrina por CG/DIC Perkin-Elmer®.....	81
Tabela 5.15: Comparação dos limites de detecção obtidos por CG e CLAE/DAD.....	82
Tabela 5.16: Repetibilidade (precisão intra-corrída)	83
Tabela 5.17: Precisão intermediária (precisão inter-corrída).....	84
Tabela 5.18: Recuperação da <i>p</i> -sinefrina após extração, <i>clean-up</i> por SPE e derivação da amostra com cicloexanona (CH).....	85
Tabela 5.19: Identificação dos derivados de <i>p</i> -sinefrina, efedrina e octopamina por CG/DIC com confirmação por CG/EM.....	87
Tabela 5.20: Resultados das análises em produtos derivados de <i>Citrus aurantium</i>	88

LISTA DE ABREVIATURAS

AA	Anidrido acético
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ANISAL	Anisaldeído
ANOVA	Análise de variância
AT	Aminas traço
ATFA	Anidrido trifluoroacético
BENZAL	Benzaldeído
CA	<i>Citrus aurantium</i>
CCD	Cromatografia em camada delgada
CH	Cicloexanona
CG/DIC	Cromatógrafo a gás com detector de ionização de chama
CG/EM	Cromatógrafo a gás com detector de massas
CLAE/DAD	Cromatógrafo a líquido com detector de arranjo de diodos
CLAE/UV	Cromatógrafo a líquido com detector ultravioleta
CMD	Concentração média determinada
CV	Coefficiente de variação
d	Dubleto
dd	Duplo dubleto
DP	Desvio padrão
FDA	do inglês, <i>Food and drug administration</i>
GMEFH	Gerência de medicamentos fitoterápicos
IM	Íon molecular
IV	Infravermelho
m	Multiplete
MSTFA	<i>N</i> -metil- <i>N</i> -trimetilsilil-trifluoro acetamida
MTBSTFA	<i>N</i> -(<i>tert</i> -butildimetilsilil)- <i>N</i> -metiltrifluoroacetamida
m/z	Relação massa/carga
PFFA	Anidrido pentafluoropropiônico
R _f	Fator de retenção
RMN	Ressonância magnética nuclear
SCX	do inglês, <i>Strong Cation Exchanger</i>
SIM	do inglês, <i>Selected Ion Monitoring</i>
s	Simpleto
SNA	Sistema Nervoso Autônomo
SNC	Sistema Nervoso Central
SPE	Extração em fase sólida (do inglês, <i>solid phase extraction</i>)
x	massa do fragmento

RESUMO

Citrus aurantium L. var. *amara*. (CA) é uma árvore pertencente à família Rutaceae que apresenta a amina adrenérgica *p*-sinefrina como principal constituinte de seus frutos. A *p*-sinefrina constitui-se uma feniletilamina similar em termos estruturais com a efedrina, principal alcalóide do gênero *Ephedra* (Ephedraceae). Em abril de 2004, após a proibição da utilização de suplementos alimentares contendo *Ephedra* e/ou efedrina pela agência americana FDA (*Food and Drug Administration*), suplementos conhecidos como “*Ephedra-free*”, geralmente contendo CA associado com extratos de outras plantas, proteínas e aminoácidos, foram lançados no mercado internacional. A quantificação de *p*-sinefrina em produtos derivados de CA geralmente é realizada por cromatografia a líquido acoplada a detector de ultravioleta (CLAE/UV ou CLAE/DAD). A principal limitação desta metodologia deve-se a falta de especificidade. Um método apropriado para quantificação desta amina por extração em fase sólida (SPE) e cromatografia a gás acoplada com detector de ionização de chama (CG/DIC) e detector de massas (CG/EM) em produtos de origem vegetal ainda não se encontra disponível. Assim, o objetivo deste trabalho foi desenvolver e validar um novo procedimento mais seletivo para a quantificação e identificação de *p*-sinefrina em produtos derivados de CA por CG/DIC, seguido pela confirmação por CG/EM, após *clean-up* por SPE e derivação. Derivados trifluoroacetilados e oxazolidinas foram preparados, após reação com anidrido trifluoroacético e cicloexanona, e analisados por ressonância magnética nuclear (RMN ^1H e ^{13}C), CG/DIC e GC/EM. Cartuchos de troca iônica (SCX) e a cicloexanona apresentaram melhor desempenho como fase estacionária e reagente de derivação, respectivamente. O método de CG/DIC apresentou-se linear na faixa de concentração de 125-500 mg% ($r=0,9997$; $R^2= 0,9993$; $y = 535,11x-30063$). A precisão intra-dia (expressa como DPR%) foi de 3,60% e a precisão inter-dias foi de 3,59%. A recuperação média estabelecida a partir do extrato de CA foi de $78,1 \pm 3,64\%$. Melhor seletividade foi alcançada por confirmação do derivado oxazolidina de *p*-sinefrina por CG/EM. O método validado foi aplicado para a análise de *p*-sinefrina em derivados de CA como frutos, extrato e composto emagrecedor com resultados satisfatórios.

Palavras-chave: *Citrus aurantium*, *p*-sinefrina, Rutaceae.

ABSTRACT

Development and validation of gas chromatography method for quantification of *p*-synephrine in *Citrus aurantium*

Citrus aurantium var. *amara* (CA) is a plant belonging to the Rutaceae family, characterized by the presence of adrenergic amine *p*-synephrine in its fruits. *p*-Synephrine is a phenyletilamine structurally similar to ephedrine, the main active component of plants of the genus *Ephedra* (Ephedraceae). After the ban of *Ephedra* and/or ephedrine in dietary supplements in April 2004 by FDA (Food and Drug Administration), "Ephedra-free" products generally containing CA associated with other herbs extracts, proteins, and aminoacids, gain the international market. The quantification of *p*-synephrine in products containing CA is currently out by HPLC/UV or HPLC/DAD analysis. The limit of this approach is that of lack in the specificity. An appropriated method to the quantification of this amine by solid phase extraction (SPE), gas chromatography method with flame ionization detection (GC/FID) and mass spectrometry detector (GC/MS) in herbal products, need to be developed. In this way, the aim of this study was to develop and validate a new procedure for quantification and identification of *p*-synephrine in CA products based on GC/FID followed by GC/MS confirmation analysis, after clean-up by solid phase extraction and derivatization. Trifluoroacetylated derivatives and oxazolidines were prepared after reaction with trifluoroacetic anhydride and cyclohexanone (CH), respectively, and were subjected to analysis by nuclear magnetic resonance (NMR ^1H and ^{13}C), GC/FID and GC/MS. The results indicate that SCX stationary phase for SPE and CH agent afforded the best performance. The GC/FID method developed was validated and was found to be linear in the range of 125-500 mg% ($r=0.9997$; $R^2= 0.9993$; $y = 535,11x-30063$). Intra-day precision (calculated as %R.S.D) was 3.60% and inter-day precision was 3.59%. Mean recovery from extract of CA was $78.1 \pm 3.64\%$. The method selectivity was further improved by confirmation of oxazolidine derivative of *p*-synephrine by CG/MS. The validated method was applied to analysis in products containing CA like extract, fruits and weight loss preparation with satisfactory results.

Keywords: *Citrus aurantium*, *p*-synephrine, Rutaceae

1. INTRODUÇÃO

A *p*-sinefrina é uma amina simpatomimética de ação indireta que compartilha similaridade estrutural com a adrenalina, efedrina e a fenilpropanolamina (COLKER *et al.*, 1999; FUGH-BERMAN e MYERS, 2004; BOUCHARD *et al.*, 2005). Foi introduzida como fármaco sintético, na forma de racemato, por suas propriedades de vasoconstrição e broncodilatação (MATTOLI *et al.*, 2005).

Na natureza é encontrada sob a forma de (*R*)-(-)-*p*-sinefrina (PELLATI *et al.*, 2005), em plantas (Rutaceae, Amaryllidaceae, Moraceae) e animais, incluindo o homem (WHEATON e STEWART, 1970; FUGH-BERMAN e MYERS, 2004). Está presente em produtos derivados de cítricos, sendo obtida, principalmente, da casca e do fruto da laranja-amarga, conhecida como *Citrus aurantium* L. (CA) (DHARMANANDA, 2002; GROLLMAN, 2005; MATTOLI *et al.*, 2005; PELLATI *et al.*, 2005).

O consumo de produtos contendo CA passou a despertar interesse econômico e científico após a proibição do uso de preparações a base de efedra (Ma Huang, *Ephedra* sp.), em suplementos alimentares pela *Food and Drug Administration* (FDA) em 2004, devido à associação estabelecida entre o consumo destes produtos com óbitos e sérios efeitos adversos como ataques cardíacos, derrames cerebrais, hipertensão e problemas psiquiátricos (FUGH-BERMAN e MYERS, 2004; GROLLMAN, 2005; SCHEKELLE, 2006).

Atualmente extratos de CA estão sendo livremente utilizados nestes produtos, em substituição à efedrina, indicados para a perda de peso e ganho de massa muscular (FIRENZUOLI, 2005). A venda anual destes suplementos, conhecidos como *efedra-free*, já supera um bilhão de dólares e a expectativa é que continue crescendo exponencialmente (GROLLMAN, 2005).

Os extratos comerciais de CA são padronizados com proporções que variam, geralmente, entre 4 a 6% de *p*-sinefrina, sendo relatados casos extremos onde o teor pode chegar a 95% (AVULA *et al.*, 2005). Estes extratos diferem dos materiais *in natura* por apresentarem conteúdo consideravelmente maior do que o normalmente encontrado em fontes naturais (DHARMANANDA, 2002). São estes extratos enriquecidos que são utilizados em suplementos alimentares e em

compostos emagrecedores que, em geral, contém de 100 a 200 mg do extrato de CA por dose (BLUMENTAL, 2005).

A composição de produtos derivados de CA destinados à perda de peso é bem variável e complexa. Vários ingredientes podem ser associados como minerais, vitaminas e outros princípios ativos de efeito sinérgico presentes em extratos vegetais, como cafeína em chá-da-índia (*Thea sinensis*), guaraná (*Paullinia cupana*) e noz-de-cola (*Cola acuminata*), salicina em salgueiro (em *Salix sp.*) e efedrina (em *Ephedra sp.*, Ma-Huang), potencializando seus efeitos e, conseqüentemente, os riscos associados (FUGH-BERMAN e MYERS, 2004; FIRENZUOLI *et al.*, 2005; HALLER, 2005; SCHEKELLE, 2006).

A complexidade das amostras comerciais e as peculiaridades estruturais da molécula da *p*-sinefrina, como elevada polaridade, baixa volatilidade e instabilidade térmica (PELLATI e BENVENUTI, 2007a), constituem-se em fatores limitantes para o controle de qualidade destes produtos. Embora a maioria dos métodos propostos para a quantificação de *p*-sinefrina utilize cromatografia em fase líquida com detecção por UV (CLAE/UV), a CLAE apresenta limitações quando empregada para análise de matrizes complexas encontradas em compostos emagrecedores e suplementos alimentares, como a inespecificidade associada a coeluição de análogos estruturais e outros interferentes (MATTOLI *et al.*, 2005, SANDER *et al.*, 2005; PUTZBACH *et al.*, 2007b).

Uma vez que a *p*-sinefrina é o princípio ativo dos extratos de CA, um método capaz de separar, identificar e quantificar simultaneamente esta amina constitui-se em uma importante ferramenta para assegurar a qualidade destes produtos (PELLATI, 2005). Neste contexto, a cromatografia a gás (CG) representa uma alternativa importante e ainda pouco explorada. A possibilidade de hifenização do CG com um detector de massas (CG/EM) representa um diferencial. A obtenção da massa molecular reduz o número de possibilidades estruturais possibilitando a identificação com alto grau de confiança (MATTOLI *et al.*, 2005; BARNES *et al.*, 2006; MARCHEI *et al.*, 2006; PELLATI e BENVENUTI, 2007a). Entretanto, a análise de *p*-sinefrina por CG apresenta algumas dificuldades como a complexidade da matriz, necessidade de etapas de *clean-up* e derivação.

MARCHEI e col. (2006) é a única citação encontrada na literatura sobre análise de *p*-sinefrina em suplementos alimentares, empregando um procedimento de extração com clorofórmio:isopropanol, em meio básico, seguido pela derivação do extrato seco com anidrido pentafluoropropiônico (PFPA) e análise por CG/EM. Embora este método tenha se mostrado adequado para a quantificação, ele apresenta algumas desvantagens como, por exemplo, a não seletividade do procedimento de extração, os reagentes halogenados empregados são tóxicos e o espectro de massas do derivado obtido por reação com PFPA não exhibe o íon molecular.

Para possibilitar a análise de *p*-sinefrina por CG em amostras complexas, procedimentos alternativos de extração, *clean-up* e derivação devem ser desenvolvidos. Neste sentido, este trabalho se propõe a investigar métodos alternativos de *clean-up* e obtenção de derivados voláteis da *p*-sinefrina, bem como desenvolver e validar um método analítico por CG/DIC, capaz de separar e quantificar esta amina após *clean-up* e derivação prévia, com confirmação por CG/EM. Devido a maior complexidade da matriz presente em preparações comerciais, inicialmente o procedimento será desenvolvido para os extratos de CA e, posteriormente, adaptado para avaliação da futura aplicação do método para análise de compostos emagrecedores e misturas equivalentes às empregadas em suplementos alimentares.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral:

Estabelecer e validar metodologia para quantificação de *p*-sinefrina, em produtos derivados de CA, por cromatografia a gás com detector de ionização de chama (CG/DIC) seguido por confirmação por cromatografia a gás com detector de massas (CG/EM).

2.2. Objetivos específicos:

- Estabelecer e otimizar métodos alternativos para a derivação de *p*-sinefrina para análise por cromatografia a gás;
- Estabelecer protocolo de *clean-up* dos extratos de CA por extração em fase sólida (SPE);
- Estabelecer e validar metodologia para quantificação e análise de *p*-sinefrina, em extratos de CA, por cromatografia a gás com detector de ionização de chama (CG/DIC) e confirmar os resultados por cromatografia a gás acoplada com detector de massas (CG/EM);
- Comparar os resultados da quantificação de *p*-sinefrina, em frutos de CA por cromatografia a gás, com os previamente obtidos e validados pelo nosso grupo de pesquisa por cromatografia em fase líquida com detector de arranjo de diodos (CLAE/DAD).

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Generalidades

Do ponto de vista estrutural, a *p*-sinefrina (Figura 3.1) é uma feniletilamina com substituições na posição 4 do anel aromático, no carbono β e no átomo de nitrogênio da cadeia lateral.

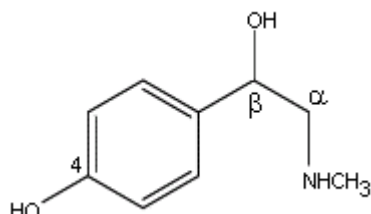


Figura 3.1: Fórmula estrutural da *p*-sinefrina (modificado de BOUCHARD e col., 2005).

Esta amina é um metabólito comum de produtos derivados de cítricos, sendo obtida, principalmente, da casca e do fruto da laranja-amarga, conhecido como *Citrus aurantium* (DHARMANANDA, 2002; GROLLMAN, 2005; PELLATI *et al.*, 2005; MATTOLI *et al.*, 2005).

Citrus aurantium L. var. *amara*. (CA) é uma árvore frutífera pequena, em torno de 5 metros de altura, pertencente à família Rutaceae (FUGH-BERMAN e MYERS, 2004; MARCHEI *et al.*, 2006). É nativa do sudoeste asiático sendo cultivada em pomares domésticos em todo o Brasil. Os frutos (Figura 3.2) são globosos do tipo baga, com casca grossa e rugosa, de sabor amargo contendo muitas sementes (HARRI e MATOS, 2002).



Figura 3.2. Fruto verde (a) e maduro (b) de *Citrus aurantium* L. var. *amara* (CA).

O fruto imaturo do CA contém flavonóides (até 10%) e aminas adrenérgicas, principalmente, a *p*-sinefrina (0,2%) (MATTOLI *et al.*, 2005). Em geral, os precursores biossintéticos, octopamina e a tiramina, não são detectados (PELLATI *et al.*, 2002). A casca contém, também, furanocumarinas, terpenos como o limoneno e flavonóides como a hesperidina, naringina, e tangeretina (FUGH-BERMAN e MYERS, 2004).

O teor de *p*-sinefrina presente em frutos imaturos de origem chinesa fica em torno de 0,25% (CHANG e BUT, 1986; AVULA *et al.*, 2005), o que é equivalente ao conteúdo relatado para frutos secos coletados no Japão (OHTA *et al.* 1994). Em sucos de CA, a concentração de *p*-sinefrina varia entre 5 e 6% (PENZAK *et al.*, 2001).

ARBO (2008) determinou o teor de *p*-sinefrina em frutos e folhas de CA, coletados em diferentes localidades da região metropolitana de Porto Alegre, entre dezembro de 2003 e janeiro de 2006. Os resultados obtidos variaram entre 0,02 a 0,05% e demonstraram que a *p*-sinefrina ocorre em todas as partes do fruto, com teor maior nas cascas e que a concentração da amina diminui com o aumento do diâmetro do fruto, dado relatado previamente por HOSODA e col. (1990).

Os frutos de CA possuem sabor amargo e raramente são utilizados para fins alimentícios. Entretanto, a casca é muito utilizada para a preparação de geléias e doces (HARRI e MATOS, 2002; FUGH-BERMAN e MYERS, 2004). As flores e as folhas fornecem óleos essenciais muito apreciados pela indústria de perfumes (HARRI e MATOS, 2002), denominados óleo de neroli e óleo *petit grain*, respectivamente.

Os produtos derivados de CA são muito utilizados por suas propriedades medicinais (FUGH-BERMAN e MYERS, 2004). Zhi Shi é uma preparação obtida a partir do fruto seco e imaturo de CA utilizada na Medicina Tradicional Chinesa por mais de 5.000 anos, sendo indicada para tratar problemas digestivos, distensão abdominal, disenteria ou constipação (BLUMENTHAL, 2005). A dose diária recomendada varia entre 3,0 a 9,0 gramas da planta representando, teoricamente, de 7,5 a 22,5 mg de *p*-sinefrina, considerando um teor de 0,25% (DHARMANANDA, 2002). Na China, a infusão intravenosa de extratos de CA é utilizada no tratamento

do choque anafilático e em problemas cardíacos (FUGH-BERMAN e MYERS, 2004; BLUMENTHAL, 2005; MATTOLI *et al.*, 2005). Outros usos medicinais relatados para CA são como antifúngico, estimulante, sedativo, tratamento da anemia, ulceração produzida pelo frio, fraqueza geral, hemorragia da retina, úlceras duodenais e prolapso do útero ou ânus (TRACY e KINGSTON, 2007).

Além do CA, outras espécies do gênero *Citrus* (*C. reticulata*, *C. sinensis*, *C. deliciosa*) acumulam *p*-sinefrina podendo apresentar, inclusive, quantidades superiores àquelas encontradas na laranja-amarga (STEWART *et al.*, 1964; AVULA *et al.*, 2005). Segundo ARBO (2008), a presença desta amina em frutos de diversas espécies de *Citrus* coletados em Porto Alegre varia entre 0,03-0,143%. De acordo com os estudos realizados por VIEIRA e col. (2007), sucos de laranja-doce adquiridos no mercado brasileiro, contêm em média 1,6% de *p*-sinefrina.

3.2. Características químicas e biossíntese da *p*-sinefrina

A *p*-sinefrina é uma substância de caráter básico ($pK_a = 10,2 - NH$), polar e solúvel em água (NIEMANN e GAY, 2003; PELLATI e BENVENUTI, 2007b). É muito similar a outras aminas simpatomiméticas como a efedrina, diferindo desta apenas na presença de uma hidroxila no anel aromático e ausência de um grupo metila da cadeia lateral, como ilustrado na Figura 3.3.

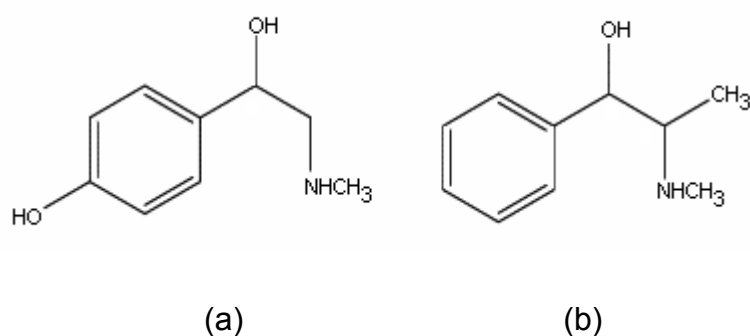


Figura 3.3. Similaridade estrutural entre (a) *p*-sinefrina e (b) efedrina (PELLATI, 2005).

Devido a sua atividade farmacológica, caráter alcalino e origem biossintética, muitos autores (GANZERA *et al.*, 2005; PELLATI e BENVENUTI, 2007a; PUTZBACK *et al.*, 2007a; PUTZBACK *et al.*, 2007b) classificam a *p*-sinefrina como um alcalóide. Entretanto, levando em consideração a sua ocorrência em plantas e animais,

consideramos esta classificação inadequada. Ainda, existe alguma confusão na literatura com relação ao isômero de sinefrina que estaria presente em CA (ALLISON *et al.*, 2005; HAAZ, 2006; PENZAK *et al.*, 2001). Alguns autores referem, equivocadamente, a *m*-sinefrina (fenilefrina) como metabólito natural (BLUMENTHAL, 2005).

Do ponto de vista biossintético, nos vegetais, a *p*-sinefrina é formada a partir da tiramina, via descarboxilação da tirosina, conforme apresentado na figura 3.4 (WHEATON e STEWART, 1969; PELLATI e BENVENUTI, 2007a).

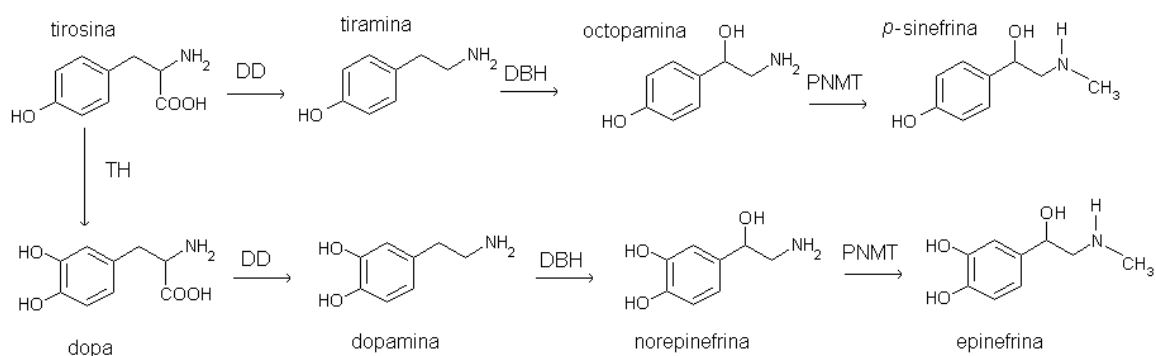


Figura 3.4. Relação biossintética da octopamina e *p*-sinefrina com as rotas metabólicas de produção de catecolaminas e fenolaminas a partir da *p*-tirosina; TH: tirosina hidroxilase; DD: dopa descarboxilase; DBH: dopamina beta-hidroxilase; PNMT: feniletanolamina-N-metiltransferase (modificado de EVANS (1988) e IKEMOTO (1995)).

Constitui-se em uma amina quiral que ocorre na natureza apenas na sua forma levógera, enquanto o equivalente sintético está disponível na forma de racemato (PELLATI e BENVENUTI, 2005). A configuração absoluta da (-)-*p*-sinefrina é *R*, sendo estabelecida por estudos de difração de raios X após a preparação do ânion (-)-3-bromo-cânfora-8-sulfonato (MIDGLEY *et al.*, 1989). As estruturas dos enantiômeros de *p*-sinefrina são apresentadas na figura 3.5.

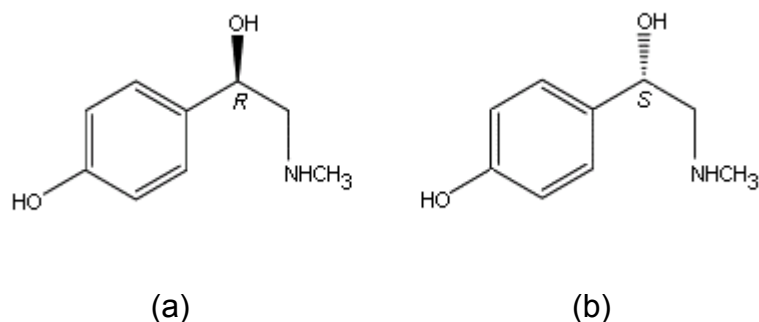


Figura 3.5. Enantiômeros da *p*-sinefrina (a) (R)-(-)-*p*-sinefrina (b) (S)-(+)-*p*-sinefrina (PELLATI, 2005).

Além de serem encontradas em plantas, a *p*-sinefrina, a tiramina e octopamina ocorrem também em bactérias e em animais, incluindo o homem. Elas são comumente chamadas de aminas traço ou elusivas devido a sua baixa quantidade endógena. Estas aminas podem fazer parte da dieta (alimentos derivados de cítricos, chocolate, queijos, vinhos) ou, ainda, serem sintetizadas através de uma rota metabólica de produção de aminas clássicas conforme apresenta a figura 3.4 (D'ANDREA *et al.*, 2006; VIEIRA *et al.*, 2007). Esta rota é diferente da observada em plantas, provavelmente, devido às diferenças de especificidade de substrato (WHEATON e STEWART, 1969).

Após serem sintetizadas, as aminas traço são armazenadas no Sistema Nervoso Autônomo (SNA). Atualmente acredita-se que desordens no metabolismo de tais aminas estejam relacionadas com muitos distúrbios visto que os seus níveis encontram-se alterados em casos de enxaqueca e outros tipos de dores de cabeça (LINDEMANN e HOENER, 2005; D'ANDREA *et al.*, 2006), além de depressão, esquizofrenia, epilepsia, doença de Parkinson e hiperatividade (BRANCHEK e BLACKBURN, 2003; LINDEMANN e HOENER, 2005).

3.3. Preparações comerciais contendo CA e/ou *p*-sinefrina

Na Europa, a *p*-sinefrina também é conhecida com o nome de Oxedrina, sendo utilizada na forma de tartarato para o tratamento da hipotensão pelas vias oral, subcutânea, intramuscular ou intravenosa. A dose usual empregada é de 100 mg a 150 mg, três vezes ao dia (DHARMANANDA 2002; HAAZ *et al.*, 2006). O tartarato de *p*-sinefrina também é utilizado como descongestionante nasal e ocular (BOUCHARD *et al.*, 2005).

Medicamentos industrializados contendo *p*-sinefrina não são disponíveis no Brasil. Apenas são comercializadas preparações contendo extratos de CA, consideradas medicamentos fitoterápicos, devendo atender critérios de qualidade, segurança e eficácia estabelecidos em legislação específica (BRASIL, 2004). De acordo com consulta eletrônica realizada à ANVISA, atualmente, não há nenhum fitoterápico registrado contendo CA destinado à perda de peso (GMEFH, 2008).

Nos Estados Unidos e na Europa, produtos contendo extratos de CA não são considerados medicamentos, sendo comercializados como suplementos dietéticos (MATTOLI *et al.*, 2005; MARCHEI *et al.*, 2006). De acordo com a legislação americana, os suplementos alimentares podem conter vários constituintes como vitaminas, minerais, extratos de plantas, aminoácidos, etc (DIETARY, 2006) podendo ser adquiridos ou dispensados livremente, em vários locais como academias, supermercados, farmácias, lojas especializadas no ramo ou por meio da internet (GRAY e WOOLF, 2005; MARCHEI *et al.*, 2006; DIETARY, 2006). Contudo, conforme as especificações da lei americana, os suplementos dietéticos não podem ser utilizados para tratar, curar, prevenir ou diagnosticar doenças ficando, portanto, fora do controle da FDA (YUNES e CALIXTO, 2001).

Uma vez que o registro dos medicamentos fitoterápicos é legislado de forma diferente dependendo do país, a fiscalização é difícil. Em 2002, foram recolhidos do mercado brasileiro produtos ilegais que não tinham registro no Ministério da Saúde (ANVISA, 2002). Atualmente, compostos emagrecedores contendo CA também podem ser encontrados em farmácias de manipulação, drogarias e supermercados (LINCK, 2005; BRAUM, 2006), bem como em academias de ginástica (QUINTEROS, 2006), lojas especializadas em produtos ergonômicos e até pela Internet.

Em levantamento realizado, em farmácias e drogarias da Região Metropolitana de Porto Alegre/RS, constatou-se que 57,2% das farmácias e 55% das drogarias comercializam produtos contendo CA (LINCK, 2005).

BRAUM (2006) relata que cerca de 20% dos chás disponíveis nas prateleiras dos supermercados de Porto Alegre contém espécies cítricas, principalmente CA, sendo evidenciada presença de *p*-sinefrina (por CCD e CLAE) em 70% das amostras aleatoriamente selecionadas para análise. Alguns destes chás eram

indicados “para acordar” - sugerindo-se que seja tomado pela manhã, para ajudar a despertar; para “depois das refeições” - para se evitar a sonolência comum após a alimentação; para “ajudar a manter a forma” - servindo como acelerador do metabolismo; e ainda, para o combate da sonolência. A autora relata, também, a comercialização de preparados de erva-mate (*Ilex paraguariensis*) contendo CA. Cabe ressaltar que bebidas a base de erva-mate são amplamente utilizadas no Rio Grande do Sul, onde o uso do chimarrão (infusão a partir da erva-mate) faz parte da cultura dos gaúchos.

3.4. Atividades farmacológicas

Os fabricantes de suplementos alimentares sugerem que a *p*-sinefrina possui atividade específica sob receptores β -3, menos efeitos sobre o Sistema Nervoso Central (SNC) e sistema cardiovascular do que a efedrina. No entanto, devido à similaridade estrutural da *p*-sinefrina com outras aminas adrenérgicas, acredita-se que o uso de extratos de CA possa causar efeitos adversos similares aos associados à efedrina e devam ser submetidos às mesmas medidas restritivas (MARCUS e GROLLMAN, 2003; FUGH-BERMAN e MYERS, 2004).

A atividade farmacológica das feniletilaminas é determinada por substituições no anel aromático, nos carbonos α ou β e na amina da cadeia lateral (Figura 3.1.). As substituições efetuadas na posição 4 do anel aromático, no carbono β e no grupo amínico da cadeia lateral sugerem que a *p*-sinefrina pode ser um potente agonista α e β adrenérgico. Entretanto, a introdução de grupos hidroxila, tanto no carbono β quanto na posição 4 do anel aromático, diminui, provavelmente, a sua capacidade em penetrar o SNC (BOUCHARD, 2005).

A hidroxilação do anel aromático, somente em uma posição, sugere que a *p*-sinefrina não seja degradada pela catecol-*O*-metiltransferase. Desta forma, a sua eficácia e duração de ação seriam maiores (BOUCHARD, 2005). Quando administrada por via intravenosa, promove vasoconstrição e aumento de pressão arterial (HALLER *et al.*, 2005).

