

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
**FACULDADE DE FARMÁCIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**JOSÉ HUGO DE SOUSA GOMES**

**ESTABILIDADE DE L-(+)-BORNESITOL, MARCADOR QUÍMICO DE**  
***Hancornia speciosa* GOMES, FRENTE A DIFERENTES CONDIÇÕES DE**  
**ESTRESSE**

**Belo Horizonte – MG**

**2016**

**JOSÉ HUGO DE SOUSA GOMES**

**ESTABILIDADE DE L-(+)-BORNESITOL, MARCADOR QUÍMICO DE  
*Hancornia speciosa* GOMES, FRENTE A DIFERENTES CONDIÇÕES DE  
ESTRESSE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Área de concentração: Fármacos e medicamentos

Orientador: Prof. Dr. Fernão Castro Braga, FAFAR, UFMG

Co-Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Maia de Pádua

Belo Horizonte – MG

2016

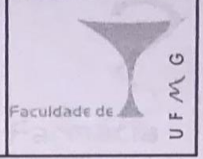
G633e Gomes, José Hugo de Sousa.  
Estabilidade de L-(+)-bornesitol, marcador químico de *Hancornia speciosa* Gomes, frente a diferentes condições de estresse / José Hugo de Sousa Gomes. – 2016.  
129 f. : il.

Orientador: Fernão Castro Braga.  
Coorientador: Rodrigo Maia de Pádua.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

1. Apocinaceas – Teses. 2. Mangaba – Teses. 3. Bornesitol – Teses. 4. Marcadores biológicos – Teses. 5. Produtos naturais – Teses. 6. Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência – Teses. 7. Espectrometria de massa – Teses. 8. Efeito matriz – Teses. 9. Validação de método – Teses. I. Braga, Fernão Castro. II. Pádua, Rodrigo Maia de. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. IV. Título.

CDD: 615.321



## FOLHA DE APROVAÇÃO

**Estabilidade de L-(+)-bornesitol, marcador químico de *Hancornia speciosa* Gomes, frente a diferentes condições de estresse**

### JOSÉ HUGO DE SOUSA GOMES

Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, como requisito para obtenção do grau de Mestre em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, área de concentração CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS.

Aprovada em 26 de fevereiro de 2016, pela banca constituída pelos membros:

Dr. Markus Kohlhoff  
Centro de Pesquisas René Rachou

Profa. Isabela da Costa César  
UFMG

Prof. Rodrigo Maia de Pádua - Coorientador  
UFMG

Prof. Fernão Castro Braga - Orientador  
UFMG

Belo Horizonte, 26 de fevereiro de 2016.

*Às quatro mulheres que me ensinam  
a ser homem.*

## AGRADECIMENTOS

Ao Professor Fernão Castro Braga, pela inestimável orientação, confiança, conselhos, compreensão e ensinamentos. Meu espelho profissional e exemplo de ser humano. Obrigado por tudo, Fernão.

Ao Professor Rodrigo Maia de Pádua, pela paciência, bom humor, carinho e auxílio de sempre. Obrigado por segurar minha mão e me ajudar a andar pelos tortuosos caminhos da Fitoquímica.

Aos professores Rosemeire, Rossimiriam, Ricardo e Rachel por aumentar meu senso crítico.

Ao professor Christian e a Naialy do Laboratório de Controle de Qualidade da UFMG pela contribuição intelectual.

Ao Diego, por escutar minhas lamúrias, pela amizade e disponibilidade de sempre.

À Mari pelo carinho, amizade e tranquilidade nos momentos de tormenta.

À Raquel pelo apoio técnico, por me contestar e me mostrar outros pontos de vista. Te admiro como mulher e profissional.

Aos amigos do Laboratório de Fitoquímica Ana Bárbara, Bárbara, Carol, Celinho, Douglas, Elisângela, Grasi, Juliana Amorim, Juma, Juliana Almeida, Kamilinha, Luana, Mariana Pádua, Maria Fernanda, Prof. Alaíde, Rafael e Tati, pela convivência harmoniosa, e pelos cafés renovadores.

Aos pilares que suportaram todo meu crescimento pessoal e profissional: minha mãe, Lee e minha avó. Tudo isso é de vocês.

À minha pequena mas indispensável família, minha esposa Luciana e meu Tuco. Obrigado pela compreensão, paciência, ajuda e amor. Não seria possível sem você.

À todos os funcionários da Faculdade de Farmácia da UFMG.

À CAPES pelo apoio financeiro.

À Deus, que tornou tudo isso possível.

*“A experiência nunca falha,  
apenas as nossas opiniões falham,  
ao esperar da experiência  
aquilo que ela não é capaz de oferecer.”*  
(Leonardo da Vinci)

## RESUMO

*Hancornia speciosa* Gomes (Apocynaceae), popularmente conhecida como mangaba, teve sua potencial atividade anti-hipertensiva demonstrada em trabalhos anteriores do nosso grupo de pesquisa, atividade esta relacionada à presença de polifenóis e ciclitóis. O presente trabalho teve como objetivo avaliar a estabilidade do ciclitol L-(+)-bornesitol, definido como marcador químico da espécie, em diferentes condições de estresse: degradação ácida, degradação básica, hidrólise neutra, degradação oxidativa, fotólise, termólise e degradação por íons metálicos. Para tanto, foi obtido um extrato em MeOH/EtOAc (1:1) de folhas de *H. speciosa*, a partir do qual foi isolado o bornesitol, com rendimento de 1,45% m/m. Para avaliar a estabilidade do bornesitol, foi desenvolvido um método de UPLC-MS/MS no modo de aquisição MRM (*Multiple Reaction Monitoring*) e ionização em modo negativo, baseado em duas transições observadas para o analito, uma específica ( $m/z$  193  $\rightarrow$  161 Da) e outra confirmatória ( $m/z$  193  $\rightarrow$  175 Da). O método foi validado e apresentou linearidade ( $r^2 > 0,99$ ), seletividade, especificidade e precisão (DPR  $< 2,9\%$ ) satisfatórias. Não foi possível determinar a exatidão do método a partir de estudos de recuperação. O método mostrou-se robusto para variações na temperatura de dessolvatação (440 e 460 °C), mas não para alterações no fluxo (0,24 e 0,36 mL/min) e gás de dessolvatação (840 e 960 L/h). Durante o desenvolvimento do método, observou-se a supressão do sinal do bornesitol induzida pelo cloreto de sódio presente na matriz, o qual foi eliminado pela extração da amostra com piridina. Os resultados dos estudos de estabilidade, baseados na quantificação do teor de bornesitol (%  $\pm$  d.p. m/m), possibilitaram classificá-lo como lábil frente à hidrólise ácida (71,96  $\pm$  96%) e básica (77,37  $\pm$  6,74%). Para as condições de degradação oxidativa e hidrólise neutra, o analito foi classificado como muito estável (90,09  $\pm$  0,56% e 74,97  $\pm$  0,52%, respectivamente). Nos estudos de fotólise, o bornesitol foi classificado como praticamente estável (98,78  $\pm$  1,5%). Já os estudos de degradação por íons metálicos (34,67  $\pm$  3,67) e termólise (79,70  $\pm$  1,13%) indicaram significativa redução no teor de bornesitol. O presente estudo forneceu dados inéditos sobre a estabilidade do bornesitol frente a diferentes condições de estresse, os quais são relevantes para o desenvolvimento e o controle de qualidade de derivados da droga vegetal folhas de *H. speciosa*.



**Palavras-chaves:** *Hancornia speciosa*. L-(+)-bornesitol. Quantificação. UPLC-MS/MS. MRM. Efeito matriz. Degradação.

## ABSTRACT

*Hancornia speciosa* Gomes, a plant species popularly known as “mangaba”, had its potential antihypertensive activity previously demonstrated by our research group, being the activity ascribed to polyphenols and cyclitols like L-(+)-bornesitol. The goal of this work was to evaluate the stability of the chemical marker bornesitol submitted to different stress conditions, namely acidic, alkaline and neutral hydrolysis, oxidative degradation, photolysis, thermal degradation and metal ion degradation. An extract of *H. speciosa* leaves was obtained by percolation with methanol/ethyl acetate (1:1) and its fractionation afforded bornesitol (1.45% w/w). To evaluate bornesitol stability, an UPLC-MS/MS method was developed based on the MRM (*Multiple Reaction Monitoring*) acquisition mode and negative ionization mode, employing a specific ( $m/z$  193  $\rightarrow$  161 Da) and a confirmatory transition ( $m/z$  193  $\rightarrow$  175). The method was validated and showed adequate linearity ( $r^2 > 0.99$ ), selectivity, specificity and precision (RSD < 2.9%). It was not possible to evaluate method accuracy by recovery studies. The method was robust for deliberate variations on desolvation temperature (440 and 460 °C), but not for changes in the flow rate (90.24 and 0.36 mL/min) and desolvation gas (840 and 960 L/h). During method development, the bornesitol signal was suppressed by the sodium chloride found in the matrix, which was eliminated by sample extraction with pyridine. The results from the stability studies, based on quantitation of bornesitol content (%  $\pm$  s.d. w/w), allowed us to classify it as labile for acidic (71.96  $\pm$  96%) and alkaline hydrolysis (77.37  $\pm$  6.74%), whereas under oxidative and neutral hydrolysis conditions, bornesitol was regarded as very stable (90.09  $\pm$  0.56% and 74.97  $\pm$  0.52%, respectively). In the photolysis degradation, the cyclitol was classified as practically stable (98.78  $\pm$  1.5%). A considerable reduction in bornesitol contents was induced by metal ions (34.67  $\pm$  3.67%) and thermolysis (79.70  $\pm$  1.13%). The present work furnished new data on bornesitol stability under different stress conditions, which might be relevant for the development and quality control of derivatives from *H. speciosa* leaves.

**Keywords:** *Hancornia speciosa*. L-(+)-bornesitol. Quantitation. UPLC-MS/MS. MRM. Matrix effect. Stability studies.

## LISTA DE FIGURAS

1	Representação da oxidação do D-(+)-bornesitol.....	38
2	Reatividade do bornesitol em meio de ácido iodídrico concentrado, sob aquecimento.....	38
3	Reatividade do bornesitol em acetona na presença de ácido acético e cloreto zinco, sob condições anidras.....	39
4	Oxidação catalítica de mio-inositol. Fonte: Post & Anderson, 1961.....	39
5	Oxidação catalítica do quebrachitol e pinitol com O <sub>2</sub> em presença de Platina. Fonte: Post & Anderson, 1961.....	40
6	Fluxograma do processo de precipitação do extrato de <i>H. speciosa</i> com acetato de etila.....	50
7	Fluxograma da purificação de PptTOTAL com carvão ativado.....	51
8	Estrutura química do bornesitol.....	71
9	Perfil cromatográfico obtido por CCD, para extrato seco EtOAc:MeOH (1:1) (A) de <i>Hancornia speciosa</i> , PptTOTAL (B) e padrão de bornesitol (C). Revelador: KMnO <sub>4</sub> 0,5% em NaOH 1,0 N. Eluente: Água:EtOAc:MeOH (6:11:83).....	72
10	Perfil cromatográfico obtido por CCD, para extrato seco EtOAc:MeOH (1:1) (A) de <i>Hancornia speciosa</i> , Fase orgânica em diferentes concentrações (B / E), PptTOTAL (C), f <sub>aca</sub> (D), e padrão de bornesitol (F) e rutina (G). Revelador: KMnO <sub>4</sub> 0,5% em NaOH 1,0 N. Eluente: Água:EtOAc:MeOH (6:11:83).....	73
11	Cromatogramas obtidos por UPLC-DAD para solução de referência de bornesitol, e soluções submetidas à degradação ácida, básica e oxidativa. Condições cromatográficas: vide item 4.5.3.....	75
12	Cromatogramas obtidos por UPLC-MS operando em modo de ionização positivo para solução de referência de bornesitol, e soluções submetidas à degradação ácida, básica e oxidativa. Condições cromatográficas: vide item 4.5.3. O pico correspondente ao bornesitol está indicado pela seta (t <sub>r</sub> = 2,7 min).....	76
13	Cromatogramas obtidos por UPLC-MS operando em modo de ionização negativo para solução de referência de bornesitol e soluções submetidas à degradação ácida, básica e oxidativa. Condições cromatográficas: vide item 4.5.3. O pico correspondente ao bornesitol está indicado pela seta (t <sub>r</sub> = 2,7 min).....	76
14	Espectro de MS obtido <i>on line</i> no modo ESI+ para o pico com t <sub>r</sub> =2,7 min (bornesitol), indicando os adutos e fragmentos identificados.....	77
15	Espectro de MS obtido <i>on line</i> no modo ESI- para o pico com t <sub>r</sub> =2,7 min (bornesitol), indicando os adutos e fragmentos identificados.....	77

<b>16</b> Propostas das estruturas químicas para as transições $m/z$ 193 → 161 e 193 → 175, correspondente às perdas do grupo metoxila ( $H_3C-OH$ ) $[M-32]^-$ e água ( $H_2O$ ) $[M-18]^-$ , respectivamente.....	<b>80</b>
<b>17</b> Cromatogramas obtidos (a) na região do ultravioleta (190-500 nm) e (b) em modo MRM paara o bornesitol $t_r=2,7$ min.....	<b>81</b>
<b>18</b> Cromatogramas obtidos (a) no UV-Vis (190-500 nm) e (b) em modo MRM para a condição de degradação ácida. Destaque para a região com ausência de sinal entre 2,0 e 3,5 min, intervalo correspondente ao tempo de retenção do bornesitol.....	<b>83</b>
<b>19</b> Cromatogramas obtidos (a) no UV-Vis (190-500 nm) e (b) em modo MRM para a condição de degradação ácida. Destaque para a região com ausência de sinal entre 2,0 e 3,5 min, intervalo correspondente ao tempo de retenção do bornesitol.....	<b>83</b>
<b>20</b> Espectros obtido no tempo de retenção com ausência de sinal (2,0 – 3,5 min) para as condições de degradação ácida (a) e básica (b) no modo de ionização positivo (ESI+.).....	<b>85</b>
<b>21</b> Espectros obtidos no tempo de retenção com ausência de sinal (2,0 – 3,5 min) para as condições de degradação ácida (a) e básica (b) no modo de ionização negativo (ESI). .....	<b>86</b>
<b>22</b> Cromatogramas obtidos em modo MRM para a solução branco de NaCl para as transições em $m/z$ 268,8→210,8 Da e $m/z$ 268,8→92,8 Da do sal, bem como em $m/z$ 193,1→175,4 Da e $m/z$ 193,1→161,0 Da para o bornesitol.....	<b>87</b>
<b>23</b> – Cromatogramas obtidos em modo MRM para a solução de bornesitol contaminada com NaCl, na mesma concentração do branco, para as transições em $m/z$ 268,8→210,8 Da e $m/z$ 268,8→92,8 Da do sal, bem como em $m/z$ 193,1→175,4 Da e $m/z$ 193,1→161,0 Da para o bornesitol.....	<b>88</b>
<b>24</b> Cromatogramas obtidos no modo de varredura no UV-Vis (190-500 nm) e em modo MRM para a solução de bornesitol contaminada com NaCl para as transições em $m/z$ 268,8→210,8 Da e $m/z$ 268,8→92,8 Da do sal, bem como em $m/z$ 193,1→175,4 Da e $m/z$ 193,1→161,0 Da para o bornesitol. Condição cromatográfica G.....	<b>90</b>
<b>25</b> Cromatogramas obtidos no modo de varredura no UV-Vis (190-500 nm) e em modo MRM para a solução de bornesitol contaminada com NaCl para as transições em $m/z$ 268,8→210,8 Da e $m/z$ 268,8→92,8 Da do sal, bem como em $m/z$ 193,1→175,4 Da e $m/z$ 193,1→161,0 Da para o bornesitol.....	<b>93</b>
<b>26</b> Cromatogramas obtidos no modo de varredura no UV-Vis (190-500 nm) e em modo MRM para a solução de bornesitol contaminada com NaCl para as transições em $m/z$ 268,8→210,8 Da e $m/z$ 268,8→92,8 Da do sal, bem como em $m/z$ 193,1→175,4 Da e $m/z$ 193,1→161,0 Da para o bornesitol.....	
<b>26</b> Cromatogramas obtidos no modo de varredura no UV-Vis (190-500 nm) e em modo MRM para as transições em $m/z$ 268,8→210,8 Da e $m/z$ 268,8→92,8 Da do sal (não foram observadas), bem como em $m/z$ 193,1→161,0 Da para o bornesitol, sem supressão de sinal.....	<b>94</b>

27	Cromatogramas obtidos no modo de varredura o UV-Vis (190-500 nm) e em modo MRM para as transições do sal, bem como do bornesitol, sem supressão de sinal do analito e sem presença de NaCl. Condição de degradação ácida.....	94
28	Cromatogramas obtidos no modo de varredura no UV-Vis (190-500 nm) e em modo MRM para as transições do sal, bem como do bornesitol, sem supressão de sinal do analito e sem presença de NaCl. Condição de degradação básica.....	95
29	Cromatogramas obtidos para amostra branco (MeOH) na análise de bornesitol por UPLC-MS em MRM.....	97
30	Cromatogramas obtidos para amostra de glicose por UPLC-MS em MRM.....	97
31	Cromatogramas obtidos para amostra de rutina por UPLC-MS em MRM.....	98
32	Cromatograma obtido para amostra de ácido caféico por UPLC-MS em MRM.....	98
33	Cromatograma obtido para amostra de ácido clorogênico por UPLC-MS em MRM.....	99
34	Cromatograma obtido para amostra de quercetina por UPLC-MS em MRM.....	99
35	Curvas analíticas para a quantificação de bornesitol obtidas por UPLC-MS/MS modo MRM em dois dias consecutivos de análise e curva média resultante.....	101
36	Avaliação da robustez do método para quantificação de bornesitol por UPLC-MS/MS modo MRM. As médias diferiram entre si após a análise de variância ( $p < 0,05$ ).....	104
37	Cromatogramas obtido para bornesitol após degradação oxidativa branda no modo de varredura no UV-Vis (190-500 nm) e em modo MRM para astransições em $m/z$ 268,8→210,8 Da e $m/z$ 268,8→92,8.....	110
38	Cromatogramas obtidos para o bornesitol após degradação oxidativa média no modo de varredura no UV-Vis (190-500 nm) e em modo MRM para as transições em $m/z$ 268,8→210,8 Da e $m/z$ 268,8→92,8.....	110
39	Cromatogramas obtidos para o bornesitol após degradação oxidativa drástica no modo de varredura no UV-Vis (190-500 nm) e em modo MRM para as transições em $m/z$ 268,8→210,8 Da e $m/z$ 268,8→92,8.....	111
40	Cromatogramas obtidos para o bornesitol após diferentes condições oxidativas e solução padrão não submetida à degradação. As setas indicam o produto de degradação formado ( $t_r = 1,9$ min).....	112

## LISTA DE TABELAS

<b>1</b>	<b>Rendimento obtido para o extrato seco EtOAc:MeOH (1:1).....</b>	<b>49</b>
<b>2</b>	<b>Série eluotrópica utilizada no fracionamento de f<sub>aca</sub>.....</b>	<b>51</b>
<b>3</b>	<b>Condições do detector de espectrômetro de massas (MS) definidas para análise de bornesitol.....</b>	<b>55</b>
<b>4</b>	<b>Condição cromatográfica desenvolvida por Bathena e colaboradores (2012) para a análise de mio-inositol.....</b>	<b>56</b>
<b>5</b>	<b>Condições de detecção do MS utilizadas na quantificação de NaCl via MRM.....</b>	<b>58</b>
<b>6</b>	<b>Condições cromatográficas de UPLC avaliadas visando obter resolução entre bornesitol e cloreto de sódio.....</b>	<b>60</b>
<b>7</b>	<b>Gradiente de eluição definido para o método de UPLC-MS para a quantificação de bornesitol.....</b>	<b>63</b>
<b>8</b>	<b>Condições espectroscópicas definidas para o método de quantificação do bornesitol por UPLC-MS.....</b>	<b>64</b>
<b>9</b>	<b>Volumes e massas correspondentes de bornesitol empregados na construção das curvas analíticas.....</b>	<b>66</b>
<b>10</b>	<b>Condições empregadas nos estudos de degradação.....</b>	<b>69</b>
<b>11</b>	<b>Valores das constantes dielétricas dos solventes avaliados para solubilização seletiva do bornesitol em presença de cloreto de sódio.....</b>	<b>92</b>
<b>12</b>	<b>Volumes de injeção e massas injetadas na avaliação da linearidade do método para quantificação de bornesitol, obtidos em dois dias consecutivos de análise.....</b>	<b>101</b>
<b>13</b>	<b>Resultados da regressão linear para as curvas analíticas do bornesitol, obtidas em dois dias consecutivos de análise.....</b>	<b>101</b>
<b>14</b>	<b>Dados da precisão intradia do método para quantificação de bornesitol por UPLC-MS/MS modo MRM.....</b>	<b>102</b>
<b>15</b>	<b>Dados da precisão interdias do método para quantificação de bornesitol por UPLC-MS/MS modo MRM.....</b>	<b>103</b>

<b>16 Classificação da estabilidade de fármacos com base na extensão de degradação observada em condições diferentes de exposição.....</b>	<b>106</b>
<b>17 Teor de bornesitol obtido após degradação em condições de hidrólise ácida.....</b>	<b>106</b>
<b>18 Teor de bornesitol obtido após degradação em condições de degradação básica.....</b>	<b>107</b>
<b>19 Condições sugeridas para a condução de estudos de degradação ácida e básica que permitem a classificar a estabilidade do fármaco com base na degradação suficiente (20-80%). Fonte: Singh &amp; Bakshi, 2000.....</b>	<b>107</b>
<b>20 Teor de bornesitol obtido após degradação em condições de hidrólise neutra.....</b>	<b>108</b>
<b>21 Classificação da estabilidade do fármaco frente a degradação hidrolítica neutra com base na degradação suficiente (20-80%). Fonte: Singh &amp; Bakshi, 2000.....</b>	<b>108</b>
<b>22 Teor de bornesitol obtido após degradação por peróxido de hidrogênio.....</b>	<b>109</b>
<b>23 Classificação da estabilidade do fármaco frente a degradação oxidativa com base na degradação suficiente (20-80%). Fonte: Singh &amp; Bakshi, 2000.....</b>	<b>112</b>
<b>24 Teor de bornesitol obtido após degradação por fotólise.....</b>	<b>113</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CCD	Cromatografia em camada delgada
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CLA-EM	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrômetro de massas
CLAE-DAD	Cromatografia líquida de alta eficiência Acoplada a Detector de Arranjo de Diodos
CG-EM	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas
DCV	Doenças cardiovasculares
DMSO	Dimetilsufóxido
ECA	Enzima conversora de angiotensina
EtOAc	Acetato de etila
EtOH	Álcool etílico
HA	Hipertensão arterial
HAS	Hipertensão arterial sistêmica
iECA	Inibidores da enzima conversora de angiotensina
MeOH	Metanol
mmHg	Milímetros de mercúrio
<i>n</i>	Número de repetições
NO	Óxido nítrico
OMS	Organização Mundial de Saúde
PA	Pressão arterial
<i>R<sub>f</sub></i>	Fator de retenção
RMN <sup>13</sup> C	Ressonância magnética nuclear de C-13
RMN <sup>1</sup> H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
<i>t<sub>r</sub></i>	Tempo de retenção
UV/ Vis	Espectrometria de absorção no ultravioleta e visível