A *p*-sinefrina é uma amina adrenérgica, de ação indireta que potencializa a liberação de noradrenalina (COLKER *et al.*, 1999; BOUCHARD, 2005). Estudos em ratos indicam que a *p*-sinefrina possui atividade moderada sobre receptores α -

adrenérgicos, sendo mais potente em α_1 do que α_2 (KIM *et al.*, 2001), bem como atividade agonista β -3, em ratos (CARPÉNÉ *et al.*, 1999) e em camundongos (ARBO, 2008), e atividade parcial sobre a lipólise em adipócitos de mamíferos, incluindo o homem (CARPÉNÉ *et al.*, 1999). Com relação à perda de peso, ainda não existem evidências científicas concretas de que a *p*-sinefrina seja eficaz (BENT *et al.*, 2004; FUGH-BERMAN e MYERS, 2004).

3.5. Segurança e toxicidade de extratos contendo CA e/ou *p*-sinefrina

Os resultados dos estudos científicos sobre a eficácia e a segurança de produtos contendo CA são contraditórios e insipientes. A argumentação de que o CA tem uso milenar, na Medicina Tradicional Chinesa, vem sendo utilizada pela indústria nutracêutica como marcador de segurança indireta. Argumentação semelhante foi utilizada para a efedrina. No período compreendido, entre 1992 até 2002, foram relatados ao FDA mais de 1000 reações adversas graves (ataques cardíacos, hipertensão, batimento cardíaco irregular, dores de cabeça, derrames e problemas psiquiátricos) e 118 óbitos associados com o consumo de suplementos contendo efedrina (FUGH-BERMAN e MYERS, 2004; GROLLMAN, 2005; SCHEKELLE, 2006). A utilização de extratos concentrados de CA, possivelmente associado com outras drogas e/ou fármacos simpatomiméticos, durante longos períodos de tempo, não tem precedente como uso tradicional (FUGH-BERMAN e MYERS, 2004). Inúmeros casos de reações adversas associadas à utilização de produtos contendo CA em associações já foram relatados (WHO, 2004; BOUCHARD *et al.*, 2005; FIRENZUOLI *et al.*, 2005; HAAZ, 2006).

Por outro lado, existem poucos relatos de reações adversas relacionadas à utilização de produtos contendo exclusivamente extrato de CA (FUGH-BERMAN e MYERS, 2004; BLUMENTAL, 2005; HALLER *et al.*, 2005). Estudos realizados por HALLER e col. (2005) sugerem que os efeitos cardiovasculares observados, após a ingestão de suplementos *efedra-free*, são atribuídos à cafeína e outros estimulantes presentes nestas formulações.

Recentemente, ARBO (2008) realizou estudos para avaliar a toxicidade aguda e subcrônica de *p*-sinefrina e de extratos de CA em camundongos por via oral. Os resultados da avaliação toxicológica aguda indicaram uma baixa toxicidade da *p*-

sinefrina. Entretanto, foram observados alguns efeitos como redução da atividade locomotora, exoftalmia, piloereção e salivação que sugerem que a *p*-sinefrina possui ação inespecífica sobre o sistema adrenérgico, contrariando a suposta estimulação específica em receptores β -3. Com relação aos estudos de toxicidade crônica, não foram observadas alterações clínicas e anátomo-patológicas, nem morte nos animais tratados (ARBO, 2008).

3.6. Métodos de extração e *clean-up* da *p*-sinefrina de extratos vegetais e preparações comerciais

Com relação ao método de extração, várias técnicas são descritas para análise de *p*-sinefrina em produtos derivados de CA. Dentre os solventes mais empregados tem-se: metanol, metanol com dimetilsulfóxido (dmsO), etanol, água destilada, água destilada com acetonitrila, ácido clorídrico 0,37%, entre outros (GANZERA *et al.*, 2005; PELLATI e BENVENUTI 2007a; PUTZBACH *et al.*, 2007a; ARBO, 2008). A extração pode ser realizada empregando-se agitação magnética (PELLATI *et al.*, 2005), ultra-som (PELLATI e BENVENUTI, 2007b), Soxhlet (SANDER *et al.*, 2005), refluxo (PELLATI e BENVENUTI, 2007a), fluido pressurizado (PUTZBACH *et al.*, 2007a) e homogenizador de tubos (ARBO, 2008). Dependendo da complexidade da matriz e da técnica utilizada, o tempo de extração pode variar entre 15 a 120 minutos (NIEMANN e GAY, 2003; PELLATI *et al.*, 2005; NELSON *et al.*, 2007; PUTZBACH *et al.*, 2007a).

Recentemente, PELLATI e BENVENUTI (2007b) avaliaram dois métodos de extração empregando-se agitação magnética e sonicação com vários solventes como a água destilada, ácido clorídrico 0,1 M, metanol e metanol acidificado. Para a extração da *p*-sinefrina, o melhor resultado foi obtido com a utilização da água destilada. Tanto a sonicação quanto a agitação magnética foram eficientes para a extração da amina, sendo os resultados obtidos com a primeira ligeiramente superiores.

Para avaliar a eficiência da técnica de extração da *p*-sinefrina de produtos derivados de CA, alguns autores propõem o método de adição com padrões (PELLATI *et al.*, 2005; MARCHEI *et al.*, 2006). Quando empregaram este método,

MARCHEI e col. (2006) e PELLATI e col. (2005) recuperaram, em média, 89,2% e 75,0% de *p*-sinefrina adicionada, respectivamente.

Em contrapartida, outros autores não recomendam este procedimento porque ele não reflete necessariamente a recuperação do analito presente em matrizes vegetais complexas (ONG, 2004; SANDER *et al.*, 2006; PUTZBACH *et al.*, 2007b). PUTZBACH e col. (2007b) sugerem a avaliação da eficiência da extração com base na massa absoluta do analito recuperada.

Métodos de extração não seletivos, quando aplicados ao material vegetal, freqüentemente, ocasionam a co-extração de uma quantidade relativamente grande de componentes indesejáveis, que podem afetar severamente o desempenho da separação e da detecção por cromatografia (HUIE, 2002; PELLATI e BENVENUTI, 2007a). Para possibilitar a análise cromatográfica, o extrato bruto deve ser submetido a um processo de *clean-up*. Para esta finalidade a SPE é a técnica mais utilizada (NYIREDY, 2004).

O *clean-up* de extratos vegetais por SPE é relatado para análise de *p*-sinefrina por CLAE (PELLATI *et al.*, 2005; SANDER *et al.*, 2005; GAY *et al.* 2006). Quando comparado ao extrato líquido-líquido, o eluato obtido por SPE é mais límpido, e praticamente livre de impurezas propiciando melhor seletividade analítica (PELLATI *et al.*, 2005). O estabelecimento do protocolo de SPE para análise de produtos derivados de CA por CG, entretanto, ainda não foi estabelecido.

A SPE é uma técnica cromatográfica que consiste na partição do analito entre duas fases, sendo uma delas líquida (fase móvel) e a outra sólida (fase estacionária). Em geral, a SPE é realizada empregando-se um pequeno cartucho de polipropileno, contendo cerca de 50 a 500 mg de sorvente com 40-60 µm de tamanho de partícula (Figura 3.6), fixado no tubo através de dois filtros (LANÇAS, 2004).



Figura 3.6: Cartuchos de extração em fase sólida (SPE) (GENPORE, 2008).

A capacidade de separação da SPE baseia-se na afinidade preferencial do analito ou da impureza pela fase estacionária. Os sorventes sólidos podem ser apolares, polares ou iônicos. Quando a fase sólida é mais apolar do que a amostra, o sorvente é chamado de fase reversa (FR). A retenção do analito pelo sorvente ocorre por interações hidrofóbicas do tipo Van der Waals (figura 3.7) e as separações envolvem uma matriz, geralmente aquosa, polar ou moderadamente polar. O analito de interesse é apolar ou de média polaridade. O sorvente mais popular de FR é o grupo octadecil C_{18} ligado à sílica.

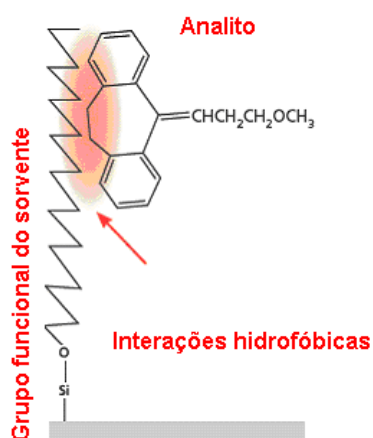


Figura 3.7.: Mecanismo de retenção por extração em fase sólida (SPE) de fase reversa (SUPELCO, 2008).

Os sorventes de fase normal são mais polares do que a amostra e são utilizados quando o analito de interesse encontra-se em uma matriz orgânica. A retenção do analito ocorre por interações hidrofílicas polares como pontes de

hidrogênio e interações dipolo-dipolo (figura 3.8). A sílica, a alumina e o florisil são exemplos destes sorventes.

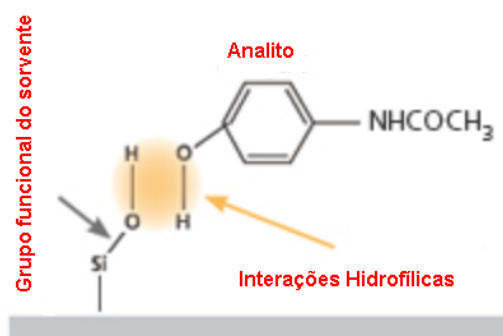


FIGURA 3.8: Mecanismo de retenção por extração em fase sólida (SPE) de fase normal (SUPELCO, 2008).

Os sorventes de troca iônica são utilizados para o isolamento de analitos de caráter ácido ou básico presentes em soluções aquosas. Por exemplo, analitos com carga positiva, como as aminas, são retidos por cargas negativas presentes em trocadores de cátions fracos, como ácido carboxílico, ou trocadores fortes do tipo SCX (*strong cation exchanger*), como os grupos sulfônicos [SO_3^-], aprisionado à estrutura básica da sílica (figura 3.9).

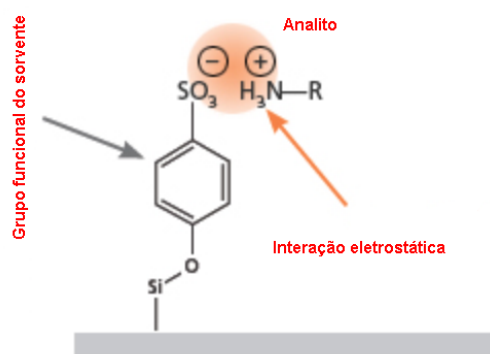


Figura 3.9.: Mecanismo de retenção por extração em fase sólida (SPE) de troca iônica (SUPELCO, 2008).

As etapas de SPE encontram-se ilustradas na figura 3.10 e consistem na ativação do cartucho, adição do analito ao sorvente, eliminação dos interferentes da matriz, eluição do analito e posterior concentração do extrato.

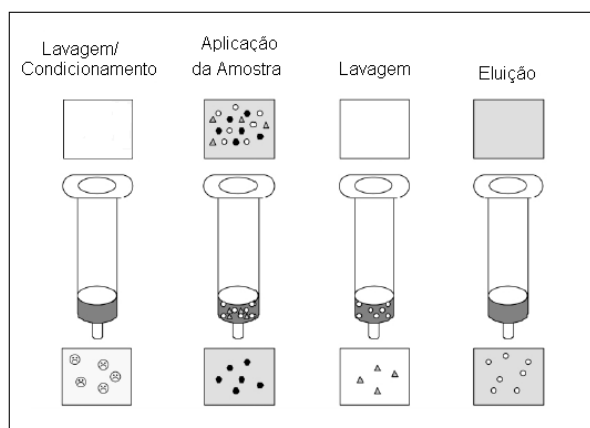


Figura 3.10: Etapas da extração em fase sólida - SPE (CAMEL, 2003).

Quando comparada com os métodos convencionais de extração, a utilização da SPE oferece várias vantagens tais como redução do consumo de solventes tóxicos; remoção de interferentes possibilitando ganho de seletividade; proteção da coluna analítica; concentração do analito; ausência de emulsões e possibilidade de automação (HUIE, 2002; SUPELCO, 2008).

3.7. Métodos de análise de *p*-sinefrina

Embora algumas farmacopéias (Ph. Jap. 2001 ; F. Port., 2002) apresentem monografias para produtos derivados de CA, a análise de *p*-sinefrina, em compêndios oficiais, ainda não foi contemplada.

A maioria dos métodos propostos para a quantificação de *p*-sinefrina utiliza CLAE com detecção por UV. A falta de especificidade desta técnica representa um limitante para a análise de matrizes mais complexas como suplementos alimentares e medicamentos fitoterápicos.

A cafeína (SANDER *et al.*, 2005) e a octopamina, por exemplo, podem interferir na análise de amostras complexas de CA por CLAE/UV (MATTOLI *et al.*, 2005; PUTZBACH *et al.*, 2007b; SLEZAK *et al.*, 2007). Na análise de *p*-sinefrina em matrizes complexas por CLAE/UV, empregando-se fase reversa e condições isocráticas, a cafeína eluiu tardiamente da coluna dificultando a quantificação da amina (SANDER *et al.*, 2005). Para contornar estes inconvenientes, alguns autores propõem a utilização de outros detectores mais específicos como o de quimiluminescência (SLEZAK *et al.*, 2007), eletroquímico (KUSU *et al.*, 1996),

arranjo de diodos (DAD) (HE *et al.*, 1997; ARBO, 2008), detector de massas (EM) (ALLISON *et al.*, 2005; MATTOLI *et al.*, 2005; SANDER *et al.*, 2005; BARNES *et al.*, 2006; GAY *et al.*, 2006; MARCHEI *et al.*, 2006; NELSON *et al.*, 2007) e ultravioleta (UV) associado com fluorescência (NIEMANN e GAY, 2003; PUTZBACH *et al.*, 2007b).

A utilização de técnicas cromatográficas acopladas com detector de massas (EM) vem crescendo exponencialmente nos últimos anos e, atualmente, são consideradas mais seletivas e específicas, permitindo a identificação inequívoca dos componentes da amostra (PELLATI e BENVENUTI, 2007a). Dentre essas, a CG/EM é a mais acessível e difundida (MARCHEI *et al.*, 2006).

Entretanto, para possibilitar a análise de *p*-sinefrina por CG em amostras complexas, procedimentos alternativos de extração, *clean-up* e derivação devem ser estabelecidos.

MARCHEI e col. (2006) utilizaram um método de extração líquido-líquido com clorofórmio:isopropanol (9:1, v/v), em condições alcalinas, seguido pela derivação com PFP, para quantificar a *p*-sinefrina em suplementos alimentares por CG/EM.

3.8. Derivação da *p*-sinefrina

Para uma substância ser analisada por CG ela precisa ser volátil e termicamente estável (CASTILHO e SILVEIRA, 1998; MARCHEI *et al.*, 2006). A análise direta de *p*-sinefrina por esta metodologia não é possível devido a sua elevada polaridade, baixa volatilidade e instabilidade térmica (PELLATI e BENVENUTI, 2007a). Esta dificuldade pode ser superada recorrendo à modificação química dos grupos funcionais polares da molécula através da preparação de um derivado adequado.

A derivação é a etapa final de preparação da amostra e consiste na substituição dos grupos polares da molécula por outros menos polares melhorando as suas características de volatilidade, adsorção e estabilidade (CASTILHO e SILVEIRA, 1998).

Os reagentes de silição são os agentes de derivação mais difundidos. Nestas reações, os hidrogênios ativos presentes nos grupos –OH, –SH e –NH são

substituídos por grupos trimetilsilil (TMS) ou tert-butildimetilsilil (TBDMS). Embora a sililação de grupos amínicos seja possível, a reação não é favorecida (NICHOLSON, 1978b) pela baixa reatividade do grupo amino (KATAOTA, 1996). SEBBEN (2007) empregou a sililação com MSTFA (*N*-metil-*N*-trimetilsilil-trifluoro acetamida) e MTBSTFA (*N*-(tert-butildimetilsilil)-*N*-metiltrifluoroacetamida) para preparar derivados de efedrina e anfetamina. Dentre as desvantagens apontadas pela autora, podemos citar a instabilidade do derivado com presença de misturas de derivados *N*-trimetilsilil e *O*-trimetilsilil e o alto custo destes reagentes.

A acilação é outra reação de derivação empregada para aminas primárias e secundárias (KATAOKA, 1996). O procedimento consiste na conversão dos hidrogênios presentes em grupos -NH₂, -NH-, -OH-, -SH em ésteres, tioésteres e amidas por meio de reação com anidrido acético (AA), anidrido trifluoroacético (ATFA) ou anidrido pentafluoropropiônico (PFPA) (NICHOLSON, 1978a). Estas reações podem ser catalisadas por calor (MARCHEI *et al.*, 2006), por meio ácido (VALENTINE e MIDDLETON, 2000) ou básico (KATAOKA, 1996) e, geralmente, são realizadas na presença de piridina que atua simultaneamente como solvente e catalisador da reação (KATAOKA, 1996).

A alquilação consiste na substituição de hidrogênio de grupos polares por um grupo alquila ou arila. Ácidos carboxílicos, álcoois, tióis, fenóis, aminas primárias e secundárias constituem as principais funções orgânicas que podem ser alvo para as reações de alquilação. A alquilação com diazometano, seguida por reação com foscênio, foi utilizada por KÖNIG e col. (1986) para preparar derivados da adrenalina e compostos relacionados, incluindo a *p*-sinefrina, para análise por CG/DIC. Atualmente, a utilização destes reagentes não é recomendada porque eles são extremamente tóxicos, instáveis e potencialmente explosivos (NICHOLSON, 1978a; BLACK e MUIR, 2003).

Um procedimento alternativo para a derivação de aminas é a condensação com compostos carbonílicos de aldeídos e cetonas (NICHOLSON, 1978b; CLARK, 1975; EL-HAJ *et al.*, 2003; SEBBEN, 2007). Para possibilitar a formação deste tipo derivado, o analito de interesse deve possuir dois grupos funcionais com uma separação espacial adequada (SEGURA *et al.*, 1998).

Recentemente, EL-HAJ e col. (2003) e SEBBEN (2007) empregaram a cicloexanona (CH) para a preparação de derivados cíclicos de algumas aminas, tais como, a efedrina, anfetamina e metanfetamina, para análise por CG. Os espectros destes derivados são bem característicos. O anel confere rigidez à molécula aumentando a chance de detecção do íon molecular.

WALKER e MASSEY (1988) e WALKER e col. (1989) realizaram estudos por CG/EM das oxazolidinas derivadas de efedrina obtidas por reação com cetonas (acetona, cicloexanona e ciclopentanona) e com aldeídos (benzaldeído e anisaldeído). Outros estudos de oxazolidinas por EM foram realizados por RENNEKAMP e col. (1971), VAINIOTALO e col. (1990), por LEHTELÄ e col. (1994).

Cabe ressaltar que, como todo procedimento analítico, a preparação de derivados para análise por CG requer alguns cuidados e precauções como: (1) o frasco de reação deve ser adequado ao procedimento; (2) frascos com tampa de teflon não são recomendados para uso com reagentes de acilação contendo átomos de flúor devido à possibilidade de absorção e hidrólise; (3) alguns reagentes empregados em reações de derivação são higroscópicos necessitando cuidados no manuseio; (4) derivados obtidos por sililação e acilação são instáveis na presença de umidade e não podem ser armazenados, devendo ser mantidos em condições anidras até o momento da análise; (5) para não danificar a coluna do CG, o excesso de reagentes de acilação, assim como o seu sub-produto, devem ser removidos antes da injeção (BLAU e KING, 1977; NICHOLSON, 1978a; KATAOKA, 1996; CASTILHO e SILVEIRA, 1998).

MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Padrões e reagentes

Foram utilizados padrão de (\pm)-*p*-sinefrina adquirido na forma de base livre (99 %, MP Biomedicals®), além de cafeína (99%, Merck®) e outras aminas como o cloridrato de octopamina (\geq 95%, Sigma®) e cloridrato de efedrina (99,5%, Aldrich®), empregados para avaliação de seletividade do método.

As bases livres da octopamina e efedrina foram preparadas a partir da extração de suas soluções aquosas por SPE seguindo o protocolo descrito em 4.4.

Os seguintes reagentes foram empregados: (1) metanol (99,8%, Vetec®); (2) butanol (99%, Synth®); (3) acetato de etila (99,5%, Vetec®); (4) isopropanol (99%, Inlab®); (5) acetona (99,5%, Synth®); (6) ciclohexanona (99%, Dinâmica®); (7) ciclohexanona (\geq 99,0%, Sigma®), (8) anidrido trifluoroacético (\geq 99%, Aldrich®); (9) anisaldeído (\geq 99,0%, Aldrich®) (10) benzaldeído (\geq 99,0%, Aldrich®) (11) ninhidrina (99%, Vetec®), (12) hidróxido de amônio (28-30%, Reagen®) e (13) ácido acético (99,7%, Quimex®).

4.2. Amostras

O extrato seco de *Citrus aurantium* L. (CA) foi obtido da Galena® com especificação mínima de 6% de *p*-sinefrina, confirmada através de análise por CLAE/DAD, segundo método descrito por ARBO (2008).

O extrato seco de CA utilizado para avaliação da exatidão foi adquirido em farmácia local sendo a presença de *p*-sinefrina não detectada por CLAE/DAD.

Para a quantificação de *p*-sinefrina, na presença de outros extratos vegetais, foi utilizado um composto emagrecedor contendo extrato de CA padronizado a 6%, adquirido em farmácia de manipulação apresentando-se sob a forma farmacêutica cápsulas, em proporções equivalentes às empregadas em suplementos alimentares com a seguinte composição:

<i>Citrus aurantium</i>	100 mg
<i>Paullinia cupana</i>	250 mg
<i>Salix alba</i>	150 mg

Os frutos de CA foram coletados, em Porto Alegre, no mês de janeiro de 2008, de populações previamente identificadas pelo Professor Otto Carlos Koller da Faculdade de Agronomia da UFRGS.

4.3. Extração

O método de extração foi adaptado de PELLATI e col. (2005) e ARBO (2008). As amostras foram extraídas com água destilada (PELLATI *et al.*, 2005) em homogenizador de tubos, SIEL®, modelo 026, segundo descrito por ARBO (2008). O tempo de extração e o número de ciclos foram determinados experimentalmente.

4.3.1. Frutos

Frutos verdes foram triturados em liquidificador até obter uma massa pastosa. A seguir, pesou-se exatamente cerca de 1 g da amostra e extraiu-se o material com água destilada (5 mL) durante 30 minutos. Centrifugou-se a 5000 rpm por 10 minutos. Reservou-se o sobrenadante. O resíduo foi re-extraído nas mesmas condições. Os extratos foram combinados e reservados para *clean-up* por SPE conforme descrito em 4.4.

4.3.2. Extrato seco

Pesaram-se, aproximadamente, 15 mg de extrato seco de CA e adicionou-se água destilada (3 mL). O material foi extraído por 30 minutos e a seguir, centrifugou-se a 5000 rpm por 10 minutos. O extrato aquoso (1 mL), equivalente a 5 mg do extrato inicial, foi reservado para o *clean-up* por SPE conforme descrito em 4.4

4.3.3. Composto emagrecedor

Pesou-se uma quantidade de pó equivalente a 5 mg do extrato de CA. Adicionou-se água destilada (3 mL) e extraiu-se por 30 minutos. Centrifugou-se a 5000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi reservado e o resíduo re-extraído nas mesmas condições por duas vezes. Os extratos foram combinados e submetidos ao *clean-up* por SPE conforme descrito em 4.4

4.4. Extração em Fase Sólida (SPE)

Para o *clean-up* por SPE foram empregados cartuchos de 100 mg e 400 mg da marca Adsorbex e da marca Vertipak™, do tipo SCX, adquiridos da Merck® e da Vertical®, respectivamente, juntamente com o sistema coletor de amostra a vácuo da Vertical® apresentado na figura 4.1.



Figura 4.1: Sistema coletor de amostra a vácuo para extração em fase sólida (SPE) Vertical®.

O procedimento de SPE foi adaptado de PELLATI e col. (2005) sendo que as condições de eluição foram modificadas para tornar o eluato adequado para a reação de derivação com a cicloexanona (CH).

Para garantir a retenção adequada da *p*-sinefrina ao sorvente, o pH do extrato bruto foi verificado antes do *clean-up* e corrigido entre 7-8 quando necessário.

Para o *clean-up* do extrato bruto foi executado o seguinte protocolo: Primeiro, o sorvente foi condicionado através da passagem de 2 mL de metanol para promover a solvatação dos seus grupos funcionais e remover quaisquer impurezas presentes. Após, o cartucho foi lavado com 2 mL de água destilada, tomando-se o cuidado de não deixar o sorvente secar para não comprometer a retenção do analito. A segunda etapa consistiu na percolação da amostra através do sorvente empregando-se um fluxo baixo para permitir a retenção do analito (1-2 gotas/segundo). Na terceira etapa, fez-se a lavagem da fase sólida com 2 mL de água-metanol (75:25 v/v) para retirar os interferentes da matriz. A seguir foi feita a secagem do sorvente para eliminar a presença de água no extrato final. Para a desorção da *p*-sinefrina empregou-se o eluente (metanol:isopropanol:hidróxido de amônio; 78:20:2, v/v). A eluição foi realizada utilizando-se três e quatro porções de 1

mL do eluente para cartuchos contendo 100 mg e 400 mg de sorvente, respectivamente.

4.5. Derivação

4.5.1. Preparação dos derivados

Para a preparação dos derivados para CG foram empregadas reações de acilação e de condensação com compostos carbonílicos. Devido a possível presença de outros análogos estruturais da *p*-sinefrina, em suplementos alimentares e compostos emagrecedores, foram investigadas algumas destas reações de derivação com outras aminas, como a efedrina e a octopamina.

Todas as reações foram realizadas empregando-se um excesso molar do reagente de derivação. Após o término da reação, os produtos obtidos foram analisados por CG/EM ou por RMN conforme descrito em 4.6 e 4.9, respectivamente.

As reações de acilação foram realizadas no Laboratório de Toxicologia da Faculdade de Farmácia da UFRGS, empregando-se anidrido trifluoroacético (ATFA), em frascos de reação de 1 mL, em bloco de aquecimento reacti-therm, Pierce® (Figura 4.2). As condições experimentais utilizadas são apresentadas na tabela 4.1 e foram adaptadas de VALENTINE e MIDDLETON (2000) e MARCHEI e col. (2006).

Para evitar danos à coluna cromatográfica, o excesso do ATFA foi eliminado sob fluxo de nitrogênio. Antes da injeção no CG, o produto da reação foi ressuspenso em acetato de etila.

Para as reações de condensação com compostos carbonílicos foram empregados cicloexanona (CH), anisaldeído (ANISAL) e benzaldeído (BENZAL). As reações foram estabelecidas, no Laboratório de Síntese Orgânica do Instituto de Química da UFRGS, em balão de 5 mL, em chapa de aquecimento com banho de óleo, com agitação magnética e controle de temperatura conforme apresenta a figura 4.2. As condições experimentais utilizadas são apresentadas na tabela 4.2 e foram adaptadas de EL-HAJ e col. (2003).

Considerando que a disponibilidade do par de elétrons do átomo de nitrogênio

pode influenciar a velocidade da reação de condensação com compostos carbonílicos, para fins de comparação de reatividade, alguns procedimentos de derivação foram realizados, paralelamente, com o cloridrato e com a base livre da amina. Com exceção da *p*-sinefrina, as demais aminas disponíveis apresentavam-se sob a forma de cloridrato.

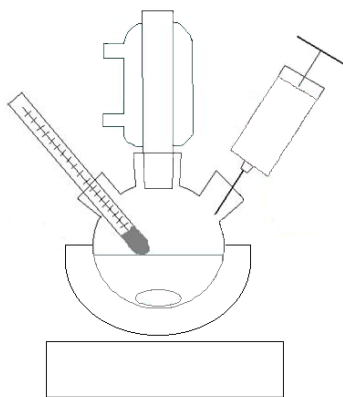


Figura 4.2.: Síntese de oxazolidinas

4.5.2. Derivação das amostras

O eluato obtido da SPE foi transferido para frasco de reação e o solvente foi evaporado sob fluxo de nitrogênio à secura, à temperatura de 60°C, empregando-se um evaporador reacti-vapTM. A reação de derivação com a CH foi realizada, em frasco de reação de 1 mL em bloco de aquecimento, conforme apresentado na figura 4.3, empregando-se as mesmas condições experimentais estabelecidas para a preparação dos derivados obtidos por condensação com compostos carbonílicos conforme descrito na tabela 4.2.



Figura 4.3.: Bloco de aquecimento reacti-therm, modelo 18870, com evaporador reacti-vapTM, modelo 18780, Thermo Fisher Scientific®.

Tabela 4.1: Condições experimentais para as reações de acilação com anidrido trifluoroacético (ATFA)

PROCEDIMENTO	REAGENTES							
	<i>p</i> -Sinefrina (base livre)			Anidrido trifluoroacético (ATFA)				
	MM (g/mol) ^c	μMóis	Massa (μg)	MM (g/mol) ^c	μMóis	Massa (g)	Volume (μL)	d (g/mL) ^c
PR-1 20 min 80 °C	167,2	3	500	210,03	180	0,076	50	1,511
PR-2 ^a 20 min 25 °C	167,2	3	500	210,03	180	0,076	50	1,511
PR-3 ^b 20 min 80 °C	167,2	3	500	210,03	180	0,076	50	1,511
PR-4 20 min 80 °C	Octopamina (cloridrato)			Anidrido trifluoroacético (ATFA)				
	MM (g/mol) ^c	μmóis	Massa (μg)	MM (g/mol) ^c	μMóis	Massa (g)	Volume (μL)	d (g/mL) ^c
	189,5	3	568,5	210,03	180	0,076	50	1,511

^aMeio ácido - 100 μL de HCl metanólico 10% ; ^b Adaptado de MARCHEI e col. (2006) com ajuste do pH com tampão fosfato 0,1 M; MM: massa molecular; d = densidade

^cThe Merck Index , 2001

Tabela 4.2: Condições experimentais para as reações de condensação com compostos carbonílicos

PROCEDIMENTO	REAGENTES							
	<i>p</i> -Sinefrina (base livre)			Cicloexanona (CH)				
	MM (g/mol) ^a	μMóis	Massa (mg)	MM (g/mol) ^a	μMóis	Massa (g)	Volume (μL)	d (g/mL) ^a
PR-5 60 min 100 °C	167,2	90	15	98,1	900	0,09	100	0,947
PR-6 60 min 100 °C	Efedrina (base livre)			Cicloexanona (CH)				
	165	97	16	98,1	900	0,09	100	0,947
PR-7 60 min 100 °C	Octopamina (base livre)			Cicloexanona (CH)				
	153	90	13,8	98,1	900	0,09	100	0,947
PR-8 60 min 100 °C	Octopamina (cloridrato)			Cicloexanona (CH)				
	189,5	90	13,8	98,1	900	0,09	100	0,947
PR-9 120 min 100 °C	<i>p</i> -Sinefrina (base livre)			Anisaldeído (ANISAL)				
	167,2	311	52	136,15	12400	1,68	1,5	1,121
PR-10 60 min 100 °C	<i>p</i> -Sinefrina (base livre)			Benzaldeído (BENZAL)				
	167,2	210	35	106	495	1,05	1,0	1,05

^aThe Merck Index ,2001.

MM: massa molecular; d= densidade.

4.6. Cromatografia a gás

A CG foi empregada para análise e caracterização dos derivados preparados, bem como para a validação do método proposto para a quantificação e confirmação da *p*-sinefrina em produtos derivados de CA. Para a validação do método de quantificação foi empregado o equipamento CG/DIC descrito em 4.6.1. Para avaliação da robustez do método de quantificação e para a confirmação da *p*-sinefrina foram empregados dois equipamentos de CG/EM distintos. A principal diferença entre os dois equipamentos utilizados é observada no estágio de análise de massas. No CG/EM Varian®, com analisador *ion-trap* descrito em 4.6.2, os íons são analisados no mesmo local em que são originados. No CG/EM Shimadzu® com analisador quadrupolo, descrito em 4.6.3., os íons são formados continuamente, acelerados e direcionados ao detector de íons. Ambos equipamentos de CG/EM empregados podem ser operados no modo *full-scan* para gerar o espectro completo do analito quanto no modo *single ion monitoring* (SIM). No modo SIM, são selecionados três ou mais fragmentos específicos do analito de interesse, possibilitando a detecção de concentrações bem menores. Quando comparado com o quadrupolo, o analisador *ion-trap* apresenta uma série de vantagens como melhor sensibilidade no modo *full-scan*, maior eficiência e maior seletividade (SEBBEN, 2007). O confinamento de íons no *trap* possibilita o estudo químico dos íons na fase gasosa e a elucidação estrutural pelo acompanhamento da massa seqüencial gerada por estágios múltiplos (MARCH, 1997). No entanto, a capacidade do *trap* deste equipamento é limitada a 10^4 íons (SPARKMAN, 2008). Se este número é excedido, pode ocorrer saturação comprometendo o desempenho do equipamento (JONSCHER e YATES, 1997; SPARKMAN, 2008). Além disso, outra desvantagem do *ion trap* é a menor reprodutividade dos espectros em relação ao quadrupolo (BORREY *et al.*1998).

4.6.1. Cromatógrafo a gás com detector de ionização de chama (CG/DIC) – Perkin-Elmer® XL GC Autosystem

Foi empregado o cromatógrafo a gás Perkin-Elmer® modelo XL GC Autosystem, localizado na Central Analítica 2 do PPGCF, equipado com detector de ionização de chama (DIC). Como módulo de separação foi utilizada uma coluna capilar de sílica

fundida (DB-1), da J & W Scientific®, 100% dimetilpolisiloxano, 30 m x 0,25 mm, 0,25 µm. As temperaturas do injetor e do detector foram 250 °C e 260 °C, respectivamente. Nitrogênio foi utilizado como gás de arraste com um fluxo constante de 1 mL/min. O forno da coluna foi programado a 80 °C(3 min) com uma rampa de 40 °C/min até 220 °C (2 min), seguido por uma rampa 40 °C/min até 280 °C (2 min) e, finalmente, uma rampa 40 °C/min até 300 °C (2,5 min). A razão de divisão do injetor foi 1:25 e o volume de injeção foi 1 µL. O detector foi programado para range 1 e atenuação -2.

4.6.2. Cromatógrafo a gás com detector de massas (CG/EM) – Varian® Saturno 2000

Foi empregado o cromatógrafo a gás, Varian®, modelo 3800 acoplado ao detector de massas, modelo Saturno 2000, *Ion trap* (CG/EM/EM), com amostrador automático modelo 8200, localizado no Laboratório de Análise de Emergência do Centro de Informação Toxicológica do Rio Grande do Sul (CIT/RS), operado a 70 eV, ionização por impacto de elétrons, modo *full-scan*. Como módulo de separação foi utilizada uma coluna capilar de sílica fundida (CP-SIL 8CB) *low bleed* MS da Varian®, 5% fenil 95% dimetilpolisiloxano, 30 m x 0,25 mm, 0,25 µm. As temperaturas do injetor e da linha de transferência foram ajustadas para 220 °C e 260 °C, respectivamente. Hélio 6.0 foi utilizado como gás de arraste com fluxo constante de 1 mL/min. A temperatura da coluna foi programada para 80 °C/2min, 50 °C/min até 250 °C/2min, 100 °C/min até 280 °C/min. A razão de divisão no injetor foi 1:10 e o volume de injeção foi 1µL.

4.6.3. Cromatógrafo a gás com detector de massas (CG/EM) – Shimadzu® CG17A/QP5000

Foi empregado o cromatógrafo a gás acoplado a um detector de massas (CG/EM) Shimadzu®, modelo CG17A/QP5000, localizado na Central Analítica 2 do PPGCF, equipado com quadrupolo cilíndrico, operado a 70 eV, com ionização por impacto de elétrons, modo *full-scan* e SIM. Como módulo de separação foi utilizada uma coluna capilar de sílica fundida (DB-5), da J & W Scientific®, 5% fenil 95%

dimetilpolisiloxano, 30 m x 0,25 mm, 0,25 μm . O injetor e a linha de transferência foram ajustados a 220 °C a 260 °C, respectivamente. O hélio 6.0 foi utilizado como gás de arraste com um fluxo de 1 mL/min. O forno da coluna foi programado a 80 °C (3 min) com uma rampa de 40 °C/min até 220 °C (2 min), seguido por uma rampa 40 °C/min até 280 °C (2 min) e, finalmente, uma rampa 40 °C/min até 300 °C (2,5 min). A razão de divisão do injetor foi 1:10 e o volume de injeção foi 1 μL .

4.7. Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

A cromatografia em camada delgada foi realizada empregando-se placas de celulose, 20 cm x 20 cm, da Merck®, utilizando-se como eluente butanol:ácido acético:água (4:1:2,2; v:v:v). Para a visualização da *p*-sinefrina foi utilizada ninhidrina:butanol:ácido acético (30:10:0,3; m/v/v), seguida de aquecimento a 100 °C por 10 min.

4.8. Infravermelho (IV)

Para a caracterização dos grupos funcionais das aminas e dos cloridratos empregados foi utilizado um espectrofotômetro de Infravermelho Nicolet, modelo 380, acoplado a um acessório de Refletância Total Atenuada (ATR) da Thermo Electron®, localizado no Laboratório do Setor Técnico-Científico da Superintendência da Polícia Federal do Rio Grande do Sul.

4.9. Ressonância magnética nuclear (RMN)

Devido a polaridade da *p*-sinefrina e a reversibilidade da reação de derivação com a CH, não foi possível acompanhar o desaparecimento da amina por CG, CCD e CLAE. Para contornar este problema, a reação de derivação com a CH, nas condições descritas em 4.5, foi monitorada por RMN de ^1H e de ^{13}C .

Os espectros de RMN da *p*-sinefrina e do produto bruto da reação com a CH foram obtidos, em um equipamento VNMRS-300 Varian®, localizado no Instituto de Química/UFRGS, após dissolução em dimetilsulfóxido deuterado ($\text{dms}\text{-d}^6$).

4.10. Validação do método

Para demonstrar que o método para quantificação de *p*-sinefrina por CG/DIC com confirmação por CG/EM é apropriado para a finalidade pretendida, a metodologia foi validada de acordo com as recomendações da Resolução 899 da ANVISA – guia de validação de métodos analíticos, sendo avaliados os seguintes parâmetros: linearidade, intervalo, precisão, exatidão, especificidade, robustez, limites de detecção e quantificação (BRASIL, 2003).

4.10.1. Linearidade

A linearidade é a capacidade do método analítico de demonstrar que os resultados obtidos são proporcionais à concentração do analito na amostra dentro de um intervalo especificado (BRASIL, 2003).

Para a avaliação da linearidade do método, foram utilizadas sete soluções padrões contendo diferentes concentrações de *p*-sinefrina preparadas em CH, em três dias diferentes.

As soluções foram preparadas através da dissolução de 12,5; 15,0; 20,0; 30,0; 40,0 e 50,0 mg de *p*-sinefrina em cerca de 5 mL de CH. A preparação do derivado oxazolidina foi realizada sob aquecimento a 100 °C por 60 min empregando-se o bloco de aquecimento da Pierce® descrito em 4.5.2. Após o resfriamento das soluções, transferiu-se quantitativamente para balões volumétricos de 10,0 mL e completou-se o volume com CH. Obtiveram-se, assim, soluções com concentrações do derivado oxazolidina que variavam entre 125 a 500 mg% contemplando a faixa de 80 a 120% da concentração teórica do teste.

Após análise por CG, as médias das áreas absolutas do pico do derivado oxazolidina de *p*-sinefrina, correspondente a cada um das soluções padrões, foram plotadas em gráfico de relação de áreas *versus* concentração. Para estabelecer a equação de regressão calculou-se a inclinação (a), a intercepção (b) e o coeficiente de correlação (r). A validade da equação de regressão foi determinada através da análise de variância (ANOVA), empregando-se o programa microsoft excel 2000. A

interpretação dos resultados foi avaliada através do teste F com um nível de significância de 5% de probabilidade ($p > 0,05$).

4.10.2. Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ)

O limite de detecção (LD) é a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado, porém não necessariamente quantificado, sob as condições experimentais estabelecidas. O limite de quantificação (LQ) é a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas (BRASIL, 2003).

Os LD e LQ para o método de quantificação estabelecido por CG/DIC foram obtidos através de cálculos matemáticos utilizando os dados do DPR do intercepto com o eixo do Y e os valores de inclinação das retas obtidas a partir das três curvas de calibração empregadas na verificação da linearidade.

Para fins de comparação com a resposta do CG/DIC, foi determinado por diluição progressiva da solução padrão, o limite de detecção do derivado oxazolidina de *p*-sinefrina por CG/EM.

4.10.3. Precisão

A precisão é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra. A repetibilidade (precisão intra-corrída) avalia a concordância entre os resultados dentro de um curto período de tempo com o mesmo analista e com o mesmo equipamento. A precisão intermediária (precisão inter-corrídas) avalia a concordância entre os resultados do mesmo laboratório mas obtidos em dias diferentes, com analistas diferentes e/ou equipamentos diferentes. O valor máximo aceitável deve ser definido de acordo com a metodologia empregada, a concentração do analito na amostra, o tipo de matriz e a finalidade do método, não se admitindo valores superiores a 5% (BRASIL, 2003).

Para a verificação da repetibilidade utilizou-se extrato seco de CA com especificação mínima de 6% de *p*-sinefrina e 9% de perda por dessecação, segundo

especificação do fabricante. Foram realizadas seis determinações a 100% da concentração do teste com três réplicas de cada no mesmo dia e com o mesmo analista. As determinações seguiram o protocolo de preparação de amostra (extração, *clean-up* e derivação) conforme descrito em 4.3, 4.4 e 4.5. Para verificação da precisão intermediária seguiu-se o mesmo procedimento da repetibilidade exceto que as determinações foram realizadas em dois dias consecutivos por analistas diferentes.

A precisão do método foi avaliada pelo desvio padrão relativo (DPR) ou coeficiente de variação (CV%), segundo a fórmula:

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

Onde, DP é o desvio padrão e CMD, a concentração média determinada.

Para calcular a concentração de *p*-sinefrina nas amostras foi utilizada à seguinte fórmula:

$$\text{Sinefrina \%} = \frac{\text{Concentração de } p\text{-sinefrina na amostra (mg\%)} \times 100}{\text{amostra (mg)} \times 1000}$$

4.10.4. Exatidão

A exatidão de um método analítico é a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro (BRASIL, 2003).

Para a verificação da exatidão, investigou-se a recuperação obtida através do método de adição de padrão a um de extrato seco de CA desprovido de *p*-sinefrina. Antes da fortificação com a solução padrão, analisou-se o teor de *p*-sinefrina por CG/DIC.

Para a fortificação foram utilizadas três soluções padrões contendo diferentes concentrações de *p*-sinefrina em água destilada. As soluções foram preparadas através da dissolução de 6,0; 11,8 e 15,4 mg de *p*-sinefrina em 25,0 mL do solvente. Aliquotas

destas soluções foram, então, adicionadas ao extrato de CA de modo a obter 168,5; 331,4 e 432,5 mg% de *p*-sinefrina contemplando o intervalo linear do procedimento. Após a fortificação, as amostras foram submetidas a SPE e a posterior derivação com CH. Foram realizadas nove determinações com três réplicas de cada.

Para o cálculo da recuperação foi utilizada a seguinte equação:

$$\text{Recuperação} = \frac{\text{Concentração obtida} \times 100}{\text{Concentração teórica}}$$

4.10.5. Especificidade e seletividade

É a capacidade que o método possui de medir exatamente um analito, na presença de outros componentes, tais como, impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz (BRASIL, 2003).

Para verificar a especificidade e a seletividade do método, investigou-se o comportamento cromatográfico na presença da cafeína, efedrina e octopamina. A presença de interferentes nos reagentes empregados foi avaliada através da análise de um branco de amostra. Os derivados de efedrina e octopamina foram preparados por reação com CH conforme descrito em 4.5. O padrão de cafeína (10 mg) foi preparado em metanol sendo analisado por CG/DIC antes e após o *clean-up* por SPE.

Para a identificação da *p*-sinefrina foram observados os tempos de retenção obtidos para o derivado correspondente após análise por GC empregando-se às condições descritas em 4.6. A presença da *p*-sinefrina foi confirmada por CG/EM, monitorando-se os principais íons oriundos da fragmentação do derivado oxazolidina com a sua abundância relativa.

4.10.6. Robustez

A robustez de um método analítico é a medida de sua capacidade em resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos (BRASIL, 2003)

Para avaliação da robustez do método, a análise do derivado oxazolidina de *p*-sinefrina foi realizada por diferentes operadores em três equipamentos de CG diferentes, utilizando-se colunas de diferentes fabricantes conforme descrito em 4.6. Foram testadas, também, diferentes marcas de CH e de cartuchos de SPE.

4.10.7. Aplicação do método

Devido a maior complexidade da matriz presente em compostos emagrecedores e suplementos alimentares, o método foi validado, inicialmente, para a quantificação de *p*-sinefrina em extratos de CA. Uma vez estabelecida as condições para a quantificação no extrato, o método foi adaptado para análise de *p*-sinefrina em composto emagrecedor contendo outros extratos vegetais, em proporções equivalentes àquelas empregadas em suplementos alimentares. Com o intuito de estabelecer comparações com o método estabelecido por CLAE/DAD, realizamos, também, a quantificação de *p*-sinefrina em frutos de CA coletados em Porto Alegre.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para uma determinada substância ser analisada por CG ela precisa ser volátil e termicamente estável. Uma vez que as propriedades físico-químicas da *p*-sinefrina não favorecem a sua análise direta por CG, foi necessário recorrer à preparação de derivados desta molécula.

A escolha do reagente de derivação é uma etapa importante no desenvolvimento do método analítico. A seleção do reagente mais adequado depende de vários fatores como: (1) da estrutura do analito e de suas propriedades físico-químicas; (2) da disponibilidade, do custo e da toxicidade dos reagentes empregados; (3) da estabilidade do derivado formado; (4) do rendimento da reação, entre outras (SEGURA *et al.*, 1998; BLACK e MUIR, 2003).

Para que uma reação de derivação seja bem sucedida alguns critérios devem ser atendidos. Um único derivado deve ser formado para cada composto. A reação deve ser simples, rápida e ocorrer sob condições brandas. O derivado deve ser formado com um alto e reprodutível índice de conversão e ser estável no meio de reação. Com relação às condições da reação, elas devem ser bem estabelecidas para evitar a formação de derivados múltiplos, em consequência da derivação incompleta, o que inviabiliza análises quantitativas (SEGURA *et al.*, 1998).

Considerando que a reação de derivação introduz uma etapa adicional na preparação da amostra, a melhor relação custo x benefício foi atribuída aos reagentes de acilação e aos compostos carbonílicos.

Após a seleção do reagente de derivação mais adequado e da otimização das condições de reação, a próxima etapa do desenvolvimento do método consistiu em estabelecer um protocolo de *clean-up* por SPE que possibilitasse a obtenção de um extrato mais adequado para análise cromatográfica.

Finalmente, para demonstrar que o método proposto é apropriado para quantificação de *p*-sinefrina em produtos derivados de CA por CG/DIC com confirmação por CG/EM, a metodologia foi validada de acordo com as recomendações da ANVISA (BRASIL, 2003).

5.1. Reações de derivação

5.1.1. Derivados obtidos por acilação

A molécula de *p*-sinefrina possui três grupos funcionais que podem ser alvo para a reação de acilação: uma hidroxila fenólica, uma hidroxila alcoólica e um grupo amínico secundário. O átomo de hidrogênio destes grupos pode ser substituído por grupos acila após reação com um reagente de acilação. Os álcoois e os fenóis são convertidos em ésteres e as aminas em amidas. Em geral, os reagentes de acilação mais empregados são: anidrido acético (AA), anidrido trifluoroacético (ATFA) e anidrido pentafluoropropiônico (PFPA) (NICHOLSON, 1978a).

Como o intuito de avaliar a reatividade dos grupos funcionais da *p*-sinefrina, utilizou-se como ponto de partida um reagente de acilação análogo ao proposto por MARCHEI e col. (2006), o anidrido trifluoroacético (ATFA).

Devido à diferença de basicidade de aminas, álcoois e fenóis, a acilação de analitos poli-funcionais pode levar a mistura de produtos. Buscando a obtenção de um único produto trifluoroacetilado (figura 5.3), investigamos algumas condições de reação (PR-1; PR-2 e PR-3), empregando catálise ácida e aquecimento, conforme descrito em 4.5.1. Os procedimentos de acilação utilizados em PR-1 (3 μ mol de *p*-sinefrina, 180 μ mol de ATFA, 80 °C, 20 min) e PR-2 (3 μ mol de *p*-sinefrina, 180 μ mol de ATFA, 80 °C, 20 min, pH ajustado com 100 μ L de HCl metanólico 10%) foram investigados para verificar a possibilidade da utilização da SPE com a derivação com o ATFA. Para fins comparativos, realizamos também o procedimento PR-3 (μ mol de *p*-sinefrina, 180 μ mol de ATFA, 80 °C, 20 min, pH ajustado com tampão fosfato 0,1 M) empregando-se condições semelhantes às aquelas utilizados por MARCHEI e col. (2006).

Embora a catálise básica utilizando piridina, seja recomendada por alguns autores, optamos por não utilizá-la devido à dificuldade em obter e manter este reagente em condição anidra.

Com relação ao procedimento técnico empregado, foi necessário tomar algumas precauções para conseguir êxito com as reações de acilação, tais como: (1) a

substituição dos frascos de reação com tampas de teflon; (2) após a reação de derivação, eliminou-se o excesso do ATFA e derivado foi reconstituído em acetato de etila, imediatamente, antes da injeção no CG.

As reações de trifluoracilações da *p*-sinefrina empregando-se as condições utilizadas com PR-1 e PR-2 produziram uma mistura de derivados, conforme pode ser observado nas figuras 5.1 e 5.2.

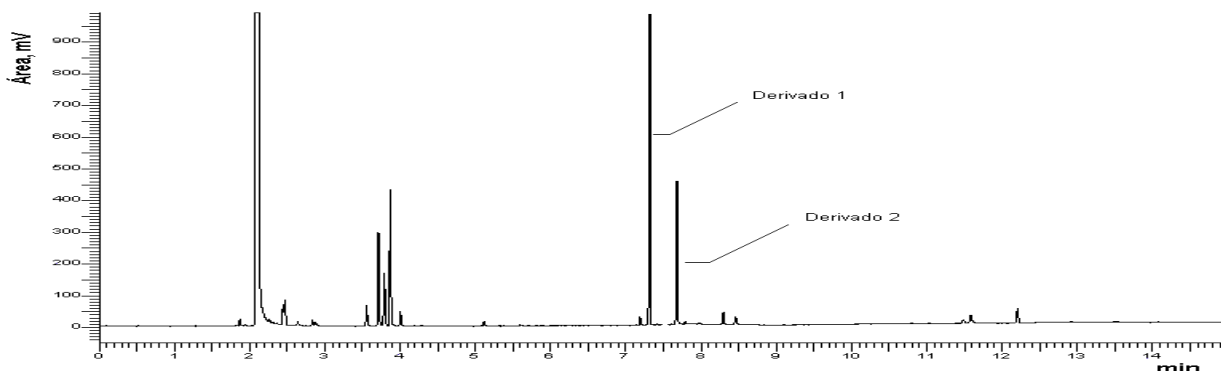


Figura 5.1.: Cromatograma dos derivados obtidos após acilação da *p*-sinefrina com o procedimento PR-1 (3 μ mol de *p*-sinefrina, 180 μ mol de anidrido trifluoroacético, 80 °C, 20 min), após análise por CG/DIC Perkin-Elmer®.

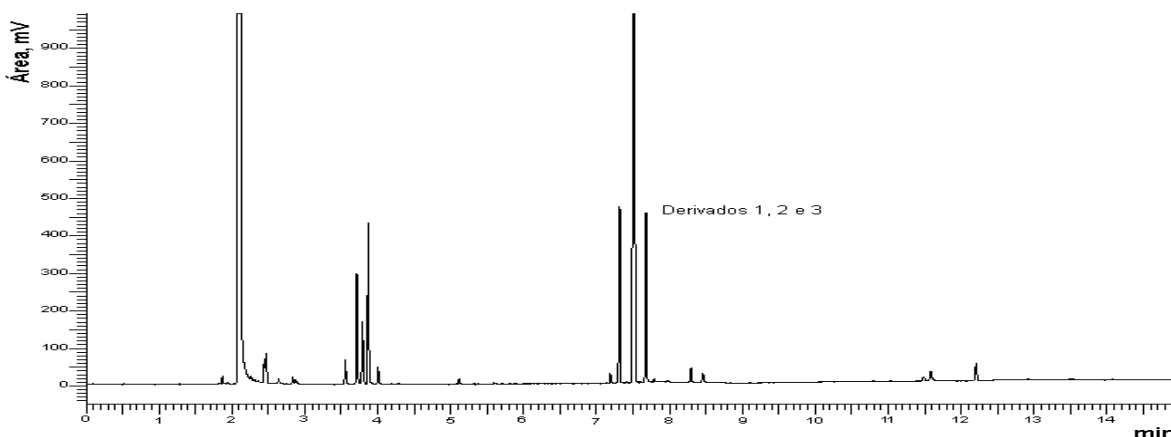


Figura 5.2.:Cromatograma dos derivados obtidos após acilação da *p*-sinefrina com o procedimento PR-2 (3 μ mol de *p*-sinefrina, 180 μ mol de anidrido tricluoroacético, 80 °C, 20 min, pH ajustado com HCl metanólico 10%), após análise por CG/DIC Perkin-Elmer®.

Acilações múltiplas (*N*-acetilefedrina, *O*-acetilefedrina e *N,O*-diacetilefedrina) também foram observadas por SEBBEN (2007) ao empregar anidrido acético para preparar derivados de efedrina para análise por CG.

Derivados múltiplos não são adequados para quantificação. Contudo, quando a concentração do analito de interesse é elevada, estes derivados podem ser úteis para análise qualitativa confirmatória (SEGURA *et al.*, 1998).

Dentre os procedimentos que foram investigados, apenas com PR-3 (3 μmol de *p*-sinefrina, 180 μmol de ATFA, 80 °C, 20 min, pH ajustado com tampão fosfato 0,1 M) obteve-se o produto trifluoroacetilado esperado proveniente da *N*-acilação e da *O*-acilação. O derivado obtido empregando-se estas condições segue apresentado na figura 5.3.

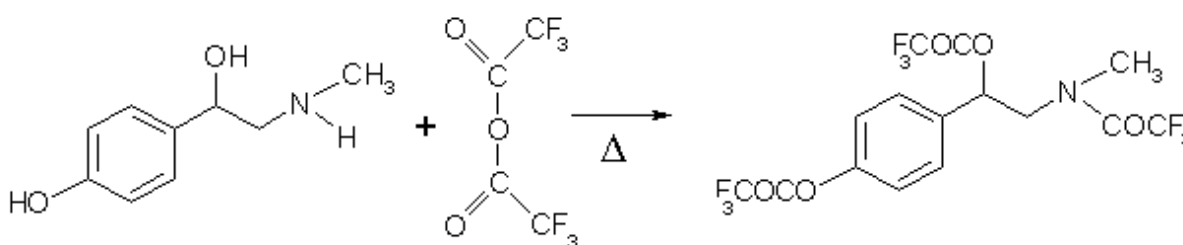


Figura 5.3: Reação de acilação da *p*-sinefrina com anidrido trifluoroacético (ATFA) (modificado de SEBEN, 2007).

O resultado da análise deste derivado por CG/DIC Perkin-Elmer® é apresentado na figura 5.4. O tempo de retenção (TR) foi observado em 7,31 minutos.

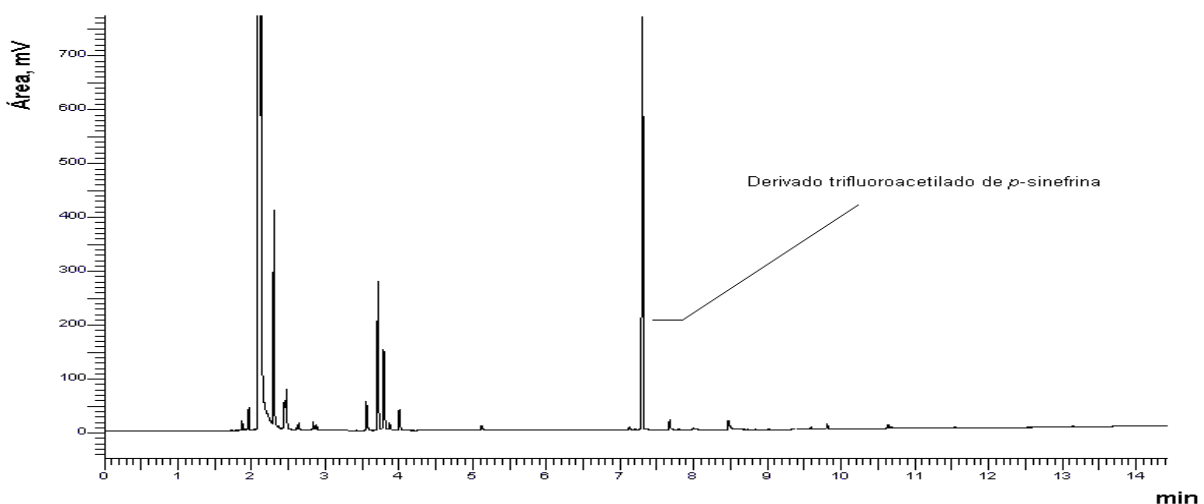


Figura 5.4.: Cromatograma do derivado obtido por acilação da *p*-sinefrina com o procedimento PR-3 (3 μmol de *p*-sinefrina, 180 μmol de anidrido trifluoroacético, 80 °C, 20 min, pH ajustado com tampão fosfato 0,1 M), após análise por CG/DIC Perkin-Elmer®

A confirmação da trifluoroacilação da *p*-sinefrina foi obtida por análise por CG/EM. A figura 5.5 apresenta o cromatograma e o respectivo espectro de massas obtido no CG/EM Shimadzu®. O TR do derivado, na coluna DB-5, foi observado em 7,51 minutos.

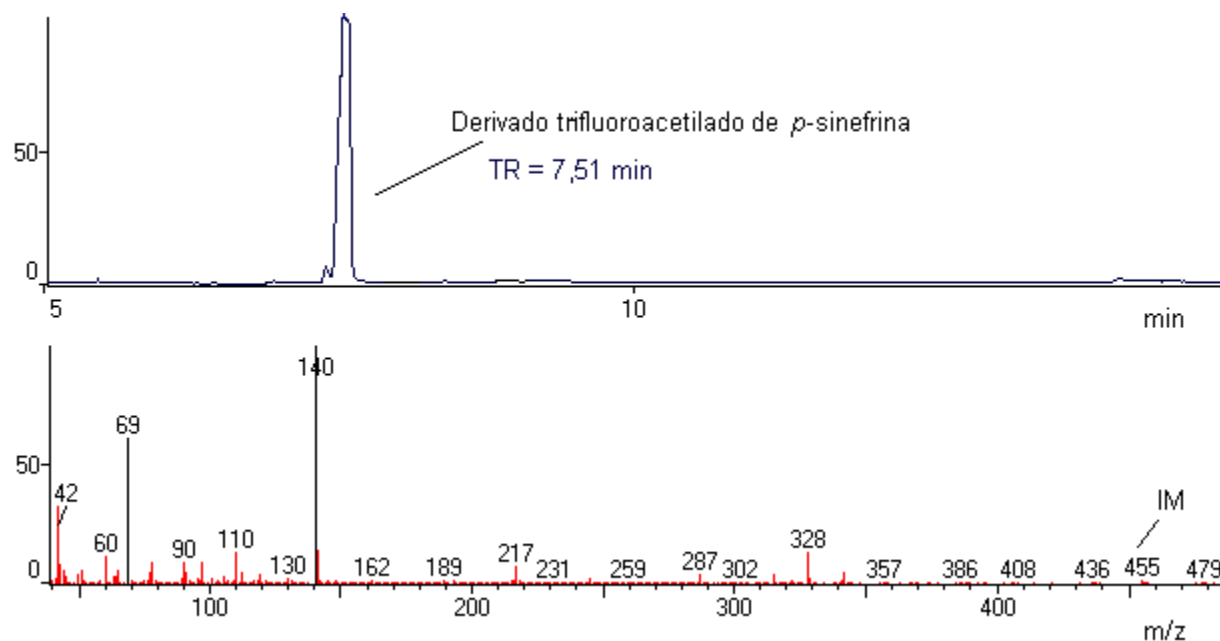
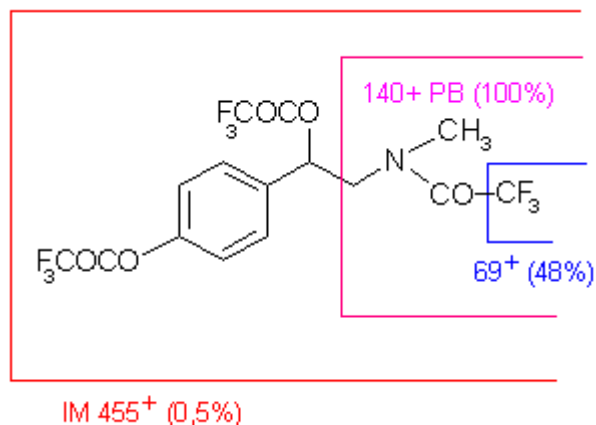


Figura 5.5.: Cromatograma/espectro de massas do derivado obtido após acilação da *p*-sinefrina com o procedimento PR-3 (3 μmol de *p*-sinefrina, 180 μmol de anidrido trifluoroacético, 80 °C, 20 min, pH ajustado com tampão fosfato 0,1 M), após análise por CG/EM Shimadzu®.

A proposta de fragmentação para o derivado trifluoroacetilado de *p*-sinefrina é apresentada no esquema da figura 5.6.



Massa Molecular	455
Fórmula Molecular	C ₁₅ H ₁₀ NO ₅ F ₉

Figura 5.6: Proposta para a fragmentação do derivado trifluoroacetilado de *p*-sinefrina.

A tabela 5.1. apresenta os principais íons observados no espectro de massas do derivado trifluoroacetilado de *p*-sinefrina com as respectivas abundâncias relativas.

Tabela 5.1: Principais íons do espectro de massas do derivado trifluoroacetilado de *p*-sinefrina com as respectivas abundâncias.

m/z (u.m.a.)	Abundância Relativa (%)	IM-(X)
455	0,5	IM
436	0,2	IM-19
140	100	IM-315
110	7	IM-345
69	48	IM-386

m/z = relação massa/carga; u.m.a. = unidade de massa atômica; IM = íon molecular; X = massa do fragmento-chave

A presença do íon molecular (IM), em m/z 455, também foi observada quando este derivado foi analisado pelo equipamento CG/EM Varian® (Figura 5.7).