UPLC-MS Cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a espectrômetro de massas

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	23
2 OBJETIVOS.....	25
2.1 Objetivo geral.....	25
2.2 Objetivos específicos.....	25
3 REVISÃO DA LITERATURA.....	26
3.1 Hipertensão arterial.....	26
3.2 <i>Hancornia speciosa</i> : ocorrência, usos tradicionais, atividades farmacológicas e biológicas.....	27
3.3 Composição química da espécie.....	30
3.4 Estudos de estabilidade.....	33
3.5 Bornesitol.....	37
3.6 Colunas Hilic.....	40
3.6.1 <u>Fase móvel</u> .....	41
3.6.2 <u>Fase estacionária</u> .....	42
3.6.2.1 <i>Interação de analitos não iônicos em colunas HILIC e influência da composição da fase móvel, temperatura e pH</i> .....	43
3.6.3 <u>Emprego de colunas HILIC</u> .....	44
4 EXPERIMENTAL.....	46
4.1 Equipamentos.....	46
4.1 Material vegetal.....	48
4.2 Obtenção do extrato.....	49
4.3 Isolamento do bornesitol.....	49
4.3.1 <u>Precipitação com acetato de etila</u> .....	49
4.3.2 <u>Extração com carvão ativado</u> .....	50

4.3.3 <u>Filtração em sílica gel</u> .....	51
4.3.4 <u>Recristalização e purificação</u> .....	52
4.4 Ensaio de caracterização e pureza.....	52
4.4.1 <u>Cromatografia em camada delgada (CCD)</u> .....	52
4.4.2 <u>Ponto de fusão</u> .....	53
4.4.3 <u>RMN</u> .....	53
4.5 Desenvolvimento de método analítico para quantificação de bornesitol por LC-MS-ESI.....	53
4.5.1 <u>Sistema de detecção</u> .....	53
4.5.2 <u>Desenvolvimento do método analítico</u> .....	56
4.5.3 <u>Avaliação do efeito <i>carryover</i> em amostras submetidas a degradação ácida, básica e oxidativa</u> .....	56
4.5.3.1 <u>Preparo da solução padrão</u> .....	56
4.5.3.2 <u>Degradação ácida</u> .....	57
4.5.3.3 <u>Degradação básica</u> .....	57
4.5.3.4 <u>Degradação oxidativa</u> .....	57
4.6 Avaliação do efeito de matriz.....	57
4.6.1 <u>Preparo da solução padrão de bornesitol</u> .....	58
4.6.2 <u>Preparo da solução estoque de NaCl</u> .....	58
4.6.3 <u>Preparo das soluções de trabalho</u> .....	58
4.6.4 <u>Otimização das condições cromatográficas</u> .....	59
4.6.5 <u>Otimização das condições de extração do bornesitol para análise por UPLC-MS</u> .....	61
4.6.5.1 <u>Avaliação da solubilização do NaCl</u> .....	61
4.6.5.2 <u>Avaliação da detecção de bornesitol nas soluções contaminadas com NaCl</u> .....	61

<b>4.6.5.3 Avaliação da detecção de bornesitol em condições reais de degradação ácida e básica.....</b>	<b>62</b>
<b>4.7 Método analítico estabelecido para a quantificação de bornesitol por ULPC-MS.....</b>	<b>62</b>
<b>4.7.1 <u>Condições cromatográfica e espectroscópica definidas.....</u></b>	<b>62</b>
<b>4.7.2 <u>Solução de compensação.....</u></b>	<b>65</b>
<b>4.8 Validação do método analítico.....</b>	<b>65</b>
<b>4.8.2 <u>Preparo das soluções de análise.....</u></b>	<b>65</b>
<b>4.8.2.1 <i>Preparo das soluções de bornesitol.....</i></b>	<b>65</b>
<b>4.8.3 <u>Especificidade.....</u></b>	<b>65</b>
<b>4.8.4 <u>Linearidade.....</u></b>	<b>66</b>
<b>4.8.5 <u>Limite de quantificação.....</u></b>	<b>67</b>
<b>4.8.6 <u>Limite de detecção.....</u></b>	<b>67</b>
<b>4.8.7 <u>Precisão .....</u></b>	<b>67</b>
<b>4.8.8 <u>Exatidão.....</u></b>	<b>68</b>
<b>4.8.9 <u>Robustez.....</u></b>	<b>68</b>
<b>4.9 Estudos de degradação forçada do bornesitol.....</b>	<b>68</b>
<b>4.9.1 <u>Degradação ácida e alcalina .....</u></b>	<b>69</b>
<b>4.9.2 <u>Degradação oxidativa e hidrólise neutra .....</u></b>	<b>69</b>
<b>4.9.3 <u>Fotólise e termólise .....</u></b>	<b>69</b>
<b>4.9.4 <u>Ións metálicos.....</u></b>	<b>70</b>
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>71</b>
<b>5.1 Isolamento e purificação do bornesitol.....</b>	<b>71</b>
<b>5.2 Ensaio de caracterização e pureza do bornesitol.....</b>	<b>74</b>
<b>5.3 Desenvolvimento de método analítico por UPLC-MS/MS para a quantificação de bornesitol .....</b>	<b>74</b>

<b>5.3.1 <u>Desenvolvimento do método</u></b> .....	<b>74</b>
<b>5.3.1.1 <i>Avaliação do efeito carry over</i></b> .....	<b>74</b>
<b>5.3.1.2 <i>Desenvolvimento de método por Monitoramento de Reações Múltiplas (MRM) para quantificar bornesitol por LC-MS/MS</i></b> .....	<b>78</b>
<b>5.3.2 <u>Avaliação do efeito da matriz</u></b> .....	<b>81</b>
<b>5.3.2.1 <i>Desenvolvimento de método de MRM para o NaCl</i></b> .....	<b>87</b>
<b>5.3.2.2 <i>Otimização das condições cromatográficas visando eliminar o efeito da matriz (ME)</i></b> .....	<b>88</b>
<b>5.3.2.3 <i>Otimização das condições espectroscópicas visando eliminar o efeito da matriz (ME)</i></b> .....	<b>90</b>
<b>5.3.2.4 <i>Eliminação do efeito de matriz (ME) via preparo da amostra</i></b> .....	<b>92</b>
<b>5.4 Validação de método analítico para quantificação de bornesitol por LC-MS/MS</b> .....	<b>95</b>
<b>5.4.1 <u>Parâmetros de validação avaliados</u></b> .....	<b>96</b>
<b>5.4.1.1 <i>Especificidade e seletividade</i></b> .....	<b>96</b>
<b>5.4.1.2 <i>Linearidade</i></b> .....	<b>99</b>
<b>5.4.1.3 <i>Limite de quantificação e Limite de detecção</i></b> .....	<b>101</b>
<b>5.4.1.4 <i>Precisão</i></b> .....	<b>101</b>
<b>5.4.1.4.1 <i>Precisão intradia</i></b> .....	<b>101</b>
<b>5.4.1.4.2 <i>Precisão interdias</i></b> .....	<b>102</b>
<b>5.4.1.5 <i>Robustez</i></b> .....	<b>103</b>
<b>5.5 Avaliação da estabilidade do bornesitol em diferentes condições de estresse</b> .....	<b>105</b>
<b>5.5.1 <u>Degradação ácida e básica</u></b> .....	<b>106</b>
<b>5.5.2 <u>Hidrólise Neutra</u></b> .....	<b>108</b>

<b>5.5.3 <u>Oxidação em presença de peróxidos</u></b> .....	<b>108</b>
<b>5.5.4 <u>Fotólise</u></b> .....	<b>112</b>
<b>5.5.5 <u>Degradação em presença de íons metálicos</u></b> .....	<b>113</b>
<b>5.5.6 <u>Termólise</u></b> .....	<b>114</b>
<b>6 CONCLUSÃO</b> .....	<b>115</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>16</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, a indústria farmacêutica vem sofrendo uma crescente crise de criatividade. O que se intitula de “novo” no mercado, raramente o é, sendo na maioria das vezes uma releitura diferente de conhecidos fármacos. A síntese orgânica, que constituiu a base do desenvolvimento de fármacos a partir da segunda metade do século XX, mostrou-se saturada nas últimas décadas. Nesse sentido, observa-se o ressurgimento do interesse pela química de produtos naturais como estratégia para inovação farmacêutica (OLIVEIRA et al., 2013). A bioprospecção de espécies vegetais pode contribuir diretamente nesse processo, resultando em fármacos propriamente ditos (fitofármaco), ou de maneira indireta, servindo de protótipos moleculares para a síntese de derivados, possibilitando a identificação de novos grupos farmacofóricos. Adicionalmente, podem ser desenvolvidos fitoterápicos, baseados em extratos ou frações padronizadas. Segundo a OMS, aproximadamente 40% dos medicamentos disponíveis atualmente derivam direta ou indiretamente de fontes naturais, especialmente de plantas (WHO, 2011).

A busca por produtos naturais bioativos ou derivados de drogas vegetais para ampliar o arsenal terapêutico têm aumentado nos anos recentes. O mercado de fitoterápicos movimenta atualmente aproximadamente US\$ 44 bilhões (OLIVEIRA et al., 2013) e apresenta taxa de crescimento anual de 15%, frente aos 4% de crescimento dos medicamentos sintéticos (GADELHA, 2007). Isto se deve principalmente à ineficácia de algumas abordagens terapêuticas convencionais, a conscientização ecológica e a crença popular de que produtos naturais não apresentam toxicidade (SIMÃO, 2013; SILVEIRA et al., 2008; RATES, 2001). Entretanto, entre os estudos iniciais e a aprovação de um novo produto fitoterápico pelas agências regulatórias há um árduo processo interdisciplinar, multidisciplinar, e mesmo interinstitucional, cobrindo desde a antropologia, botânica, ecologia, química, fitoquímica, farmacologia, toxicologia, biotecnologia, química orgânica, até a tecnologia farmacêutica (PIERONI et al., 2009; TOLEDO et al., 2003). A aprovação desse novo fármaco deve atender os requisitos mínimos de registro, que exigem dados variados, tais como identificação botânica, autenticidade, pureza, integridade, análise das

substâncias ativas, testes de estabilidade, farmacologia, toxicologia pré-clínica e clínica, entre outros requisitos (BRASIL, 2010).

O Brasil ocupa uma posição privilegiada no cenário mundial para o desenvolvimento de fármacos derivados da biodiversidade. O território brasileiro responde pela maior diversidade genética vegetal do mundo, cuja flora é estimada em 41.000 espécies (MARTINELLI & MORAES, 2013). Aliado a isso, estima-se que apenas 8% das espécies da flora brasileira foram estudadas na busca por compostos bioativos, e apenas 1.100 plantas tiveram suas propriedades medicinais avaliadas (SIMÕES et al., 2003). Assim, o Brasil apresenta um cenário propício para a pesquisa de produtos naturais bioativos, podendo contribuir para a consolidação do mercado farmacêutico nacional, bem como para a inovação terapêutica a nível mundial.

Nesse contexto se insere o presente trabalho, que visa fornecer subsídios para o controle de qualidade e segurança da espécie medicinal *Hancornia speciosa* (mangaba), a partir de estudos de estabilidade com o marcador bornesitol, relacionado com a potencial atividade anti-hipertensiva da espécie.



## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Avaliar a estabilidade do marcador químico L-(+)-bornesitol presente em derivados da droga vegetal folhas de *Hancornia speciosa* Gomes, frente a estudos de estresse.

### **2.2 Objetivos específicos**

1. Isolar o bornesitol a partir de extratos de folhas de *H. speciosa*.
2. Desenvolver e validar um método analítico de cromatografia líquida de ultra eficiência com detector de espectrometria de massas e ionização por eletronspray (UPLC-MS-ESI) para quantificação de bornesitol.
3. Avaliar qualitativa e quantitativamente a estabilidade do marcador químico bornesitol sob condições de estresse: temperatura, hidrólise em ampla faixa de pH, hidrólise neutra, oxidação com peróxido de hidrogênio, fotólise e íons metálicos.

### 3 REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1 Hipertensão arterial

Hipertensão arterial é a condição clínica multifatorial associada a níveis elevados e sustentados de pressão – valores superiores a 140 mmHg para a sistólica e/ou superiores a 90 mmHg para a diastólica (WHO, 2007) – sendo que episódios isolados não caracterizam o indivíduo como hipertenso (VI DIRETRIZES..., 2010). Os principais agravantes da doença são as comorbidades que frequentemente a acompanham, com alterações funcionais e estruturais em órgãos alvo, como coração, encéfalo, rins e vasos sanguíneos, além de alterações metabólicas, com aumento do risco de eventos cardiovasculares (VI DIRETRIZES..., 2010).

A hipertensão arterial tem alta prevalência e baixas taxas de controle; em função disso é um dos mais importantes problemas de saúde pública no mundo (VI DIRETRIZES..., 2010). Em 2001, cerca de 7,6 milhões de mortes no mundo foram atribuídas à elevação da pressão arterial, sendo 54% decorrentes de acidentes vascular-encefálicos e 47% de isquemias cardíacas (WILLIAMS, 2010). Em 2007, mais de 300.000 óbitos decorreram de doenças do aparelho circulatório (MALTA et al., 2009). Em 2009, foram registradas 91.970 internações por DCV no Sistema Único de Saúde (SUS), resultando em um custo de R\$ 165.461.644,33 (DATASUS, 2009). A estimativa é que a ocorrência da doença aumente em 60% entre 2000 e 2025 (CAMPBELL, 2010).

O controle da hipertensão reduz consideravelmente a morbi-mortalidade associada ao sistema cardiovascular, além de diminuir a ocorrência de eventos fatais e não-fatais, e de outros eventos coronarianos (MANCIA et al, 2007). A abordagem terapêutica envolve inicialmente terapias não farmacológicas, e em casos mais graves terapias farmacológicas, objetivando-se a redução da pressão arterial para valores inferiores a 140/90 mmHg (MANCIA et al, 2007). A terapia medicamentosa é ampla e envolve diferentes classes de fármacos, entre eles diuréticos tiazídicos, inibidores da enzima conversora de angiotensina (iECA), bloqueadores dos canais de cálcio, dos receptores de angiotensina e bloqueadores dos receptores beta-adrenérgicos (HARDMAN et al., 2006).

A escolha da alternativa terapêutica inicial deve ser feita considerando-se os fatores de risco associados ao paciente, bem como os efeitos protetores diferenciados sobre o sistema cardiovascular (EHS, 2013; MANCIA et al., 2007). Recomenda-se como terapia de primeira linha os diuréticos tiazídicos, beta-bloqueadores ou bloqueadores de canais de cálcio (EHS, 2013; MANCIA et al., 2007). Os beta-bloqueadores são recomendados quando há ocorrência de comorbidades como angina, insuficiência cardíaca e infarto do miocárdio recente (MANCIA et al., 2007; WHO, 2007).

A monoterapia raramente é efetiva no controle da pressão arterial, sendo frequentemente empregadas terapias combinadas. Esse tipo de abordagem geralmente é individualizado, com considerável trabalho para o clínico, além de dispendioso e de difícil adesão por parte do paciente. Adicionalmente, deve se considerar a possibilidade de interações medicamentosas, dificuldades relacionadas à própria polifarmácia e a somatória dos efeitos adversos causados pelos agentes anti-hipertensivos, tais como ganho de peso, interferência com o metabolismo de lipídios e aumento da incidência de diabetes, dificultando ainda mais a adesão ao tratamento.

A despeito de todo arsenal terapêutico disponível, na maioria dos casos, a hipertensão arterial é tratada de maneira inadequada. Isto talvez se deva à incidência elevada de efeitos adversos, esquema terapêutico complexo e dificuldades na definição dos fármacos e doses adequadas ao paciente (WAGNER & ULRICH-MERZENIC, 2009). Assim, a busca por novos agentes terapêuticos que ofereçam um tratamento eficaz e mais confortável para o paciente e o clínico, se faz necessária.

### **3.2 *Hancornia speciosa*: ocorrência, usos tradicionais, atividades farmacológicas e biológicas**

A espécie *Hancornia speciosa* Gomes (Apocynaceae), popularmente conhecida como mangaba, mangava ou mangabeira, é uma árvore frutífera de clima tropical nativa no Brasil, ocorrendo principalmente nas regiões centro-oeste, norte, nordeste e sudeste (LEDERMAN et al., 2000). Tem nos frutos o seu principal atrativo, sendo consumidos *in natura*, em virtude de suas

características organolépticas e do elevado valor nutritivo. Os frutos também são utilizados na produção de doces, xaropes, compotas, vinhos, vinagre e, principalmente, sucos e sorvetes, com grande aceitação comercial e utilização agroindustrial (VIEIRA NETO, 2001).

Com relação aos usos tradicionais, diversas aplicações estão registradas na literatura para diferentes partes da planta. A casca possui propriedades adstringentes e é indicada para tratar afecções hepáticas. O látex é utilizado no tratamento de doenças fúngicas, tuberculose, úlceras, herpes, dermatoses e verrugas (SANTOS et al., 2007; NOGUEIRA et al., 2004). O chá das folhas é indicado para o tratamento de cólicas menstruais e o decocto da raiz utilizado para tratar luxações, hipertensão e como hipoglicemiante (ALMEIDA, 1993; BRASIL, 1984; MOREIRA, 1984). Em um estudo etnobotânico de plantas medicinais do cerrado, decoctos da casca foram relatados para o tratamento de diabetes e obesidade, e o unguento das cascas para tratar dermatoses (RODRIGUES & CARVALHO, 2001).

No que tange às atividades biológicas, Moraes e colaboradores (2008) relataram atividade gastroprotetora e atividade anti-*Helicobacter pylori in vitro* para extratos etanólicos de cascas da espécie. Rufino e colaboradores (2009) comprovaram a atividade antioxidante frente ao DPPH para os frutos da espécie. A atividade anti-inflamatória foi demonstrada em camundongos, associada à inibição da produção de óxido nítrico (NO), prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) e citocinas (MARINHO et al., 2011), sendo também relatada em modelo de edema de pata induzido por carragenina, e atividade hipoglicemiante em ratos com diabetes induzido por aloxana (KLEIN et al., 1996; LIMA & MARTINS, 1996). A literatura também descreve a atividade antifúngica de *H. speciosa* em ensaios de difusão em ágar (COSTA et al., 2008). O látex da espécie foi apontado como ativo contra *Candida albicans* (SILVA et al., 2010).

Há alguns anos, nosso grupo de pesquisa vem envidando esforços no estudo da atividade anti-hipertensiva de *H. speciosa*. Serra e colaboradores (2005) relataram a atividade inibitória da ECA *in vitro* para o extrato etanólico das folhas. Em outro trabalho, foi relatada a atividade vasodilatadora do extrato etanólico de folhas em preparações *ex vivo* de anéis de aorta de rato pré-contráidas com fenilefrina, bem como efeito vasodilatador em anéis de artéria mesentérica superior de ratos. O efeito vasodilatador foi caracterizado como

sendo dependente do endotélio, via óxido nítrico, da ativação de canais de potássio e da liberação de fator hiperpolarizante derivado do endotélio (FERREIRA et al., 2007a; FERREIRA et al., 2007b).

Em outro estudo, conduzido com extrato etanólico de folhas de *H. speciosa*, Endringer (2007) identificou L-(+)-bornesitol e rutina como principais constituintes bioativos, através do biomonitoramento por ensaio *in vitro* de inibição da ECA. Também foi avaliado o efeito inibitório do fator de transcrição nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B) do extrato bruto, de uma fração rica em ciclitóis e flavonoides, bem como dos constituintes isolados. A fração induziu inibição significativa da ativação de NF- $\kappa$ B *in vitro*, bem como seus constituintes principais (bornesitol, rutina e ácido quínico), sendo possível postular a existência de sinergismo entre eles.

Nosso grupo também investigou a atividade hipotensora de uma fração padronizada enriquecida em flavonoides e ciclitóis obtida de folhas da espécie (SILVA et al., 2011). Houve uma redução significativa da pressão arterial sistólica em ratos normotensos após a administração intraperitoneal e oral da fração nas doses de 1 a 100 mg/Kg. De acordo com os resultados, o mecanismo de ação envolve a inibição da ECA, redução da produção de angiotensina II, efeito vasodilatador direto pela ativação de PKA e de canais de potássio, bem como aumento dos níveis séricos de óxido nítrico (SILVA et al., 2011). Recentemente, Silva e colaboradores (2016) demonstraram o mecanismo hipotensor da fração padronizada de *H. speciosa* após a administração oral da fração nas doses de 0,03 a 1 mg/ kg. De acordo com os autores, a redução da resistência periférica pela produção de óxido nítrico (NO) e aumento da produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nas artérias mesentéricas de ratos hipertensos seria responsável pela resposta hipotensora.

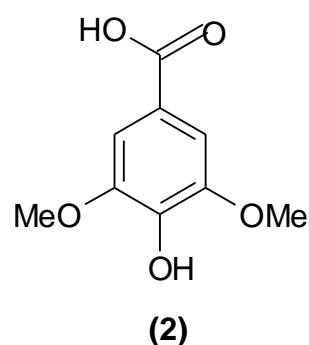
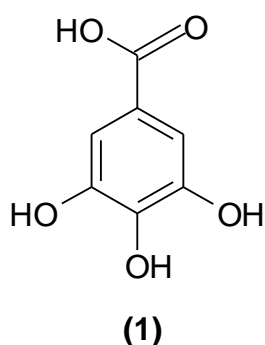
Nosso grupo de pesquisa também realizou a avaliação da toxicidade pré-clínica de um extrato padronizado de folhas de *H. speciosa*. A partir dos resultados do estudo de toxicidade aguda, o extrato foi classificado na categoria 5 do *Globally Harmonized System*, possuindo baixa toxicidade oral em dose única (resultados não publicados). Da mesma maneira, nos estudos de toxicidade crônica não foram encontrados indícios de toxicidade expressiva para os animais tratados, sendo observados valores elevados da enzima creatinina quinase (CK). Um aumento semelhante na atividade dessa enzima já

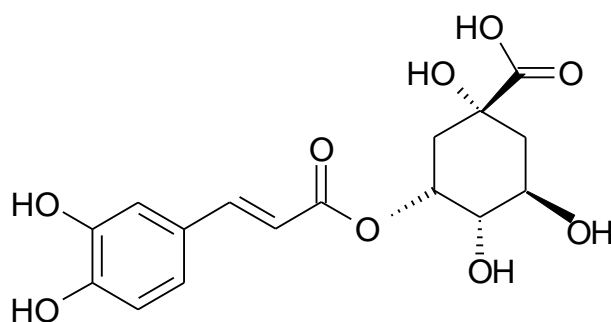
foi descrito na literatura para diversos fármacos, incluindo lidocaína D, penicilina, quinidina e succinilcolina, entre outros (MOTTA, 2010), mesmo em doses terapêuticas, não constituindo um empecilho para seu uso clínico.