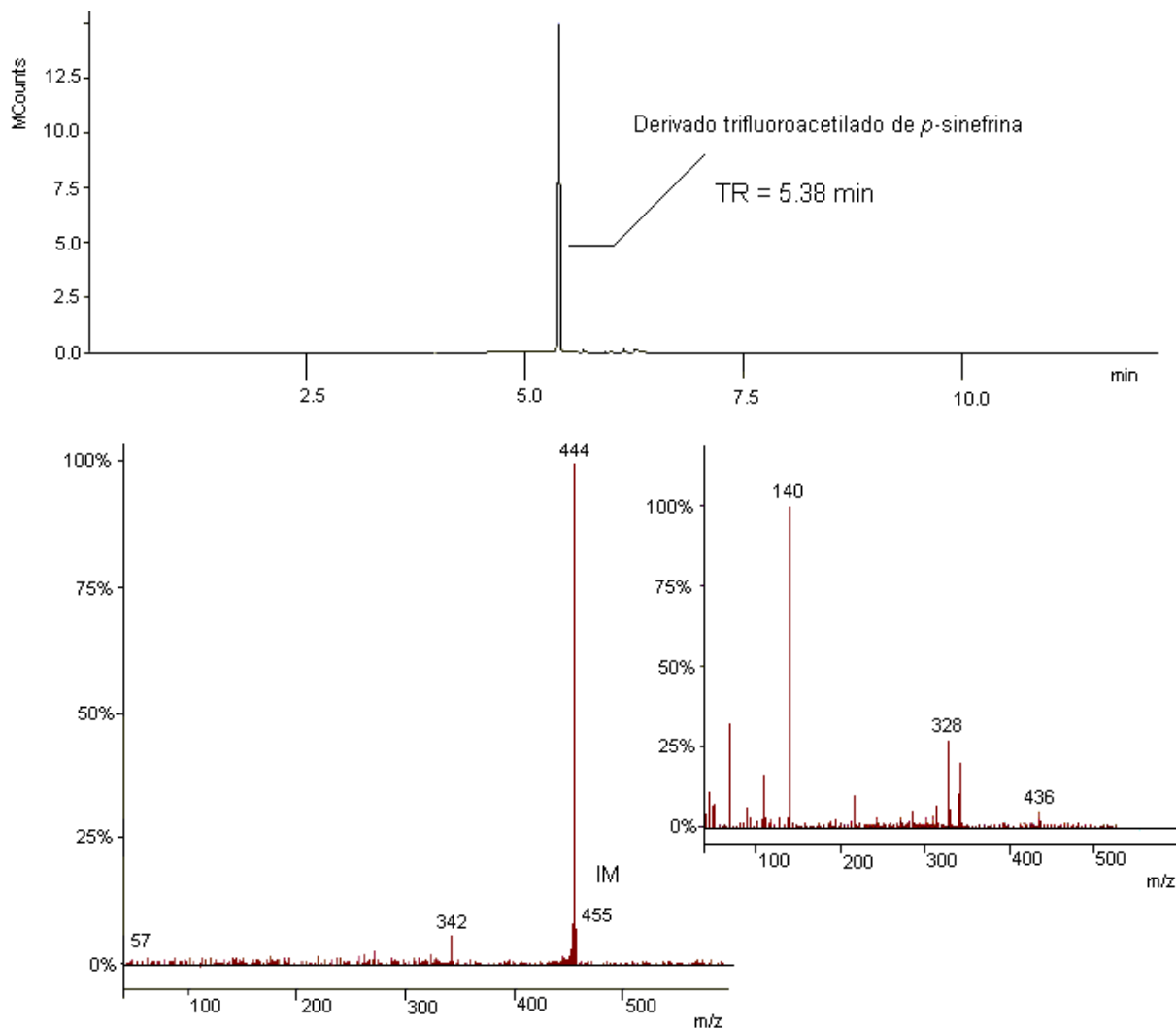


Figura 5.7.: Cromatograma/espectro de massas do derivado trifluoroacetilado de *p*-sinefrina obtido com o procedimento PR-3 (3 μ mol de *p*-sinefrina, 180 μ mol de anidrido trifluoroacético, 80 °C, 20 min, pH ajustado com tampão fosfato 0,1 M), após análise em CG/EM Varian®.

Para fins de comparação de reatividade com a *p*-sinefrina, realizou-se a derivação de uma amina primária com o ATFA (PR-4; 3 μ mol de octopamina.HCl, 180 μ mol de ATFA, 80 °C, 20 min). As condições de tempo e temperatura empregadas em PR-4 foram idênticas àsquelas utilizadas em PR-1 (3 μ mol de *p*-sinefrina, 180 μ mol de ATFA, 80 °C, 20 min). A octopamina (amina primária) é uma base mais fraca do que a *p*-sinefrina (amina secundária) e após reação com o ATFA, produziu um derivado único. O produto obtido por este procedimento foi submetido à análise por CG/EM Shimadzu®

e o resultado é apresentado na figura 5.8. O tempo de retenção deste derivado foi observado em 7,34 minutos.

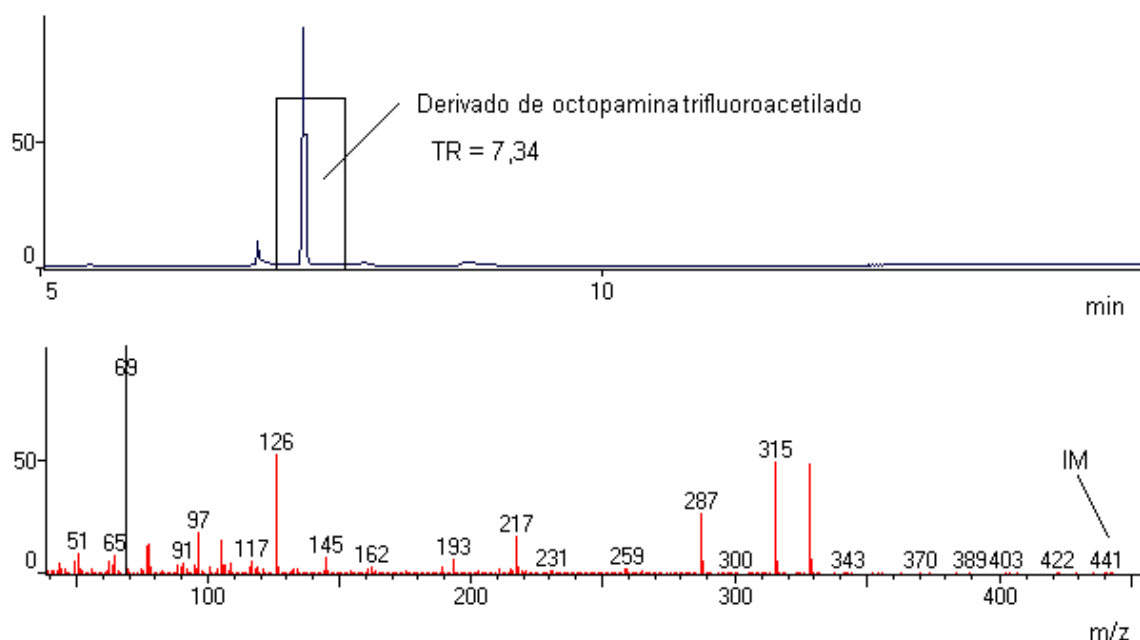
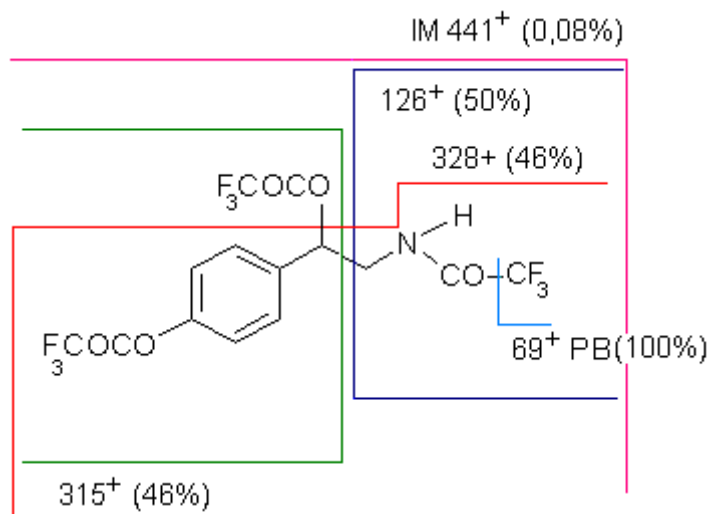


Figura 5.8: Cromatograma/espectro de massas do derivado trifluoroacetilado de octopamina obtido com o procedimento PR-4 (3 μmol de octopamina.HCl, 180 μmol de anidrido trifluoroacético, 80 $^{\circ}\text{C}$, 20 min), após análise no CG/EM Shimadzu®.

A proposta de fragmentação para o derivado trifluoroacetilado de octopamina é apresentada na figura 5.9.



Massa Molecular	441
Fórmula Molecular	C ₁₄ H ₈ NO ₅ F ₉

Figura 5.9.: Proposta para a fragmentação do derivado trifluoroacetilado de octopamina.

Os principais íons observados no espectro de massas do derivado trifluoroacetilado de octopamina são apresentados na tabela 5.2.

Tabela 5.2: Principais íons do espectro de massas do derivado trifluoroacetilado de octopamina com as respectivas abundâncias.

m/z (u.m.a.)	Abundância Relativa (%)	IM-(X)
441	0,08	IM
422	0,07	IM-19
328	46	IM-113
315	46	IM-126
287	24	IM-154
126	50	IM-315

m/z = relação massa/carga; u.m.a. = unidade de massa atômica; IM = íon molecular; X = massa do fragmento-chave

5.1.2. Derivados obtidos por condensação com compostos carbonílicos

Quimicamente a *p*-sinefrina é considerada um amino-álcool. A reatividade e separação espacial da -OH alcoólica e do grupo -NH permitem a preparação de derivado cíclico por meio de reações de condensação com aldeídos e cetonas.

Quando comparada com as reações de acilação, as reações de condensação com compostos carbonílicos, como a CH, possuem várias vantagens (EL-HAJ *et al.*, 2003). A CH é uma cetona de baixo custo, de fácil disponibilidade e seletividade para aminas primárias e secundárias enquanto que os reagentes de acilação são menos específicos porque reagem tanto com grupos NH quanto com grupos -OH e -COOH.

A CH atua simultaneamente como reagente de derivação e como solvente para o derivado formado. Não há necessidade de remoção do excesso do reagente podendo o mesmo ser injetado diretamente no CG.

Um outro aspecto importante refere-se ao padrão de fragmentação dos derivados obtidos por reação com a CH. A acilação introduz na molécula um grupo alifático enquanto que a condensação com CH leva a um derivado cíclico. O anel confere rigidez à molécula aumentando a probabilidade de detecção do íon molecular. Os derivados obtidos com a CH são também mais estáveis frente à umidade do que àqueles referidos anteriormente (EL-HAJ *et al.*, 2003).

Levando em consideração esta vantagens, a maioria dos derivados preparados neste trabalho foi obtida por reação com a CH.

O mecanismo envolvido nas reações de condensação com aldeídos e cetonas consiste na adição nucleofílica do átomo de nitrogênio da amina ao átomo de carbono da carbonila. Estas reações são reversíveis e para que ocorra a formação do produto de adição é necessário eliminar uma molécula de água do sistema. Para deslocar o equilíbrio no sentido de formação dos produtos, utilizou-se o aquecimento a 100 °C por 60 minutos e um excesso do reagente de derivação.

Amino-álcoois secundários, como a *p*-sinefrina e efedrina, reagem com os compostos carbonílicos produzindo oxazolidinas (NEELAKANTAN, 1971). A figura 5.10 apresenta a reação da CH com estas aminas.

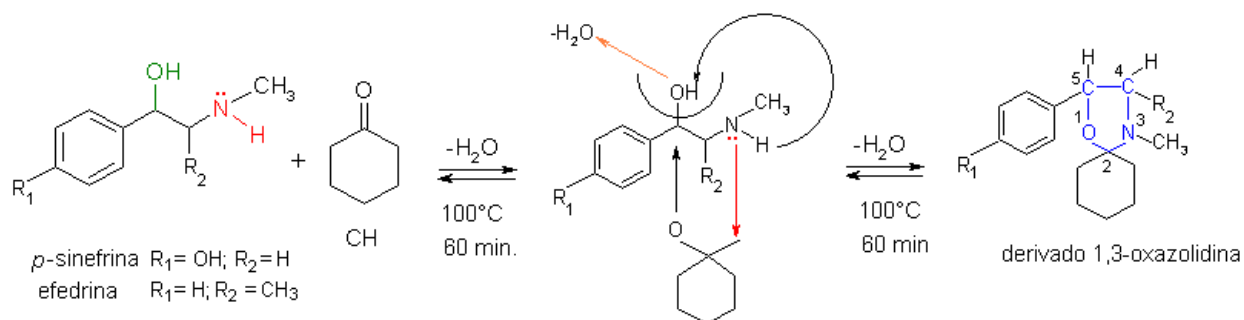


Figura 5.10: Reação de amino-alcóois secundários com cicloexanona (CH) (modificado de SEBBEN, 2007).

Quando amino-álcoois primários, como a octopamina, reagem com compostos carbonílicos, as oxazolidinas obtidas podem assumir a forma tautomérica com a imina ou base de Schiff correspondente, conforme é apresentado na figura 5.11 (NEELAKANTAN, 1971).

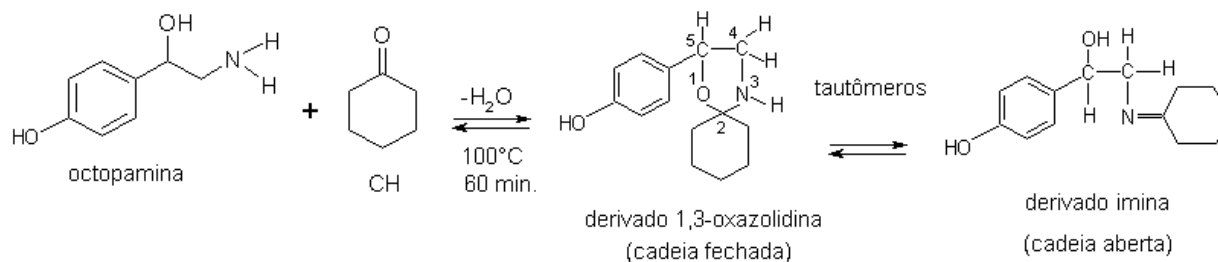


Figura 5.11: Reação da octopamina com ciclohexanona (CH) (modificado de EL-HAJ e col., 2003).

5.1.2.1. Oxazolidinas de *p*-sinefrina

As condições para a derivação da base livre de *p*-sinefrina seguiram o preconizado em PR-5 (90 μmol de *p*-sinefrina, 900 μmol de CH, 100 °C, 60 min), PR-9 (311 μmol de *p*-sinefrina, 12400 μmol de ANISAL, 100 °C, 120 min) e PR-10 (210 μmol de *p*-sinefrina, 495 μmol de BENZAL, 100 °C, 60 min).

A oxazolidina derivada de *p*-sinefrina com CH foi submetida à análise por CG/DIC, CG/EM e por RMN de ^1H e ^{13}C .

Quando analisado por CG/DIC Perkin-Elmer®, em coluna capilar DB-1, o derivado apresentou um TR de 10,30 minutos, conforme mostra a figura 5.12.

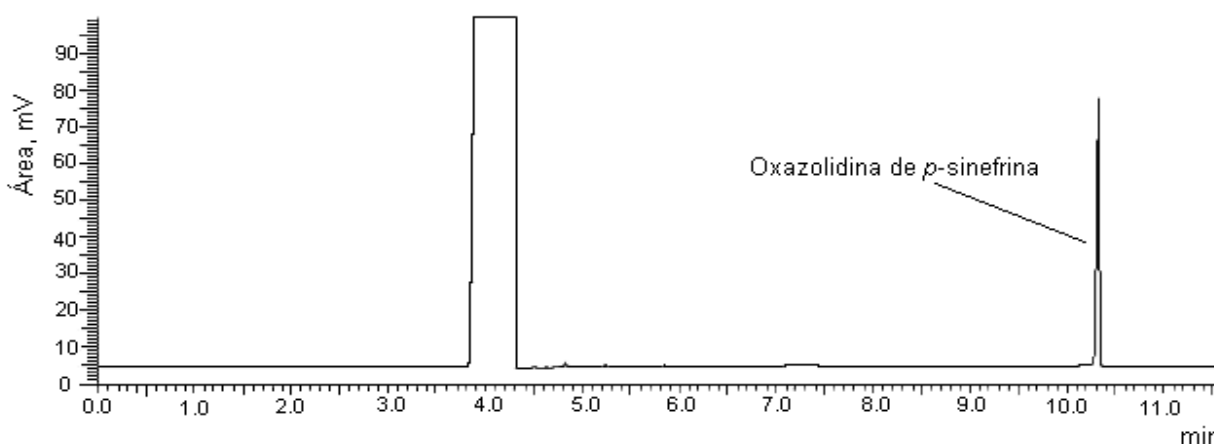


Figura 5.12: Cromatograma da oxazolidina de *p*-sinefrina obtida com o procedimento PR-5 (90 μmol de *p*-sinefrina, 900 μmol de CH, 100 °C, 60 minutos), após análise por CG/DIC Perkin-Elmer®.

O pico correspondente a oxazolidina eluiu próximo a 280 °C, conforme pode ser visualizado no gráfico de programação de temperatura apresentado na figura 5.13.

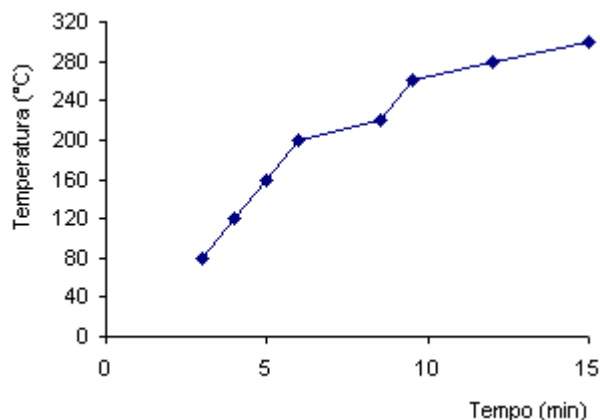


Figura 5.13: Representação gráfica da programação de temperatura da coluna capilar DB-1 empregada no equipamento CG/DIC Perkin-Elmer®.

No equipamento CG/EM Shimadzu®, a separação foi realizada em uma coluna DB-5, empregando-se a mesma programação de temperatura utilizada na coluna DB-1 do CG/DIC. O pico do derivado apresentou um TR de 10,95 min. Não houve alteração do perfil cromatográfico, conforme observado na figura 5.14.

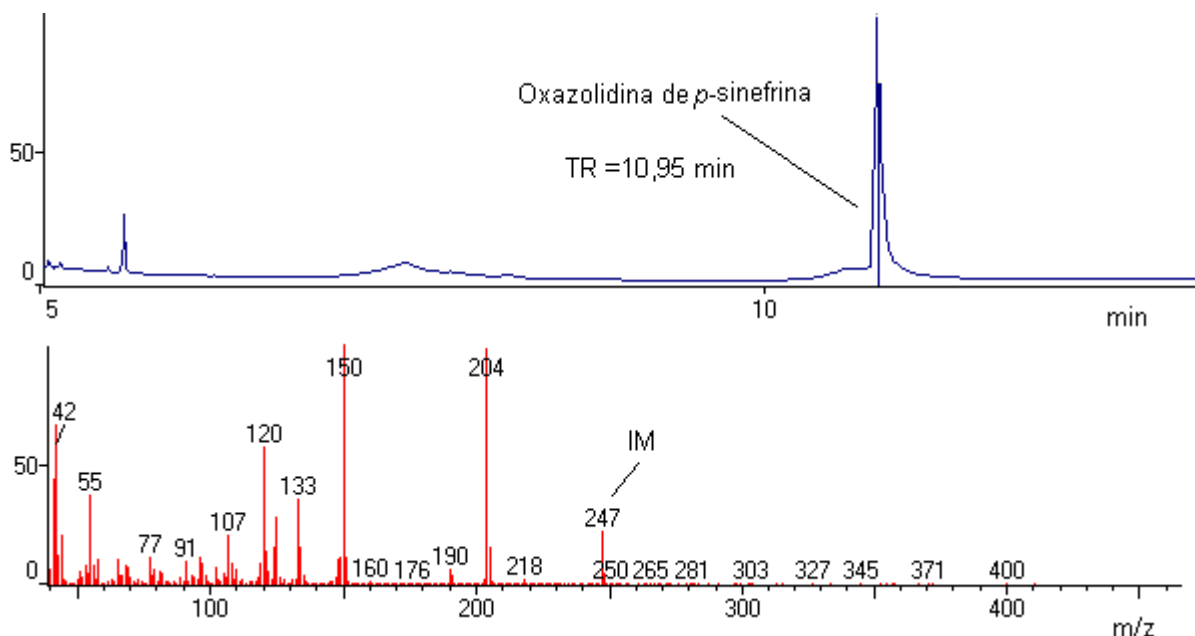


Figura 5.14: Cromatograma/espectro de massas da oxazolidina de *p*-sinefrina obtida com o procedimento PR-5 (90 μmóis de *p*-sinefrina, 900 μmóis de CH, 100 °C, 60 minutos), após análise por CG/EM Shimadzu®.

O cromatograma obtido na análise desta oxazolidina, no CG/EM Varian® é apresentado na figura 5.15.

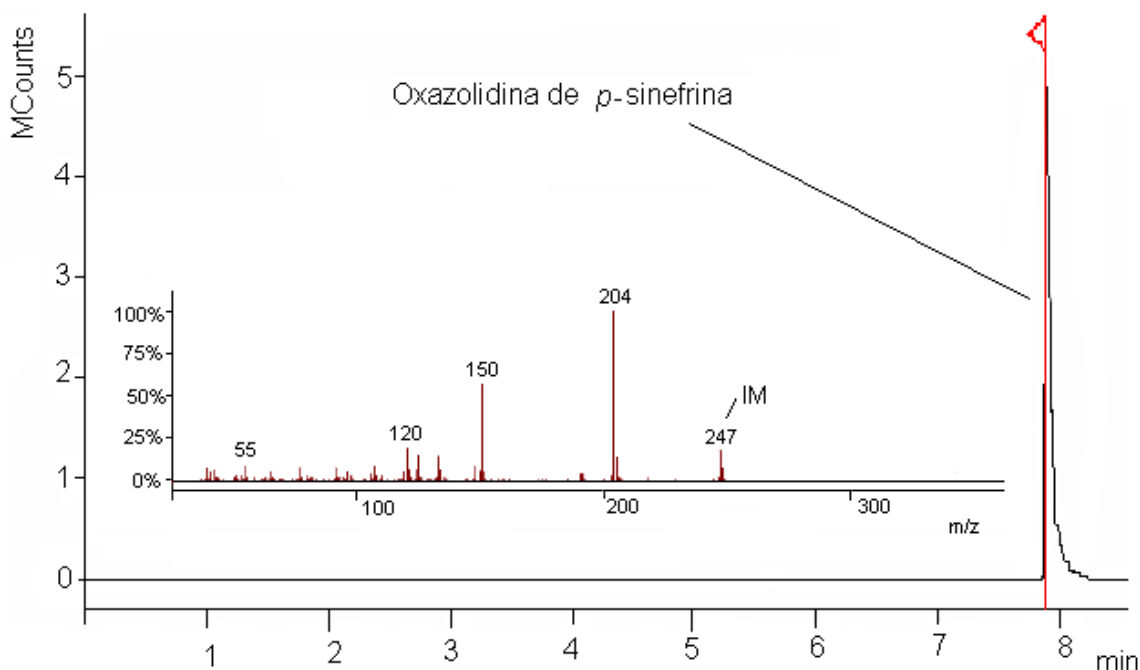


Figura 5.15: Cromatograma/espectro de massas da oxazolidina de *p*-sinefrina obtida empregando-se o procedimento PR-5 (90 μ móis de *p*-sinefrina, 900 μ móis de CH, 100 °C, 60 minutos), após análise por CG/EM Varian®.

A eluição da oxazolidina, na coluna CPSIL-8CB, ocorreu com um TR menor, em 7,90 minutos, em função das alterações da programação da temperatura utilizada nesta coluna. Todavia, não houve alteração na temperatura de eluição do derivado que ocorreu na mesma faixa observada nas outras colunas utilizadas. A figura 5.16 apresenta a representação gráfica da programação de temperatura empregada nesta coluna capilar.

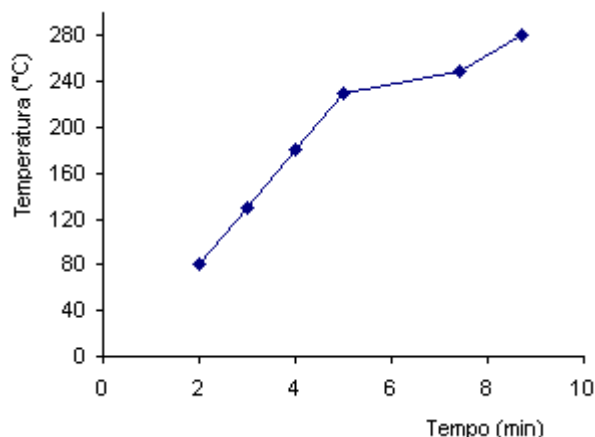
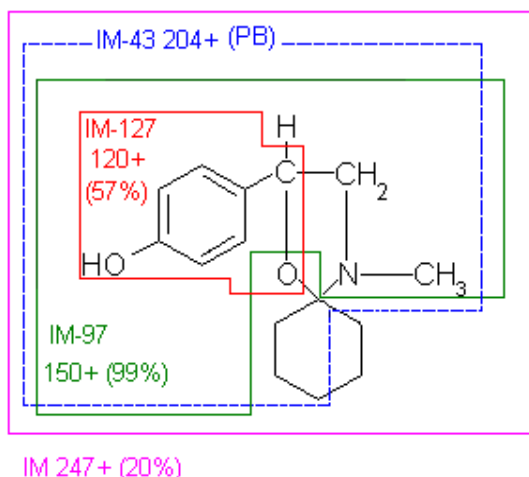


Figura 5.16: Representação gráfica da programação de temperatura da coluna CPSIL-8CB empregada no equipamento CG/EM Varian®.

Com relação à interpretação do espectro de massas da figura 5.14, o íon em 247 m/z (IM) corresponde à massa molecular da oxazolidina proposta. O IM perde dois fragmentos neutros (M-29 e M-43) resultando nos íons 218 m/z e 204 m/z, respectivamente. O IM é ímpar indicando a presença de um número ímpar de átomo de nitrogênio na molécula. A estrutura cíclica do derivado estabiliza o IM o que explica a intensidade relativa observada para este íon (20%).

O esquema da figura 5.17 apresenta uma proposta para a fragmentação do derivado oxazolidina de *p*-sinefrina.



Massa Molecular	247
Fórmula Molecular	C ₁₅ H ₂₁ NO ₂

Figura 5.17: Proposta de fragmentação para a oxazolidina de *p*-sinefrina.

A fragmentação da molécula inicia por α -clivagem. Os principais fragmentos de massas observados são os íons 204 m/z (100% - pico base), 150 m/z (99%), 120 m/z (60%) e 247 m/z (20% - IM).

A tabela 5.3 apresenta os dados do espectro de massas para a oxazolidina de *p*-sinefrina.

Tabela 5.3: Proposta de fragmentação para a oxazolidina de *p*-sinefrina

m/z (u.m.a.)	Abundância Relativa (%)	IM-X	Fragmentos-chaves	Proposta
247	20	-	IM	C ₁₅ H ₂₁ N ⁺ O ₂
204	100	IM-43	CH ₃ CH ₂ CH ₂ ·	C ₁₂ H ₁₄ N ⁺ O ₂
150	99	IM-97	C ₆ H ₁₀ O·	C ₉ H ₁₁ N ⁺ O
120	57	IM-127	C ₈ H ₁₇ N·	OH-C ₆ H ₅ -CO ⁺

m/z = relação massa/carga; u.m.a. = unidade de massa atômica; IM = íon molecular; X = massa do fragmento-chave

Uma vez que a análise direta de *p*-sinefrina por CG não é possível, o acompanhamento da reação de derivação exclusivamente por cromatografia a gás não fornece evidências conclusivas sobre a conversão total de *p*-sinefrina em oxazolidina. Para investigar a presença de *p*-sinefrina na mistura, o produto bruto da reação obtido empregando-se o procedimento PR-5 foi avaliado por RMN. Os resultados da RMN de ¹H e de ¹³C corroboraram a estrutura proposta por CG/EM e demonstraram que a conversão em oxazolidina foi quantitativa sem indícios de *p*-sinefrina. A partir de 90 μmóis de *p*-sinefrina obteve-se 22,0 mg do derivado (89 μmóis) correspondendo a 98,9%.

Para facilitar a interpretação dos sinais observados nos espectros de RMN do derivado, analisou-se, paralelamente, a *p*-sinefrina empregada em PR-5. Os espectros de RMN de ¹H e de ¹³C obtidos são importantes visto que não foram encontrados na literatura espectros de referência para a comparação. Buscando caracterizar melhor os átomos de hidrogênios da *p*-sinefrina não visualizados no RMN ¹H (NH e OH), realizou-se, também, a análise por infravermelho (IV). A tabela 5.4 apresenta a interpretação das principais bandas de absorção na região de interesse da *p*-sinefrina. O espectro de IV correspondente é apresentado no anexo B.

Os espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C da *p*-sinefrina e do derivado oxazolidina são apresentados no anexo A.

A tabela 5.5 apresenta a interpretação dos sinais observados no espectro de RMN de ^1H da *p*-sinefrina. Os átomos de hidrogênio da *p*-sinefrina foram numerados de acordo com a figura 5.18.

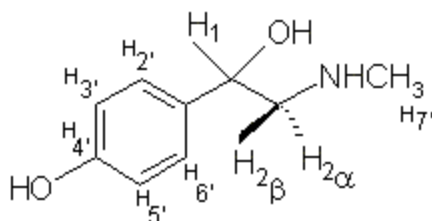


Figura 5.18: Numeração dos átomos de hidrogênio da (\pm)-*p*-sinefrina.

Tabela 5.4.: Interpretação das principais bandas do espectro de infravermelho (IV) da (\pm)-*p*-sinefrina.

Número de Onda (cm^{-1})	Atribuições/Comentários ^a
3280	Deformação axial da ligação NH de amina secundária sobreposta com a absorção de deformação axial da ligação OH/ Grupos NH secundários apresentam uma única absorção na região entre 3350 e 3310 cm^{-1} . Geralmente a banda de absorção da ligação OH é observada na região de 3300 cm^{-1} .
1260 (F)	Deformação axial da ligação CO de fenol/ Absorção da ligação CO de fenol ocorre na região entre 1260 e 1180 cm^{-1} .
1100 (F)	Deformação axial da ligação CO de álcool/ Absorção da ligação CO de álcool secundário ocorre próximo a 1100 cm^{-1} .

^aPOUCHERT, 1981; SILVERTEIN e WEBSTER, 2000; SOCRATES, 1994. (F) absorção forte

Tabela 5.5: Interpretação do espectro de ressonância magnética nuclear (RMN) ^1H da (\pm)-*p*-sinefrina, 300 MHz, em dimetilsulfóxido deuterado ($\text{dms}\text{-d}_6$)

δ^{obs} (ppm)	δ^{esp} (ppm) ^a	Integral	Atribuição	Multiplicidade	J (Hz)	Comentários ^a
2,27	2,47	3H	H-7'	s	-	Hidrogênios da metila ligada ao átomo de nitrogênio
2,41-2,59	2,74	2H	H-2	m	-	Hidrogênios do metileno ligado ao átomo de nitrogênio
4,49	3,94	1H	H-1	dd	$^2\text{J} = 8,1$ $^3\text{J} = 4,5$	Hidrogênio do metino ligado à hidroxila do álcool mais desprotegido devido à presença do anel aromático adjacente
6,70	6,64	2H	H-3'/H-5'	d	8,4	Hidrogênios aromáticos em posição orto em relação à hidroxila do fenol
7,10	7,00	2H	H-2'/H-6'	d	8,4	Hidrogênios aromáticos em posição meta em relação à hidroxila do fenol

δ^{obs} = deslocamento químico observado; δ^{esp} = deslocamento químico esperado; J = constante de acoplamento;

s = simpleto; m = multipletto; d = dubleto; dd = duplo dubleto

^aPRETSCH *et al.*, 1983.;

A interpretação dos sinais observados no espectro de RMN de ^{13}C da *p*-sinefrina é apresentada na tabela 5.6. Os átomos de carbono da *p*-sinefrina foram numerados de acordo com a figura 5.19.

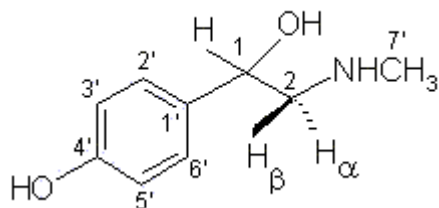


Figura 5.19: Numeração dos átomos de carbono da (\pm)-*p*-sinefrina.

Tabela 5.6: Interpretação do espectro de ressonância magnética nuclear (RMN) de ^{13}C da (\pm)-*p*-sinefrina, 75,4 MHz, em dimetilsulfóxido deuterado (dms o -d 6).

δ^{obs} (ppm)	δ^{esp} (ppm) ^a	Atribuição	Comentários ^a
35,9	38,2	C-7'	Carbono da metila ligado ao átomo de nitrogênio
59,9	45,0	C-2	Carbono do metileno ligado ao átomo de nitrogênio mais desprotegido devido à presença da hidroxila do álcool em C-1
70,8	68,7	C-1	Carbono do metino ligado a hidroxila do álcool
114,7	115,4	C-3'/C-5'	Carbono aromático em posição orto em relação à hidroxila do fenol
127,0	127,7	C-2'/C-6'	Carbono aromático em posição meta em relação à hidroxila do fenol
134,8	130,5	C-1'	C $_0$ aromático
156,2	152,6	C-4'	Carbono aromático ligado à hidroxila do fenol

δ^{obs} = deslocamento químico observado; δ^{esp} = deslocamento químico esperado

^aPRETSCH *et al.*, 1983.

A tabela 5.7 apresenta a interpretação do espectro de RMN de ^1H da oxazolidina de *p*-sinefrina. Os átomos de hidrogênio do derivado foram numerados de acordo com a figura 5.20.

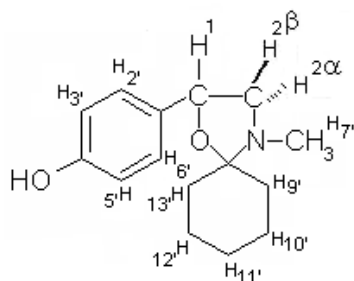


Figura 5.20: Numeração dos átomos de hidrogênio da oxazolidina de *p*-(±)-sinefrina.

Tabela 5.7: Interpretação do espectro de ressonância magnética nuclear (RMN) ^1H da oxazolidina de (±)-*p*-sinefrina, 300 MHz, em dimetilsulfóxido deuterado ($\text{dms}\text{-d}^6$).

δ^{obs} (ppm)	δ^{esp} (ppm) ^a	Integral	Atribuição	Multiplicidade	J (Hz)	Comentários
1,35-1,70	1,44	10H	H-9' até H-13'	m	-	Hidrogênios dos grupos metilenos do anel alicíclico
2,25	2,47	3H	H-7'	s	-	Hidrogênios da metila ligada ao átomo de nitrogênio
2,69	2,50	1H	H-2	dd	$^2\text{J} = 9,3$ $^3\text{J} = 7,8$	Hidrogênio do metileno ligado ao átomo de nitrogênio
3,20	2,50	1H	H-2	dd	$^2\text{J} = 9,5$ $^3\text{J} = 6,3$	Hidrogênio do metileno ligado ao átomo de nitrogênio
4,83	3,94	1H	H-1	dd	$^2\text{J} = 7,2$ $^3\text{J} = 6,6$	Hidrogênio do metino ligado ao átomo de oxigênio do anel oxazolidina mais desprotegido devido ao anel aromático
6,65	6,64	2H	H-3'/H-5'	d	8,4	Hidrogênios aromáticos em posição orto em relação à hidroxila do fenol
7,10	7,00	2H	H-2'/H-6'	d	8,4	Hidrogênios aromáticos em posição meta em relação à hidroxila do fenol
9,31	9,30	1H	-OH fenólica	s	-	Hidrogênio da hidroxila fenólica

δ^{obs} = deslocamento químico observado; δ^{esp} = deslocamento químico esperado; J = constante de acoplamento; s = simpleto; m = multipeto; d = dubleto; dd = duplo dubleto;^a PRETSCH *et al.*, 1983.

A tabela 5.8 apresenta a interpretação do espectro de RMN de ^{13}C do derivado oxazolidina de *p*-sinefrina. Os átomos de carbono deste derivado foram numerados de acordo com a figura 5.21.

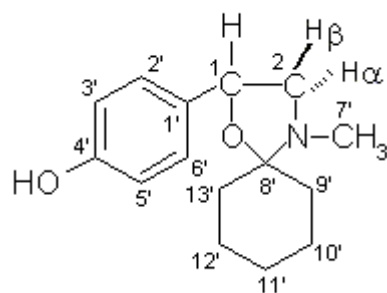


Figura 5.21: Numeração dos átomos de carbono da oxazolidina de *p*-(\pm)-sinefrina.

Tabela 5.8: Interpretação do espectro de ressonância magnética nuclear (RMN) de ^{13}C da oxazolidina de (\pm)-*p*-sinefrina, 75,4 MHz, em dimetilsulfóxido deuterado (dms o -d 6)

δ^{obs} (ppm)	δ^{esp} (ppm) ^a	Atribuição	Comentários
22,9	27,1	C-10'/C-11' ou C-12'	Carbono do metileno do anel alicíclico
23,3	27,1	C-10'/C-11' ou C-12'	Carbono do metileno do anel alicíclico
25,2	27,1	C-10'/C-11' ou C-12'	Carbono do metileno do anel alicíclico
32,5	27,1	C9' ou C13'	Carbono do metileno do anel alicíclico mais desprotegidos devido à proximidade com os átomos de nitrogênio e oxigênio
32,8	27,1	C9' ou C13'	Carbono do metileno do anel alicíclico mais desprotegido devido à proximidade com os átomos de nitrogênio e oxigênio
35,2	38,2	C-7'	Carbono da metila ligado ao átomo de nitrogênio
60,5	64,0	C-2	Carbono do metileno ligado ao átomo de nitrogênio mais desprotegido devido à hidroxila do álcool em C-1
75,5	68,7	C-1	Carbono do metino ligado ao átomo de oxigênio do anel oxazolidina
95,4	96,0	C-8'	Carbono quaternário ligado aos átomos de oxigênio e ao nitrogênio
114,7	115,4	C-3'/C-5'	Carbonos aromáticos em posição orto em relação à hidroxila do fenol
127,2	127,7	C-2'/C-6'	Carbonos aromáticos em posição meta em relação à hidroxila do fenol
132,5	130,5	C-1'	C ₀ aromático
156,6	152,6	C-4'	Carbono aromático ligado à hidroxila do fenol

δ^{obs} = deslocamento químico observado; δ^{esp} = deslocamento químico esperado

^aPRETSCH *et al.*, 1983; AGAMI *et al.*, 1986.

A comparação dos espectros de RMN de ^1H da *p*-sinefrina e do produto bruto da reação, obtido por PR-5, apresentou as seguintes evidências da conversão quantitativa da amina ao derivado oxazolidina:

- O espectro de ^1H da oxazolidina apresenta um multiplete (m), na região entre 1,35-1,70 ppm, proveniente dos átomos de hidrogênio do anel alicíclico formado após a condensação com a CH;
- O espectro de ^1H da *p*-sinefrina não apresenta sinais abaixo de 2,27 ppm;
- O espectro de ^1H da oxazolidina não mostra sinais duplicados na região aromática e as integrais observadas são proporcionais aos átomos de hidrogênios do derivado;

Com relação à interpretação dos espectros de RMN de ^{13}C , o derivado oxazolidina apresenta seis sinais de carbono adicionais que não ocorrem no espectro de ^{13}C da *p*-sinefrina como:

- Cinco sinais, observados na região entre 22,9-32,8 ppm, que correspondem aos grupos metilenos do anel alicíclico;
- O sinal em 95,4 ppm corresponde ao átomo de carbono quaternário do anel oxazolidina ligado ao oxigênio e ao nitrogênio;

Levando em consideração os resultados promissores obtidos com a reação de condensação da *p*-sinefrina com CH, investigou-se a derivação desta amina com outros compostos carbonílicos como o ANISAL (PR-9) e o BENZAL (PR-10). Embora reações de condensação com estes aldeídos já tenham sido empregadas com sucesso para a preparação de derivados de efedrina (WALKER e MASSEY, 1988; EL-HAJ *et al.*, 2003), a análise por CG/EM dos produtos obtidos com PR-9 e PR-10 não evidenciou a presença das oxazolidinas esperadas.

5.1.2.2. Oxazolidina de efedrina

A oxazolidina derivada de efedrina foi preparada empregando-se o procedimento PR-6 (97 $\mu\text{móis}$ de efedrina, 900 $\mu\text{móis}$ de CH, 100 °C, 60 minutos) utilizando-se a base livre da amina preparada por SPE conforme descrito em 4.4. O

cloridrato de efedrina não foi utilizado porque o sal mostrou-se insolúvel na CH. Para caracterizar melhor a base livre empregada em PR-6 empregou-se a espectroscopia por IV. Os espectros de IV correspondentes são apresentados no anexo B. A tabela 5.9 apresenta a interpretação das principais bandas de absorção da base livre e do cloridrato de efedrina.

Tabela 5.9: Interpretação das principais bandas do espectro de infravermelho (IV) da efedrina base livre e do cloridrato de efedrina.

Número de Onda (cm ⁻¹)	Atribuições/Comentários ^a
3300	Deformação axial da ligação NH de amina secundária/Grupos NH secundários apresentam uma única absorção na região entre 3350 e 3310 cm ⁻¹
2960, 2830,2750 (F) e 2465	Deformação axial da ligação NH de sais de amônio/ Sais de aminas secundárias apresentam absorção forte na região entre 3000 e 2700 cm ⁻¹ podendo apresentar bandas até 2273 cm ⁻¹

^aPOUCHERT, 1981; SILVERTEIN e WEBSTER, 2000; SOCRATES, 1994; (F) absorção forte

A figura 5.22 mostra o cromatograma obtido após análise da oxazolidina de efedrina por CG/DIC Perkin-Elmer®. Nas condições cromatográficas utilizadas, o derivado apresentou um TR de 9,06 minutos.

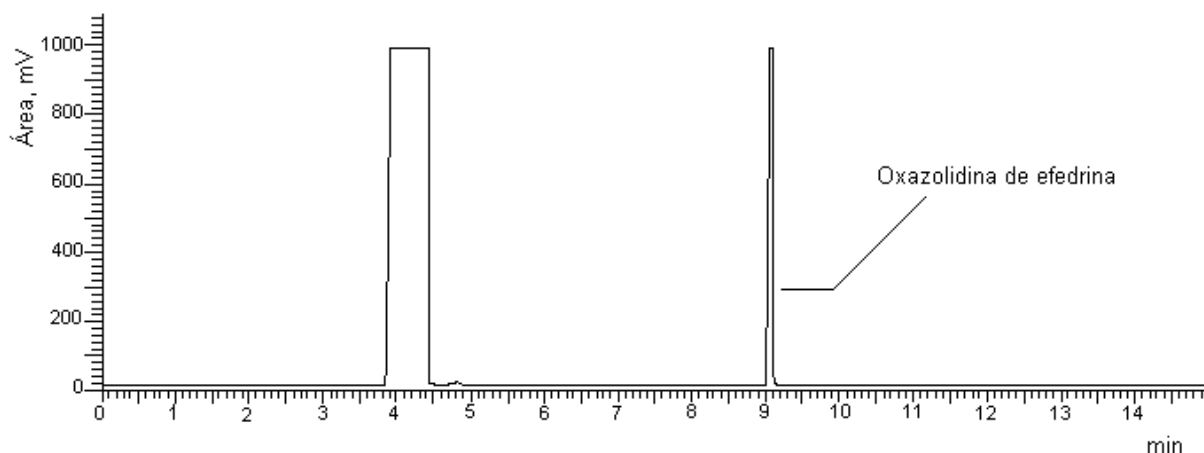


Figura 5.22: Cromatograma da oxazolidina de efedrina obtida empregando-se PR-6 (97 µmóis de efedrina, 900 µmóis de CH, 100 °C, 60 minutos) após análise por CG/DIC Perkin-Elmer®.

Na análise realizada por CG/EM Shimadzu®, a oxazolidina de efedrina apresentou um TR de 9,32 min. O cromatograma com o respectivo espectro de massas segue na figura 5.23.

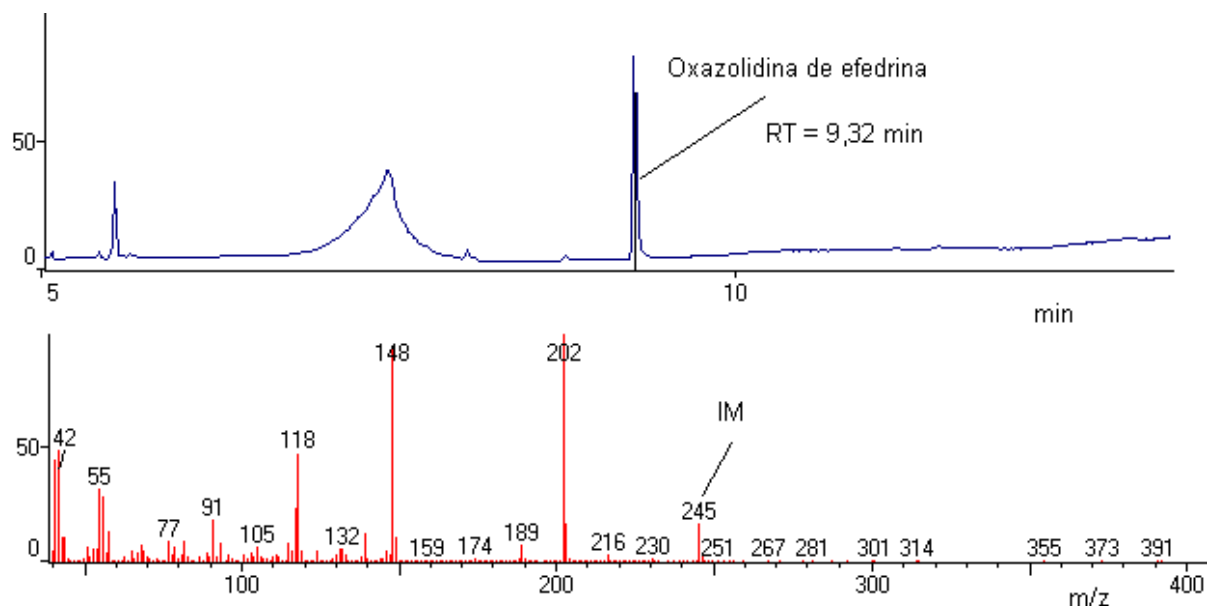


Figura 5.23: Cromatograma/espectro de massa da oxazolidina de efedrina obtida empregando-se PR-6 (97 μ móis de efedrina, 900 μ móis de CH, 100 °C, 60 minutos) após análise por CG/EM Shimadzu®.

O cromatograma com o respectivo espectro de massas do derivado oxazolidina de efedrina após análise no CG/EM Varian® é apresentado na figura 5.24. O TR desta oxazolidina foi observado em 6,57 minutos.

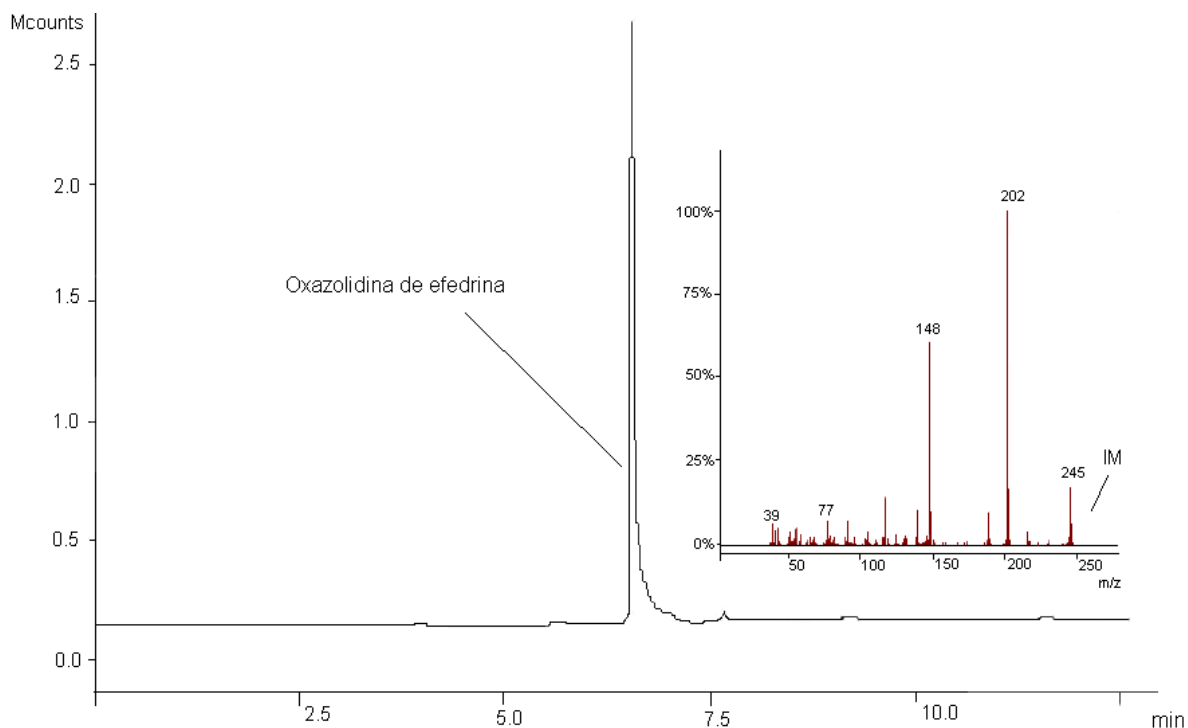
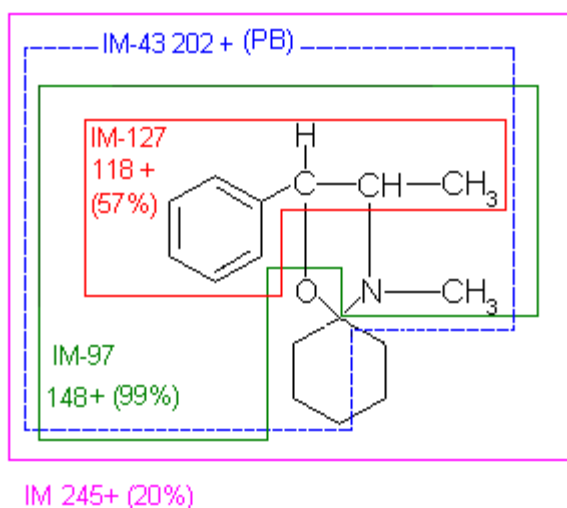


Figura 5.24: Cromatograma/espectro de massa do derivado oxazolidina de efedrina obtida empregando-se PR-6 (97 μ móis de efedrina, 900 μ móis de CH, 100°C, 60 minutos) após análise por CG/EM Varian®.

Os principais fragmentos de massa observados na figura 5.23 são os íons 202 m/z (100% - pico base), 148 m/z (99%), 118 m/z (57%) e 245 m/z (20% - IM). O espectro apresentado é semelhante àquele obtido por outros autores (WALKER *et al.*, 1989; EL-HAJ *et al.*, 2003 e SEBBEN, 2007).

De acordo com os estudos de WALKER e col. (1989), provavelmente a fragmentação da oxazolidina de efedrina segue a proposta apresentada na figura 5.25.



Massa Molecular	245
Fórmula Molecular	C ₁₆ H ₂₃ NO

Figura 5.25: Proposta para a fragmentação do derivado oxazolidina de efedrina.

A tabela 5.10 apresenta os principais fragmentos observados para o derivado oxazolidina de efedrina conforme a proposta da figura 5.25.

Tabela 5.10: Proposta para a fragmentação da oxazolidina de efedrina

m/z (u.m.a.)	Abundância Relativa (%)	IM-X	Fragmentos-chaves	Proposta
245	20	-	IM	C ₁₆ H ₂₃ N ⁺ O
202	100	M-43	CH ₃ CH ₂ CH ₂ ·	C ₁₃ H ₁₆ N ⁺ O
148	99	M-97	C ₆ H ₁₀ O·	C ₁₀ H ₁₄ N ⁺
118	57	M-127	C ₇ H ₁₃ NO·	[C ₆ H ₅ -CH=CH-CH ₃] ⁺
91	20	M-154	C ₉ H ₁₆ NO·	[C ₇ H ₇] ⁺

m/z = relação massa/carga; u.m.a. = unidade de massa atômica; IM = íon molecular; X = massa do fragmento-chave

5.1.2.3. Oxazolidina de octopamina

O derivado de octopamina foi preparado empregando-se a base livre correspondente obtida por SPE, com as condições estabelecidas no procedimento PR-7 (90 μmols de octopamina, 900 μmols de CH, 100 °C, 60 minutos). Quando o cloridrato desta amina foi utilizado, com as condições empregadas em PR-8 (1,3 μmols de cloridrato de octopamina, 900 μmols de CH, 100 °C, 60 minutos), o mesmo problema relatado para o cloridrato de efedrina foi observado. A reação de adição não produziu o produto esperado.

Para melhor caracterização da base livre de octopamina empregada em PR-7, recorreu-se à análise por IV. Os espectros de IV correspondentes são apresentados no anexo B. A tabela 5.11 apresenta a interpretação das principais bandas de absorção da base livre e do cloridrato de octopamina.

Tabela 5.11: Interpretação das principais bandas do espectro de infravermelho (IV) da octopamina base livre e do cloridrato de octopamina.

Número de Onda (cm^{-1})	Atribuições/Comentários ^a
3340 e 3275	Deformação axial da ligação NH de amina primária/ Grupos NH_2 primários apresentam duas absorções na região entre 3380 e 3310 cm^{-1}
3200 (F), 2950 e 2850 com bandas múltiplas até 2300	Deformação axial da ligação NH de sais de amônio Absorção forte e larga do grupo NH_3^+

^aPOUCHERT, 1981; SILVERTEIN e WEBSTER, 2000; SOCRATES, 199; (F) absorção forte

O derivado de octopamina foi submetido à análise por CG/DIC e CG/EM. A figura 5.26 mostra o cromatograma deste derivado obtido por CG/DIC Perkin-Elmer®. O TR observado foi de 10,25 minutos.

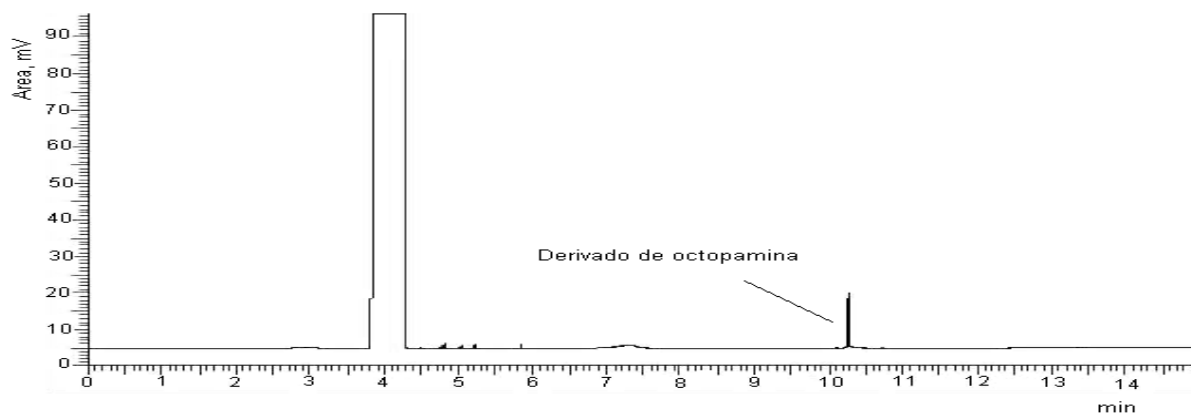


Figura 5.26: Cromatograma do derivado de octopamina empregando-se PR-7 (90 μmols de octopamina, 900 μmols de CH, 100 °C, 60 minutos), após análise por CG/DIC Perkin-Elmer®.

Na análise realizada por CG/EM Shimadzu®, o derivado de octopamina apresentou um RT de 10,87 min. O cromatograma com o respectivo espectro de massas segue na figura 5.27.

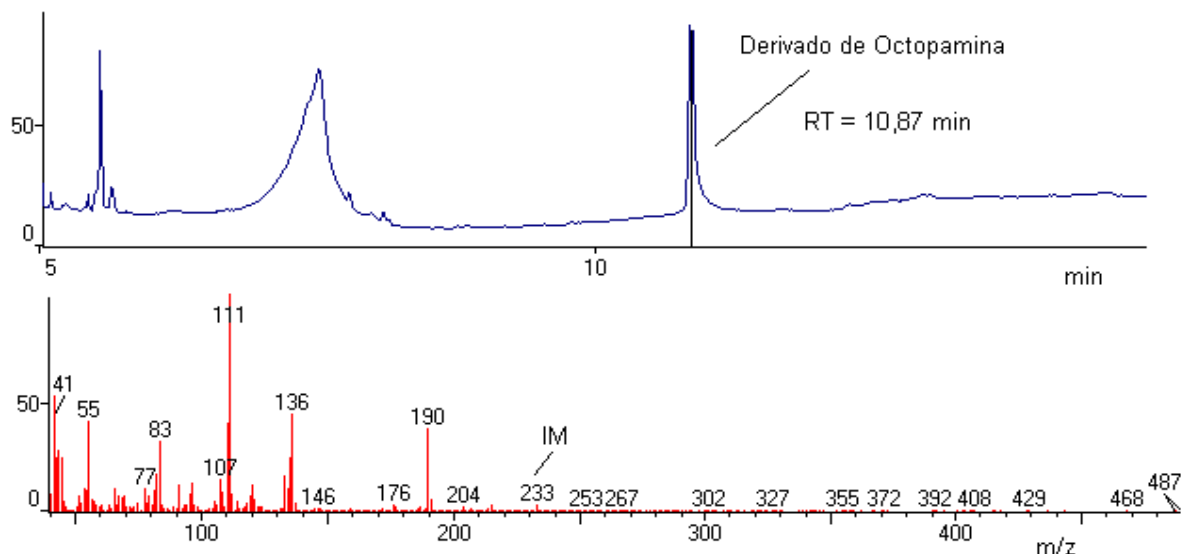
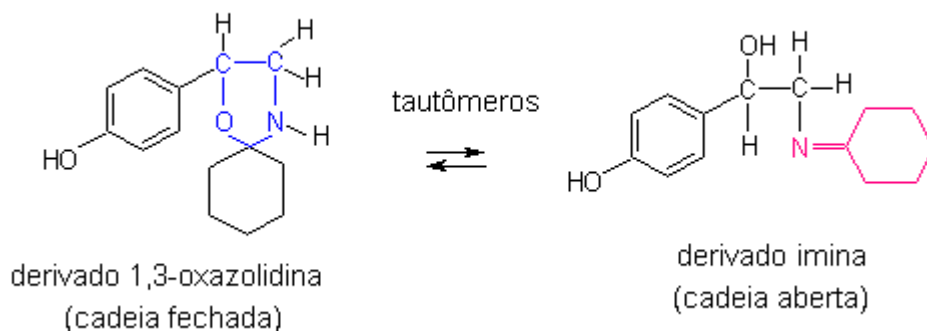


Figura 5.27: Cromatograma/espectro de massas do derivado de octopamina obtido com PR-7 (90 μ móis de octopamina, 900 μ móis de CH, 100°C, 60 minutos) após análise por CG/EM Shimadzu®.

O produto derivado da reação de condensação da octopamina com a CH, oxazolidina, pode assumir a forma tautomérica com a base de Schiff correspondente (Fig. 5.28). Vários autores já relataram a presença de tautômeros, quando investigaram a fragmentação de oxazolidinas contendo um grupo amínico secundário (RENNEKAMP *et al.*, 1971; LEHTELÄ *et al.*, 1994; VAINIOTALO *et al.*, 1990). Quando o grupo amínico é terciário este tautomerismo não é favorecido (LEHTELÄ *et al.*, 1994).



Massa Molecular	233
Fórmula Molecular	$C_{14}H_{19}NO_2$

Figura 5.28: Derivado de octopamina após condensação com ciclohexanona (CH)

Os principais íons observados no espectro da figura 5.27 são apresentados na tabela 5.12. Em função do tautomerismo observado, a fragmentação deste derivado é bem mais complexa do que àquela observada para as oxazolidinas de efedrina e *p*-sinefrina.

Tabela 5.12: Principais íons do espectro de massas do derivado de octopamina com cicloexanona (CH) com as respectivas abundâncias.

m/z (u.m.a.)	Abundância Relativa (%)	IM-(X)
233	3	IM
190	37	IM-43
136	45	IM-97
111	100	IM-122

m/z = relação massa/carga; u.m.a. = unidade de massa atômica; IM = íon molecular; X = massa do fragmento-chave

O cromatograma com o respectivo espectro de massas do derivado de octopamina após análise no CG/EM Varian® é apresentado na figura 5.29. O TR observado foi de 8,02 minutos.

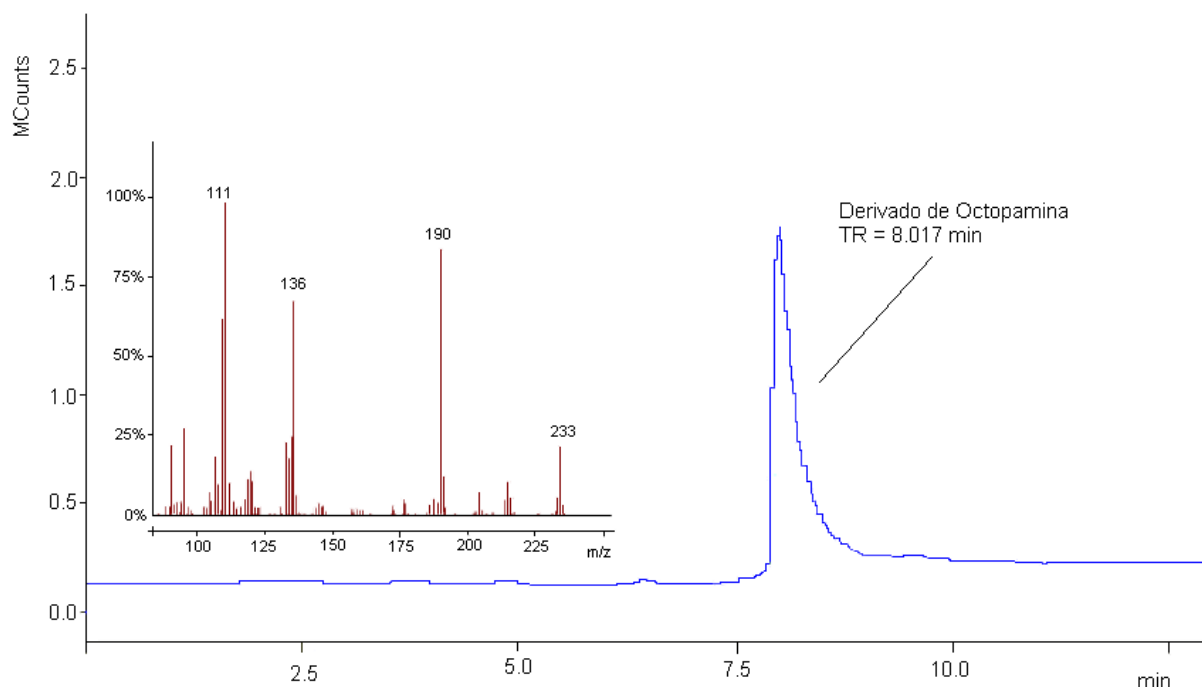


Figura 5.29: Cromatograma/espectro de massas do derivado de octopamina obtido com PR-7 (90 μ móis de octopamina, 900 μ móis de CH, 100 °C, 60 minutos), após análise por CG/EM Varian®.