Por sua vez, o estudo de toxicidade subcrônica do extrato padronizado de *H. speciosa* apresentou resultados contraditórios em relação à avaliação crônica, uma vez que se observou a morte de três animais na maior dose avaliada. Considerando que no estudo crônico não houve nenhuma morte, esperava-se que o estudo subcrônico seguisse a mesma tendência, já que o período de administração do extrato foi menor. Uma possível explicação para o ocorrido pode estar nas condições experimentais do estudo subcrônico, no qual os extratos foram submetidos a ciclos de congelamento / descongelamento, para pesagem semanal das doses a serem administradas. Isto pode ter promovido a degradação de constituintes do extrato, com a formação de produtos de degradação tóxicos, ao passo que no estudo crônico os extratos permaneceram congelados até o momento da administração (dados não publicados).

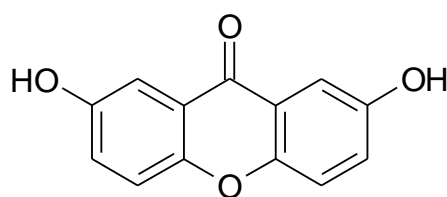
### 3.3 Composição química da espécie

Os estudos fitoquímicos realizados com *H. speciosa* revelaram a presença de constituintes de diversas classes. A composição química da espécie inclui ácidos orgânicos e seus derivados, como os ácidos gálico (1) e siríngico (2), derivados do ácido cafeoilquínico, com destaque para o marcador químico ácido 3-O-cafeoilquínico (3) (RODRIGUES et al., 2006). No mesmo trabalho, os autores identificaram compostos pertencentes à classe das xantonas, como a 2,7-diidroxixantona (4).



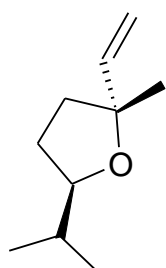


(3)

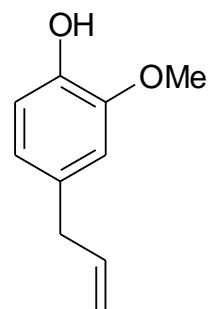


(4)

Alguns compostos voláteis foram identificados nas folhas de *H. speciosa* empregando cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrômetro de massas (CG-EM). Dentre eles, pode-se citar: óxido de *trans*-linalol (5) e o eugenol (6) (SANTOS et al., 2006).



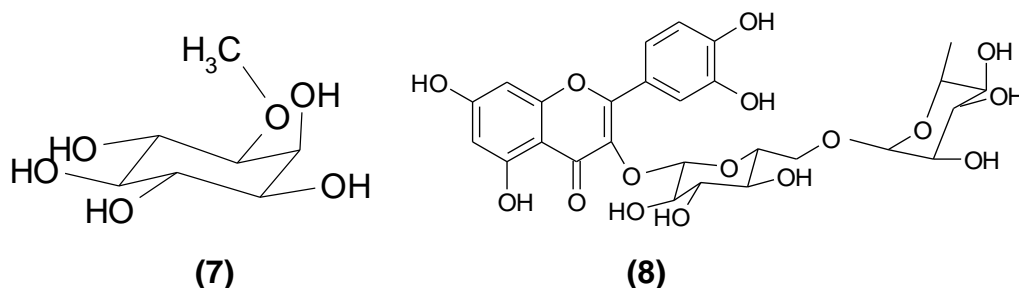
(5)



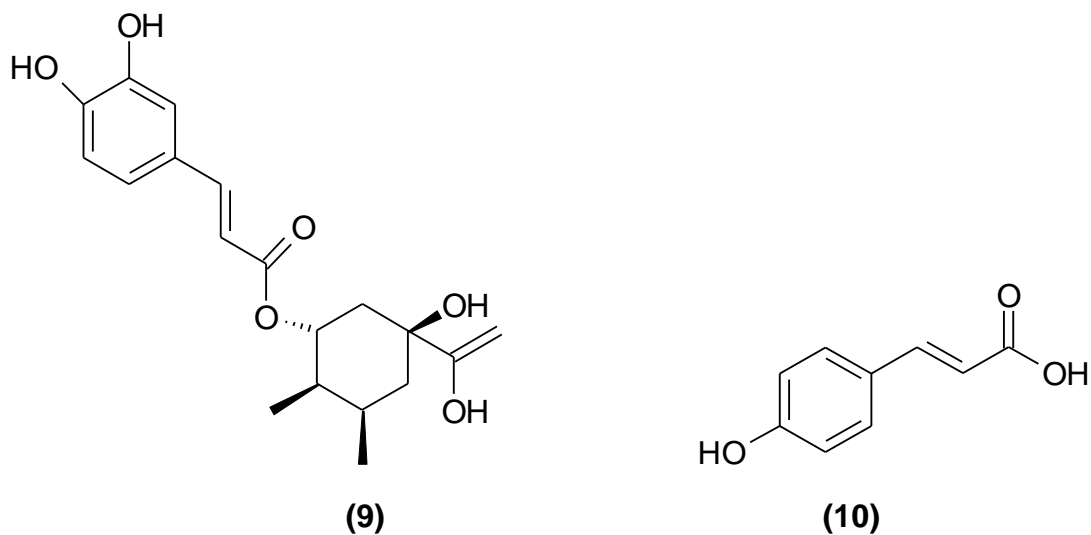
(6)

Em trabalhos desenvolvidos por nosso grupo de pesquisa, o fracionamento cromatográfico do extrato etanólico de folhas de *H. speciosa* resultou no isolamento de L-(+)-bornesitol (7) e rutina (8), definidos como marcadores químicos da espécie (ENDRINGER, 2007). Bornesitol foi identificado como constituinte majoritário de extratos etanólicos de folhas de diferentes acessos genéticos de *H. speciosa*, atingindo teores superiores a 8%

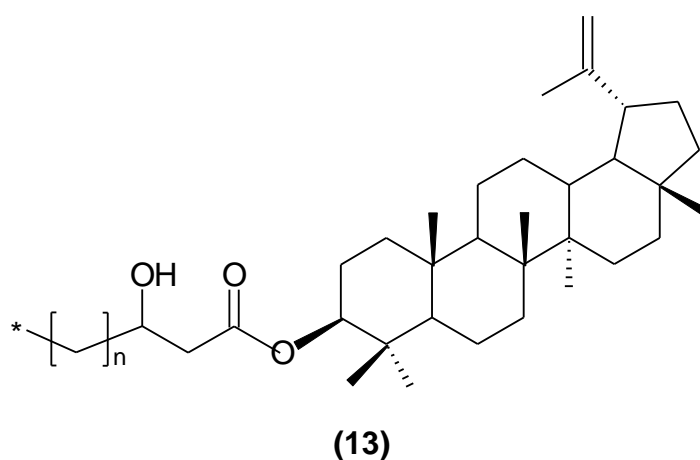
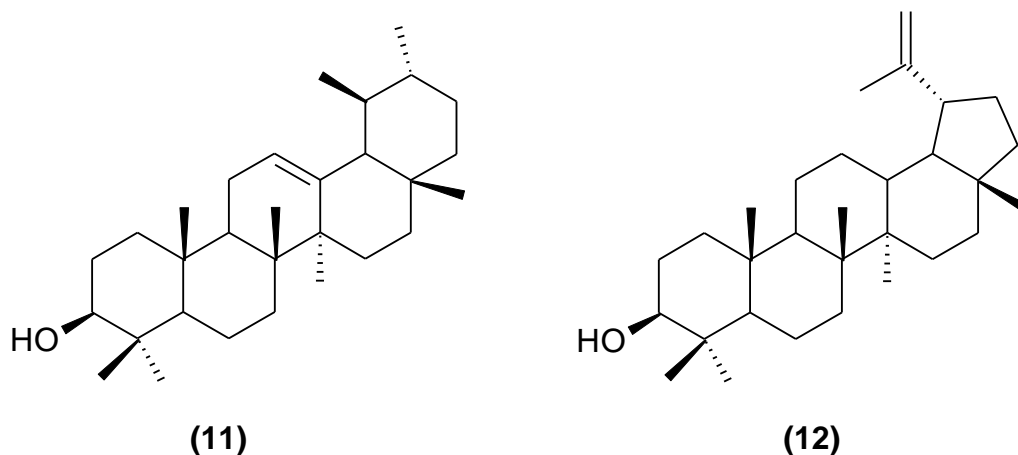
m/m em algumas amostras (PEREIRA, 2012). A quantificação do bornesitol foi realizada por CLAE-UV, após derivatização com cloreto de tosila (PEREIRA et al., 2012).



Além do bornesitol e da rutina, também foram descritos outros constituintes químicos por nosso grupo de pesquisa, como ácido 5-*O*-cafeoil-quínico (9), ácido *trans*-4-hidroxicinâmico (10),  $\alpha$ -amirina (11), lupeol (12) e 3 $\beta$ -*O*-éster de ácido graxo (13) e o ácido clorogênico (ácido-3-*O*-cafeoil-quínico) (3) (ENDRINGER, 2007).







Outros compostos apolares foram obtidos através do fracionamento dos extratos hexânico e etanólico de folhas de *H. speciosa*. O extrato hexânico resultou em uma mistura de hidrocarbonetos, alcoóis de cadeia longa e triterpenos como o lupeol (12). No extrato etanólico foram identificados rutina (8) e ácido clorogênico (3) (BARROS, 2008).

### 3.4 Estudos de estabilidade

A ANVISA define a condição de estabilidade como a capacidade de um produto em manter suas propriedades inalteráveis e seu desempenho em um intervalo de tempo conhecido, desde que respeitadas as condições de armazenamento estabelecidas (BRASIL, 2012). Não há, na legislação vigente, uma resolução própria para drogas vegetais, derivados e produtos fitoterápicos. Assim, os estudos de estabilidade realizados com essas matrizes podem ser conduzidos de acordo com a RDC N° 45, de 9 de agosto de 2012 (Brasil, 2012), com as adaptações necessárias. Outros guias também são válidos para

a condução dos experimentos, como o Guia para Condução dos Estudos de Estresse (SINGH & BAKSHI, 2000).

A revisão da literatura indica um número reduzido de estudos de estabilidade conduzidos com extratos padronizados. A maioria deles descreve a avaliação de uma condição degradativa específica, e não de todas as condições estabelecidas pela legislação. Assim, a estabilidade térmica (25 °C para estabilidade de longa-duração e 40 °C para estabilidade acelerada) e fotolítica (176 Klux) foi avaliada para um extrato seco de *Hypericum perforatum* em relação aos teores de flavonóis, hiperforinas e hipericinas. Esses extratos são utilizados no tratamento da gota, desordens hepáticas, úlceras gástricas, por sua atividade anti-inflamatória e antimicrobiana, havendo ainda relatos de atividade antidepressiva. De acordo com os autores, todos os componentes mostraram-se fotossensíveis nas condições testadas. Já nos estudos de termoestabilidade, os flavonóis mostraram-se estáveis por vários meses, as hiperforinas não se alteraram por um período de 3 meses e as hipericinas mostraram-se estáveis por algumas semanas apenas (BILIA et al., 2007 [a]).

Chang e colaboradores (2006) avaliaram a estabilidade dos cinco compostos fenólicos mais abundantes (epicatequina, procianidina B2, ácido clorogênico, hiperosídeo e isoquercetina) nos frutos e sucos enlatados de *Crataegus pinnatifida*. A espécie é empregada na medicina chinesa para tratar hiperlipidemias, patologias relacionadas ao enfraquecimento do miocárdio, taquicardia e outras doenças cardiovasculares. Para tanto, as amostras foram armazenadas durante seis meses, em três temperaturas diferentes (4, 23 e 40 °C). No caso dos frutos, para a temperatura de 4 °C, todos os constituintes avaliados foram considerados estáveis, mas foram instáveis em temperaturas superiores a 40 °C. Por último, à 23 °C, os hiperosídeos e isoquercetina mostraram-se relativamente estáveis, com menos de 8% de degradação. No caso do suco enlatado, todos os constituintes foram estáveis em baixas temperaturas, e relativamente instáveis em temperaturas superiores.

Em outro estudo conduzido com a espécie *Crataegus monogina*, avaliou-se a estabilidade térmica ( $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ,  $60 \pm 5\%$  de UR) de tinturas das flores e folhas. Os constituintes avaliados foram os flavonoides, expressos em termos de hiperosídeos, vitexina-2-O-ramnosídeo, acetil-vitexina-2-O-ramnosídeo e procianidinas. A tintura mãe mostrou-se menos estável que as

tinturas derivadas para o teor de flavonóides, ao passo que, para o teor de procianidinas, observou-se o oposto. O estudo também avaliou a estabilidade térmica ( $25 \pm 2$  °C,  $60 \pm 5\%$  de UR) de tinturas de *Hieracium pilosella*, preparadas com folhas e flores da espécie, utilizadas no tratamento de celulite e obesidade, em função de sua propriedade diurética. A tintura dessa espécie mostrou-se estável para os teores de ácido clorogênico, flavonoides e cumarinas (BILIA et al., 2007[b]).

Com relação à termoestabilidade e fotoestabilidade, Yatsu e colaboradores (2011) avaliaram a estabilidade de constituintes fenólicos em extrato aquoso de folhas de *Ilex paraguariensis*, obtido por *spray-dry*. O extrato mostrou-se estável após 48 h de exposição à radiação UVC. No caso da estabilidade térmica, observou-se uma redução significativa no teor total de polifenóis quando o extrato foi mantido em atmosfera controlada por 4 meses [75% U.R., 40 °C].

Em outro estudo realizado com extrato hidroetanólico de folhas de *Maytenus ilicifolia* seco em leito de jorro, avaliou-se a estabilidade em termos do marcador catequina. A exposição a diferentes temperaturas (25, 34 e 45 °C) e UR (32,4% e 63,5%) levou a maior degradação (10%) nas condições mais drásticas do estudo (45 °C/ 63,5% UR) (SOUZA et al., 2013).

Bakowska-Barczak & Kolodziejczyk (2011) avaliaram a estabilidade de compostos polifenólicos em extratos obtidos por *spray-dry* de cinco variedades de groselhas-pretas (*Ribes nigrum* L.). Para tanto, os pós foram armazenados a 8 e 25 °C durante 12 meses. O teor de antocianinas apresentou redução entre 16 e 25%, ao passo que os polifenóis totais reduziram entre 2 e 5%, quando armazenados em 8 °C. No armazenamento a 25 °C observou-se uma redução de 24 a 32% de antocianinas e de 8 a 11% de polifenóis totais.

A estabilidade de sucos desidratados de *Myrica cerifera* (mirica), obtidos por *spray-dry* com maltodextrina (DE 10), foi avaliada por Fang & Bhandari (2011) em diferentes temperaturas (4, 25 e 40 °C) e atividade de água controlada (0,11; 0,22; 0,33 e 0,44). Após seis meses de armazenamento a 4 °C, houve um decréscimo de 6-8% e 7-27% nos teores de fenólicos totais e antocianinas, respectivamente; na temperatura de 25 °C houve um decréscimo de 6-9% no teor de fenólicos e 9-37% para antocianinas, ao passo que, a 40 °C

o teor de fenólicos e antocianinas reduziu em aproximadamente 7-37% e 9-94%, respectivamente.

A estabilidade da rutina e ácido clorogênico presente nas inflorescências de *Sambucus nigra* foi avaliada por Dadáková e colaboradores (2010) durante o processo de secagem. De acordo com os autores, o teor de rutina e ácido clorogênico não apresentou diferença estatisticamente significativa quando a temperatura de secagem foi de 22 e 30 °C. Entretanto, houve uma redução de 20 e 12%, respectivamente, quando a temperatura de secagem foi mantida em 50 °C.

Em outro estudo, Friedman e Jürgens (2000) avaliaram a estabilidade de compostos fenólicos em ampla faixa de pH (3-11) por espectroscopia na região do ultravioleta. De acordo com os autores, quando expostos a altos valores de pH (7-11), os ácidos caféico e gálico mostraram-se instáveis, sendo as modificações espectrais induzidas pela exposição não reversíveis. O ácido clorogênico também mostrou-se instável em pH básico (pH 7-11), mas manteve suas características espectrais em pH ácido. Comprovou-se a estabilidade em ampla faixa de pH para (-)-catequina, (-)-epigallocatequina, ácido ferúlico e rutina.

Zvezdanović e colaboradores (2012) demonstraram o efeito da exposição à radiação UV para rutina e quercetina. Para tanto, soluções metanólicas e aquosas de rutina e solução metanólica de quercetina (0,1 mM) foram expostas à radiação UV-B (300 nm) e UV-C (254 nm). A solução metanólica de quercetina exposta à radiação UV-C por 30 min apresentou uma redução de 95%, ao passo que na exposição à radiação UV-B por 120 min a redução foi de 50%. Já a exposição à radiação UV-C da solução metanólica e aquosa de rutina por 90 min resultou em uma redução de 85% e 30%, respectivamente.

Makris & Rossiter (2000) avaliaram a degradação oxidativa da rutina e quercetina em solução tampão fosfato pH 8,0 a 97 °C por espectroscopia na região do ultravioleta, durante 250 min. Ambos os flavonóides foram instáveis frente às condições descritas. No mesmo estudo, os autores comprovaram o efeito catalisador dos íons metálicos  $Fe^{2+}$  e  $Cu^{2+}$  em concentrações variáveis (0,05; 0,1; 0,15 e 0,2  $\mu M$ ), mediante o aumento da taxa de degradação, em relação à primeira condição.

Cabe destacar que não foram encontrados relatos na literatura sobre estudos de estabilidade para extratos de *H. speciosa* ou para o marcador químico bornesitol.

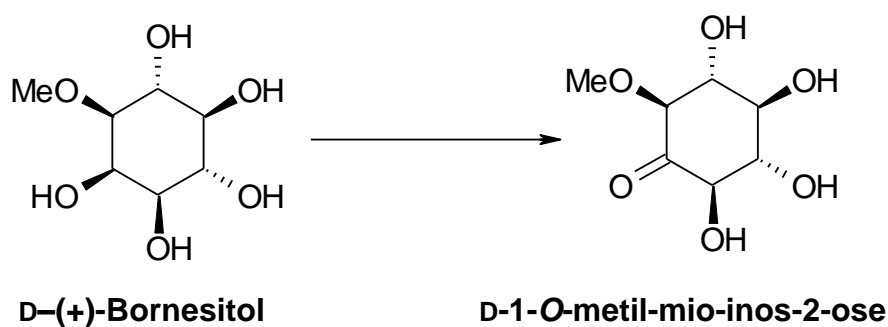
### 3.5 Bornesitol

O bornesitol é um mio-inositol metilado, encontrado em várias espécies de plantas (NISHIBE et al., 2001). Pertence à classe dos ciclitóis e possui apenas um grupo hidroxila em axial, estando os demais orientados em equatorial (7) (POST & ANDERSON, 1962). De acordo com Pereira (2012), o bornesitol é o constituinte majoritário do extrato etanólico de folhas de *H. speciosa* ( $7,31 \pm 1,09\%$  m/m), sendo definido como um dos marcadores químicos da espécie relacionado à sua atividade anti-hipertensiva.

Não foram encontrados relatos na literatura de estudos de estabilidade para o bornesitol, mas outros ciclitóis já foram investigados. Ortbauer & Popp (2008) avaliaram o efeito protetor dos ciclitóis D-pinitol, L-quebrachitol e mio-inositol na estabilidade térmica de proteínas, e sua consequente contribuição para a manutenção da estrutura original. Na presença desses compostos poli-hidroxilados a estrutura protéica se manteve preservada a temperaturas elevadas (70 °C), sugerindo a estabilidade térmica dessa classe de compostos.

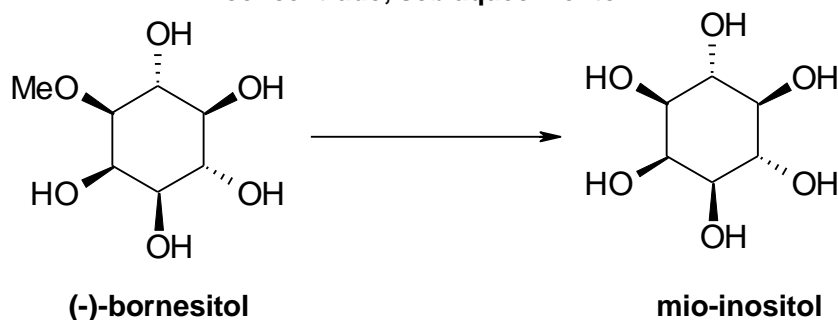
Com relação à reatividade desses compostos, Anderson e colaboradores (1958) avaliaram a posição preferencial de oxidação em diversos ciclitóis pela bactéria *Acetobacter suboxydans*. Os autores concluíram que a oxidação ocorre preferencialmente em hidroxilas axiais, o que também é corroborado em outros estudos (SHVETS, 1974). Além disso, a oxidação de uma hidroxila na posição axial procede de maneira mais eficiente quando existe uma hidroxila equatorial na posição *para* em relação a ela. A oxidação do bornesitol pelas bactérias do gênero *Acetobacter* resultou no derivado D-1-O-metil-mio-inosose-2 (**Figura 1**).

**Figura 1 - Representação da oxidação do D-(+)-bornesitol.**



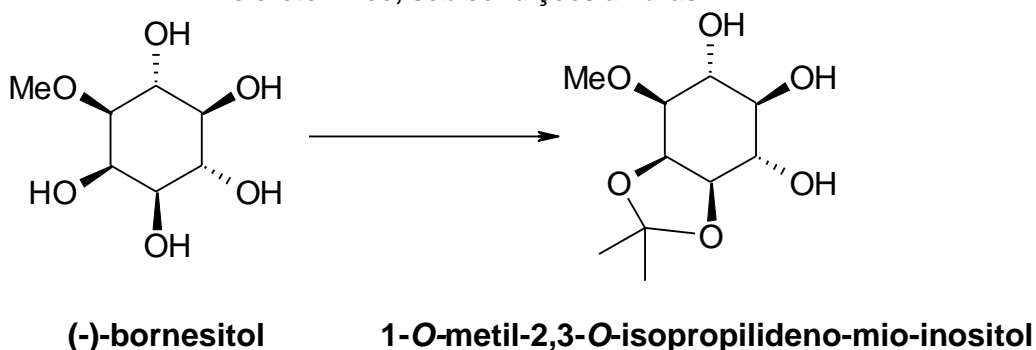
A avaliação da estabilidade do bornesitol em meio ácido foi descrita por Bien e Ginsburg (1958). De acordo com os autores, o (-)-bornesitol é desmetilado em meio de ácido iodídrico concentrado, sob aquecimento, gerando o mio-inositol (**Figura 2**).

**Figura 2 – Reatividade do bornesitol em meio de ácido iodídrico concentrado, sob aquecimento.**



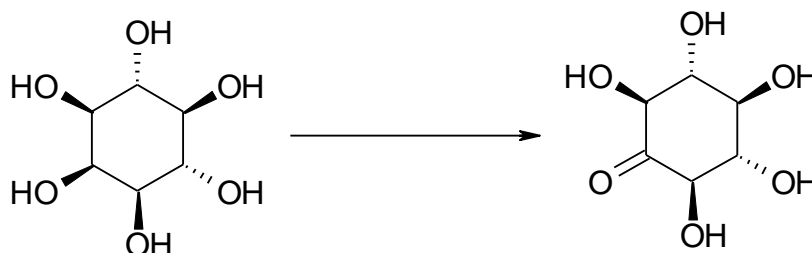
Ainda no mesmo estudo, (-)-bornesitol foi convertido em 1-O-metil-2,3-O-isopropilideno-mio-inositol após tratamento com acetona na presença de ácido acético e cloreto zinco, sob condições anidras (**Figura 3**). Apesar das condições avaliadas por esses autores serem distintas daquelas preconizadas em estudos de estabilidade, os resultados relatados indicam possíveis grupos mais lábeis no bornesitol.

**Figura 3 –** Reatividade do bornesitol em acetona na presença de ácido acético e cloreto zinco, sob condições anidras.



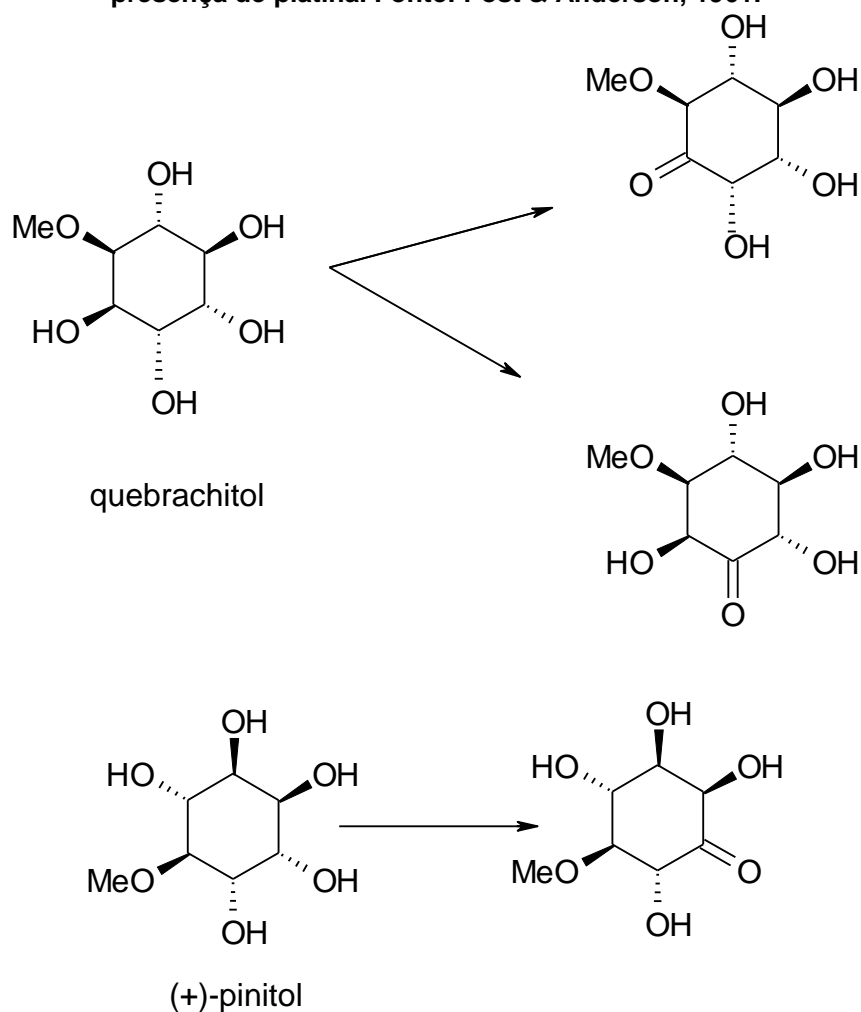
Em outro estudo, demonstrou-se que a oxidação catalítica de mio-inositol em atmosfera de oxigênio, tendo platina como catalisador, a 90 °C, ocorre exclusivamente na hidroxila da posição axial (**Figura 4**). O estudo demonstrou a labilidade das hidroxilas axiais, bem como a estabilidade de demais grupos da molécula sob temperaturas elevadas (POST & ANDERSON, 1961).

**Figura 4 –** Oxidação catalítica de mio-inositol. Fonte: Post & Anderson, 1961.



No mesmo estudo, avaliou-se a oxidação do quebrachitol, bornesitol e pinitol, utilizando as mesmas condições reacionais supracitadas. Todos os compostos geraram produtos oxidados no carbono que continha a hidroxila na posição axial. Os autores concluíram que somente hidroxilas axiais são passíveis de oxidação, e que são obtidos exclusivamente monocetonas, ainda que o substrato possua uma segunda hidroxila em axial. Ainda, para o pinitol e quebrachitol, que possuem duas hidroxilas em axial, a oxidação é seletiva para a hidroxila *meta*-dirigida ao grupo metoxila (**Figura 5**).

**Figura 5 – Oxidação catalítica do quebrachitol e pinitol com O<sub>2</sub> em presença de platina. Fonte: Post & Anderson, 1961.**



### 3.6 Colunas Hilic

Separações cromatográficas em fase reversa têm sido a base das análises por CLAE nos últimos 30 anos (WANG & HE, 2011), sendo empregadas para a separação de substâncias orgânicas de baixa e/ou média polaridade, de tamanhos variados, bem como para moléculas inorgânicas. A análise de compostos de elevada polaridade em fase reversa, entretanto, nem sempre é bem sucedida, uma vez que, os analitos eluem próximo, ou mesmo no volume morto da coluna. Estratégias como reações de derivatização são empregadas no intuito de solucionar este problema, mas na maioria dos casos não é possível obter êxito, principalmente em análises quantitativas (ALPERT, 1990).



O desenvolvimento de fases estacionárias adequadas para retenção de compostos de alta polaridade se faz imperioso, e entre as inovações introduzidas destaca-se a cromatografia líquida de interação hidrofílica – HILIC (*Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography*) (ALPERT, 1990).

A fase estacionária nessa modalidade de cromatografia é constituída por compostos de alta polaridade, como sílica, grupamentos amino, diol, ciano, entre outros, ligados à sílica. Para garantir a retenção dos analitos, é usual se trabalhar com altas proporções do solvente orgânico, como acetonitrila, enquanto a água é o modificador da força da fase móvel (JANDERA, 2011).

### **3.6.1 Fase móvel**

A força da fase móvel em cromatografia com colunas HILIC é definida pela proporção de água no eluente. Assim, a retenção de analitos polares é favorecida pela pequena proporção de água, ao passo que a menor retenção se dá em maiores proporções do solvente aquoso. O modificador orgânico mais comumente utilizado é a acetonitrila (ACN) (WANG & HE, 2011). Para uma boa retenção dos compostos de alta polaridade, recomenda-se trabalhar na faixa 70 a 90% de ACN em água (JANDERA, 2011). Ainda, em análises de detecção por espectrometria de massas (MS), ACN é também o solvente de escolha devido à sua maior volatilidade (BUSZEWSKI & NOGA, 2012). Alternativamente, pode-se usar sistemas de eluição contendo metanol.

A utilização de aditivos de resolução e melhoramento de sinal deve ser racionalizada com base nas propriedades físico-químicas do analito em questão, notadamente o pKa. Para compostos levemente básicos, recomenda-se o uso de ácido acético e ácido fórmico (0,1 – 0,2% v/v) – atentando-se à necessidade de volatilidade dos aditivos em caso de MS (WANG & HE, 2011). No caso de compostos de acidez elevada, deve-se considerar aditivos de pH elevados, como tampão formato / acetato de amônio (BUSZEWSKI & NOGA, 2012). Por fim, para a análise de carboidratos, os aditivos supracitados não são essenciais. É muito comum em LC-MS/MS a utilização de tampão acetato de sódio para aumentar a intensidade do sinal (JANDERA, 2011).

### **3.6.2 Fase estacionária**

No período anterior à década de 70, as separações de compostos polares por HILIC era realizada principalmente em colunas de sílica não modificada quimicamente e sistema de eluição H<sub>2</sub>O / ACN (WANG & HE, 2011). Embora essas colunas continuem sendo uma alternativa em função de sua estabilidade e baixa pressão, diversas fases estacionárias são empregadas na atualidade e possibilitaram um avanço na análise de compostos polares (QUIAO et al., 2016).

Colunas HILIC com funcionalizações diversas estão comercialmente disponíveis e incluem sílica quimicamente modificada com grupamentos amino, amida, ciano, polissuccinamida, sulfoalquilbetaina, aspartamida, diol, imidazol, triazol e fosfocolina, entre outras. Cabe destacar que o teor de grupos silanóis funcionalizados é geralmente menor quando comparado às colunas C18 ou C8 (ARRUA et al., 2012).

Todos os grupos funcionais supracitados têm a propriedade intrínseca de reter uma baixa quantidade de água (0,5 - 1,0% v/v), formando uma fina camada na superfície do leito cromatográfico, especialmente quando se utiliza pequenas proporções de água na fase móvel (< 40%) (QUIAO et al., 2016). Essa camada torna-se, então, parte da fase estacionária. Assim, quanto mais hidrofílico o analito for, maior será sua retenção nesta fina camada (WANG & HE, 2011).

Acredita-se que o mecanismo de separação em colunas HILIC alterne entre adsorção e partição, dependendo da proporção de água na fase móvel. As interações são guiadas especialmente pela funcionalização da fase estacionária, especialmente grupos carregados, que interagem fortemente via dipolos ou ligações de hidrogênio com o analito (WANG & HE, 2011). Por sua vez, a polaridade do analito pode ser estimada pela fórmula empírica:

$$\text{Polaridade} = \frac{\text{Número de grupos polares}}{\text{Número de carbonos}}$$

Quando apenas a partição domina a separação, essa fórmula empírica pode ser utilizada para prever a ordem de eluição dos compostos (JANDERA, 2011).

### **3.6.2.1 Interação de analitos não iônicos em colunas HILIC e influência da composição da fase móvel, temperatura e pH**

Existem três tipos de interações possíveis para grupos não polares que possibilitam a retenção diferencial de compostos orgânicos em colunas tipo HILIC: momento dipolo, dipolo permanente e interações tipo ligação de hidrogênio. A última é mais susceptível a alterações na composição da fase móvel e temperatura da coluna (ARRUA et al., 2012).

#### **A) Efeito da composição da fase móvel**

A principal característica considerada na escolha dos solventes constituintes da fase móvel é a capacidade de receber ou doar ligações de hidrogênio (LH) (ALPERT, 1990). Em função disso, pode-se dividir os solventes em polares próticos e polares apróticos. Os solventes próticos podem ser doadores ou receptores de LH, ao passo que os apróticos são apenas receptores (WANG & HE, 2011). Dentre os solventes próticos utilizados em cromatografia, pode-se citar: metanol (MeOH), etanol (EtOH), isopropanol e ácido acético. Já no caso de solvente apróticos, têm-se acetonitrila (ACN) e tetraidrofurano (THF). Quando os analitos são passíveis de formar ligações de hidrogênio, a troca de eluentes é uma estratégia válida para alterar a resolução entre os picos (ALPERT, 1990).

Conforme mencionado anteriormente, o mecanismo de retenção em HILIC baseia-se na fina camada superficial aquosa que repousa sobre a fase estacionária. Solventes próticos competem de maneira mais efetiva pelos sítios polares (grupos silanóis) dessa camada da HILIC, perturbando sua formação (WANG & HE, 2011). Isso resulta em uma fase estacionária mais hidrofóbica, e consequentemente, em menor retenção dos analitos que realizam LH. Solventes polares apróticos não perturbam essa fina camada da fase estacionária, permitindo uma interação efetiva entre o analito e o leito cromatográfico (ARRUA et al., 2012). Ainda nesse contexto, entre ACN e THF,

deve-se inicialmente preconizar-se o uso da ACN, uma vez que o THF tem melhor capacidade aceptora de LH.

#### B) Temperatura da Coluna

A temperatura da coluna pode afetar a retenção dos compostos de duas maneiras: alterando a entalpia de transferência do analito entre as fases móvel e estacionária, levando à maior difusão do analito, ou, em casos mais específicos, promovendo alterações estruturais na amostra. Como exemplo, pode-se citar a separação de compostos tautoméricos, em que a temperatura pode favorecer preferencialmente uma ou outra forma (MEYER, 2006). Ainda, o aumento da temperatura pode levar à redução da viscosidade da fase móvel, reduzindo o tempo de retenção dos compostos (WANG & HE, 2011).

#### C) Efeito do pH da Fase móvel

Inicialmente, deve-se ter em mente que compostos ionizados são naturalmente mais retidos pelas colunas HILIC. Assim, a variação do pH torna-se particularmente importante quando se analisa compostos ionizáveis, uma vez que podem coexistir em equilíbrio as formas ionizadas e não ionizadas. Dessa forma, a alteração do pH da fase móvel pode mudar o estado de carga do analito promovendo, ou acentuando interações eletrostáticas até então latentes. Como agentes de alteração do pH pode-se citar sais tamponantes, aditivos de resolução, ácidos orgânicos e inorgânicos (ITO, 2011).

### **3.6.3 Emprego de colunas HILIC**

O uso de colunas do tipo HILIC possibilitou um grande avanço na análise de compostos polares. Além disso, seu uso em técnicas cromatográficas hífenadas, em especial LC-MS, possibilitou avanços em estudos de farmacocinética, metabolômica e proteômica (WANG & HE, 2011).

A revisão da literatura indica o emprego de técnicas cromatográficas de HILIC para a análise de ciclitolis e derivados. Tao Sun e colaboradores (2012) desenvolveram e validaram um método de HILIC-MS/MS para quantificar glicerofosfoinositol, glicerofosfocolina, glicerol 3-fosfato, inositol e colina presentes no meio extracelular de *Saccharomyces cerevisiae*. Utilizou-se como

fase móvel ACN / água (70:30), contendo 10 mM de acetato de amônio, em eluição isocrática. Linearidade, precisão intradia e interdias e exatidão intradia e interdias foram os parâmetros de validação avaliados pelos autores.

Liang e colaboradores (2010) avaliaram a composição de derivados lipídicos e outros constituintes do parasita *Leishmania donovani* utilizando três colunas distintas: butilsilano (C-4), ZIC-HILIC e sílica gel. A melhor resolução foi obtida com a coluna HILIC, empregando o sistema eluente composto por (A) 20% de álcool isopropílico em ACN / (B) 20% de álcool isopropílico em formato de amônio 0,02 M. Neste estudo, triglicerídeos, fosfoinositóis, fosfoetanolaminas, fosfatidilserinas, fosfatidilcolinas, esfingosinas, lisofosfatidiletanolamina e lisofosfatidilcolinas foram identificados com resolução cromatográfica satisfatória.

Em outro estudo, Pazourek (2014) desenvolveu um método cromatográfico com coluna HILIC para a quantificação de mio-inositol em uma matriz complexa de carboidratos, notadamente D-manitol e sacarose. A detecção foi realizada por detector evaporativo com espalhamento de luz (ELSD) e o sistema eluente constituiu-se de ACN e acetato de amônio 100 mM em água.

Em outro estudo, Bathena e colaboradores (2012) desenvolveram e validaram um método para a quantificação de aminoácidos e mio-inositóis em tecido cerebral de rato por LC-MS/MS. A análise foi realizada em coluna HILIC e possibilitou a quantificação de glutamina, glutamato, ácido gama-aminobutírico, ácido aspártico, ácido N-acetil aspártico, taurina, colina, creatina, fosfocolina e mio-inositol com resolução adequada.

Ainda em estudos de mio-inositóis, Wong e colaboradores (2012) desenvolveram e validaram um método de detecção de trifosfato de mio-inositol em urina e plasma de equinos por LC-MS/MS com coluna HILIC. A eluição ocorreu em coluna HILIC de sílica gel, e o sistema eluente utilizado foi acetato de amônio 25 mM e acetonitrila.

Em outro estudo, Moldoveanu e Davis (2012) desenvolveram e validaram um método de LC-MS/MS para a análise de ácido quínico e mio-inositol em tabaco. Os autores empregaram nas análises coluna HILIC de sílica quimicamente modificada com amida, sendo o sistema eluente acetato de amônio e acetonitrila.

## 4 EXPERIMENTAL

### 4.1 Equipamentos

- Aparelho de ponto de fusão MQAPF-30, Microquímica.
- Balança analítica Mettler, modelo AB 204.
- Balança semi-analítica Núcleo, modelo PR 1000.
- Banho de ultrassom Thornton, modelo T 50.
- Banho de ultrassom Unique, modelo USC 1400.
- Banho seco com agitação, Mixing Block, modelo MB-101, Bioer.
- Bombas de vácuo Fabbe (modelo 0320) e Edwards (modelo C 560786).
- Câmara de exposição a Luz ultra-violeta
- Centrífuga Hermle Z323K.
- Chapas para aquecimento Fisatom, modelo 752 A e Corning, modelo V-092.
- Coluna para UPLC Waters Acquity UPLC<sup>®</sup> BEH HILIC (150 x 2,1 mm, 1,7  $\mu$ m).
- Destilador de água Fabbe, modelo A 95.
- Espectrômetro de ressonância magnética nuclear Bruker Avance DRX – 400 MHz (Departamento de Química, ICEX, UFMG).
- Evaporador rotatório Buchi, modelo B-480.
- Freezer Brastemp<sup>®</sup> flex frostfree.
- Geladeira Eletrolux<sup>®</sup> frostfree, modelo DF47.
- Liofilizador Liotop<sup>®</sup>, modelo L101 Microcentrífuga Cientec, modelo CT-14000.
- Micropipetas HTL, vol. ajustável de 10 - 100  $\mu$ L e 100 - 1000  $\mu$ L.
- Moinho de facas Marconi, modelo MA680.
- Purificador de água Milli-Q Plus.
- Sistema de concentração a vácuo Centrivap, Labconco, modelo A50.
- Sistema de UPLC-MS/MS ACQUITY Ultra Performance LC<sup>™</sup>, Waters, composto por detector de arranjos de diodo (DAD) modelo PDA 2996 e detector de espectrometria de massas ACQUITY TQ (Water), equipado

com fonte de ionização por spray de elétrons Z-spray (ESI) e software Mass Lynx™ (versão 4.1, Waters).

- Ultrafreezer Liotop®, modelo UFR80.
- Vortex Mixer, Vixar.
- Ácidos grau P.A.: ácido fórmico, ácido sulfúrico e ácido clorídrico, Merck.
- Álcool etílico comercial, Emfal.
- Cromatofolhas de alumínio recobertas por sílica gel 60, 20 x 20 cm, Merck.
- Dimetilsulfóxido, Sigma-Aldrich.
- Hidróxido de sódio P.A. em pérolas, Fmaia. Piridina anidra, Sigma-Aldrich.
- Peróxido de hidrogênio 30% (v/v), Synth
- Piridina anidra, Merck.
- Sílica gel 60 G Merck.
- Sílica gel 60, 230-400 mesh, Merck.
- Sílica gel 60, 70-230 mesh, Merck.
- Solventes grau CLAE acetonitrila e metanol, Tedia.
- Solventes grau padrão analítico (P.A.): álcool isopropílico, álcool n-butílico, acetona, acetato de etila, metanol e álcool etílico, Neon; álcool etílico 95%, Fmaia.
- Sulfato de cobre.
- Balões volumétricos de 1, 5, 10 e 25, Satelit, Normax e Blaubrand.
- Barras magnéticas diversas.
- Borrifador de vidro.
- Coluna para UPLC Waters Acquity UPLC® BEH HILIC (150 x 2,1 mm, 1,7 µm).
- Colunas cromatográficas de vidro de dimensões variadas.
- Cromatoplasmas de vidro de 5 x 10 cm e 10 x 10 cm.
- Cubas cromatográficas de vidro Pirex.
- Erlenmeyers de 25, 50, 100 e 250 mL.
- Espátulas diversas.
- Filtro de 0,45 µm, Milex® HV.
- Frascos de penicilina com tampa de borracha.

- Frascos de penicilina com tampa de borracha.
- Funil sinterizado número 3.
- Kitasato de 250 mL.
- Microtubo plástico de 2 mL e 1,5 mL do tipo *safe-lock*, Axygen.
- Papel de filtro qualitativo.
- Papel indicador de pH Universal, pH 0-14, Merck.
- Percoladores de vidro e de aço inoxidável com volumes variados.
- Placa de 96 poços para cultivo celular, Corning.
- Ponteiras universais, 1-200 µL e 100-1000 µL, Axygen Scientific Inc.
- Pré-coluna Waters Acquity UPLC<sup>®</sup> BEH HILIC (5 x 2,1 mm, 1,7 µm).
- Seringas descartáveis com agulha, de 1 mL, Descarpack e de 10 mL, Injex.
- Termômetro 10-360°C, Incoterm.
- Tubos plásticos do tipo Falcon com volumes de 15 e 50 mL, TPP.
- Tubos plásticos do tipo safelock com volumes de 1,5 e 2,0 mL, Axygen.
- Vials de vidro com tampa e septos de teflon para uso no injetor automático de sistema de CLAE e UPLC-MS, Tedia.

#### 4.1 Material vegetal

As partes aéreas de *Hancornia speciosa* foram coletadas em novembro de 2014 às margens da BR 251, Km 18, sentido Pirapora-MG. A Professora Dra. Maria das Dores Magalhães Veloso foi responsável pela identificação botânica e uma exsicata da espécie está depositada no Herbário do Centro de Ciências Agrárias da UFMG, sob o número 3816. O material vegetal foi seco em estufa ventilada a 45 °C por 48 h e, então, pulverizado em moinho de facas.



## 4.2 Obtenção do extrato

O material vegetal seco foi submetido à percolação exaustiva com metanol e acetato de etila (1:1). Duas porções de 100 g foram preparadas separadamente. O percolado foi concentrado em evaporador rotatório, sob pressão reduzida, à temperatura média de 55 °C. Os extratos foram transferidos para frascos previamente tarados, e mantidos em dessecador, sob pressão reduzida, para eliminação do solvente residual (**Tabela 1**).

**Tabela 1 – Rendimento obtido para o extrato seco EtOAc:MeOH (1:1).**

	Percolador 1	Percolador 2
Droga vegetal	100 g	100 g
Extrato seco	40,3 g	38,4 g
Rendimento	40,3 %	38,4%

## 4.3 Isolamento do bornesitol

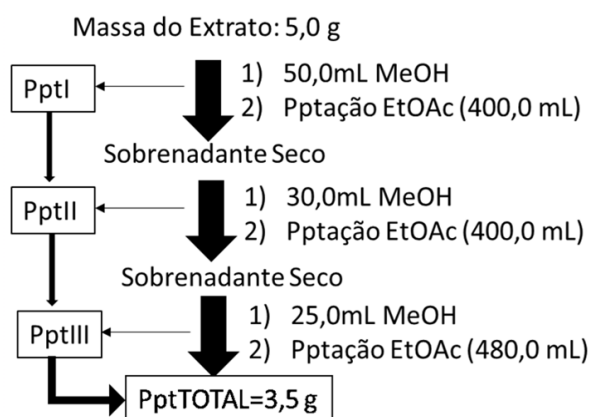
### 4.3.1 Precipitação com acetato de etila

Solubilizou-se 5,0 g do extrato seco de *H. speciosa* (item 4.2) em MeOH (50,0 mL), mantendo-se em banho de ultrassom por 20 minutos. Adicionou-se à solução 400,0 mL de EtOAc, observando-se a formação de um precipitado amarelado. Resfriou-se a solução à -4 °C por 24 horas e, então, a solução foi centrifugada a 822 g por 20 minutos. A temperatura da centrífuga foi mantida em 4 °C.