5.2. Preparação da amostra

5.2.1. Extração

Para a extração de *p*-sinefrina de material vegetal, geralmente, são utilizados solventes polares como a água destilada e o metanol (PELLATI *et al.*, 2005; PELLATI e BENVENUTI, 2007a; PELLATI e BENVENUTI, 2007b). Para estabelecer a melhor opção avaliou-se a solubilidade do extrato de CA nestes dois solventes. O extrato mostrou-se facilmente solúvel em água destilada. O mesmo comportamento não foi observado com a utilização do metanol. Desta forma, os produtos derivados de CA foram submetidos à extração com água destilada empregando-se um homogenizador de tubos conforme adaptação da técnica utilizada por ARBO (2008). O tempo de extração e o número de ciclos necessários foram definidos em função da complexidade da matriz empregada.

5.2.2. Extração em fase sólida (SPE)

Dependendo do material vegetal a extração da *p*-sinefrina foi acompanhada de outros constituintes, conferindo ao extrato bruto um aspecto viscoso inadequado para a análise cromatográfica. Para o *clean-up* do extrato vegetal empregou-se, então, a SPE.

O desenvolvimento do método de SPE foi realizado em duas etapas. Inicialmente, foi selecionado o sorvente mais adequado para a finalidade pretendida e após, o protocolo de extração foi otimizado.

A natureza e as propriedades do sorvente são fundamentais para a retenção do analito. Logo, a sua seleção é crucial para o desenvolvimento do método. Neste trabalho, empregou-se um cartucho do tipo trocador de cátions SCX e os critérios utilizados para a sua seleção foram a natureza da matriz (polar) e as características físico-químicas da *p*-sinefrina. Este analito possui caráter básico ($pK_a = 10,2 - NH$), é polar e solúvel em água (NIEMANN e GAY, 2003; PELLATI e BENVENUTI, 2007b). O grupo amínico da *p*-sinefrina encontra-se facilmente protonado em solução aquosa, existindo predominantemente na forma catiônica, facilmente disponível para a troca iônica (PELLATI *et al.*, 2005). O sorvente SCX possui grupos sulfônicos $[SO_3^-]$ ligados à superfície da sílica. Estes grupos são fortemente ácidos

($pK_a < 1$) encontrando-se ionizados numa ampla faixa de pH. Dentre os fatores que podem influenciar a separação por troca iônica, o pH da matriz é um fator preponderante, porque a retenção de analitos iônicos é obtida promovendo-se a sua ionização (LANÇAS, 2004). Com o objetivo de garantir a retenção de analitos de caráter básico, como a *p*-sinefrina, o pH do extrato bruto foi ajustado para duas unidades abaixo do seu pK_a .

Os principais parâmetros experimentais da SPE (condicionamento, aplicação da amostra, retenção e eluição) foram otimizados usando soluções padrões de aminas e uma amostra do extrato de CA. A eficiência do processo foi acompanhada por CCD e por CG/EM após reação de derivação com CH.

A figura 5.30 apresenta os resultados que foram obtidos por CCD durante o estabelecimento do protocolo da SPE.

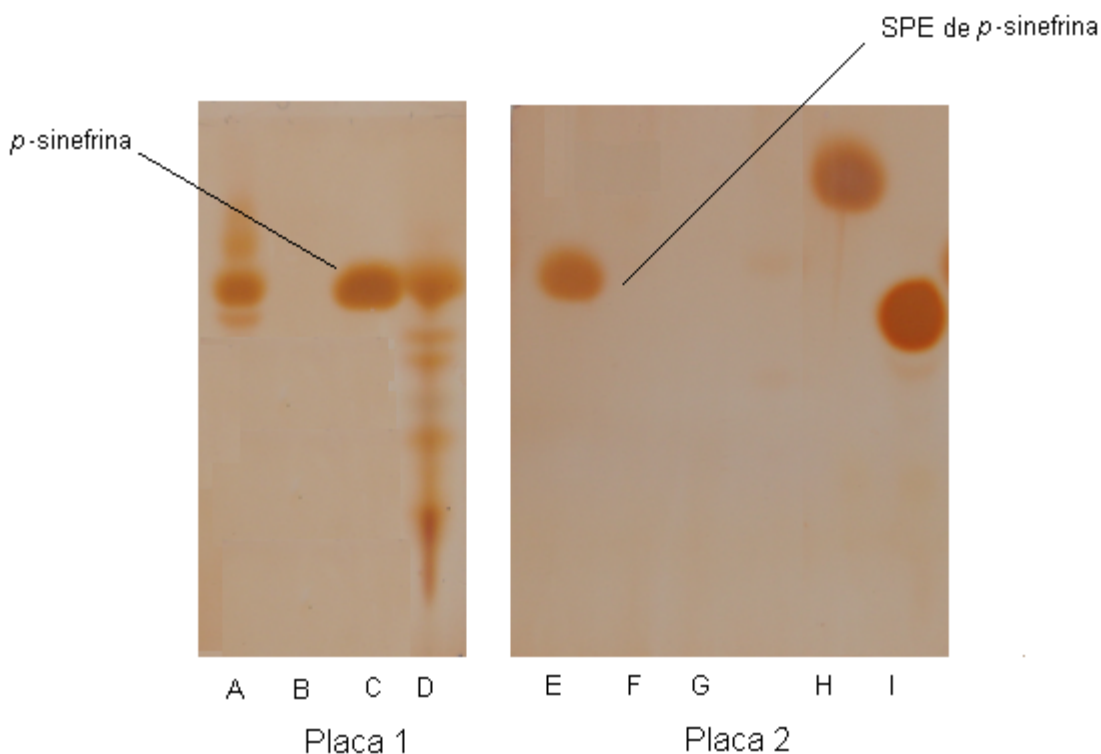


Figura 5.30: Cromatografia em camada delgada (CCD) do extrato de *Citrus aurantium* (CA) e das bases livres de aminas, em placas de celulose e fase móvel butanol:ácido acético:água destilada (5,5:1,4:3,0), após revelação com ninhidrina e aquecimento. Placa 01: (A) eluato obtido da SPE de CA; (B) extrato percolado de CA; (C) padrão de *p*-sinefrina ($R_f = 0,73$); (D) extrato de CA não submetido a SPE; Placa 02: (E) eluato obtido da SPE do padrão de *p*-sinefrina; (F) extrato percolado da solução padrão de *p*-sinefrina; (G) lavado do cartucho de SPE; (H) eluato obtido da SPE de efedrina ($R_f = 0,85$) e (I) eluato obtido da SPE de octopamina ($R_f = 0,69$).

Para a interpretação do resultado da CCD, foram utilizados como parâmetros de identificação, a comparação do fator de retenção (R_f) e a cor desenvolvida pelo padrão e pela amostra analisados concomitantemente.

A presença de *p*-sinefrina foi evidenciada nos eluatos da solução padrão e do extrato de CA. Os eluatos da SPE, de outras soluções padrões de aminas, como a efedrina e octopamina, também mostraram resultados positivos. A presença de *p*-sinefrina não foi detectada no percolado e nem no lavado da coluna de SPE.

A retenção da *p*-sinefrina ao sorvente de SPE (SCX) foi avaliada através da análise da solução padrão do analito e do extrato de CA por CG/EM, após o procedimento de *clean-up* e derivação com CH.

Para a interpretação do resultado da análise por CG/EM foram utilizados como parâmetros de identificação, a comparação do TR e do espectro de massa, obtidos para a amostra e para o padrão de *p*-sinefrina, analisados nas mesmas condições.

A figura 5.31 apresenta o cromatograma e o correspondente espectro de massas do extrato de CA após a SPE e derivação com CH. O espectro de massa no TR de 10,95 minutos é compatível com o derivado oxazolidina de *p*-sinefrina obtido após a derivação com a CH.

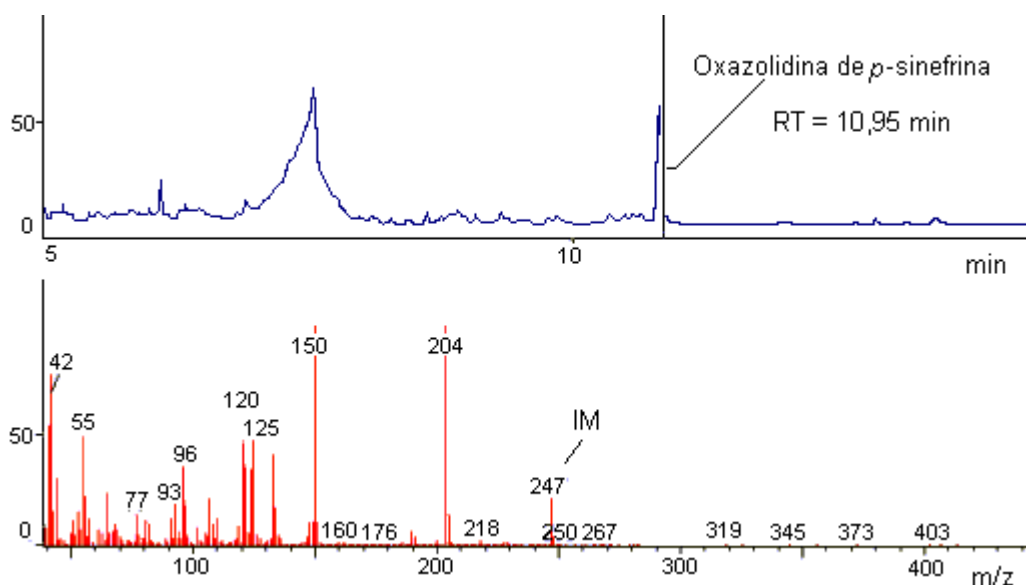


Figura 5.31: Cromatograma/espectro de massas do extrato de *Citrus aurantium* L. (CA) obtido após *clean-up* por extração em fase sólida (SPE), derivação com ciclohexanona (CH) e análise por CG/EM Shimadzu®.

A análise da solução padrão de *p*-sinefrina, após SPE e derivação com CH demonstrou recuperação quantitativa do analito superior a 90%.

5.3. Validação do Método

Considerando os resultados promissores obtidos nos testes de derivação com CH, o derivado oxazolidina de *p*-sinefrina foi escolhido para estabelecimento do método de quantificação por CG/DIC seguido por confirmação por CG/EM. O protocolo de SPE também se mostrou adequado para o *clean-up* do extrato bruto e foi utilizado conforme descrito em 4.4.

5.3.1. Linearidade

A linearidade do método foi avaliada, em três dias diferentes, empregando-se soluções padrões de *p*-sinefrina em CH, injetadas em triplicata. O método de quantificação foi estabelecido por padronização externa e a resposta do detector apresentou-se linear na faixa de concentração entre 125-500 mg%.

A figura 5.32 apresenta a representação gráfica obtida no estudo de linearidade. A equação da reta demonstrou um coeficiente de correlação linear igual a 0,9997.

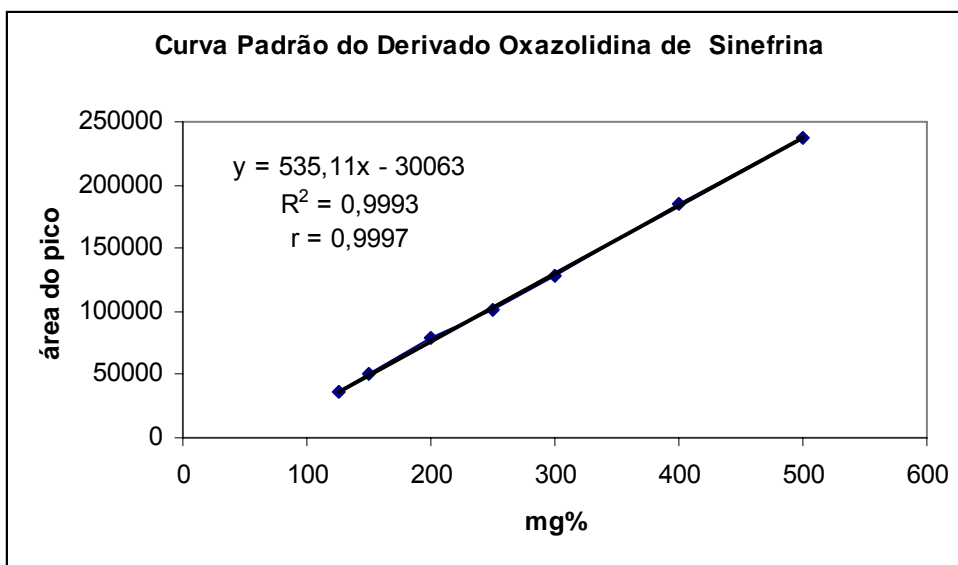


Figura 5.32: Representação gráfica da curva padrão da oxazolidina de *p*-sinefrina obtida por análise em CG/DIC Perkin-Elmer®; r = coeficiente de correlação R^2 = coeficiente de determinação

Os valores experimentais obtidos na avaliação de linearidade são apresentados na tabela 5.13.

Tabela 5.13: Valores experimentais obtidos na elaboração da curva padrão da oxazolidina de *p*-sinefrina por CG/DIC Perkin-Elmer® em três diferentes.

Concentração (mg%)	Áreas absolutas*			Média	DPR**
125	37.112,5	38.405,3	35.532,4	37.016,8	3,89
150	48.939,6	50.143,4	50.713,7	49.932,2	1,81
200	81.175,7	80.983,6	77362,5	79.840,6	2,69
250	101.588,8	103.627,9	99.637,1	101.617,9	1,96
300	126.633,7	131.787,9	125.856,2	128.092,6	2,20
400	183.376,1	183.778,2	189.510,2	185.554,8	1,85
500	234.775,0	237.249,0	240.732,0	237.585,3	1,26

*Cada valor representa a média de três determinações; **DPR = desvio padrão relativo

A análise de variância (ANOVA) das áreas obtidas para as diferentes soluções padrões de *p*-sinefrina demonstrou a existência de regressão linear e que existe diferença significativa entre as concentrações. Não foi observado desvio de linearidade. A tabela 5.14 apresenta os resultados da ANOVA.

Tabela 5.14.: Análise de variância (ANOVA) das áreas absolutas determinadas para obtenção da curva padrão da oxazolidina de *p*-sinefrina por CG/DIC Perkin-Elmer®

Fonte de variação	gl	Soma dos quadrados	Variância	F	F crítico
Entre	6	95629239002,5	15938206500,0	2618,3*	2,85
Regressão linear	1	95629239002,5	95629239002,5	15709,7*	4,60
Desvio de linearidade	5	62840643,7	12568128,7	2,06**	2,96
Resíduo	14	85221733,5	6087266,7		
Total	20	95714460735,9	4785723037		

* Significativo para $p > 0,05$; ** Não Significativo para $p > 0,05$

Os resultados obtidos conferem validade ao método desenvolvido em relação ao parâmetro linearidade.

O cromatograma do derivado oxazolidina obtido por reação do padrão de *p*-sinefrina (300 mg%) com CH é apresentado na figura 5.33.

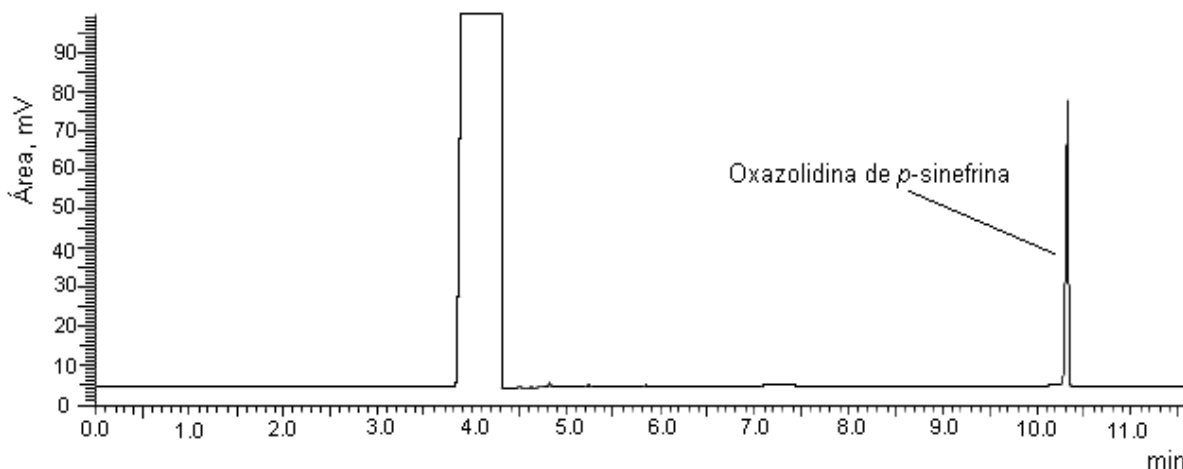


Figura 5.33: Cromatograma da oxazolidina de *p*-sinefrina (300 mg%) após reação com cicloexanona (CH) e análise por CG/DIC Perkin-Elmer®.

5.3.2. Limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ)

Os LD e LQ obtidos para o método por CG/DIC foram obtidos por cálculos matemáticos utilizando o desvio padrão (DP) do intercepto obtido a partir das curvas padrões empregadas na avaliação da linearidade do método. Nas condições estabelecidas no método proposto, os LD e LQ para a *p*-sinefrina por CG/DIC foram 33,0 mg% e 110,0 mg%, respectivamente.

Para fins de comparação com o método de quantificação por CG/DIC, são apresentados, na tabela 5.15, os LD obtidos por CG/EM e por CLAE/DAD.

Tabela 5.15: Limites de detecção (LD) obtidos por cromatografia a gás (CG) e comparados com o a cromatografia a líquido de alta eficiência acoplado com detector de arranjo de diodos (CLAE/DAD)

Equipamento	Limite de detecção (mg%)
CLAE/DAD Waters®	0,104 ^a
CG/DIC Perkin-Elmer®	33,0
CG/EM Shimadzu® modo <i>full-scan</i>	200,0
modo <i>single ion monitoring</i> (SIM)	60,0
CG/EM Varian® modo <i>full-scan</i>	1,5

^aARBO, 2008.

Os cromatogramas obtidos para os LD por CG/EM Shimadzu® e CG/EM Varian® são apresentados no anexo C.

5.3.3. Precisão

Para a verificação da repetibilidade foi empregado extrato de CA com especificação mínima de 6% de *p*-sinefrina. Os resultados são apresentados na tabela 5.16 e representam seis determinações do extrato de CA a 100% da concentração do teste no mesmo dia e com o mesmo analista.

Tabela 5.16: Repetibilidade (precisão intra-corrida) obtida através de seis determinações do extrato de CA a 100% da concentração do teste no mesmo dia.

Determinação	Área do pico	Sinefrina (%)	Média (%)*	DP	DPR (%)**
01	124.777,5	6,46	6,27	0,16	2,58
	118.432,3	6,18			
	118.520,2	6,18			
02	105.059,9	5,75	5,97	0,21	3,52
	114.643,1	6,17			
	110.705,5	5,98			
03	113.537,3	6,05	5,88	0,17	2,89
	105.833,3	5,71			
	109.797,3	5,87			
04	105.581,6	5,67	5,80	0,16	2,75
	107.872,0	5,76			
	112.924,5	5,98			
05	121.692,5	6,14	6,19	0,06	0,89
	123.090,4	6,19			
	124.383,9	6,25			
06	109.948,2	5,93	5,90	0,05	0,88
	107.969,6	5,84			
	109.938,1	5,93			

MÉDIA = 6,00 %; DESVIO PADRÃO (DP) = 0,22 ; DPR (%) = 3,60

Os resultados obtidos para a verificação da precisão intermediária são apresentados na tabela 5.17 e representam seis determinações do extrato de CA a 100% da concentração do teste em dois dias consecutivos por um analista diferente.

Tabela 5.17: Precisão intermediária (precisão inter-corridas) obtida através de seis determinações do extrato de CA a 100% da concentração do teste em dois dias consecutivos.

Determinação	Área do pico	Sinefrina (%)	Média (%)*	DP	DPR (%)**
01	106.276,4	5,99	6,10	0,10	1,61
	110.456,9	6,16			
	110.422,7	6,16			
02	118.714,2	6,38	6,36	0,09	1,64
	115.408,3	6,25			
	120.469,9	6,46			
03	110.195,2	6,19	6,08	0,11	1,81
	104.907,1	5,97			
	107.551,2	6,08			
04	105.079,9	5,71	5,85	0,14	2,39
	108.620,0	5,85			
	112.160,1	5,99			
05	108.253,3	6,02	5,93	0,09	1,43
	105.984,4	5,93			
	104.093,3	5,85			
06	114.560,6	6,29	6,39	0,10	1,49
	118.955,9	6,48			
	116.758,3	6,39			

Média = 6,12 %; Desvio Padrão (DP) = 0,22; DPR (%) = 3,59

*Cada valor representa a média de duas determinações; **DPR = desvio padrão relativo

O cromatograma do extrato seco de CA submetido à extração, *clean-up* por SPE e derivação com CH e análise por CG/DIC é apresentado na figura 5.34.

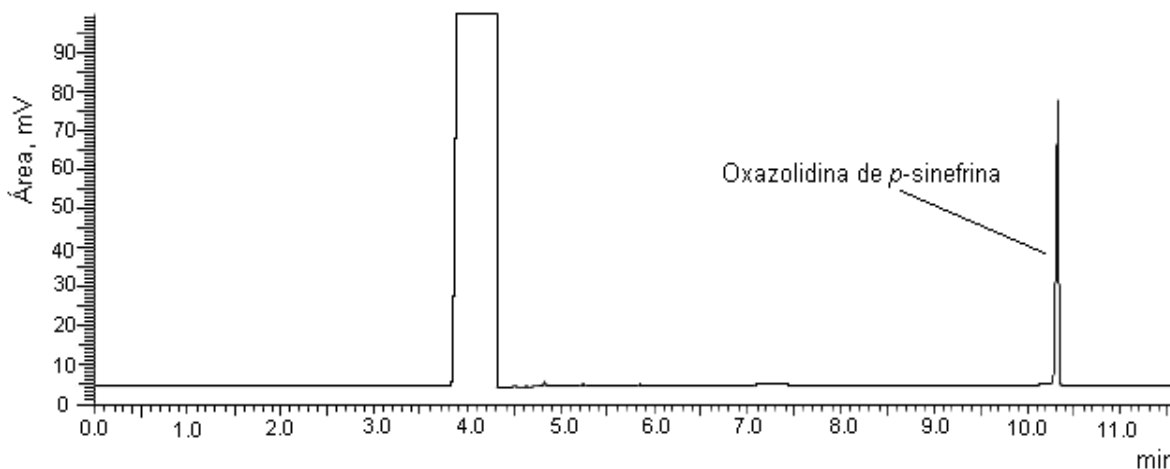


Figura 5.34: Cromatograma do extrato seco de *Citrus aurantium* L. (CA) após extração, *clean-up* por extração em fase sólida (SPE), derivação com ciclohexanona (CH) e análise por CG/DIC Perkin-Elmer®.

Os resultados obtidos conferem validade ao método desenvolvido em relação ao parâmetro precisão.

5.3.4. Exatidão

Para verificação da exatidão, empregou-se o método de adição de padrão a um extrato de CA. O cromatograma correspondente à análise deste extrato por CG/DIC antes da fortificação é apresentado na figura 5.35.

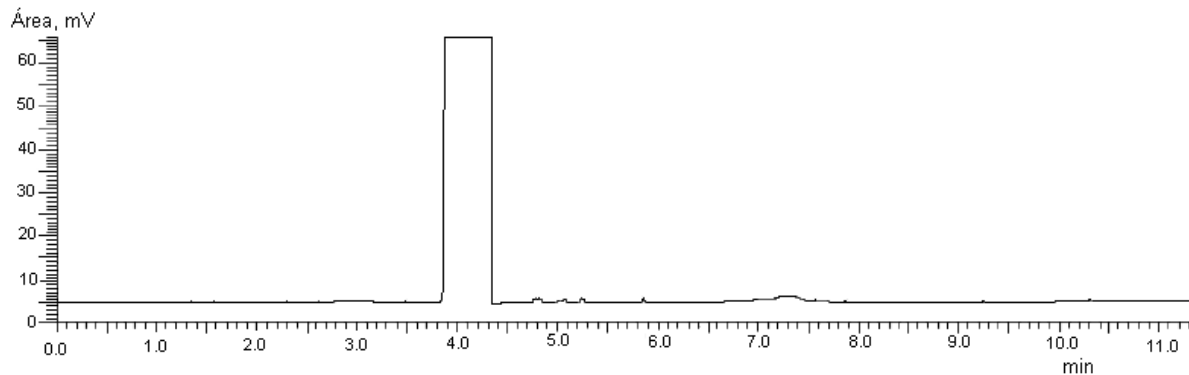


Figura 5.35: Cromatograma do extrato seco de *Citrus aurantium* L. (CA) utilizado para avaliação da exatidão, antes da fortificação com o padrão de *p*-sinefrina, submetido à extração, *clean-up* por extração em fase sólida (SPE), derivação com cicloexanona (CH) e análise por CG/DIC Perkin-Elmer®.

Os resultados obtidos para avaliação da exatidão são apresentados na tabela 5.18.

Tabela 5.18 Recuperação de *p*-sinefrina após o procedimento de extração, *clean-up* por extração em fase sólida (SPE) e derivação da amostra com cicloexanona (CH).

Amostra	Quantidade de <i>p</i> -sinefrina (mg%)		Recuperação(%)
	Adicionada	Recuperada	
R ₁	168,5	125,0 ± 3,7	74,2
R ₂	331,4	261,3 ± 8,65	78,8
R ₃	432,5	351,9 ± 11,7	81,4
Recuperação média = 78,1%; DP = 3,64; DPR = 4,66%			

Os resultados obtidos para a recuperação da *p*-sinefrina, neste trabalho, são comparáveis aos obtidos por PELLATI e col. (2005).

5.3.5. Especificidade e seletividade

A especificidade do método foi investigada analisando-se por CG/DIC análogos estruturais da *p*-sinefrina, como a efedrina e a octopamina e outros potenciais interferentes como a cafeína.

O cromatograma correspondente à análise do branco de amostra demonstra a ausência de picos interferentes nos reagentes (figura 5.36). O TR da CH foi observado próximo dos quatro minutos.

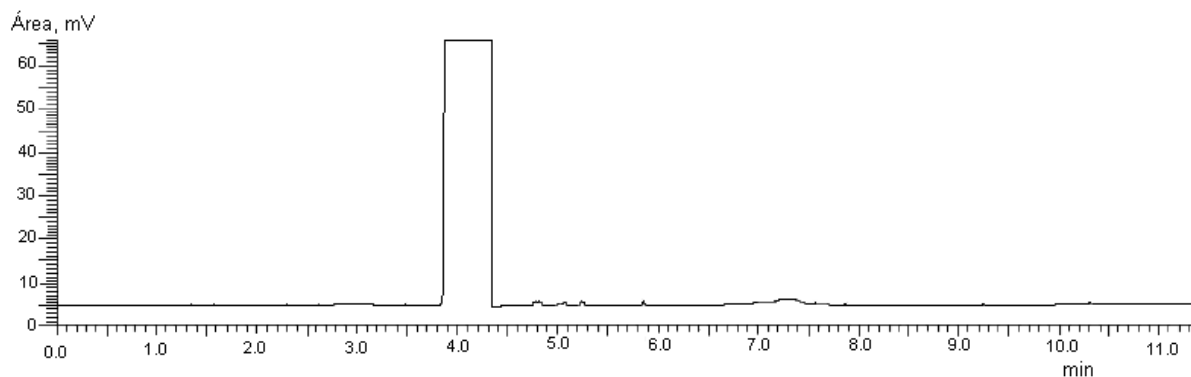


Figura 5.36: Cromatograma do branco de amostra após a derivação com ciclohexanona (CH) e análise por CG/DIC Perkin-Elmer®.

O TR da cafeína foi observado em 8,92 minutos após a injeção da solução padrão. O cromatograma obtido no CG/DIC é apresentado na figura 5.37.

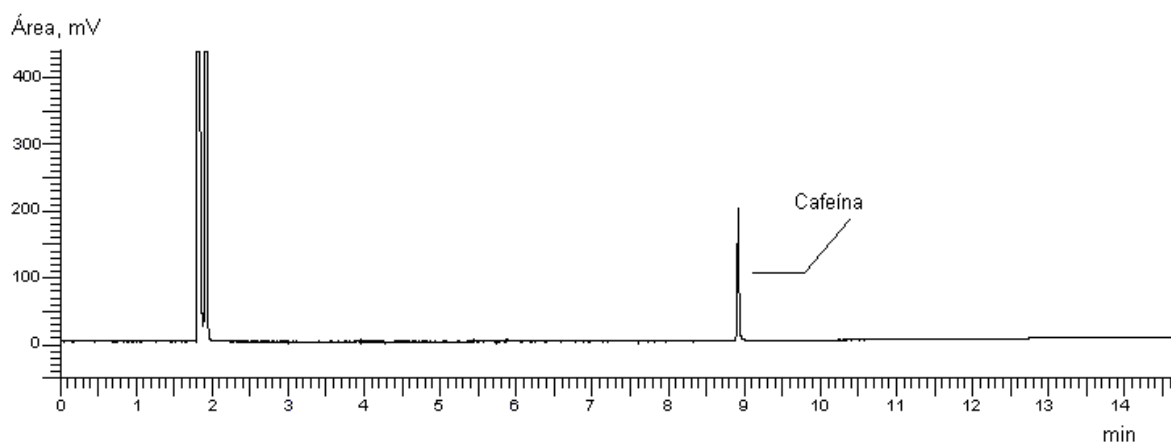


Figura 5.37: Cromatograma obtido após a análise do padrão de cafeína em metanol por CG/DIC Perkin-Elmer®.

Para avaliar a capacidade do *clean-up* por SPE em remover a cafeína, a solução padrão desta xantina foi submetida ao protocolo descrito em 4.4. Após o *clean-up* por SPE e derivação com CH, o cromatograma obtido por CG/DIC apresentou o mesmo perfil do cromatograma do branco de amostra apresentado na figura 5.36, comprovando a eficácia da SPE para esta finalidade. A não interferência da cafeína na quantificação da *p*-sinefrina também foi avaliada pela análise do composto emagrecedor contendo extrato de guaraná (figura 5.39).