O precipitado obtido (Ppt I = 3,0 g) foi transferido para um frasco previamente tarado, e mantido em dessecador sob pressão reduzida para eliminação do solvente residual. O sobrenadante foi seco em evaporador rotatório sob pressão reduzida, e solubilizado novamente em MeOH (2,0 g / 30,0). Adicionou-se 400,0 mL de EtOAc à solução e repetiu-se o procedimento anterior, obtendo-se um novo precipitado (Ppt II = 0,4 g), que foi transferido para frasco previamente tarado, e mantido em dessecador sob pressão reduzida para eliminação do solvente residual. Repetiu-se novamente o processo para a obtenção do terceiro precipitado (Ppt III = 0,1 g). Os

precipitados obtidos foram então reunidos (PptTOTAL=3,5g). O fluxograma das operações realizadas para a obtenção dos precipitados está representado na **Figura 6**.

**Figura 6 – Fluxograma do processo de precipitação do extrato de *H. speciosa* com acetato de etila.**

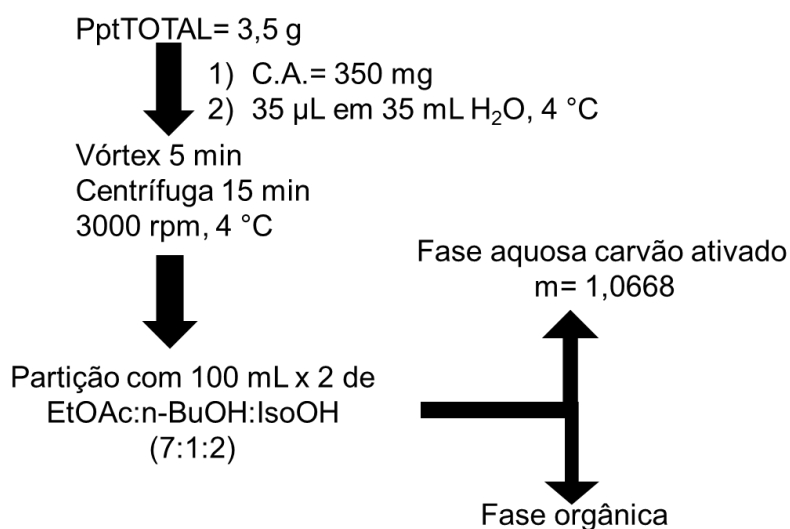


A presença de bornesitol nos precipitados foi avaliada por cromatografia em camada delgada (CCD) de sílica gel, utilizando-se como eluente água / acetato de etila / propan-2-ol (6:11:83) e como revelador 0,5% de  $\text{KMnO}_4$  em hidróxido de sódio 1N (BAUMGARTNER et al., 1986). Utilizou-se como substância química de referência o bornesitol isolado anteriormente por grupo de pesquisa (PEREIRA, 2012).

#### **4.3.2 Extração com carvão ativado**

O precipitado obtido (PptTOTAL) foi submetido à extração com carvão ativado. Para tanto, 3,5 g do material seco foram solubilizados em 35,0 mL de solução aquosa de ácido fosfórico a 0,1% resfriado a 4 °C. A solução resultante foi transferida para tubo Falcon de 50,0 mL. Adicionou-se à solução 350,0 mg de carvão ativado, agitou-se em vórtex por 5 minutos, e centrifugou-se a 822 g a 4 °C por 15 minutos. Na sequência, o sobrenadante (35,0 mL), foi particionado com mistura (2 x 100 mL) de acetato de etila / *n*-butanol / propan-2-ol (7:1:2). As fases aquosas foram reunidas, secas em evaporador rotatório à temperatura máxima de 60 °C, e o resíduo obtido foi mantido em dessecador sob pressão reduzida até completa eliminação do solvente residual, originando a fração aquosa do fracionamento com carvão ativado ( $f_{aca}=1,07$  g) (**Figura 7**).

**Figura 7 – Fluxograma da purificação de PptTOTAL com carvão ativado.**



#### 4.3.3 Filtração em sílica gel

Uma porção de 1,0 g da fração  $f_{aca}$  obtida no item anterior, foi incorporada em 5,0 g de sílica gel (0,04 – 0,063 mm) e depositada em funil sinterizado nº 4 preenchido com 45,0 g de sílica gel com as mesmas especificações. Procedeu-se à eluição com pressão negativa fornecida por trompa de vácuo, utilizando a série eluotrópica descrita na **Tabela 2**.

**Tabela 2– Série eluotrópica utilizada no fracionamento de  $f_{aca}$ .**

Eluente	Volume das frações	Frações reunidas
EtOAc (100%)	3 x 100,0 mL	1, 2, 3
EtOAc:MeOH (95:5)	14 x 50,0 mL	4 – 17
EtOAc:MeOH (90:10)	14 x 50,0 mL	18 – 31
EtOAc:MeOH (85:15)	14 x 50,0 mL	32 – 45
EtOAc:MeOH (80:20)	14 x 50,0 mL	46 – 59
EtOAc:MeOH (75:25)	14 x 50,0 mL	60 – 73
EtOAc:MeOH (70:30)	14 x 50,0 mL	74 – 87
EtOAc:MeOH (65:35)	8 x 50,0 mL	88 – 94
MeOH (100%)	1 x 100,0 mL	95

As frações foram reunidas de acordo com semelhança no perfil por CCD de sílica gel, utilizando-se como eluente o sistema água / acetato de etila / propan-2-ol (6:11:83) e revelação com solução de  $\text{KMnO}_4$  0,5% (p/v) em NaOH 0,1 M.

#### **4.3.4 Recristalização e purificação**

As frações enriquecidas em bornesitol (32-59), obtidas no item anterior, foram reunidas e secas exaustivamente em dessecador sob pressão reduzida para garantir a completa eliminação do solvente. O sólido amarelado obtido foi então submetido à recristalização em metanol.

A solução metanólica foi aquecida à temperatura máxima de  $60 \pm 5$  °C, seguindo-se as etapas de resfriamento à temperatura ambiente (20 min) e em freezer à -20 °C (24 h). A água mãe de todas as recristalizações foi reunida em um único frasco previamente tarado, sendo submetida a sucessivas etapas de recristalização em solução metanólica.

#### **4.4 Ensaios de caracterização e pureza**

Os ensaios de caracterização tiveram como objetivo avaliar a pureza do bornesitol isolado. Para tanto, foram realizadas análises por CCD de sílica gel, além da determinação do ponto de fusão e obtenção de espectros de RMN.

##### **4.4.1 Cromatografia em camada delgada (CCD)**

As placas de CCD de sílica gel foram eluídas com água / acetato de etila / propano-2-ol (6:11:83). Foram empregados reveladores inespecíficos como solução alcalina de permanganato de potássio, anisaldeído sulfúrico e sulfato cérico.

- **Solução alcalina de permanganato de potássio (Baumgartner et al., 1986):** Solubilizou-se 4 g de NaOH micropérolas em 50,0 mL de água. Adicionou-se 0,5 g de  $\text{KMnO}_4$  e transferiu-se para balão volumétrico de 100,0 mL. Completou-se o volume com água.

- **Solução de anisaldeído sulfúrico (WAGNER & BLADT, 1996):** Misturou-se 0,5 mL de anisaldeído, 10,0 mL de ácido acético glacial, 85,0 mL de metanol e 5,0 mL de ácido sulfúrico concentrado, nesta ordem, sob resfriamento.
- **Sulfato cérico (WAGNER & BLADT, 1996):** Solubilizou-se 42 g de  $\text{CeSO}_4$  em 500 mL de água contendo 28 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  e completou-se o volume para 1000 mL.

#### **4.4.2 Ponto de fusão**

As faixas de fusão foram determinadas em aparelho de ponto de fusão MQAPF-301 Microquímica.

#### **4.4.3 RMN**

Os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  (experimentos HSQC, DEPT 135 e COSY) foram obtidos no Departamento de Química, ICEx, UFMG, em Espectrômetro de ressonância magnética nuclear Bruker Avance DRX – 400 MHz, a 25 °C, utilizando tetrametilsilano (TMS) como referência interna para ambos os núcleos. O solvente empregado para as análises foi o dimetilsulfóxido deuterado ( $d_6$ -DMSO).

### **4.5 Desenvolvimento de método analítico para quantificação de bornesitol por LC-MS-ESI**

#### **4.5.1 Sistema de detecção**

O desenvolvimento e validação do método foram realizados em sistema UPLC-MS/MS Acquity Waters. As análises foram realizadas em coluna Acquity UPLC<sup>®</sup> BEH HILIC (150 x 2,1 mm, 1,7  $\mu\text{m}$ , Waters), em combinação com pré-coluna Acquity UPLC<sup>®</sup> BEH HILIC (5 x 2,1 mm, 1,7  $\mu\text{m}$ , Waters).

Os cromatogramas foram obtidos usando detector de ultravioleta-visível (UV-Vis) e espectrômetro de massas com ionização por eletrospray (ESI). Os cromatogramas e espectros foram obtidos e tratados *online* no software *MassLynx Software*<sup>®</sup> Versão 4.1 (Waters).

Para desenvolvimento do método de *Multiple Reaction Monitoring* (MRM), cerca de 2,5 mg do bornesitol foram pesados para tubo plástico tipo *safe-lock* e solubilizadas com 2,0 mL de MeOH grau CLAE. A solução foi sonicada por 20 min, sendo então mantida sob repouso por 20 min. A solução foi transferida quantitativamente para balão volumétrico de 5,0 mL e o volume completado com o mesmo solvente.

Para a quantificação do analito, desenvolveu-se e otimizou-se um método de MRM específico para o bornesitol baseado nas transições  $m/z$  193  $\rightarrow$  161 e 193  $\rightarrow$  175. As condições de análise estão descritas na **Tabela 3**. Utilizaram-se os parâmetros definidos por Bathena e colaboradores (2012) como base para estabelecimento do método analítico.

**Tabela 3 – Condições do detector de espectrômetro de massas (MS) definidas para análise de bornesitol.**

Condições de detecção por MS no modo ESI-	
<b>Voltagens</b>	
Capilaridade(kV)	3,5
Cone (V)	27
Extrator (V)	3
RF Lens (V)	0,1
Colisão (193,1-> 161 Da) (V)*	14
Colisão (193,1-> 175,4 Da) (V)*	10
<b>Temperatura</b>	
Temperatura de dessolvatação (°C)	450
Temperatura na fonte (°C)	120
<b>Fluxo dos Gases</b>	
Gas de dessolvatação (L/h)	900
Cone (L/h)	90
<b>Analizador</b>	
Resolução de massas baixas 1**	15
Resolução de massas altas 1**	15
Ion energy**	1
Entrada**	2
Saída**	2
Energia de colisão (V)**	10
Resolução de massas baixas 2**	15
Resolução de massas altas 2**	15
Ion energy 2**	1
Ganho	1
Fluxo do gás de colisão (mL/ min)	0,17
<b>Espectroscopia na região Ultravioleta</b>	
Faixa de varredura (nm)*	190 - 500
<b>Condições de injeção</b>	
Fluxo****	50 µL/ min
Modo de fluxo	Fluxo combinado

**Nota:**

\* Parâmetros otimizados pelo analista

\*\* Parâmetros definidos pelo fabricante para desenvolvimento do método de MRM

\*\*\* Parâmetro variado de acordo com a intensidade do sinal. O valor médio utilizados foi 50 µL/ min

#### 4.5.2 Desenvolvimento do método analítico

O desenvolvimento do método cromatográfico se deu a partir das condições previamente definidas por Bathena e colaboradores (2012) para a análise de mio-inositol, utilizando as condições descritas na **Tabela 4**.

**Tabela 4 – Condição cromatográfica desenvolvida por Bathena e colaboradores (2012) para a análise de mio-inositol.**

Tempo (min)	Eluente* (%)		Fluxo (mL/min)
	A	B	
Condição A			
0	13,0	87,0	0,3
5,25	13,0	87,0	0,3
5,50	75,0	25,0	0,3
9,00	75,0	25,0	0,3
9,25	13,0	87,0	0,3
15,00	13,0	87,0	0,3

\*Nota: Eluente A: 0,1% de ácido fórmico em água ultrapura

Eluente B: acetonitrila

#### 4.5.3 Avaliação do efeito *carryover* em amostras submetidas a degradação ácida, básica e oxidativa

Inicialmente, avaliou-se a capacidade do método de eluir os possíveis produtos de degradação do bornesitol gerados nas condições mais drásticas de estudo. Foram realizados experimentos em condições ácida, alcalina e oxidativa.

##### 4.5.3.1 *Preparo da solução padrão*

A solução padrão utilizada nas análises foi preparada no dia do ensaio pesando-se exatamente cerca 1,5 mg de bornesitol para tubo plástico tipo *safe-lock* de volume de 2,0 mL. Solubilizou-se o padrão em 1,5 mL de água ultrapura, gerando uma solução de concentração 1,0 mg/ mL. A solução foi sonicada por 20 minutos e posteriormente mantida em repouso por 20 minutos.



Aos meios estressantes (ácido, básico e oxidação) adicionou-se 500 µL da solução padrão e submeteu-se às condições de degradação.

#### **4.5.3.2 Degradação ácida**

A degradação ácida na condição mais drástica foi realizada sob refluxo, durante 24 h, em solução de HCl 5,0M. Para tanto, adicionou-se 830 µL de HCl 37% (m/m), 670 µL de água ultrapura e 500 µL da solução padrão descrita acima a tubos plásticos tipo *safe-lock*. Ao final de 24 h, a solução foi neutralizada com 1000 µL de solução de NaOH 10,0 M. A mistura foi centrifugada e analisada em sistema de UPLC-MS/MS em modo *Scan*.

#### **4.5.3.3 Degradação básica**

A degradação básica na condição mais drástica foi realizada sob refluxo, durante 24 h, utilizando solução de NaOH 5,0 M. Para tanto, adicionou-se 1000 µL de NaOH 10,0 M, 500 µL de água ultrapura e 500 µL da solução padrão a tubos plásticos tipo *safe-lock*. Ao final do período de exposição, a solução foi neutralizada com 830 µL de HCl 37% (m/m). A mistura foi centrifugada e analisada no UPLC-MS/MS em modo *Scan*.

#### **4.5.3.4 Degradação oxidativa**

A degradação oxidativa na condição mais drástica foi realizada à temperatura ambiente, durante 24 h, utilizando solução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 22%. Para tanto, adicionou-se 600 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30%, 900 µL de água ultrapura e 500 µL da solução padrão a tubos plásticos tipo *safe-lock*. Ao final do período de exposição, a mistura foi centrifugada e analisada no UPLC-MS/MS em modo *Scan*.

### **4.6 Avaliação do efeito de matriz**

Avaliou-se a influência do NaCl gerado pela neutralização dos agentes de degradação NaOH e HCl na quantificação de bornesitol. Para acompanhar a intensidade da interferência do sal no sinal do bornesitol, desenvolveu-se e otimizou-se um método de MRM para a quantificação no modo ESI-, baseado

nas transições do NaCl em  $m/z$  268→210 e  $m/z$  268→92,8. Os ensaios foram realizados com uma solução aquosa de NaCl 5,0 M. As condições de análise estão descritas na **Tabela 5**.

**Tabela 5 - Condições de detecção do MS utilizadas na quantificação de NaCl via MRM.**

<b>Transição em <math>m/z</math> 268,8*→92,8</b>	
Cone (V)	29
Colisão (V)	15
<b>Transição em <math>m/z</math> 268,8*→210,8</b>	
Cone (V)	29
Colisão (V)	9

Nota: As demais condições espectroscópicas foram aquelas descritas no item 4.5.1.

\* $m/z$  = [5 NaCl – Na]<sup>+</sup>

#### **4.6.1 Preparo da solução padrão de bornesitol**

A solução padrão utilizada nas análises foi preparada no dia do ensaio pesando-se exatamente cerca de 1,2 mg de bornesitol em tubos plásticos tipo safe-lock de 2,0 mL de capacidade. Adicionou-se 2,0 mL de água ultrapura, gerando uma solução de concentração 0,6 mg/mL. A solução foi sonicada por 20 minutos e posteriormente deixada em repouso por 20 minutos.

#### **4.6.2 Preparo da solução estoque de NaCl**

A solução estoque de NaCl foi preparada pela solubilização de 4,39 g de NaCl em 25,0 mL de água ultrapura, produzindo uma solução com concentração de NaCl 3,0 M.

#### **4.6.3 Preparo das soluções de trabalho**

Preparou-se três soluções (A, B e C) com concentrações crescentes de NaCl e concentrações fixas de bornesitol. Para a solução A, adicionou-se 500 µL da solução de NaCl, preparada conforme o item 4.6.2, 200 µL da solução padrão e 1300 µL de água ultrapura. Para a solução B, à mesma maneira, adicionou-se 200 µL da solução padrão, entretanto, o volume da solução de NaCl adicionado foi de 670 µL e 1130 µL de água ultrapura. Por último,

preparou-se a solução C, pela adição de 830  $\mu\text{L}$  da solução salina, 200  $\mu\text{L}$  da solução padrão e 970  $\mu\text{L}$  de água ultrapura. Para cada solução (A, B e C) preparou-se um branco individual (A', B' e C') contendo a mesma concentração de NaCl que nas soluções adicionadas com bornesitol. As soluções resultantes foram centrifugadas e filtradas. As análises foram realizadas utilizando o método de MRM para quantificação do bornesitol (item 4.5.1) e MRM para quantificação de NaCl (item 4.6.2).

#### **4.6.4 Otimização das condições cromatográficas**

Foram feitas modificações do método cromatográfico inicial (item 4.5.2) visando eliminar o efeito de matriz gerado pelo NaCl. As condições estabelecidas estão descritas na **Tabela 6** e as análises foram realizadas empregando a solução B preparada no item 4.6.3.

**Tabela 6 – Condições cromatográficas de UPLC avaliadas visando obter resolução entre bornesitol e cloreto de sódio.**

Tempo (min)	Eluente (%)		Fluxo (mL/min)	Tempo (min)	Eluente (%)		Fluxo (mL/min)
	A	B			A	B	
Condição A				Condição B			
0	13,0	87,0	0,3	0	25,0	75,0	0,3
5,25	13,0	87,0	0,3	5,25	25,0	75,0	0,3
5,50	75,0	25,0	0,3	5,50	75,0	25,0	0,3
9,00	75,0	25,0	0,3	9,00	75,0	25,0	0,3
9,25	13,0	87,0	0,3	9,25	25,0	75,0	0,3
15,00	13,0	87,0	0,3	15,00	25,0	75,0	0,3
Condição C				Condição D			
0	35,0	65,0	0,3	0	5,0	95,0	0,3
5,25	35,0	65,0	0,3	5,25	5,0	95,0	0,3
5,50	75,0	25,0	0,3	5,50	75,0	25,0	0,3
9,00	75,0	25,0	0,3	9,00	75,0	25,0	0,3
9,25	35,0	65,0	0,3	9,25	5,0	95,0	0,3
15,00	35,0	65,0	0,3	15,00	5,0	95,0	0,3
Tempo (min)	Eluente (%)		Fluxo (mL/min)	Tempo (min)	Eluente (%)		Fluxo (mL/min)
	A	C			A	C	
Condição E				Condição F			
0	25,0	75,0	0,3	0	35,0	65,0	0,3
5,25	25,0	75,0	0,3	5,25	35,0	65,0	0,3
5,50	75,0	25,0	0,3	5,50	75,0	25,0	0,3
9,00	75,0	25,0	0,3	9,00	75,0	25,0	0,3
9,25	25,0	75,0	0,3	9,25	35,0	65,0	0,3
15,00	25,0	75,0	0,3	15,00	35,0	65,0	0,3
Tempo (min)	Eluente (%)		Fluxo (mL/min)				
	A	D					
Condição G							
0	13,0	87,0	0,3				
5,25	13,0	87,0	0,3				
5,50	75,0	25,0	0,3				
9,00	75,0	25,0	0,3				
9,25	13,0	87,0	0,3				
15,00	13,0	87,0	0,3				

**Nota:** Eluentes: **A:** água com 0,1 % de ácido fórmico; **B:** acetonitrila; **C:** acetonitrila com 0,1 % de ácido fórmico; **D:** metanol. Coluna Acquity UPLC® BEH HILIC (150 x 2,1 mm, 1,7 µm), pré-coluna Acquity UPLC® BEH HILIC (5 x 2,1 mm, 1,7 µm). Gradiente linear tipo 6. O espectro no UV foi obtido em varredura de 500 a 200 nm. A detecção por MS foi realizada no modo MRM em ESI-.

#### **4.6.5 Otimização das condições de extração do bornesitol para análise por UPLC-MS**

Visando eliminar o efeito de matriz decorrente do NaCl gerado na neutralização das soluções de degradação ácida e básica, diferentes solventes foram avaliados para extração seletiva do bornesitol. A investigação foi feita em três etapas: inicialmente avaliou-se a solubilização do NaCl pelos solventes puros. Em seguida, avaliou-se a capacidade de solubilização do analito nos solventes contaminados com NaCl. Por fim, avaliou-se a solubilização do analito na presença do NaCl originado nas condições reais de hidrólise. Os solventes dimetilformamida (DMF), dimetilsulfóxido (DMSO) e piridina (Pyr) foram investigados nesse estudo.

##### ***4.6.5.1 Avaliação da solubilização do NaCl***

Prepararam-se três soluções de leitura contendo 580 mg de NaCl (massa de NaCl gerada na condição drástica de degradação), pesados diretamente para tubo plástico tipo *safe-lock* com 2,0 mL de capacidade. As soluções foram solubilizadas em 1,5 mL de DMF, DMSO e Pyr, submetidas a agitação em vórtex por 20 min. Feito isso, as amostras foram centrifugadas a 6708 g por 15 min. Dilui-se 1,0 mL do sobrenadante em balão volumétrico de 5,0 mL em metanol. Injetou-se 2,0 µL da solução no sistema de UPLC-MS, procedendo-se à eluição com a condição cromatográfica A (item 4.6.3). As condições espectrométricas de quantificação em MRM para bornesitol (item 4.5.1) e NaCl (item 4.6) foram utilizadas, sendo as análises realizadas em triplicata.

##### ***4.6.5.2 Avaliação da detecção de bornesitol nas soluções contaminadas com NaCl***

Prepararam-se as mesmas soluções descritas no item 4.6.3. Às amostras foram adicionados volumes fixos de solução estoque de bornesitol (150 µL). Preparou-se, também, uma solução referência de bornesitol na mesma concentração teórica em metanol (150 µL/1,5 mL). As amostras foram centrifugadas, diluídas e injetadas no sistema, à mesma maneira do item 4.6.4.1.

#### **4.6.5.3 Avaliação da detecção de bornesitol em condições reais de degradação ácida e básica**

As condições de degradação ácida e básica foram repetidas, à mesma maneira dos itens 4.5.3.2 e 4.5.3.3, respectivamente. Ao final da exposição, as amostras foram neutralizadas e liofilizadas (-52 °C, 400 mmHg, 48 h). Após a adição de 1,5 mL de piridina anidra, as amostras foram sonicadas (20 min) e agitadas em vórtex (5 min). Preparou-se também uma solução padrão de bornesitol na mesma concentração, que não foi submetida à marcha extrativa. As amostras foram centrifugadas a 6708 g por 10 min. Transferiu-se 1,0 mL do sobrenadante para balão volumétrico de 5,0 mL, e completou-se o volume com MeOH. As amostras foram injetadas no sistema conforme o item 4.6.4.1.

### **4.7 Método analítico estabelecido para a quantificação de bornesitol por ULPC-MS**

#### **4.7.1 Condições cromatográfica e espectroscópica definidas**

A condição cromatográfica estabelecida para o método analítico emprega coluna Acquity UPLC® BEH HILIC (150 x 2,1 mm, 1,7 µm, Waters), em combinação com pré-coluna Acquity UPLC® BEH HILIC (5 x 2,1 mm, 1,7 µm, Waters). A temperatura da coluna foi de 20 °C e a fase móvel utilizada compreendeu gradiente de eluição de água Mili-Q acidificada com 0,1% de ácido fórmico (A) e acetonitrila grau HPLC (B), conforme apresentado na **Tabela 7**. O fluxo empregado foi de 0,3 ml/min, a detecção foi realizada por DAD na região de 190-500 nm, sendo o volume de injeção variável de 1 a 3 µL.

**Tabela 7 – Gradiente de eluição definido para o método de UPLC-MS para a quantificação de bornesitol, conforme definido por Bathena e colaboradores (2012).**

<b>Tempo (min)</b>	<b>%A</b>	<b>%B</b>	<b>Modo de eluição</b>
0	13,0	87,0	Isocrático
5,25	13,0	87,0	Isocrático
5,50	75,0	25,0	Linear
9,00	75,0	25,0	Linear
9,25	13,0	87,0	Isocrático
15,00	13,0	87,0	Isocrático

As condições espectroscópicas definidas estão descritas na **Tabela 8**.

**Tabela 8 – Condições espectroscópicas definidas para o método de quantificação do bornesitol por UPLC-MS.**

Condições espectroscópicas de detecção no modo ESI-	
<b>Voltagens</b>	
Capilaridade(kV)	3,5
Cone (V)	27
Extrator (V)	3
RF Lens (V)	0,1
Colisão (193,1-> 161 Da) (V)*	14
Colisão (193,1-> 175,4 Da) (V)*	10
<b>Temperatura</b>	
Temperatura de dessolvatação (°C)	450
Temperatura na fonte (°C)	120
<b>Fluxo dos Gases</b>	
Gás de dessolvatação (L/h)	900
Cone (L/h)	90
<b>Analizador</b>	
Resolução de massas baixas 1**	15
Resolução de massas altas 1**	15
Ion energy**	1
Entrada**	2
Saída**	2
Energia de colisão (V)**	10
Resolução de massas baixas 2**	15
Resolução de massas altas 2**	15
Ion energy 2**	1
Ganho	1
Fluxo do gás de colisão (mL/ min)	0,17
<b>Espectroscopia na região Ultravioleta</b>	
Faixa de varredura (nm)*	190 - 500
<b>Condições de injeção</b>	
Volume de injeção	1,0 – 3,0 µL
Fluxo	0,3 mL/ min

**Nota:**

\* Parâmetros otimizados pelo analista.

\*\* Parâmetros definidos pelo fabricante para desenvolvimento do método de MRM.



#### **4.7.2 Solução de compensação**

Preparou-se uma solução de compensação para minimizar as variações intrínsecas da instrumentação. Para tanto, pesou-se, exatamente, cerca de 0,5 mg para balão volumétrico de 5,0 mL e diluiu-se em metanol. Na sequência, centrifugou-se por 3.074 g por 10 min e utilizou-se o sobrenadante nas análises.

#### **4.8 Validação do método analítico**

A validação do método cromatográfico e espectroscópico desenvolvido foi realizada em acordo com a Resolução nº 899, de 29 de maio de 2003 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2003) e da *European Commission Decision* (2002), de 12 de agosto de 2002.

As análises estatísticas foram feitas nos programas Microsoft Excell (Microsoft Corporation, 2003) e GraphPad Prism, versão 5 (GraphPad Software, 2007).

#### **4.8.2 Preparo das soluções de análise**

##### ***4.8.2.1 Preparo das soluções de bornesitol***

Pesou-se, exatamente, cerca de 1,0 mg de bornesitol e solubilizou-se com MeOH em balão volumétrico de 10,0 mL, com auxílio de banho de ultrassom, por 20 min. A solução resultante foi centrifugada a 6708 g por 10 min. Filtrou-se o sobrenadante em filtro de nylon (0,45 µm) e injetou-se de 1 a 3 µL automaticamente no sistema cromatográfico.

##### **4.8.3 Especificidade**

A especificidade foi avaliada pela resposta do método de MRM ( $m/z$  193→161 e  $m/z$  193→175) para a fragmentação do bornesitol frente à injeção de soluções do branco (MeOH), de soluções obtidas sob condições drásticas de degradação ácida, soluções do branco (MeOH) fortificadas com substâncias estruturalmente relacionadas (glicose e mio-inositol) e soluções fortificadas com substâncias presentes no extrato de *H. speciosa* (ácido clorogênico,

quercetina, rutina e ácido caféico), na concentração de 1,0 mg/ mL. Todos os ensaios foram realizados em replicatas ( $n=6$ ).

#### 4.8.4 Linearidade

A resposta linear do método foi avaliada a partir de curvas analíticas construídas utilizando-se cinco massas distintas. Cada ponto das curvas analíticas foi obtido pela injeção, em triplicata, de diferentes alíquotas da solução de referência de bornesitol (item 4.8.2), na faixa de 1,0 a 3,0  $\mu\text{L}$ , como indicado na **Tabela 9**. As curvas analíticas foram obtidas em relação às massas de bornesitol injetadas e as áreas das curvas correspondentes, em dois dias consecutivos.

Os dados obtidos foram analisados por regressão linear pelo método dos mínimos quadrados e os coeficientes de determinação ( $r^2$ ) correspondentes foram calculados. As curvas obtidas nos dois dias distintos foram avaliadas estatisticamente por análise de variância ( $p < 0,05$ ).

**Tabela 9 – Volumes e massas correspondentes de bornesitol empregados na construção das curvas analíticas.**

Níveis de concentração	Volume de injeção ( $\mu\text{L}$ )	Massa de bornesitol (ng)
1	1	100
2	1,5	150
3	2,0	200
4	2,5	250
5	3,0	300

#### **4.8.5 Limite de quantificação**

O limite de quantificação (LQ) foi determinado a partir da equação recomendada pela Comissão Internacional de Harmonização (ICH - *International Commission on Harmonization*) (ICH, 1996):

$$LQ = 10 \frac{\sigma}{S}$$

Em que:

$\sigma$ : desvio padrão do intercepto da curva analítica

S: inclinação da curva analítica

#### **4.8.6 Limite de detecção**

O limite de detecção (LD) foi determinado a partir da equação recomendada pela Comissão Internacional de Harmonização (ICH - *International Commission on Harmonization*) (ICH, 1996):

$$LQ = 3,3 \frac{\sigma}{S}$$

Em que:

$\sigma$ : desvio padrão do intercepto da curva analítica

S: inclinação da curva analítica

#### **4.8.7 Precisão**

A precisão intradia e interdias do método foi avaliada. A precisão intradia foi verificada por meio de seis determinações no ponto médio de concentração de bornesitol na curva analítica. As soluções de leitura foram preparadas conforme o item 4.8.2. A precisão interdia foi determinada de maneira semelhante, em dois dias consecutivos, com analistas diferentes ( $n=12$ ).

Os valores de DPR foram calculados (%) com base nas áreas obtidas para a precisão intradia ( $n=6$ ) e para a precisão interdias ( $n=12$ ). As médias dos teores entre os dias de determinação foram comparadas pelo teste  $t$  de Student ( $p < 0,05$ ).

#### **4.8.8 Exatidão**

A exatidão do método foi investigada a partir de estudos de recuperação. Apesar das diversas tentativas realizadas, não foi possível estimar a recuperação do método, devido a problemas experimentais. Novos ensaios de recuperação serão realizados oportunamente.

#### **4.8.9 Robustez**

Foram preparadas seis soluções padrão de bornesitol (item 3.6.3). Estas foram analisadas em triplicata empregando-se a condição analítica estabelecida (item 4.7.1). Analisaram-se, também, as mesmas soluções frente a alterações deliberadas nas condições analíticas, incluindo temperatura de dessolvatação (440 e 460 °C), fluxo da fase móvel (0,240 e 0,360 mL/min) e fluxo do gás de dessolvatação (840 e 960 L/h).

As modificações inseridas foram avaliadas individualmente e comparadas com os resultados aferidos na condição analítica. A avaliação estatística das áreas obtidas foi feita por análise de variância (ANOVA).

### **4.9 Estudos de degradação forçada do bornesitol**

A avaliação da estabilidade do bornesitol foi realizada com base em ensaios de degradação em meios ácido, neutro e básico, bem como oxidação em presença de peróxidos, e foram avaliadas em três níveis. A condição de degradação fotolítica foi avaliada em dois níveis, enquanto a degradação por ação de íons metálicos e a termólise foram avaliadas em um único nível. As condições empregadas em cada estudo estão descritas na **Tabela 10**.

**Tabela 10 – Condições empregadas nos estudos de degradação.**

<b>Condição</b>	<b>Três níveis de exposição</b>		
Degradação ácida (HCl)	0,1 M, 8 h, refluxo	1 M, 24 h, refluxo	5 M, 24 h, refluxo
Degradação básica (NaOH)	0,1 M, 8 h, refluxo	1 M, 24 h, refluxo	5 M, 24 h, refluxo
Hidrólise neutra	água, 1 dia, refluxo	água, 2 dias, refluxo	água, 5 dias, refluxo
Degradação oxidativa	3% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , 6 h, 25°C	10% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , 24 h, 25°C	30% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , 48 h, 25°C
	<b>Dois níveis de exposição</b>		
Fotólise	1,2 milhões de Lux/h	6,0 milhões de Lux/h	
	<b>Um nível de exposição</b>		
Íons metálicos (CuSO <sub>4</sub> )	0,05 M, 24 dias		
Termólise	70°C, 5 dias		

**Nota:** em todas as condições a massa de bornesitol empregada para degradação foi de 0,5 mg.

#### **4.9.1 Degradação ácida e alcalina**

Após a exposição, os meios estressantes foram neutralizados e submetidos a extração com piridina, conforme descrito no item 4.6.8.3. As amostras foram secas em evaporador rotatório por 24 h (30 °C), solubilizadas em balão de 5,0 mL com MeOH e injetadas no sistema cromatográfico, conforme o método descrito no item 4.7.1.

#### **4.9.2 Degradação oxidativa e hidrólise neutra**

Terminada a exposição, as amostras foram secas em evaporador rotatório por 24 h (30 °C), solubilizadas em balão volumétrico de 5,0 mL com MeOH e injetadas no sistema cromatográfico, conforme o método descrito no item 4.7.1.

#### **4.9.3 Fotólise e termólise**

Os estudos de termólise e fotólise foram realizados com o material seco. Ao fim da exposição, as amostras foram solubilizadas em balão volumétrico de 5,0 mL em MeOH e injetadas no sistema cromatográfico, conforme o método descrito no item 4.7.1.

#### **4.9.4 Íons metálicos**

Terminada a exposição, as amostras foram secas em evaporador rotatório 24 h (30 °C), solubilizadas em balão volumétrico de 5,0 mL em MeOH e injetadas no sistema cromatográfico, conforme o método descrito no item 4.7.1.

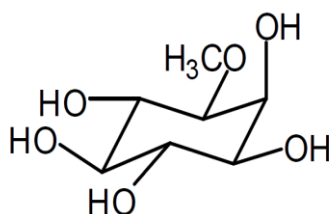
Todas as amostras foram quantificadas em triplicata frente a solução de compensação, preparada conforme descrito no item 4.7.2.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Isolamento e purificação do bornesitol

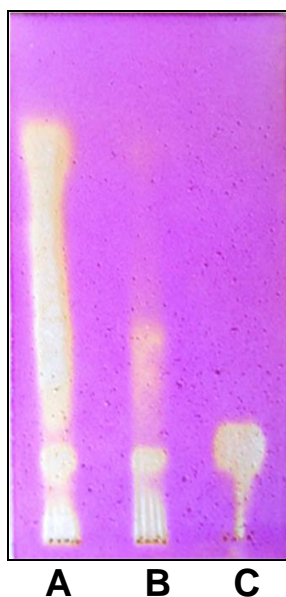
Inicialmente fez-se necessário obter o bornesitol (**Figura 8**) com pureza analítica satisfatória, uma vez que esse ciclitol não está disponível comercialmente. No presente trabalho, bornesitol foi isolado de um extrato em EtOAc/MeOH (1:1) obtido por percolação das folhas de *H. speciosa*. Foram adotadas diferentes estratégias para isolamento e purificação do ciclitol, descritas a seguir.

**Figura 8.** Estrutura química do bornesitol.



No intuito de obter frações enriquecidas em bornesitol, o extrato em EtOAc/MeOH (1:1) foi solubilizado em MeOH e adicionou-se EtOAc para promover a precipitação do ciclitol. O processo foi repetido diversas vezes e resultou em 3,5 g de um precipitado enriquecido em bornesitol, o qual apresentou um perfil cromatográfico por CCD de sílica gel mais simplificado que o material de partida, sendo evidente a concentração no ciclitol (**Figura 9**).

**Figura 9** – Perfil cromatográfico obtido por CCD, para extrato seco EtOAc/MeOH (1:1) (A) de *Hancornia speciosa*, PptTOTAL (B) e substância de referência bornesitol (C). Revelador:  $\text{KMnO}_4$  0,5% em NaOH 1,0 N. Eluente: água/EtOAc/MeOH (6:11:83).

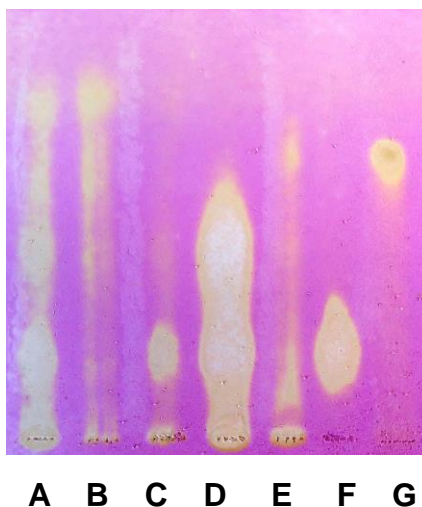


O precipitado obtido apresentou coloração amarelada, sugerindo a presença de flavonoides, incluindo rutina, anteriormente descrita na espécie (PEREIRA, 2012). Assim, empregou-se carvão ativado para a remoção de flavonoides e outros fenólicos possivelmente presentes (DABROWSKI et al., 2005). A extração de fenólicos com carvão ativado é usada com frequência em estudos fitoquímicos. O carvão ativado adsorve compostos orgânicos de baixa massa molecular em função de sua natureza porosa (DABROWSKI et al., 2005).

O uso de carvão ativado no precipitado enriquecido em bornesitol resultou em concentração da substância de interesse, conforme evidenciado na análise por CCD de sílica gel (**Figura 10**). No entanto, no ponto D, correspondente à fase aquosa após tratamento com carvão ativado, observa-se a presença de uma mancha intensa com  $R_f$  de 0,2 e de outra mancha no ponto de aplicação, indicando a necessidade de etapas adicionais de purificação. O cromatograma obtido possibilitou, ainda, confirmar a presença de rutina na amostra, flavonoide que foi anteriormente definido como marcador químico para a espécie pelo nosso grupo de pesquisa (PEREIRA, 2012).



**Figura 10** - Perfil cromatográfico obtido por CCD de sílica gel, para extrato seco EtOAc/MeOH (1:1) (A) de *Hancornia speciosa*, fase orgânica em diferentes concentrações (B / E), PptTOTAL (C), f<sub>aca</sub> (D), e substâncias de referência bornesitol (F) e rutina (G). Revelador: KMnO<sub>4</sub> 0,5% em NaOH 1,0 N. Eluente: água/EtOAc/MeOH (6:11:83).



O próximo passo na purificação do bornesitol foi o fracionamento cromatográfico do sólido obtido após tratamento com carvão ativado. O fracionamento foi realizado em funil sinterizado, com eluição sob vácuo, conforme descrito no item 4.3.3. As frações ricas em bornesitol foram resultantes desse processo foram reunidas e o sólido resultante foi submetido à cristalização em MeOH.

A massa de bornesitol obtida ao final do processo foi de 66,3 mg, partindo de 5,0 g de extrato seco, correspondendo a um rendimento de 1,3% m/m. O procedimento de purificação foi repetido diversas vezes a fim de se obter quantidades suficientes para condução dos estudos, resultando na obtenção de 315 mg. O rendimento médio das extrações realizadas foi de 1,45%.

Como principal vantagem do método de isolamento e purificação desenvolvido, destaca-se o tempo reduzido do procedimento (em torno de uma semana), o menor consumo de solventes utilizados, em comparação com o método anteriormente utilizado, bem como a não utilização de solventes clorados. Todos esses fatores são vantajosos em relação ao procedimento cromatográfico anteriormente relatado para a obtenção de bornesitol (ENDRINGER, 2007).

## 5.2 Ensaios de caracterização e pureza do bornesitol

A pureza do bornesitol obtido (item 5.1) foi avaliada através de análises por CCD de sílica gel utilizando reveladores inespecíficos (anisaldeído sulfúrico e sulfato cérico), análises espectroscópicas (RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$ ; UV-Vis), bem como faixa de fusão (198,8 - 200,4 °C), que se mostrou similar aos dados descritos anteriormente (198,7 – 200,2 °C e 199,9 – 200,5 °C, relatados por PEREIRA, 2012 e ENDRINGER, 2007, respectivamente).

Os dados obtidos confirmaram a pureza do bornesitol e viabilizaram sua utilização como substância química de referência para validação do método analítico (item 4.8) e condução dos estudos de degradação (item 4.9).

## 5.3 Desenvolvimento de método analítico por UPLC-MS/MS para a quantificação de bornesitol

### 5.3.1 Desenvolvimento do método

#### 5.3.1.1 *Avaliação do efeito carry over*

O efeito *carry over* é a eluição de analitos provenientes de análises anteriores, ou de contaminantes associados ao injetor, às linhas de solvente, ao detector ou à coluna (CAMARGO, 2008). Pode influenciar a precisão e exatidão de métodos cromatográficos, notadamente, para analitos em baixas concentrações (VISWANATHAM et al., 2007). Associado a isso, o aumento na sensibilidade dos detectores nas últimas décadas contribuiu para a observação do efeito (HUGHES et al., 2007).

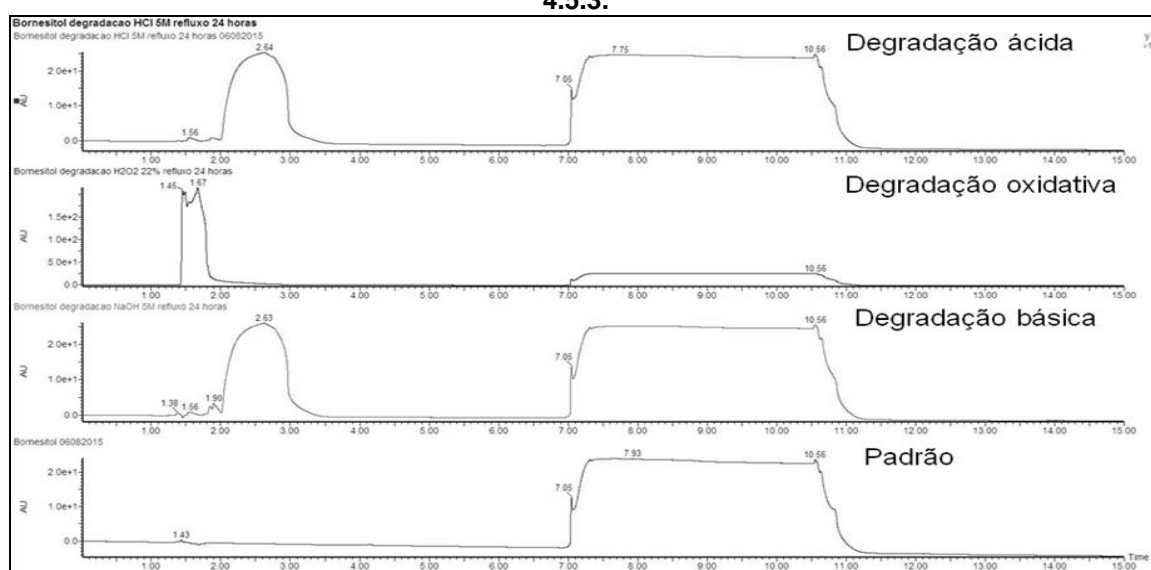
A necessidade da avaliação do efeito *carry over* no presente trabalho justifica-se pela possibilidade de alteração do perfil da amostra entre o processo de desenvolvimento e validação do método e os estudos de degradação. Ocorre que, durante a definição dos parâmetros cromatográficos, utilizou-se a substância química de referência; entretanto, a matriz poderia alterar consideravelmente após os estudos de degradação.

Idealmente, a avaliação do efeito *carry over* deveria ser feita para todas as condições de degradação utilizadas no estudo. No entanto, a fim de reduzir o número de análise, no presente trabalho foram avaliadas as condições

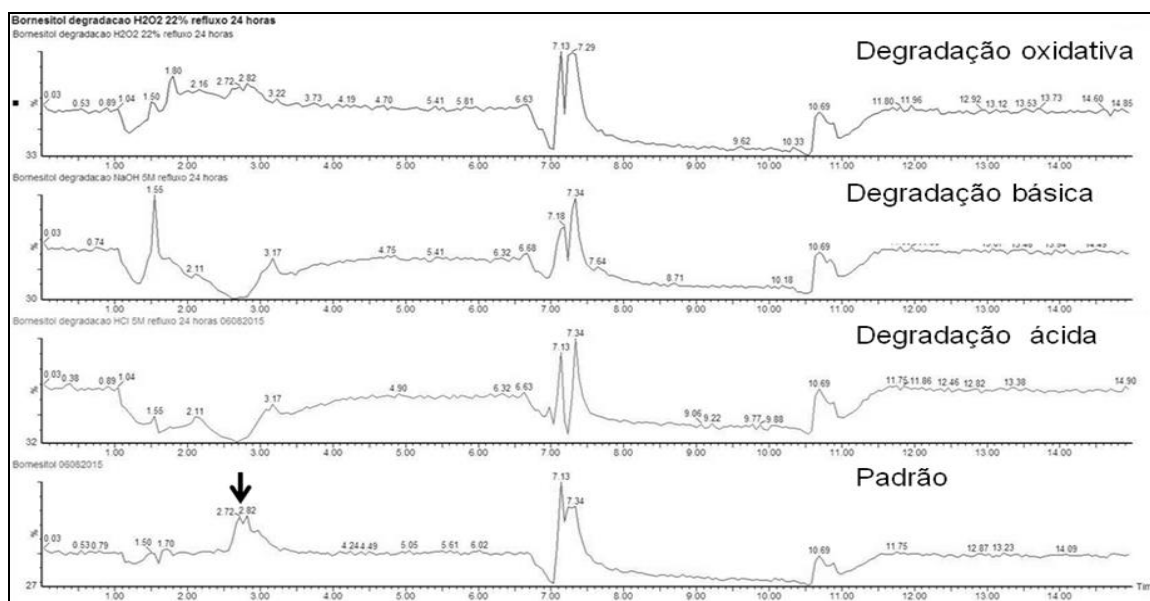
potencialmente passíveis de gerar matrizes complexas (degradação ácida, básica e oxidativa, nos níveis mais severos).