A ausência de picos interferentes nos cromatogramas de amostras de derivados de CA (figuras 5.34, 5.38 e 5.39) corrobora os achados de PELLATI e col. (2005). O eluato obtido por SPE mostrou-se livre de impurezas proporcionando melhor seletividade para análise cromatográfica.

A tabela 5.19 apresenta o TR dos derivados de *p*-sinefrina, efedrina e de octopamina após reação com CH e análise nos equipamentos de CG/DIC e CG/EM, bem como os íons diagnósticos selecionados para a identificação.

Tabela 5.19: Identificação dos derivados de *p*-sinefrina, efedrina e octopamina por CG/DIC Perkin-Elmer® com confirmação por CG/EM Shimadzu® e Varian®.

Equipamento	Oxazolidina	Tempo de retenção (min)	Íons diagnósticos (m/z) e abundância relativa (%)
CG/DIC Perkin-Elmer®	efedrina	9,06	-
	<i>p</i> -sinefrina	10,30	-
	octopamina	10,25	-
CG/EM Shimadzu®	efedrina	9,32	118 (57); 148 (99); 202 (100); 245 (20)
	<i>p</i> -sinefrina	10,95	120 (57); 150 (99); 204 (100); 247 (20)
	octopamina	10,87	233 (3); 136 (45); 190 (37); 111 (100)
CG/EM Varian®	efedrina	6,57	118 (15); 148 (57); 202 (100); 245 (17)
	<i>p</i> -sinefrina	7,90	120 (20); 150 (56); 204 (100); 247 (17)
	octopamina	8,02	233 (11); 136 (75); 190 (87); 111 (100)

m/z = relação massa/carga

5.3.6. Robustez

Foram testadas pequenas variações nas condições cromatográficas como alterações na programação da temperatura da coluna e das rampas de aquecimento e utilização de colunas de diferentes fabricantes. Estas alterações não causaram diferenças significativas no perfil cromatográfico. Com relação ao preparo da amostra para análise por CG, a utilização de outras marcas de CH e de outros fornecedores de cartuchos para SPE, também, não promoveu alteração dos resultados obtidos, demonstrando a robustez do método proposto.

5.3.7. Aplicação do Método

O método analítico desenvolvido para quantificação de *p*-sinefrina por CG/DIC foi adaptado para análise de outros produtos derivados de CA. Na presença de outros extratos vegetais, a matriz tornou-se insolúvel dificultando a extração da *p*-sinefrina. Para contornar este problema de extração, o número de ciclos empregados foi aumentado e a eficiência do procedimento foi avaliada com base na massa absoluta recuperada. Os resultados obtidos na quantificação são apresentados na tabela 5.20.

Tabela 5.20: Resultados das análises em produtos derivados de *Citrus aurantium*

Produto	Fornecedor/Procedência	Média ± DP (%)*	DPR (%)**
Frutos verdes	Porto Alegre	0,046± 0,0015	3,34
Composto emagrecedor	Farmácia Manipulação	6,70± 0,26	3,95

DP = desvio padrão; DPR = desvio padrão relativo

*Cada valor representa a média de três determinações

Os resultados obtidos para análise de *p*-sinefrina, no fruto de CA por CG/DIC, foram equivalentes àqueles obtidos por ARBO (2008) por CLAE/DAD. Com relação ao resultado da quantificação no composto emagrecedor, o teor de *p*-sinefrina encontrado está de acordo com o valor especificado na formulação.

Os cromatogramas obtidos para análise do fruto de CA e para o composto emagrecedor por CG/DIC após extração, *clean-up* por SPE e derivação com CH são apresentados nas figuras 5.38 e 5.39, respectivamente.

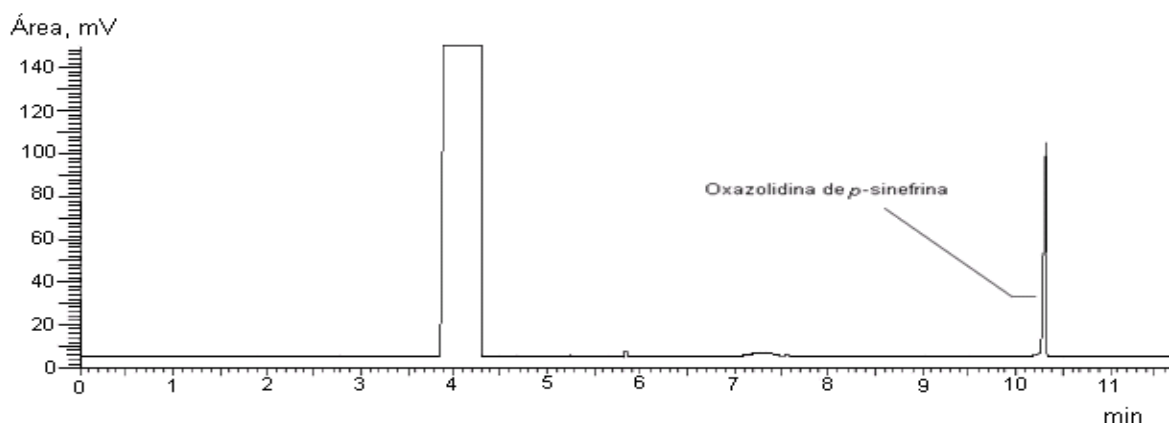


Figura 5.38: Cromatograma do fruto verde de *Citrus aurantium* L. (CA) após extração, *clean-up* por extração em fase sólida (SPE), derivação com ciclohexanona (CH) e análise por CG/DIC Perkin-Elmer®.

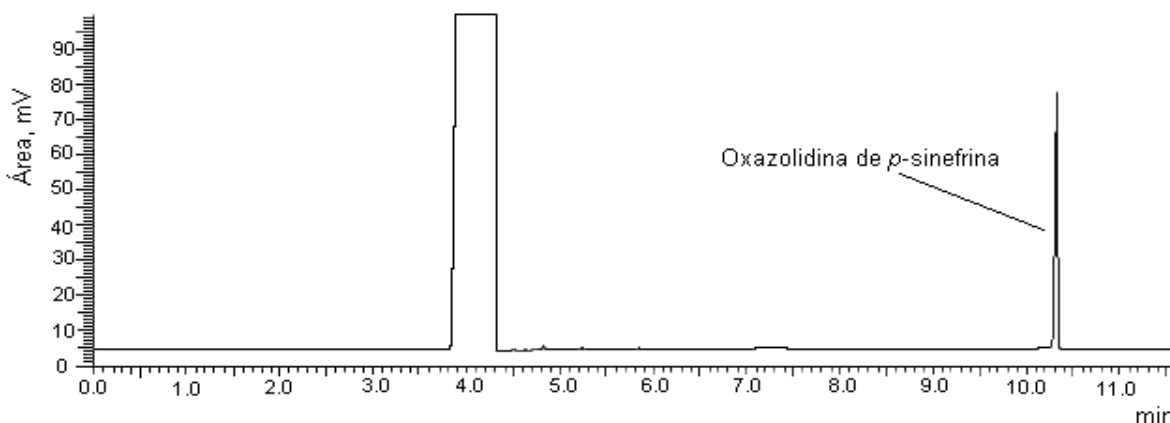


Figura 5.39: Cromatograma do composto emagrecedor contendo extrato de *Citrus aurantium* L. (CA), extrato de *Paullinia cupana* (guaraná) e *Salix alba* após extração, *clean-up* por extração em fase sólida (SPE), derivação com ciclohexanona (CH) e análise por CG/DIC Perkin-Elmer®.

6. CONCLUSÕES

- Para análise de *p*-sinefrina, em extratos de CA, foi estabelecido e validado um método para quantificação por CG/DIC com confirmação por CG/EM;
- Os resultados obtidos na validação demonstraram que o método de quantificação por CG/DIC mostrou-se linear, específico, robusto e preciso;
- O método mostrou boa exatidão considerando-se a complexidade da matriz e a necessidade de *clean-up* e derivação;
- O método validado foi aplicado para a análise de *p*-sinefrina em outras matrizes de CA, como frutos e composto emagrecedor, com resultados preliminares satisfatórios;
- O *clean-up* do extrato bruto por SPE, em fase estacionária SCX, associado com a confirmação do derivado oxazolidina de *p*-sinefrina por CG/EM proporcionaram, respectivamente, ganho de seletividade e identificação inequívoca do analito;
- A preparação da amostra por SPE possibilitou, também, a concentração do analito, a redução do consumo de solventes tóxicos, a proteção da coluna analítica do CG e a automação do processo de preparação da amostra.
- A derivação com CH mostrou-se mais vantajosa visto que este reagente é menos oneroso, menos tóxico, mais seletivo, o derivado obtido é mais estável e o seu padrão de fragmentação mais característico.

7. REFERÊNCIAS

ALLISON, D. B.; CUTTER, G.; MOORE, D.; BARNES, S. Exactly which synephrine alkaloid does *Citrus aurantium* (bitter orange) contain? **International Journal of Obesity**, v. 29, p. 443-446, 2005.

ANVISA. Notícias da ANVISA: apreendidos suplementos nutricionais sem registro. Brasília, 2002. Disponível em <<http://www.anvisa.gov.br>> . Acesso em 6.6.2006.

ARBO, M. D. **Avaliação toxicológica de p-sinefrina em extratos de *Citrus aurantium* (Rutaceae)**. Dissertação de Mestrado do Curso de Pós-Graduação. Faculdade de Farmácia, UFRGS, 2008.

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, n. 6, p.1593-1606, 2005.

BARNES, S.; PRASAIN, J. K.; WANG, C-C.; MOORE, D.R. Applications of LC-MS in the study of the uptake, distribution, metabolism and excretion of bioactive polyphenols from dietary supplements. **Life Sciences**, v.78,n.18, p. 2054-2059, 2006.

BENT, S.; PADULA, A.; NEUHAUS, J. Safety and efficacy of *Citrus aurantium* for weight loss. **The American Journal of Cardiology**., v.94, n.10, p.1359-61, 2004.

BLACK, R.M.; MUIR, B. Derivatisation reactions in the chromatographic analysis of chemical warfare agents and their degradation products. **Journal of Chromatography A**, v. 1000, p.253–281, 2003.

BLAU, K.; KING, G.S. **Handbook of Derivatives for Chromatography**. London: Heyden, 1977.

BLUMENTAL, M. Bitter orange peel and synephrine. Austin, 2005. Disponível em: http://www.herbalgram.org/default.asp?c=Bitter_Orange. Acesso em 04.05.2006.

BORREY , D.; MEYER, E.; LAMBERT , W.; DE LEENHEER , A.P. Comparison of quadrupole and (quadrupole) ion-trap mass spectrometers for the analysis of benzodiazepines. **Journal of Chromatography A**, v. 819, p. 125–131, 1998.

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.

BRANCHEK, T.A.; BLACKBURN, T.P. Trace amine receptors as targets for novel therapeutics: legend, myth and fact. **Current Opinion in Pharmacology**, v.3, p. 90-97, 2003.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº. 899 de 29 de maio de 2.003. Guia para validação de métodos analíticos. D.O.U. - Diário Oficial da União, Brasília, DF, 02 de junho de 2003.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº 48 de 16 de março de 2004. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. D.O.U. Brasília, 18 de março de 2004.

BRAUM, P. **Levantamento de chás contendo espécies cítricas, comercializados em Porto Alegre e estudo da presença e teor de sinefrina.** Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação. Faculdade de Farmácia, UFRGS, 2006.

CAMEL, V. Solid phase extraction of trace elements. **Spectrochimica Acta Part B**, v.58, p. 1177–1233, 2003.

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.

CASTILHO, M. C.; SILVEIRA, M. I. N. Técnicas de derivatização química para cromatografia em fase gasosa: I – Sililação. **Revista Portuguesa de Farmácia**, v. XLVIII, n.2, p.83-90, 1998.

CHANG, H.M.; BUT PPH (Eds.). **Pharmacology and Applications of Chinese Materia Medica.** Singapore: World Scientific, 1986. 2 v.

CLARK, C.C. Determination of amphetamine by Schiff base formation and quantitative gas-liquid chromatography. **Journal of AOAC International**, v. 58, n.6, p. 1174-1177,1975.

COLKER, C.M.; KALMAN, D.S.; TORINA, G.C., PERLIS, T.; STREET. Effects of *Citrus aurantium* extract, caffeine, and St. John's Wort on body fat loss, lipid levels, and mood states in overweight healthy adults. **Current Therapeutic Research**, v.60, n.3, p. 145-153, 1999.

D'ANDREA, G.; GRANELLA, F.; LEONE, M.; PERINI, F.; GRANELLA F.; FARRUGGIO, A.; BUSSONE, G. Abnormal platelet trace amines profiles in migraine with and without aura. **Cephalgia**, v. 26, n.8, p. 968-972, 2006.

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 24.7.2006.

DIETARY Supplements: Balancing Consumer Choice & Safety. New York: New York State Task Force on Life & the Law. Disponível em <www.healthy.state.ny.us/regulations/task_force/docs/dietary_supplement_safety.pdf> Acesso em 30.5.2006.

EL-HAJ, B.M.; AL-AMRI, A.M.; HASSAN, M.H.; ALI, H.S., KHADEM, R.K. BIN. The use of cyclohexanone as a "derivatizing" reagent for the GC-MS detection of amphetamines and ephedrine in seizures and the urine. **Forensic Science International**, v. 135, p. 16-26, 2003.

EVANS, P. D.; THONOOR, C. M.; MIDGLEY, J. M. Activities of octopamine and synephrine stereoisomers on octopaminergic receptor subtypes in Locust skeletal muscle. **The Journal of Pharmacy and Pharmacology**. v. 40, n. 12, p. 855-861, 1988.

FARMACOPÉIA Portuguesa. 7. ed. Lisboa: Infarmed, 2002. 2100 p.

FIRENZUOLI, F.; GORI, L.; GALAPAI, C. Adverse reaction to an adrenergic herbal extract (*Citrus aurantium*). **Phytomedicine**, v.12, p. 247-248, 2005.

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

GANZERA, M.; LANCER, C.; STUPPNER, H. Simultaneous determination of *Ephedra sinica* and *Citrus aurantium* var. *amara* alkaloids by ion-pair chromatography. **Talanta**, v. 66, p. 889-894, 2005.

GAY, M.L.; NIEMANN, R.L.; 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, n. 2, p.285 -291, 2006.

GENPORE. **Porous plastic liquid chromatography and solid phase extraction (SPE) column frits**. Disponível em <http://www.genpore.com/spe_column_frits.htm>. Acesso em 23 de maio de 2008.

GMEFH - Gerência de medicamentos fitoterápicos e homeopáticos. *Citrus aurantium*. Mensagem recebida por gme fh@anvisa.gov.br > 7.7.2008.

GRAY, S.; WOOLF, A.D. *Citrus aurantium* used for weight loss by an adolescent with anorexia nervosa. **Journal of Adolescent Health**, v.37, p. 415-416, 2005.

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.; CHANEY-PERUMEAN, S.; ALLISON, D.B.. *Citrus aurantium* and synephrine alkaloids in the treatment of overweight and obesity: an update. **Obesity reviews**, v. 7, p. 79-88, 2006.

HALLER, C. A.; BENOWITZ, N. L.; JACOB, P. Hemodynamic effects of ephedra-free weight-loss 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: Instituto Plantarum, 2002.

HE, X.G.; LIAN, L.Z.; LIN, L.Z.; BERNART, M.W. High performance liquid chromatography-electrospray mass spectrometry in phytochemical analysis of sour orange (*Citrus aurantium* L.). **Journal of Chromatography A**, v. 791, p. 127-134, 1997.

HOSODA, K.; NOGUCHI, M. KANAYA, T.; HIGUCHI, M. Studies on the preparation and evaluation of Kijitsu, the immature citrus fruits. III. Relation between diameter of Kijitsu and synephrine content. **Yakugaku Zasshi**, v. 110, p. 82-84, 1990.

HUIE, C.W. A review of modern sample-preparation techniques for the extraction and analysis of medicinal plants. **Analytical of Bionalytical Chemistry**, v.373, p.23-30, 2002.

IKEMOTO, Y.; MATSUZAWA, Y.; MIZUTANI, J. The effect of antifeedants against the level of biogenic amines in the central nervous system of the Lepidopteran insect (*Spodoptera litura*). **Pesticide Biochemistry Physiology**, v. 52, 60, 1995

JONSCHER, K.R.; YATES, J.R. The quadrupole ion trap mass spectrometer – a small solution to a big challenge. **Analytical Biochemistry**, v. 244, p.1-15, 1997.

KATAOKA, H. Derivatization reactions for the determination of amines by gas chromatography and their applications in environmental analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 733, p.19-34, 1996.

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 of Pharmacology**, v. 364, p.21-26, 2001.

KÖNIG, W.A.; GYLLENHAAL, O.; VESSMAN, J.. Enantiomer separation of phenolic α and β -receptor active drugs by chiral capillary gas chromatography after derivatization with diazomethane and phosgene. **Journal of Chromatography A**, v. 356, p.354-358, 1986.

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.

LANÇAS, F.M. **Extração em fase sólida (SPE)**. São Carlos: RiMa, 2004.

LEHTELÄ, P.; SMOLANDER, R.; VAINIOTALO, P. Mass spectrometric behaviour of simpler oxazolidines under electron impact and chemical ionization. **Organic Mass Spectrometry**, v.29, p.647-653, 1994.

LINCK, V.M. **Citrus aurantium: Comercialização e dispensação na cidade de Esteio/RS**. Trabalho de Conclusão do Curso de Farmácia, Porto Alegre: Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, 2005.

LINDEMANN, L.; HOENER, M.C. A renaissance in trace amines inspired by a novel GCPR family. **TRENDS in Pharmacological Sciences**, v.26, n.5, p. 274-281, 2005.

MARCH, R. E. A. An introduction to quadrupole ion trap mass spectrometry. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 32, p. 351-369, 1997.

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.

MARCUS, D.M.; GROLLMAN, A.P. Ephedra-free is not danger-free. **Science**, v.301, p. 1669-1671, 2003.

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.

MIDGLEY, J.M.; THONOOR, C.M.; DRAKE, A.F.; WILLIAMS, C.L.; KOZIOL, A.E.; PALENIK, G.J. The resolution and absolute configuration by X-Ray Crystallography of the isomeric octopamines and synephrines. **Journal of Chemical Society Perkin Transactions 2**, v.1, p. 963-969, 1989.

NEELAKANTAN, L. Asymmetric synthesis. II. Synthesis and absolute configuration of oxazolidines derived from (-)-ephedrine and aromatic aldehydes. **Journal of Organic Chemistry**, v.36 (16), p.2256-2260, 1971.

NELSON, B.C.; PUTZBACH, K.; SHARPLESS, K.E.; SANDER, L.C. Mass spectrometric determination of the predominant adrenergic protoalkaloids in bitter orange (*Citrus aurantium*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 9769-9775, 2007.

NICHOLSON, J.D. Derivative formation in the quantitative gas-chromatographic analysis of pharmaceuticals. Part I. **The Analyst**, v.103, n. 1222, p. 1-29, 1978a.

NICHOLSON, J.D. Derivative formation in the quantitative gas-chromatographic analysis of pharmaceuticals. Part II. **The Analyst**, v.103, n. 1224, p. 193-223, 1978b.

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 ultraviolet and fluorescence detection. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p.5630-5638, 2003.

NYIREDY, S. Separation strategies of plant constituents-current status. **Journal of Chromatography B**, v. 812, p. 35-51, 2004.

OHTA, I. Determination of synephrine in oriental pharmaceutical decoctions containing *Aurantii nobilis pericarpium* by ion-pair high-performance liquid chromatography. **Yakugaku Zasshi**, v.114, n.9, p. 691-696, 1994.

ONG, E.S. Extraction methods and chemical standardization of botanicals and herbal preparations. **Journal of Chromatography B**, v. 812, p.23–33, 2004

PELLATI, F.; BENVENUTI, S.; MELEGARI, M., FIRENZUOLI, F. Determination of adrenergic 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.839-849, 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.

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.

PENZAK, S.R.; JANN, M. W.; COLD, J.A., HON, Y.Y.; DESAI, H. D.; GURLEY, B. J. Effects of seville orange juice in normotensive adults. **Journal of Clinical Pharmacology**, v. 41, p. 1059-1063, 2001.

PHARMACOPOEIA of Japan. 14^a ed. Tokio: Society of Japanese Pharmacopoeia, 2001.

POUCHERT, C.J. **The Aldrich Library of Infrared Spectra**. 3 ed. Milwaukee: Aldrich Chemical Company, 1981. 1873 p.

PRETSCH, E.; BÜHLMANN, P.; AFFOLTER, C. **Structure Determination of Organic Compounds: tables of spectral data**. Berlin: Springer, 1983.

PUTZBACH, K.; RIMMER, C.A.; SHARPLESS, K.E.; WISE, S.A., SANDER, L.C. Determination of bitter orange alkaloids in dietary supplement standard reference materials by liquid chromatography with atmospheric-pressure ionization mass spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 389, n.1, p. 197-205, 2007a.

PUTZBACH, K.; RIMMER, C.A.; SHARPLESS, K.E.; SANDER, L.C. Determination of bitter orange alkaloids in dietary supplements standard reference materials by liquid chromatography with ultraviolet absorbance and fluorescence detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1156, p. 304-311, 2007b.

QUINTEROS, V.A. **Consumo de suplementos alimentares por freqüentadores de academias de ginástica de Porto Alegre**. Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação. Faculdade de Farmácia, UFRGS, 2006.

RENNEKAMP, M.E.; PAUKSTELIS, J.V.; COOKS, R.G. An investigation into the mechanism of gas-phase tautomerism using mass spectrometry. **Tetrahedron**, v. 27, p. 4407-4415, 1971.

SANDER, L.; SHARPLESS, K.E.; SATTERFIELD, M.B.; IHARA, T.; PHINNEY, K.W.; YEN, J.H.; WISE, S.A.; GAY, M. L.; LAM, J.W.; MCCOOEYE, M.; GARDNER, G.; FRASER, C.; STURGEON, R.; ROMAN, M. Determination of ephedrine alkaloids in dietary supplement standard reference materials. **Analytical Chemistry**, v.77, n,10, p.3101-3112, 2005.

SANDER, L.C.; SHARPLESS, K.E.; WISE, S.A. Dietary supplement standard reference materials. **Life Sciences**, v.78, p.2044-2048, 2006.

SCHEKELLE P.; MORTON,S.; MAGLIONE, M. **Ephedra and ephedrine for weight loss and athletic performance enhancement: clinical efficacy and side effects**. Disponível em ><http://www.fda.gov/ohrms/dockets/98fr/95n-0304-bkg-ref-07-01-index.htm>>. Acesso em 1.06.2006.

SEBBEN, V.C. **Análise de efedrinas e anfetamina e urina empregando SPE e SPME por CG/EM/EM.** Dissertação de Mestrado do Curso de Pós-Graduação. Faculdade de Farmácia, UFRGS, 2007.

SEGURA, J.; VENTURA, R.; JURADO, C. Derivatization procedures for gas chromatographic-mass spectrometric determination of xenobiotics in biological samples, with special attention to drugs of abuse and doping agents. **Journal of Chromatography B**, v.713, p.61-90, 1998.

SILVERSTEIN, R.M.; WEBSTER, F.X. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos.** Rio de Janeiro: LTC, 2000. 460 p.

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.

SOCRATES, G. **Infrared characteristic group frequencies: tables and charts.** 2 ed. Chichester: John Wiley & Sons, 1994. 249 p.

SPARKMAN, D. New generation ion trap GC/MS technology axial modulation. In: **GC/MS Varian application note**, n.6. Disponível em <http://www.varianinc.com/media/sci/apps/qcms06.pdf>. Acesso em: 12.05.2008.

STEWART, I.. The isolation and identification of *l*-synephrine in the leaves and fruit of *Citrus*. **The Journal of Biological Chemistry**, v.239, n. 3, p.930-932, 1964.

SUPELCO. Supelco solid phase extraction products. Disponível em http://www.sigmaaldrich.com/supelco/general_information/t402150.pdf >. Acesso em 05 de maio de 2008.

TRACY, T.S.; KINGSTON, R.L. (Ed.). **Book Herbal Products: toxicology and clinical pharmacology.** 2. ed. Totowa: Human Press, p.233-243, 2007.

THE MERCK INDEX: an encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals. 13 ed. Whitehouse Station, NJ: Merck Research Laboratories, 2001.

VAINIOTALO, P.; RONKANEN, S.; FÜLOP, F.; PIHLAJA, K. Gas-phase ring-chain tautomerism in 1,3-oxazolidines. **Tetrahedron**, v.46, n.10, p. 3683-3692, 1990.

VALENTINE, J.L.; MIDDLETON, R. Identification of sympathomimetic amine drugs in urine: rapid methodology applicable for emergency clinical toxicology. **Journal of Analytical Toxicology**, v.24, p. 221-222, 2000.

VIEIRA, S.M.; THEODORO, K.H.; GLÓRIA, M.B.A. Profile and levels of bioactive amines in orange juice and orange soft drink. **Food Chemistry**, v.100, p.895-903, 2007.

WALKER, R.B.; MASSEY, M.D. A study of the mass spectra of some oxazolidines derived from ephedrine and pseudoephedrine. **Organic Mass Spectrometry**, v. 23, p. 215-216, 1988.

WALKER, R.B.; MOORE, D.S.; MASSEY, M.D. Mass spectra of some oxazolidines formed by reaction of ephedrine and pseudoephedrine with aliphatic ketones. **Organic Mass Spectrometry**, v. 24, p. 345-346, 1989.

WHEATON, T. A; STEWART, I. Biosynthesis of synephrine in *Citrus*. **Phytochemistry**, v. 8, p. 85-92, 1969.

WHEATON, T. A; STEWART, I. The distribution of tyramine, *N*-methyltyramine, hordenine, octopamine, and synephrine in higher plants. **Lloydia**, v. 33, n.2, p. 244-254, 1970.

WHO. **Boletim informativo da OMS sobre produtos farmacêuticos**. Suécia, 2004. Disponível em <<http://www.emea.eu.int>>. Acesso em 6.6.2006.

YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B. Plantas medicinais sob a ótica da moderna química medicinal. Chapecó: Argos, 2001. 500 p.

ANEXOS

ANEXO A - Espectros de ressonância magnética nuclear (RMN) de ^1H e de ^{13}C

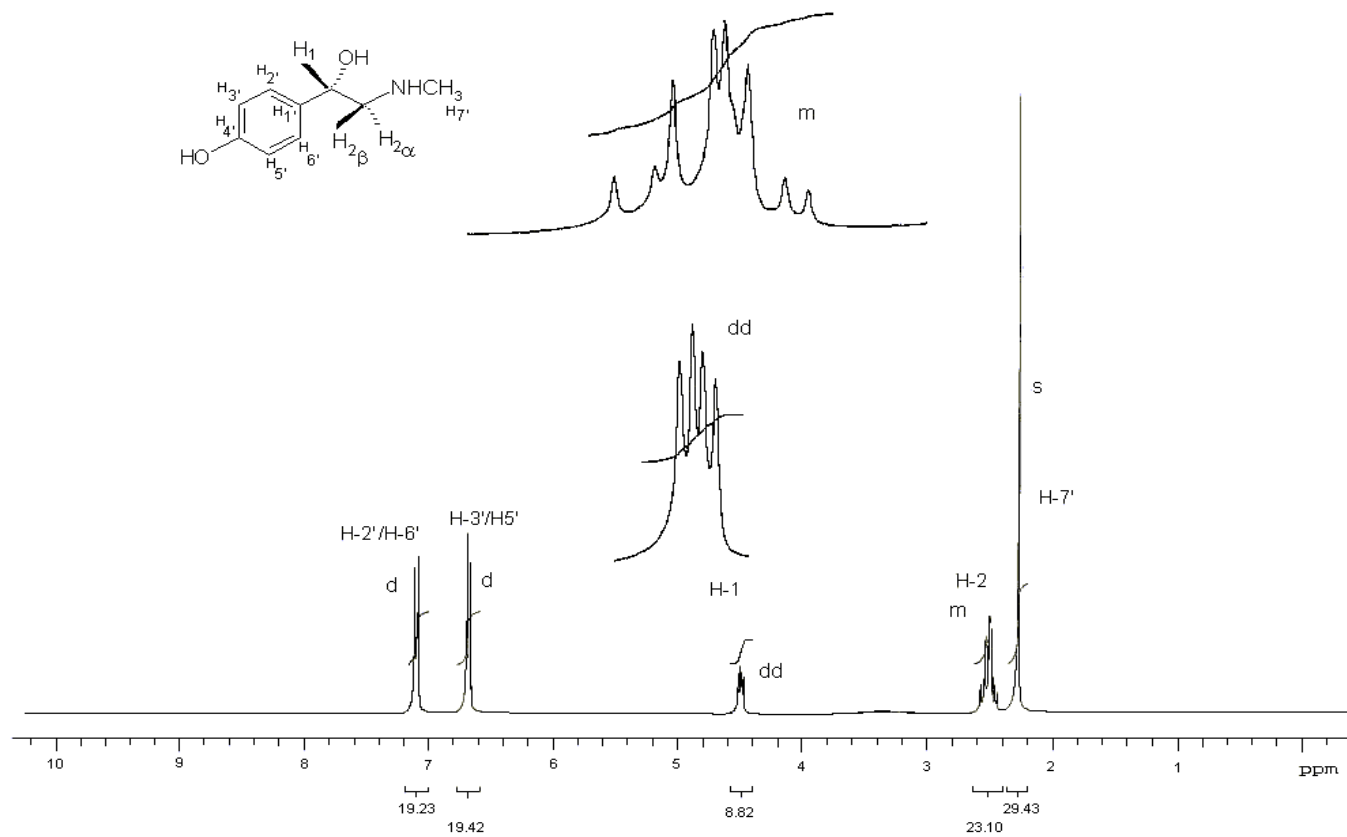


Figura 01: Espectro de RMN ¹H da (±)-*p*-sinefrina obtido em dimetilsulfóxido (dms0-d⁶), 300 MHz, no equipamento VNMRS-300 Varian®.