Os cromatogramas obtidos para o padrão e amostras submetidas aos estudos de degradação indicaram o mesmo perfil de eluição para a detecção realizada no UV-Vis (190-500 nm) (**Figura 11**), e nos modos de ionização ESI+ (**Figura 12**) e ESI- (**Figura 13**). Somado a isso, após cada corrida soluções branco foram analisadas, onde não se observou a eluição de nenhuma substância. Assim, confirmou-se a capacidade do método cromatográfico em eluir todos os eventuais produtos de degradação gerados nas condições drásticas de estudo, evitando, portanto, o aparecimento de picos fantasmas em análises sequenciais.

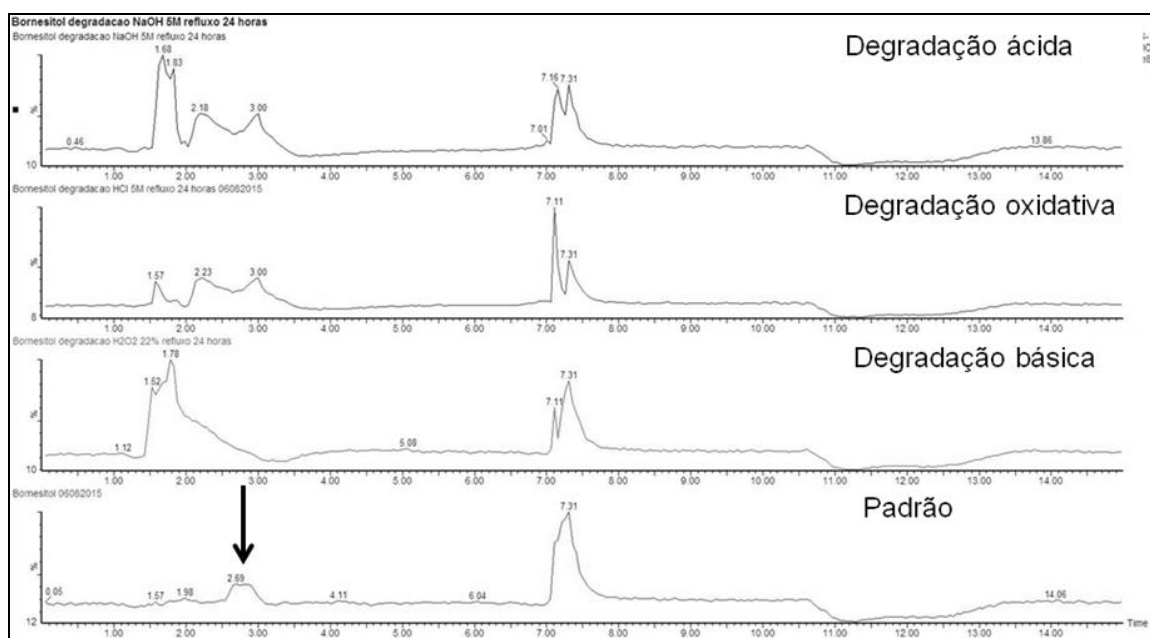
**Figura 11 – Cromatogramas obtidos por UPLC-DAD para solução de referência de bornesitol, e soluções submetidas à degradação ácida, básica e oxidativa. Condições cromatográficas: vide item 4.5.3.**



**Figura 12 – Cromatogramas obtidos por UPLC-MS operando em modo de ionização positivo para solução de referência de bornesitol, e soluções submetidas à degradação ácida, básica e oxidativa. Condições cromatográficas: vide item 4.5.3. O pico correspondente ao bornesitol está indicado pela seta ( $t_r = 2,7$  min).**



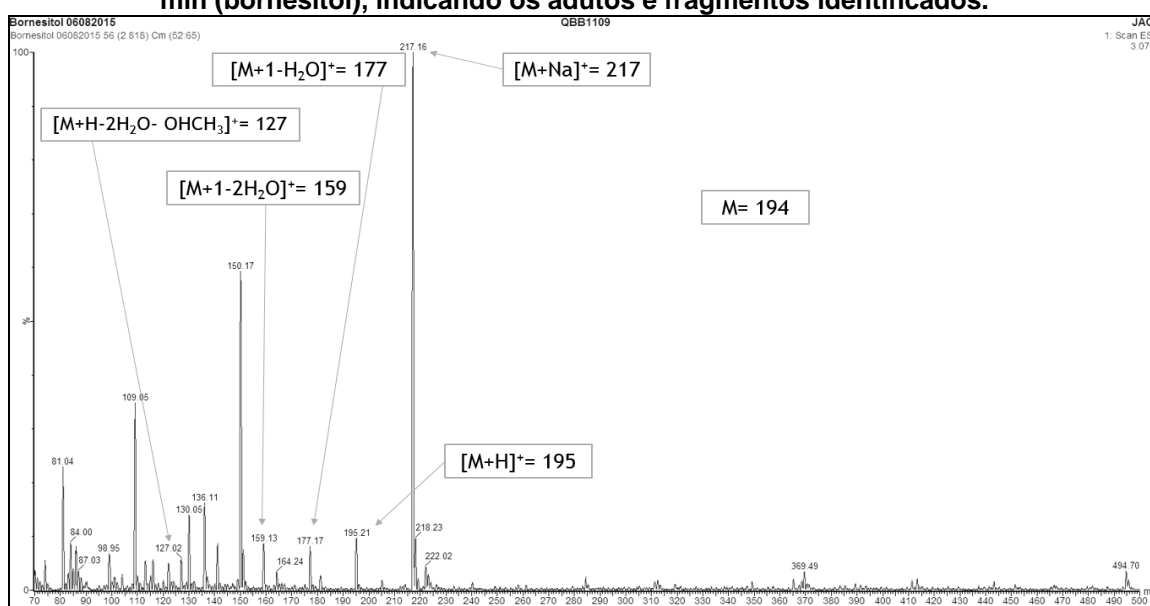
**Figura 13 – Cromatogramas obtidos por UPLC-MS operando em modo de ionização negativo para solução de referência de bornesitol e soluções submetidas à degradação ácida, básica e oxidativa. Condições cromatográficas: vide item 4.5.3. O pico correspondente ao bornesitol está indicado pela seta ( $t_r = 2,7$  min).**



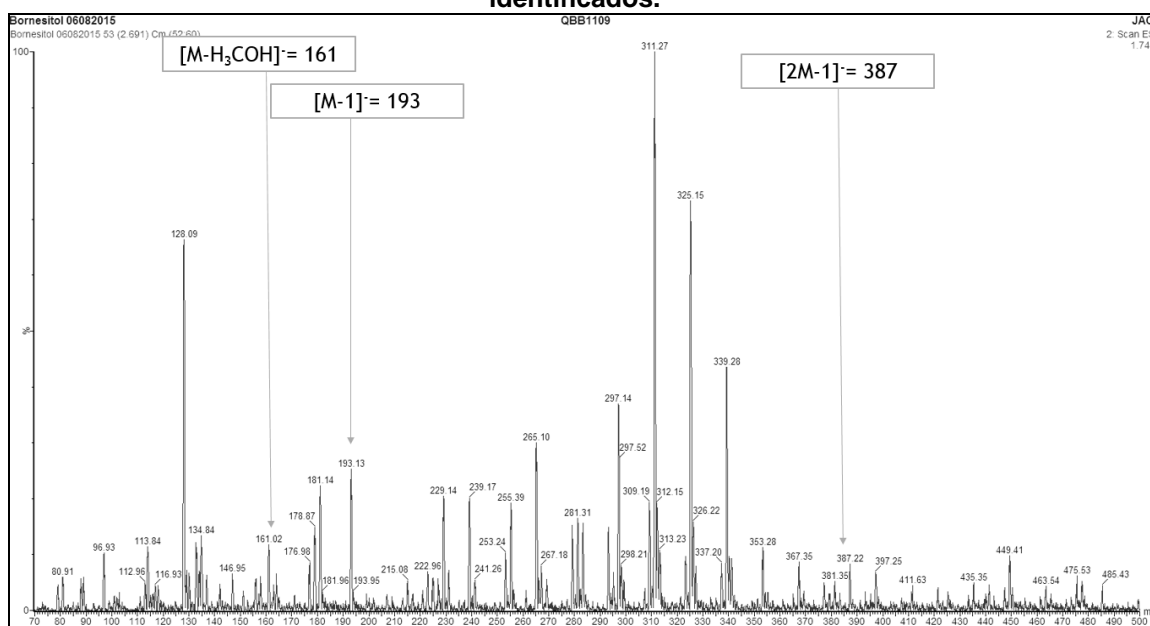
A análise dos dados espectroscópicos obtidos *on line* para o modo ESI+ (**Figura 14**) e ESI- (**Figura 15**) confirmam a eluição do bornesitol com tempo de retenção ( $t_r$ ) de 2,7 minutos. No modo de ionização positivo, pode-se observar

a formação de um aduto com sódio ( $m/z$  217) e o aduto protonado ( $m/z$  195). Os fragmentos observados correspondem à duas perdas de água ( $m/z$  177 e 159) e à perda do grupo metoxila (**Figura 14**). Já no modo de ionização negativo, observa-se os fragmentos correspondetes à perda de um próton e ao grupo metoxila (**Figura 15**). Os perfis de fragmentação, bem como os adutos encontrados, permitiram a identificação inequívoca do analito.

**Figura 14 – Espectro de MS obtido *on line* no modo ESI+ para o pico com  $t_r=2,7$  min (bornesitol), indicando os adutos e fragmentos identificados.**



**Figura 15 – Espectro de MS obtido *on line* no modo ESI- para o pico com  $t_r=2,7$  min (bornesitol), indicando os adutos e fragmentos identificados.**



Uma vez demonstrada a capacidade do método em eluir todos dos os constituintes presentes na matriz, partiu-se para o desenvolvimento do método de MRM.

### **5.3.1.2 Desenvolvimento de método por Monitoramento de Reações Múltiplas (MRM) para quantificar bornesitol por LC-MS/MS**

A quantificação por LC-MS/MS pode ser realizada pelo modo de aquisição conhecido como Monitoramento de Reações Múltiplas (MRM). Nessa modalidade, os quadropolos do equipamento atuam no seu modo mais sensível filtrando o íon precursor e o fragmento gerado na câmara de colisão (IGLESIAS, 2012). Inicialmente, deve-se definir as condições ótimas de análise para o analito, especificamente o modo de ionização. Para tanto, o primeiro passo no presente trabalho foi a definição da fonte de ionização, se positiva ou negativa. Vale ressaltar que a ionização é uma característica, antes de tudo, intrínseca da própria molécula (IGLESIAS, 2012).

A otimização do método de MRM foi feito em tempo real, por injeção direta em modo combinado da solução padrão de bornesitol (item 4.5.1). O modo combinado baseia-se na coinfusão da fase móvel que será utilizada na análise, uma vez que a resposta pode mudar completamente frente à matriz cromatográfica (IGLESIAS, 2012). Não há necessidade de saber exatamente a proporção da fase móvel no momento de eluição do analito, sugere-se apenas a coinfusão de proporções iguais entre os componentes da fase móvel. Nesse trabalho utilizou-se água acidificada com 0,1% de ácido fórmico e acetonitrila (1:1). Os parâmetros de ionização, como voltagem do capilar (especialmente no caso de ESI), fluxo e temperatura dos gases são altamente dependentes dos solventes utilizados (IGLESIAS, 2012).

O modo de ionização negativo (ESI-) foi definido para as análises, devido à melhor resposta de estabilidade iônica, quando comparado ao modo positivo. Os dados que corroboram a escolha da fonte não estão disponíveis, uma vez que a observação da transição só é possível em tempo real. O modo positivo (ESI+) não produziu íons suficientemente estáveis para a quantificação. Observa-se a fragmentação, mas os fragmentos gerados não são suficientemente estáveis para serem utilizados em análises quantitativas.

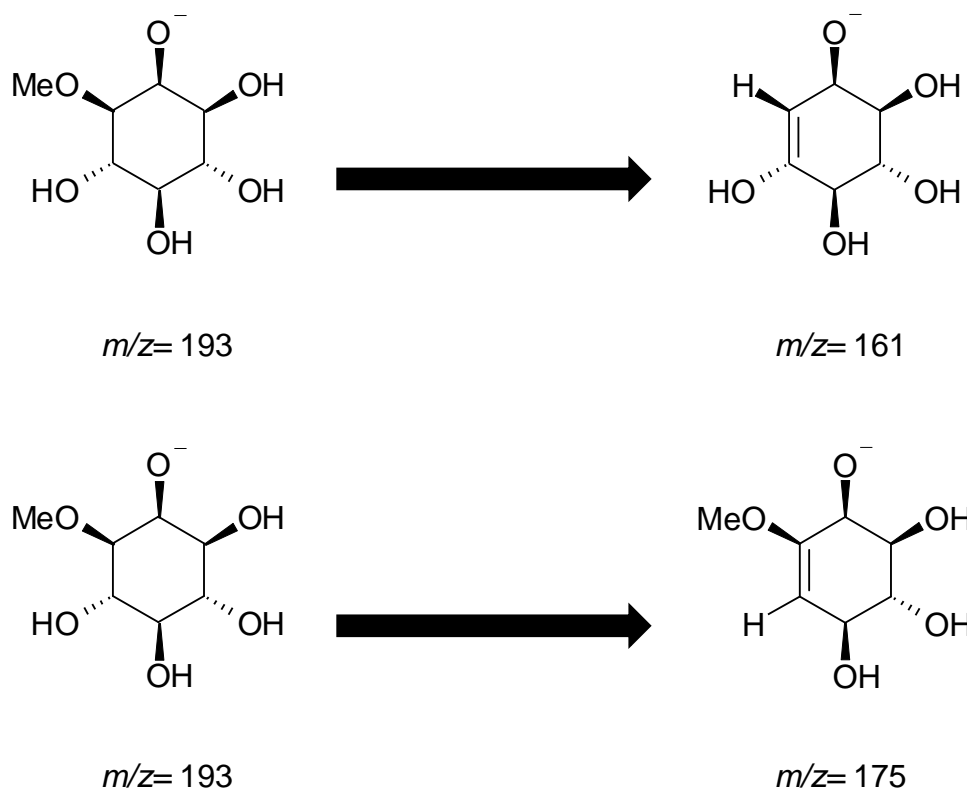
Já no modo negativo de ionização (ESI-) pôde-se observar transição iônica compatível com a quantificação, ou seja, íons suficientemente estáveis.

Uma vez definida a melhor fonte de ionização, partiu-se para a otimização da resposta. Aqui, buscou-se aumentar a eficiência da ionização e dessolvatação dos íons, o que garante a transferência da maior quantidade possível dos íons gerados para dentro do sistema de vácuo (IGLESIAS, 2012). As condições definidas no item 4.5.1 foram finamente ajustadas garantindo a maximização da resposta.

Um método de MRM adequado para análises quantitativas idealmente baseia-se no monitoramento de, no mínimo, duas transições (STOLKER et al., 2000), o que confere maior confiabilidade na quantificação do analito. Como a fragmentação é precedida de eluição cromatográfica, ambas as transições devem se dar no mesmo tempo de retenção. Caso isso não ocorra, os sinais deverão ser tratados como falso positivos, já que as transições são específicas de um mesmo composto. (STOLKER, 2000). Deve-se evitar basear a quantificação em fragmentos pouco seletivos, como perda de água (M-18 Da), amônia (M-17 Da) e dióxido de carbono (M-44 Da), pois a relação sinal/ruído será alta (IGLESIAS, 2012).

No desenvolvimento do método para a quantificação do bornesitol, duas transições foram observadas. Uma específica, que corresponde à perda de HO-CH<sub>3</sub> ( $m/z$  193,1→161 Da) – Transição 1, e outra inespecífica, atribuída à perda de H<sub>2</sub>O ( $m/z$  193,1→175,4 Da) – Transição 2 (**Figura 16**). A primeira transição foi utilizada para a quantificação, enquanto a segunda seria empregada para confirmação. No entanto, a Transição 2 não foi observada pós eluição cromatográfica, embora tenha sido constatada no desenvolvimento do método de MRM. Ainda assim, o canal responsável pela detecção desta transição foi mantido em todas as análises.

**Figura 16** – Propostas das estruturas químicas para as transições  $m/z$  193  $\rightarrow$  161 e 193  $\rightarrow$  175, correspondente às perdas do grupo metoxila ( $\text{H}_3\text{C-OH}$ ) [ $\text{M}-32$ ] e água ( $\text{H}_2\text{O}$ ) [ $\text{M}-18$ ], respectivamente.



O uso de aditivos para auxiliar no processo de ionização não foi avaliado no desenvolvimento do método. Bathena e colaboradores (2012) utilizaram fase aquosa contendo 0,1% de ácido fórmico para a quantificação de mio-inositol por LC-MS, e esse foi mantido na condução dos nossos estudos, com resultados satisfatórios.

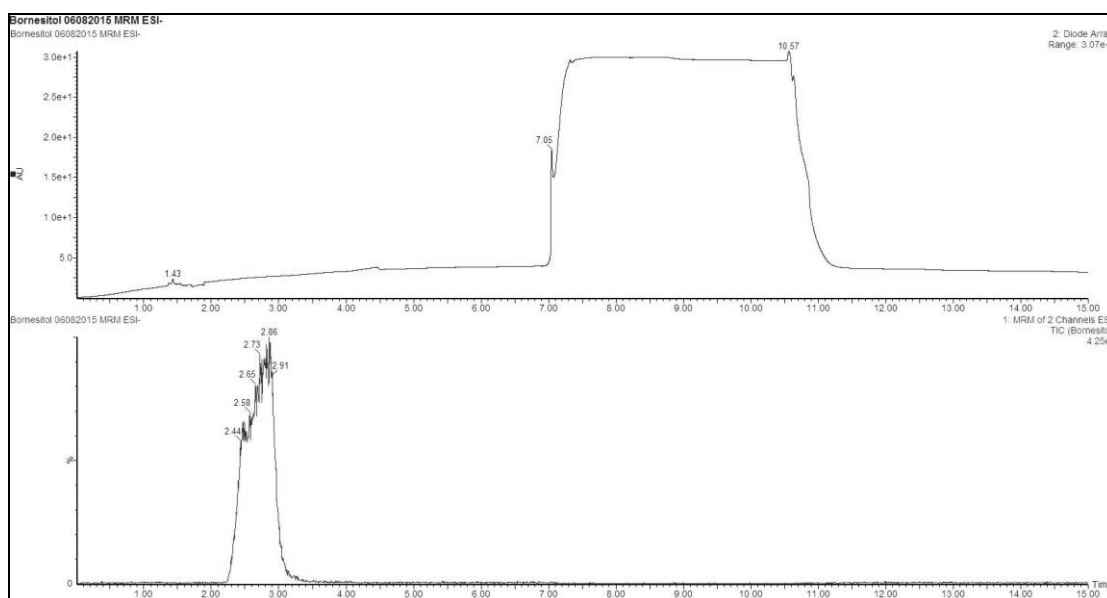
Inicialmente, pensou-se em utilizar tampões voláteis para elevar o pH do meio, uma vez que a detecção seria feita no modo negativo. Entretanto, o avanço nas técnicas de detecção tornou indiferente a necessidade de associar fase móvel com pH elevado e detecção no modo negativo, ou de maneira análoga, fase móvel acidificada e modo de detecção positivo (IGLESIAS, 2012). Há relatos na literatura do emprego de ionização em modo negativo e uso de ácido fórmico como aditivo (LIU et al., 2010), bem como de análises no modo positivo com fase móvel de pH elevado (RAINVILLE et al., 2012).

O perfil cromatográfico obtido está representado na **Figura 17** em função da contagem total dos íons (*Total Ions Count - TIC*), que é uma média



das respostas obtidas para as duas transições selecionadas. Pode-se observar, no cromatograma, a eluição do bornesitol com  $t_r=2,7$  min, corroborando os dados obtidos no modo *Scan* (item 5.3.1.1). Assim, confirmou-se cromatograficamente o método de MRM desenvolvido apenas em nível espectroscópico. O perfil irregular do pico é comum para UPLC-MS/MS; entretanto, para as quantificações fez-se um tratamento para suavizar o pico (*smoothing*), tornando-se homogêneo. Nessa figura também está representado o cromatograma registrado no UV-Vis na região de 190-500 nm. A banda larga de absorção no intervalo entre 7 e 11 min provavelmente é função da maior proporção de água acidificada com ácido fórmico nesta região, que absorve em 205 nm.