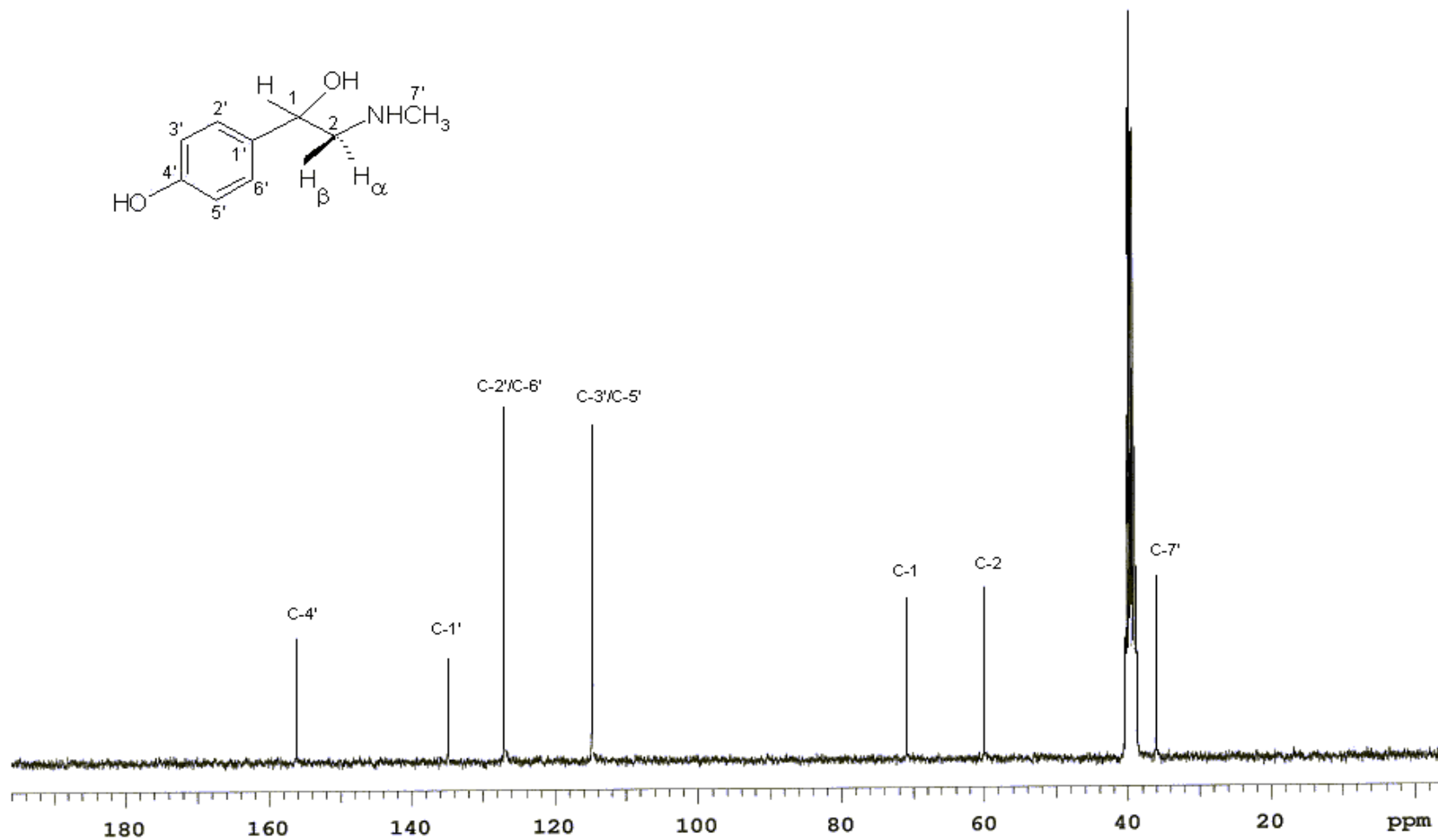


Figura 02: Espectro de RMN ¹³C da (±)-*p*-sinefrina obtido em dimetilsulfóxido (dms_o-d₆), 75,4 MHz, no equipamento VNMRS-300 Varian®.

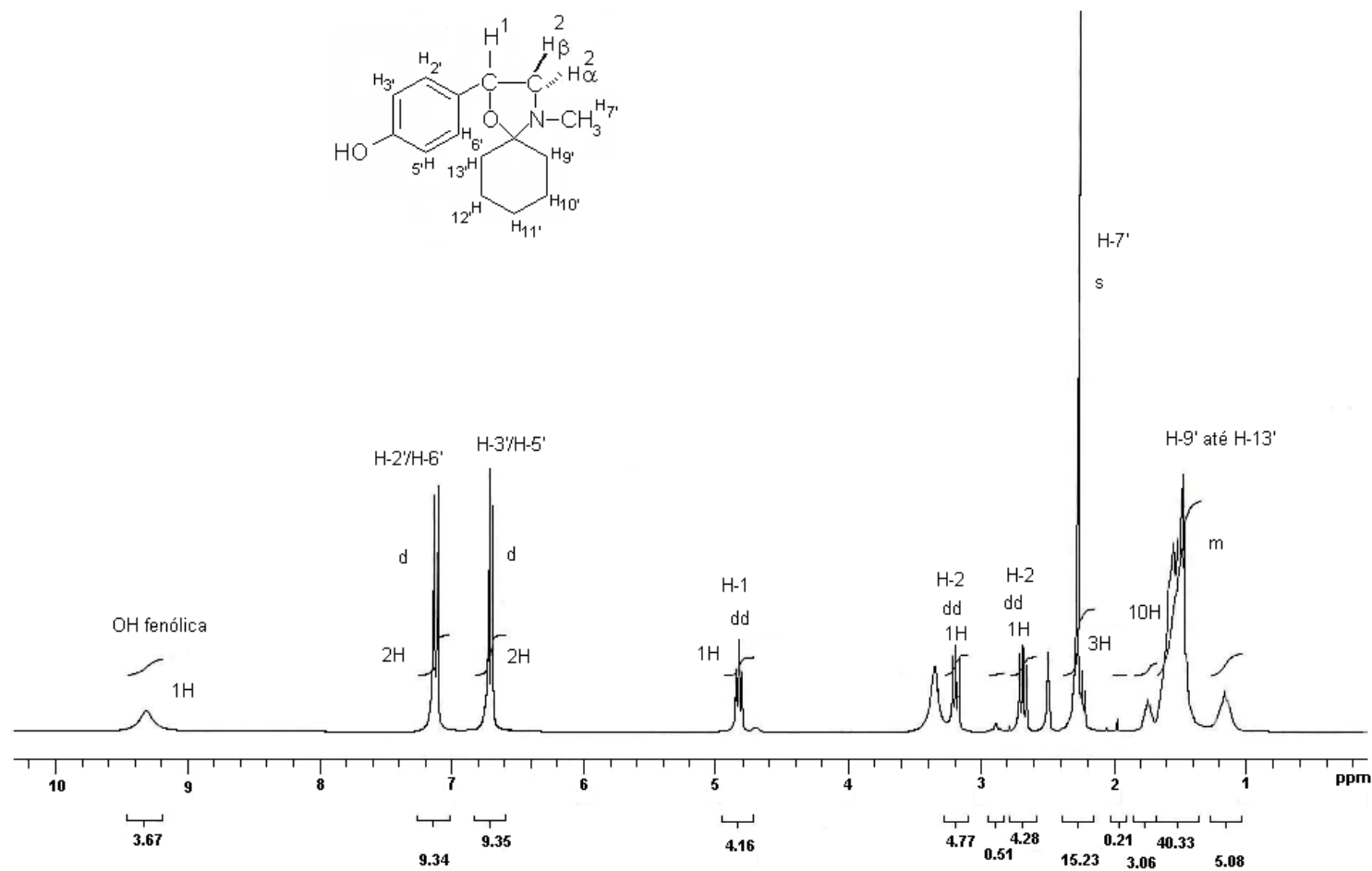


Figura 03: Espectro de RMN ¹H da oxazolidina empregando-se PR-5 (90 μmol de (±)-*p*-sinefrina, 900 μmol de CH, 100°C, 60 min), obtido em dimetilsulfóxido (dmsO-d⁶), 300 MHz, no equipamento VNMR-300 Varian®.

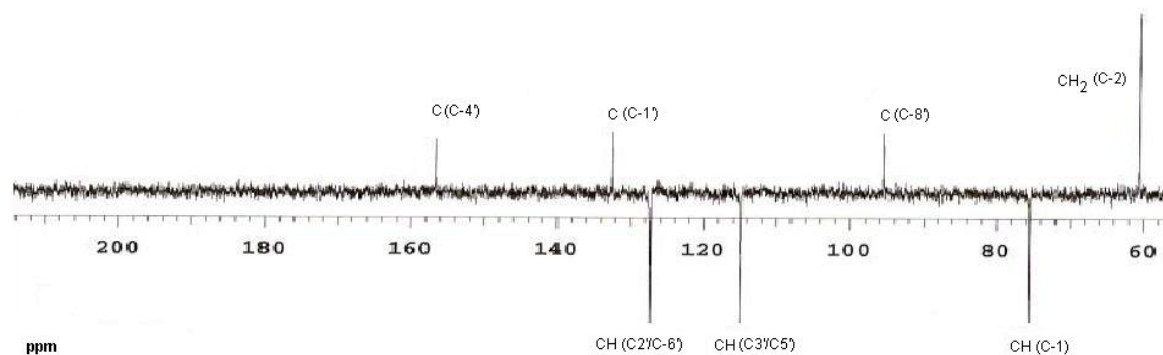
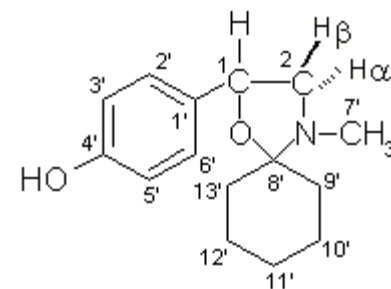
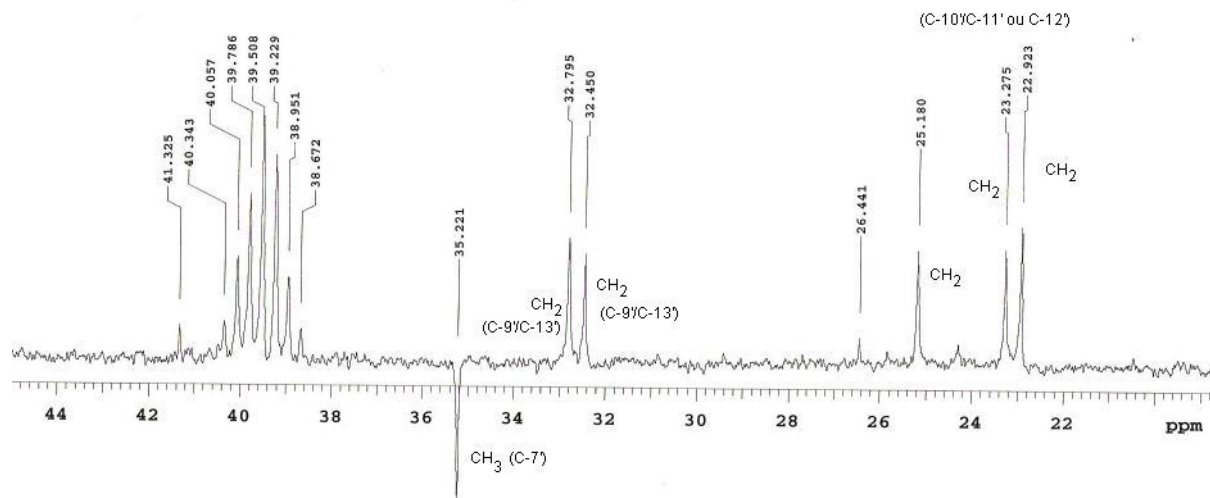


Figura 04: Espectro de RMN ^{13}C da oxazolidina obtida empregando-se PR-5 (90 μmol de (\pm)-*p*-sinefrina, 900 μmol de CH, 100°C, 60 min), obtido em dimetilsulfóxido ($\text{dms}\text{-d}^6$), 75,4 MHz, no equipamento VNMRS-300 Varian®.

ANEXO B – Espectros de Infravermelho (IV)

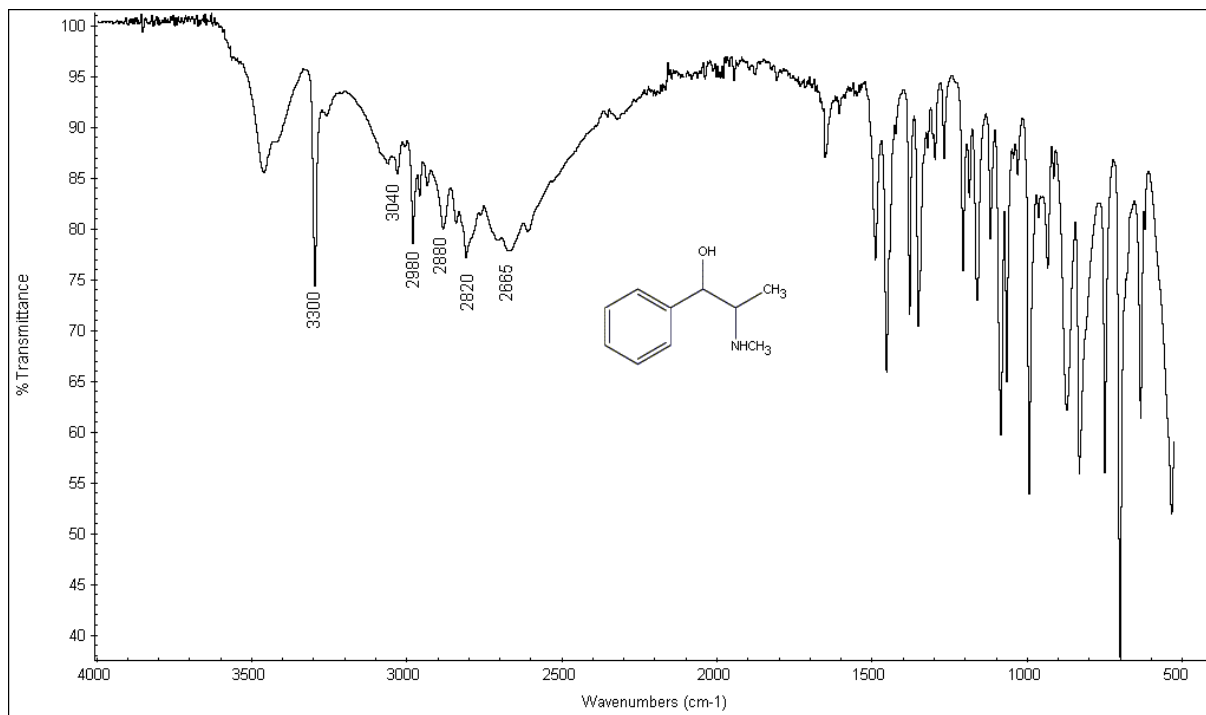


Figura 01: Espectro de absorção na região do infravermelho (IV) da efedrina base livre obtido no equipamento Nicolet 380 com acessório de Refletância Total Atenuada (ATR) da Thermo Electron®.

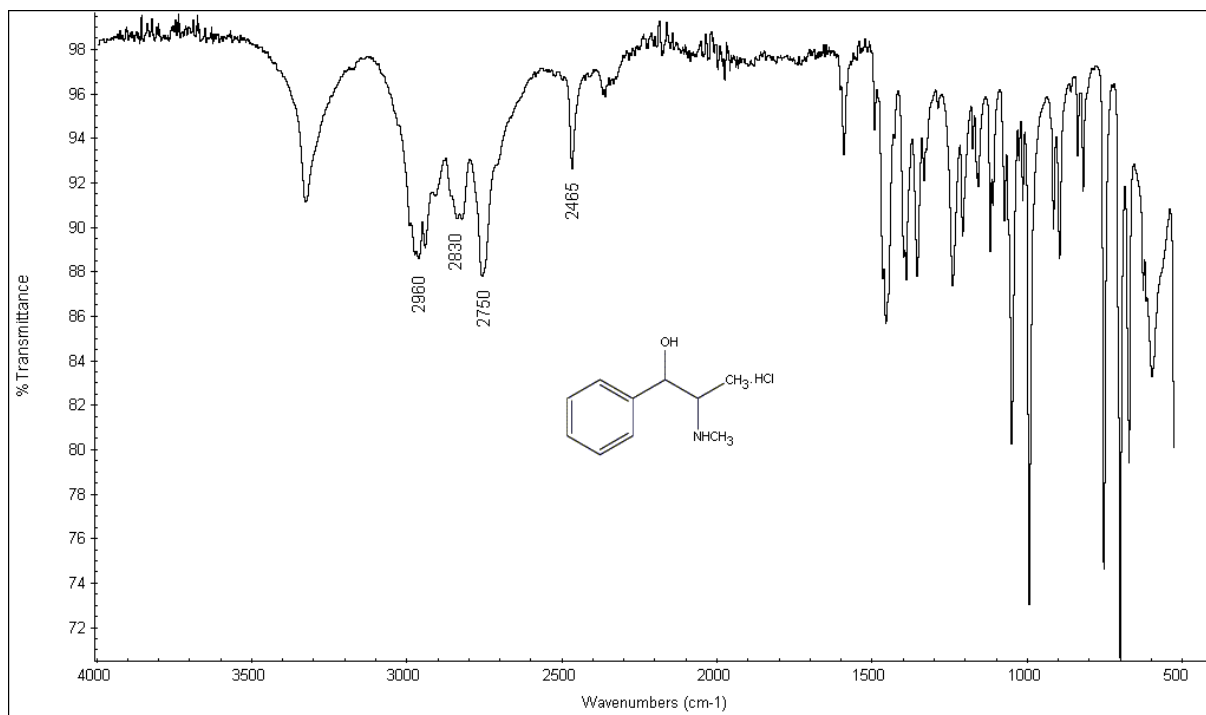


Figura 02: Espectro de absorção na região do infravermelho (IV) de efedrina.HCl obtido no equipamento Nicolet 380 com acessório de Refletância Total Atenuada (ATR) da Thermo Electron®.

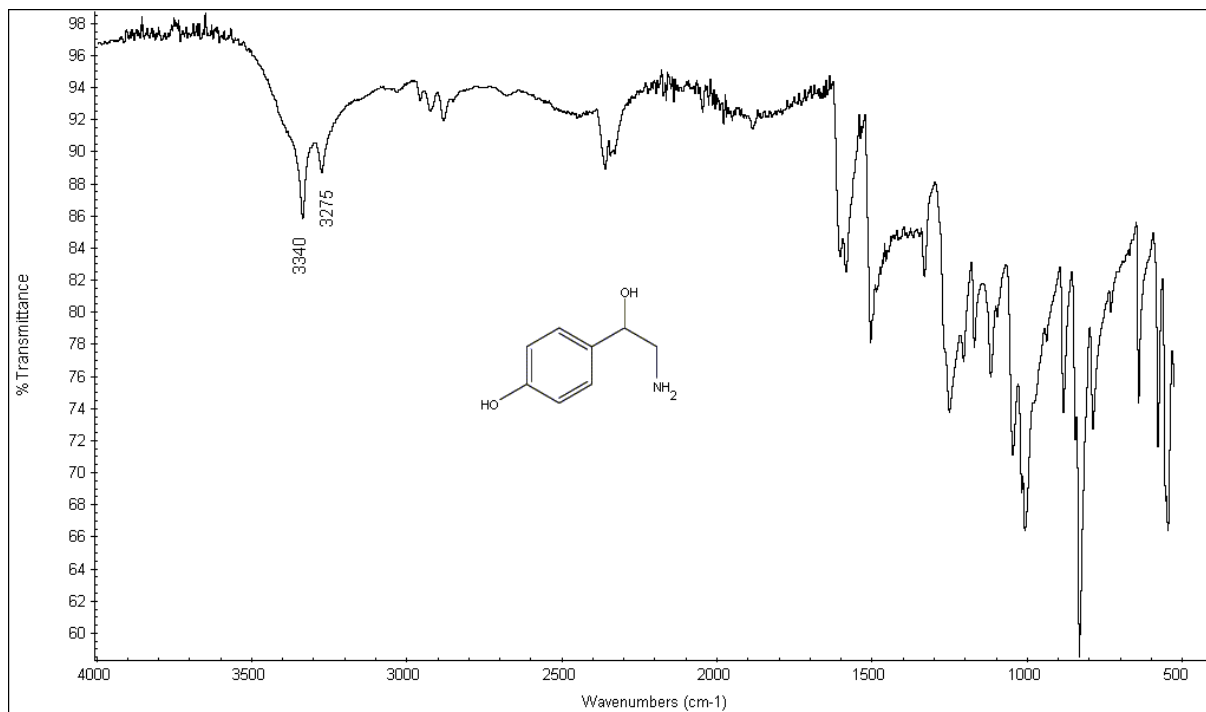


Figura 03: Espectro de absorção na região do infravermelho (IV) da octopamina base livre obtido no equipamento Nicolet 380 com acessório de Refletância Total Atenuada (ATR) da Thermo Electron®.

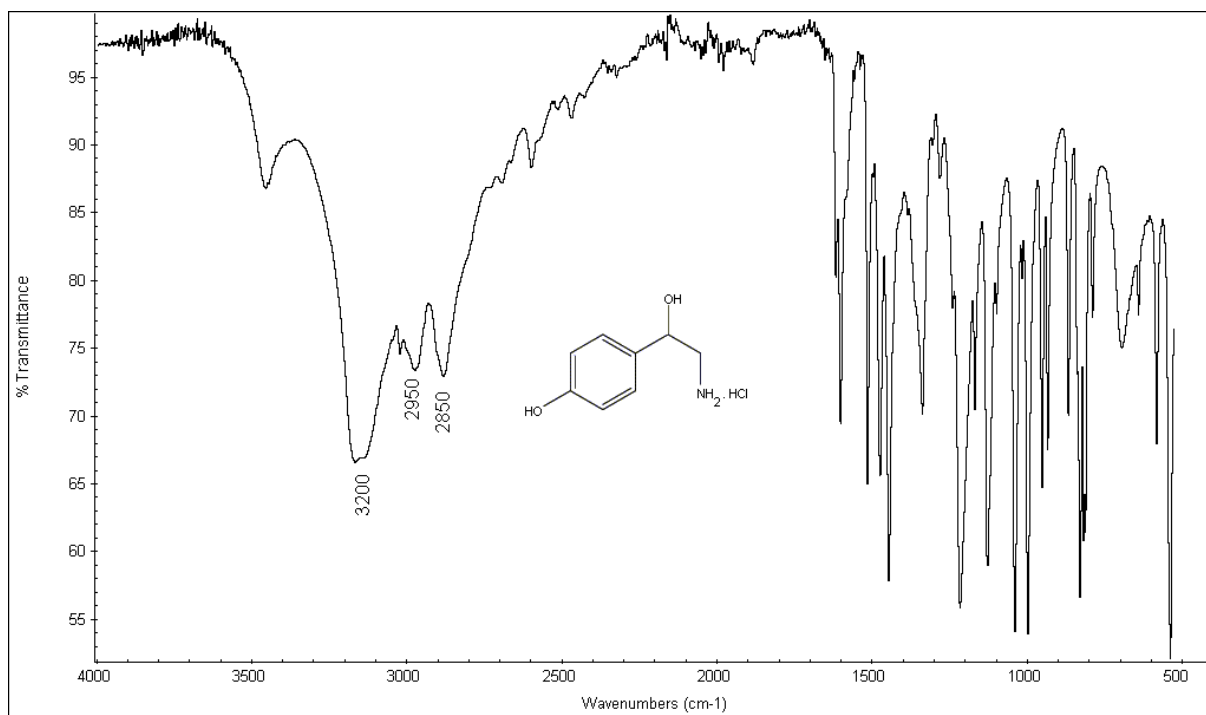


Figura 04: Espectro de absorção na região do infravermelho de octopamina.HCl. obtido no equipamento Nicolet 380 acoplado com acessório de Refletância Total Atenuada (ATR) da Thermo Electron®.

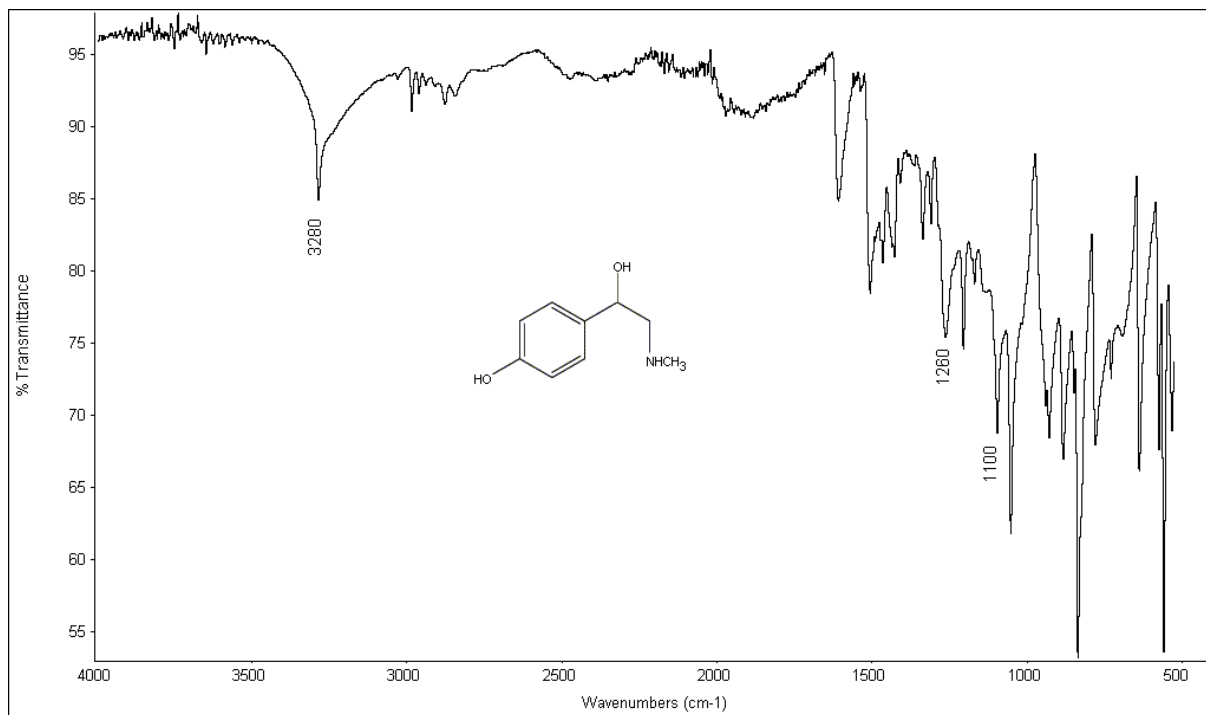


Figura 05: Espectro de absorção na região do infravermelho da base livre de (±)-*p*-sinefrina obtido no equipamento Nicolet 380 acoplado ao acessório de Refletância Total Atenuada (ATR) da Thermo Electron®.

ANEXO C – Cromatogramas/Espectros de Massa
CG/EM Shimadzu® (modo SIM)
CG/EM Varian® (modo *full-scan*)

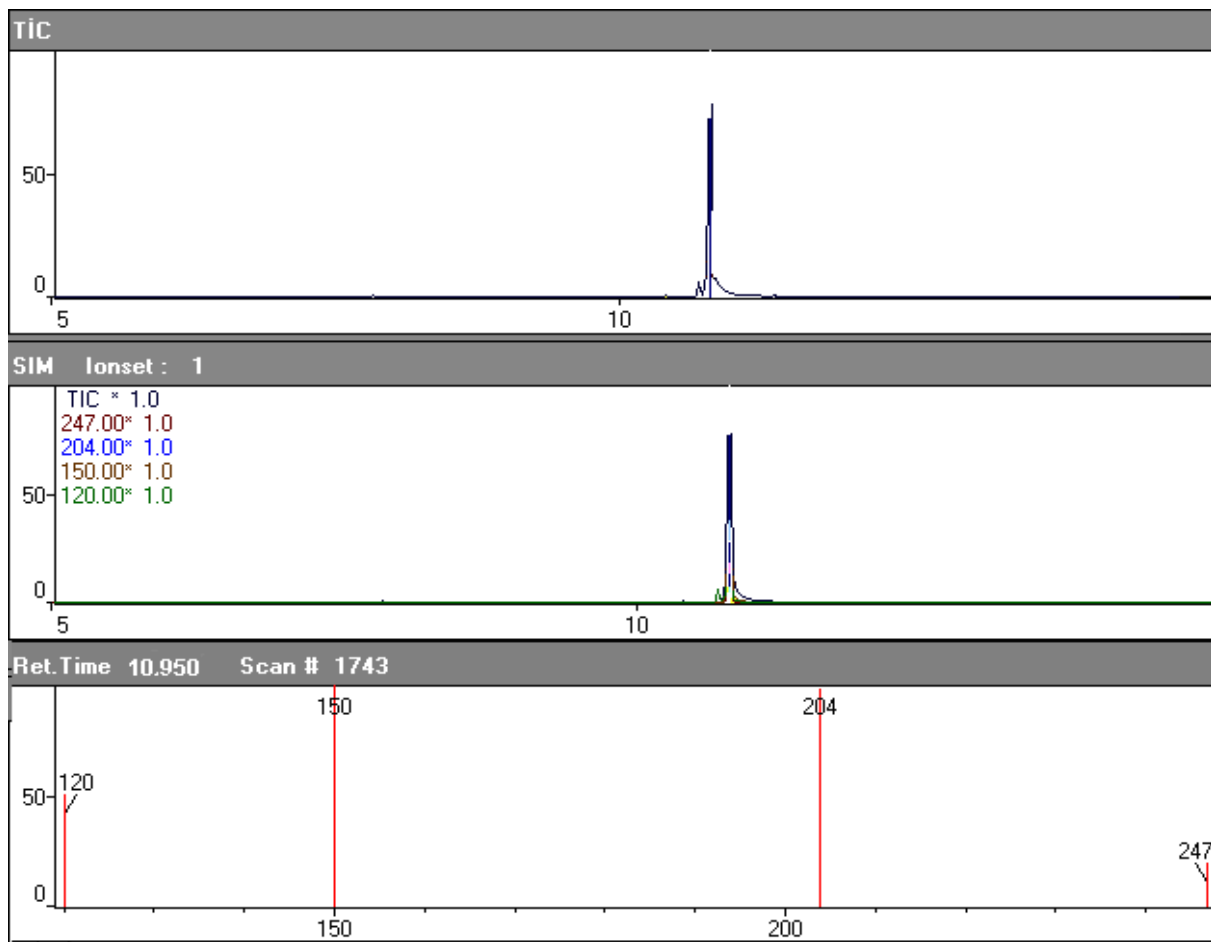


Figura 01: Cromatograma/espectro de massa do derivado oxazolidina do padrão de *p*-sinefrina (60 mg%) obtido após a derivação com ciclohexanona (CH) e análise por CG/EM Shimadzu® no modo *single ion monitoring* (SIM).

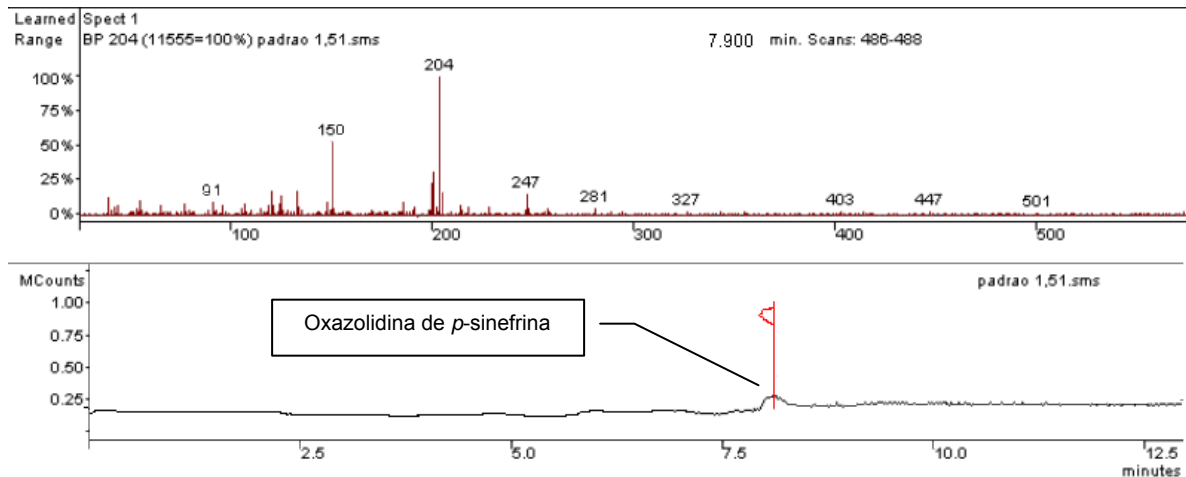


Figura 02: Cromatograma/espectro de massa do derivado oxazolidina do padrão de *p*-sinefrina (1,51 mg%) obtido após a derivação com a ciclohexanona (CH) e análise por CG/EM Varian® no modo *full-scan*.