**Figura 17 – Cromatogramas obtidos (a) na região do ultravioleta (190-500 nm) e (b) em modo MRM para o bornesitol  $t_r=2,7$  min.**



### 5.3.2 Avaliação do efeito da matriz

A última etapa no desenvolvimento de método de quantificação por MRM em LC-MS/MS é a avaliação do efeito da matriz (ME) (IGLESIAS, 2012). Todo o trabalho desenvolvido até aqui pode se revelar infrutífero, caso haja uma matriz complexa que interfira na quantificação do analito. ME é a alteração da ionização do analito de interesse promovido por um constituinte da matriz. A ionização do analito pode ser significativamente alterada caso haja co-eluição, em virtude do processo de ionização ser essencialmente competitivo

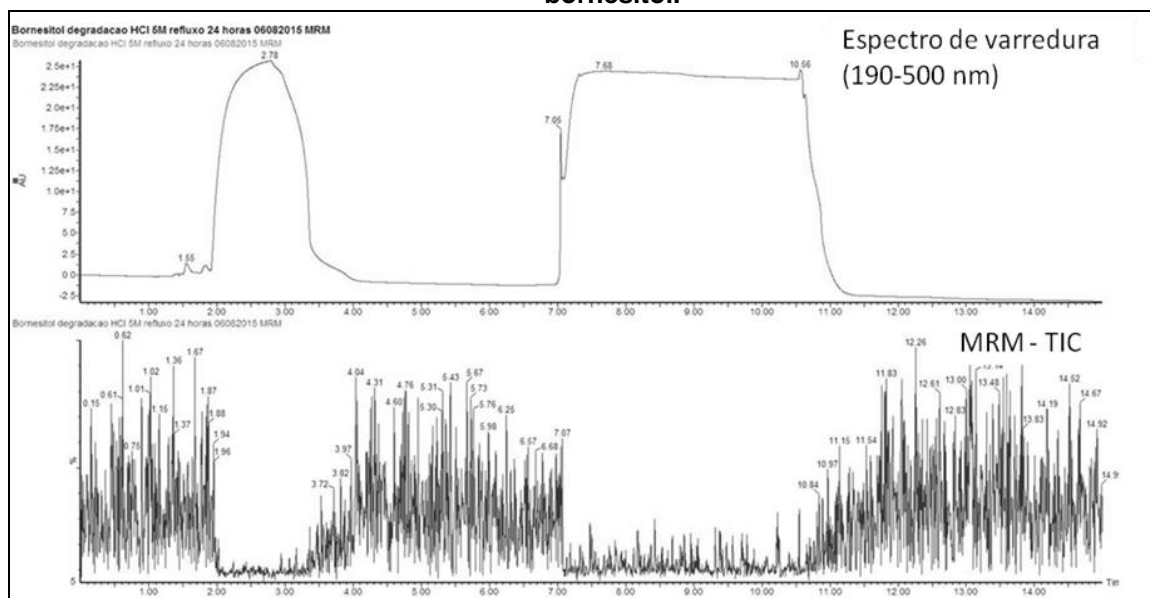
(IGLESIAS, 2012). Nesse sentido, dois eventos podem contribuir para a supressão da ionização: a concentração e a estabilidade iônica. Assim, caso o analito de interesse esteja presente em uma matriz rica em outros compostos, ainda que sua ionização seja favorecida, o fator concentração pode dificultar a resposta. No mesmo sentido, ionizam-se preferencialmente aqueles compostos que tenham maior facilidade intrínseca em ionizar. Assim, a presença de componentes na matriz que ionizam mais facilmente que o próprio analito pode suprimir a ionização do último (IGLESIAS, 2012).

ME pode inviabilizar a validação de métodos analíticos de LC-MS/MS, visto que dificulta a reprodutibilidade, exatidão e linearidade do método (IGLESIAS, 2012). Em alguns casos, ME pode passar despercebido pelo analista devido à alta especificidade do método. Os cromatogramas obtidos em MRM são, em geral, limpos, o que pode levar à conclusão equivocada de que a matriz não interfere no sinal do analito.

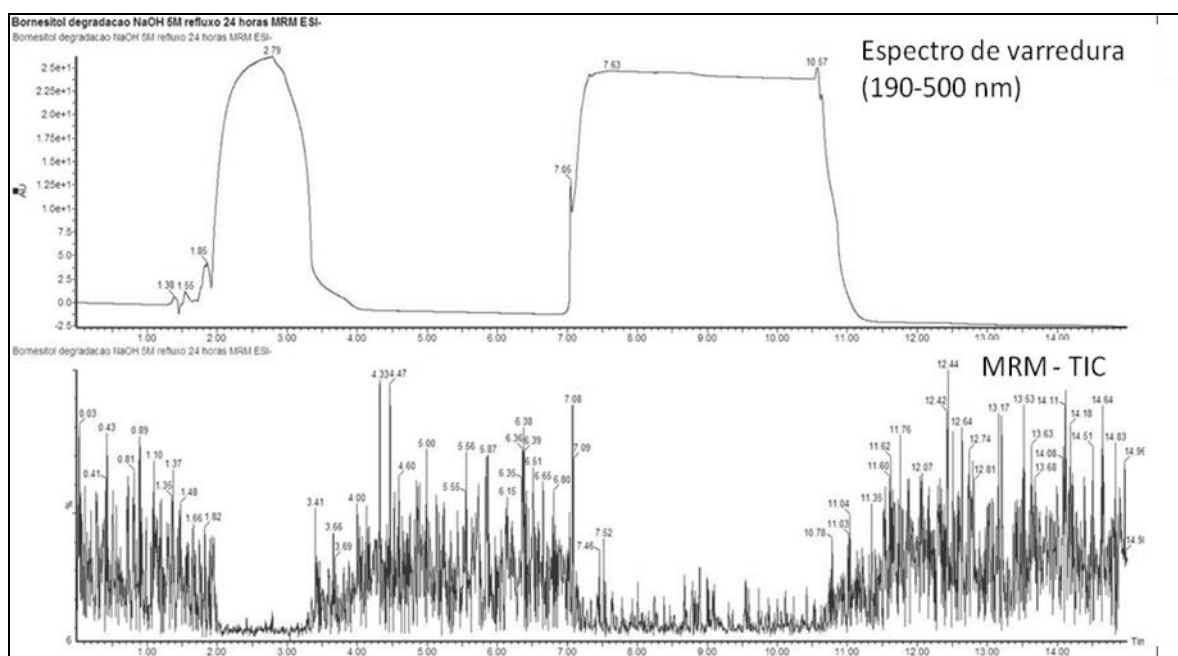
Considerando que o método para a quantificação de bornesitol desenvolvido destina-se a estudos de degradação (item 4.9), buscou-se avaliar o efeito da matriz presente nas condições mais drásticas de degradação (ácida, básica e oxidativa) e, portanto, potencialmente capazes de gerar matrizes complexas. Associado a isso, o NaCl resultante da reação de neutralização do HCl e do NaOH é uma fonte provável de ME, tendo em vista sua natureza iônica e sua concentração superior ao analito.

Os cromatogramas obtidos para a condição de degradação oxidativa, quando comparado ao padrão, não sugeriram influência da matriz na quantificação do analito. Entretanto, os cromatogramas obtidos para as degradações ácida (**Figura 18**) e alcalina (**Figura 19**) apresentaram um perfil completamente diferente, com ausência de sinal para o tempo de retenção do bornesitol.

**Figura 18 – Cromatogramas obtidos (a) no UV-Vis (190-500 nm) e (b) em modo MRM para a condição de degradação ácida. Destaque para a região com ausência de sinal entre 2,0 e 3,5 min, intervalo correspondente ao tempo de retenção do bornesitol.**



**Figura 19 – Cromatogramas obtidos (a) no UV-Vis (190-500 nm) e (b) em modo MRM para a condição de degradação ácida. Destaque para a região com ausência de sinal entre 2,0 e 3,5 min, intervalo correspondente ao tempo de retenção do bornesitol.**



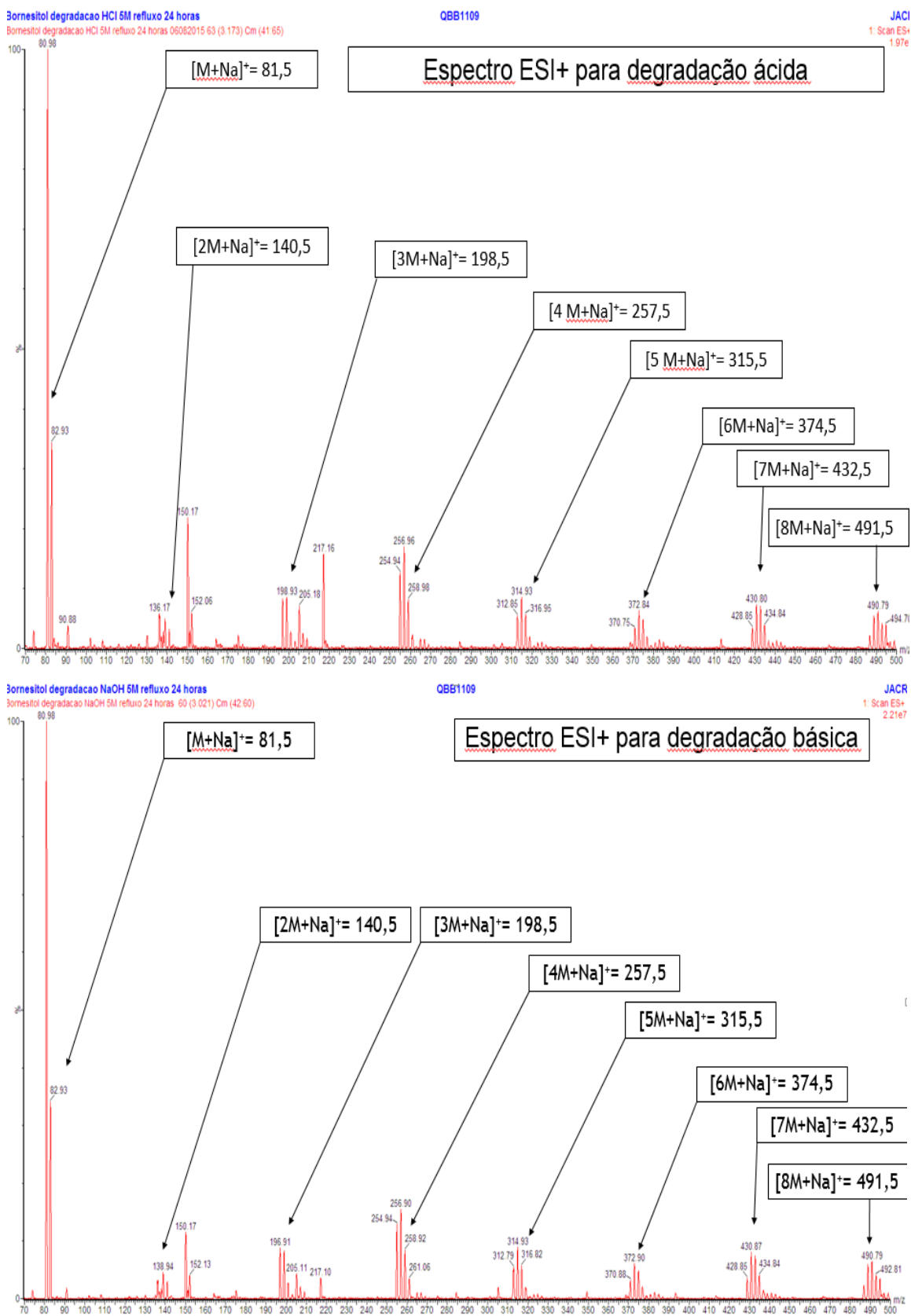
Considerou-se, inicialmente, a possibilidade de degradação total do bornesitol. Entretanto, a análise paralela por CCD das amostras demonstrou a

presença do ciltitol nas amostras. Realizou-se, então, a injeção das amostras no modo *Scan*, no intuito de descobrir a natureza dos compostos que eluíram no tempo de retenção com ausência de sinal.

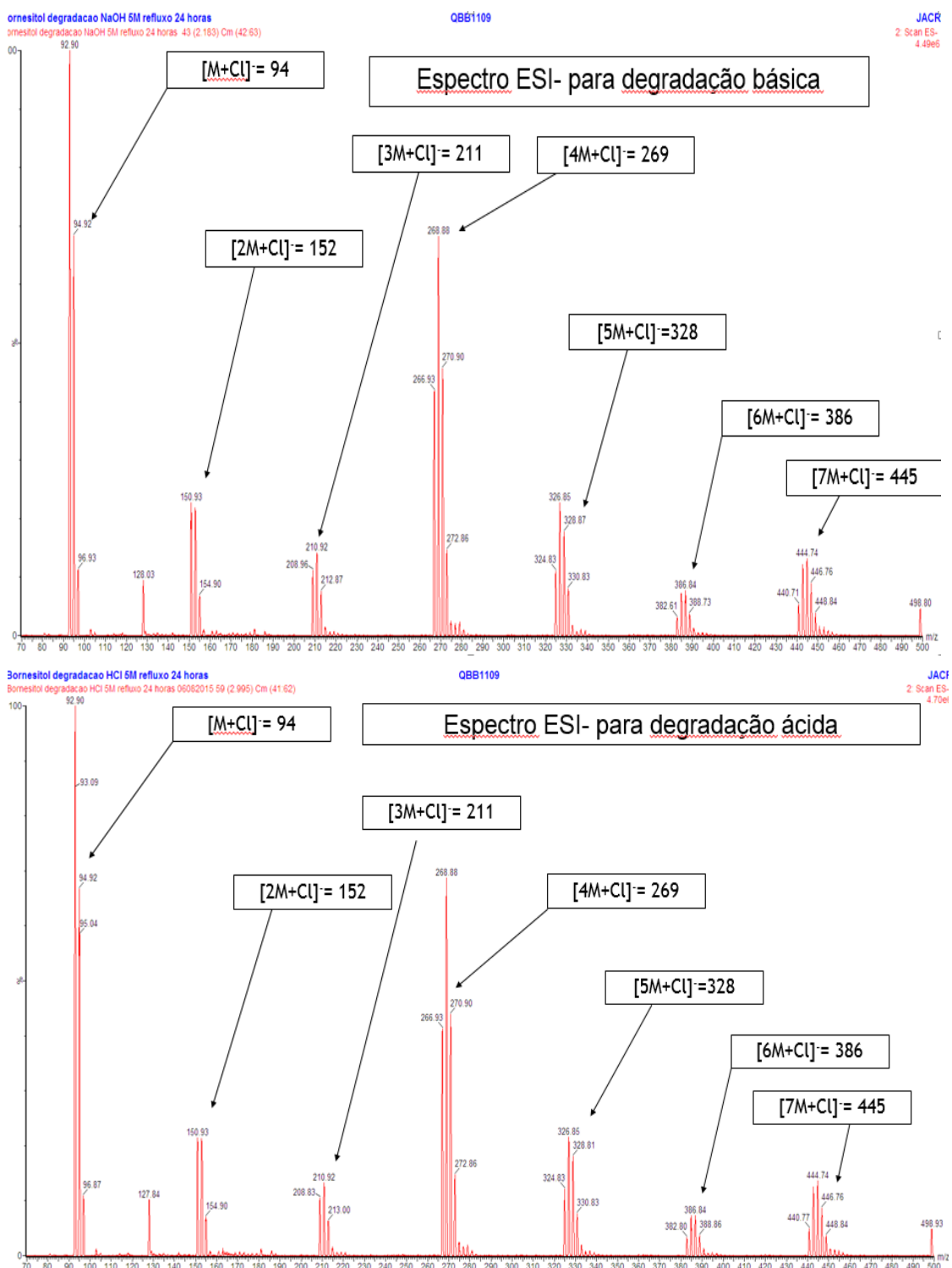
O espectro de massas referente ao tempo de retenção com ausência de sinal obtido para a degradação ácida e básica, no modo de ionização positivo (**Figura 20**) e negativo (**Figura 21**), permitiu identificar o cloreto de sódio. Os espectros obtidos indicam a formação de adutos do NaCl: em ESI+ observam-se adutos do tipo  $m/z [(nM) + Na]^+$  e em ESI- do tipo  $m/z [(nM) + Cl]^-$ , sendo M a massa molecular do NaCl. O perfil dos picos obtidos M, M+2, M+4, M+6 é condizente com a presença do isótopo do íon cloreto (PAVIA, 2010).

Além disso, os fragmentos relativos ao analito não foram sequer observados no espectro de massas, justificando a ausência de sinal do bornesitol em MRM. Dessa forma, a supressão do sinal do bornesitol pelo NaCl foi caracterizada inequivocamente como resultante de efeito da matriz.

**Figura 20 – Espectros obtido no tempo de retenção com ausência de sinal (2,0 – 3,5 min) para as condições de degradação ácida (a) e básica (b) no modo de ionização positivo (ESI+).**



**Figura 21**– Espectros obtidos no tempo de retenção com ausência de sinal (2,0 – 3,5 min) para as condições de degradação ácida (a) e básica (b) no modo de ionização negativo (ESI-).

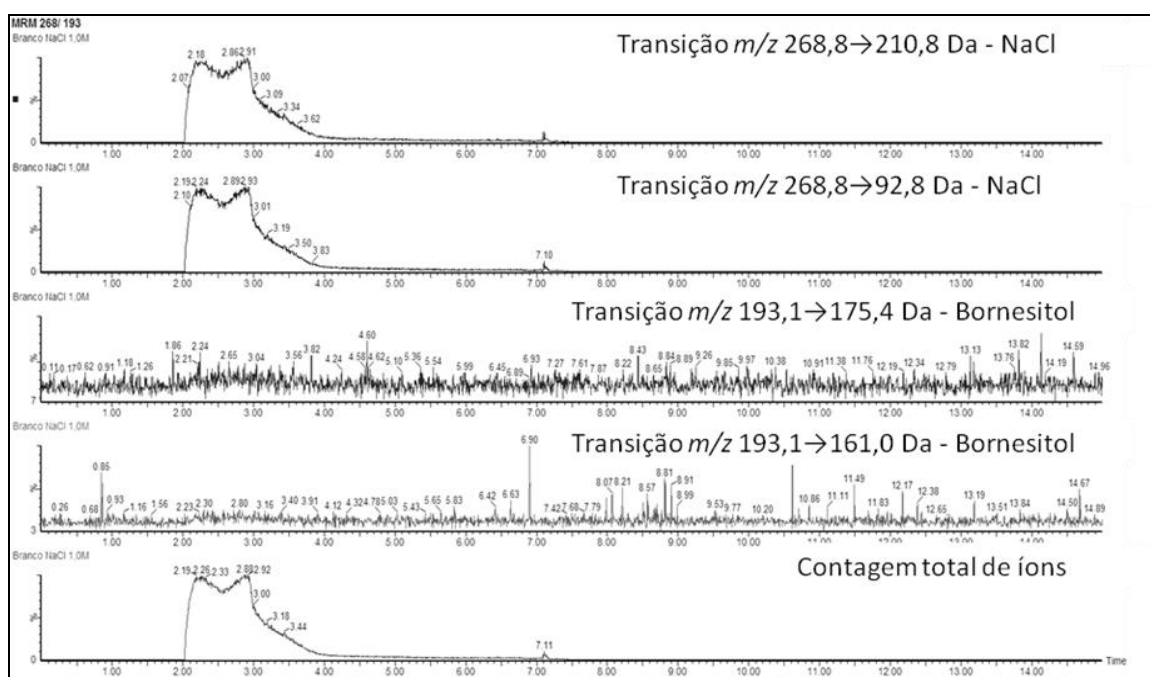


### 5.3.2.1 Desenvolvimento de método de MRM para o NaCl

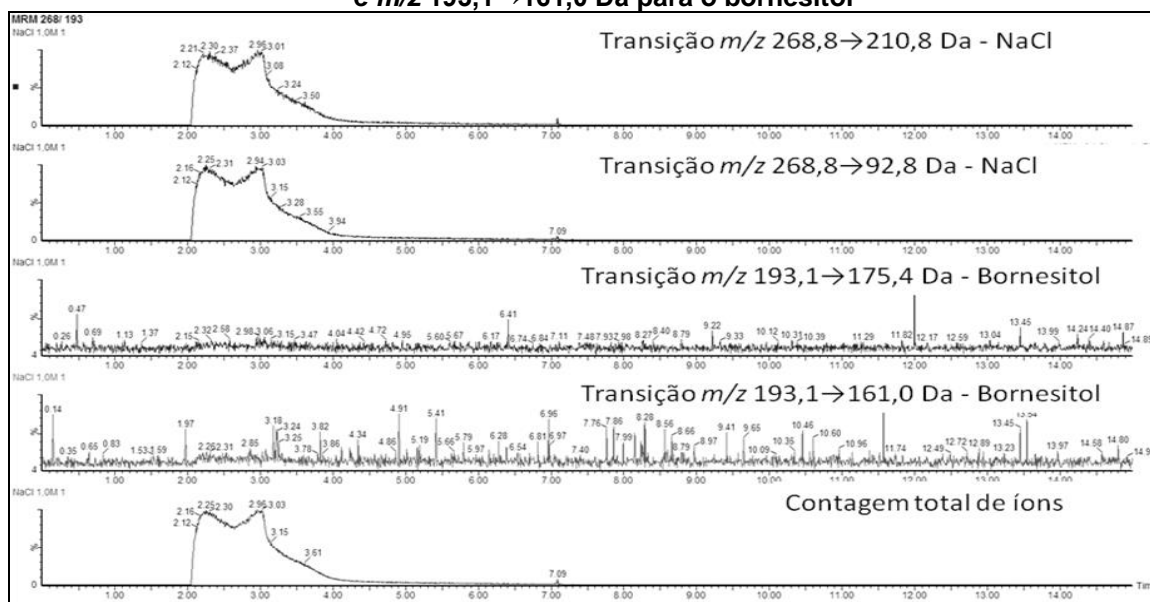
Uma vez constatado o efeito de matriz (ME) decorrente da presença de NaCl, buscou-se minimizar o efeito estabelecendo uma condição cromatográfica que apresentasse resolução satisfatória entre o sal e o bornesitol, visando eliminar o ME. A eluição em tempos de retenção distintos possibilitaria o alcance da câmara de ionização em tempos diferentes, eliminando a supressão do sinal.

O método de MRM para o NaCl foi desenvolvido para avaliar o tempo de retenção do sal com base nas transições em  $m/z$  268,8→92,8 Da e  $m/z$  268,8→210,8 Da, observadas na injeção direta. Nas três concentrações avaliadas (0,75; 1,0 e 1,25 M) o NaCl co-eluiu com o bornesitol, inviabilizando sua quantificação. Tanto para as soluções do branco (A', B' e C'), quanto para as soluções contendo bornesitol, o cromatograma para o MRM das transições do sal foi praticamente o mesmo. Os cromatogramas obtidos para a solução do branco B' (**Figura 22**) e para a solução de bornesitol contendo NaCl (B) (**Figura 23**) possibilitam visualizar inequivocamente a supressão do sinal ao NaCl. Um vez comprovada a ocorrência de ME, buscou-se alternativas para contornar, ou minimizar, seus impactos sobre o método.

**Figura 22** – Cromatogramas obtidos em modo MRM para a solução branco de NaCl para as transições em  $m/z$  268,8→210,8 Da e  $m/z$  268,8→92,8 Da do sal, bem como em  $m/z$  193,1→175,4 Da e  $m/z$  193,1→161,0 Da para o bornesitol.



**Figura 23 – Cromatogramas obtidos em modo MRM para a solução de bornesitol contaminada com NaCl, na mesma concentração do branco, para as transições em  $m/z$  268,8→210,8 Da e  $m/z$  268,8→92,8 Da do sal, bem como em  $m/z$  193,1→175,4 Da e  $m/z$  193,1→161,0 Da para o bornesitol**



### 5.3.2.2 Otimização das condições cromatográficas visando eliminar o efeito da matriz (ME)

Quando no desenvolvimento de um método constata-se o ME deve-se reconsiderar os parâmetros definidos, desde a alteração das condições cromatográficas até o preparo da amostra (IGLESIAS, 2012). Assim, partindo da condição cromatográfica inicial (condição A), foram realizadas alterações (condições cromatográficas B – G) visando eliminar o efeito de matriz para quantificar o bornesitol.

#### Condições cromatográficas B e C

Inicialmente, o que se propôs foi a alteração da Condição cromatográfica A para as condições B e C, reduzindo a proporção do modificador orgânico de 87% para 75% e 65% (item 4.6.4), respectivamente. A racionalidade dessa modificação está no comportamento das colunas HILIC frente à redução do modificador orgânico. De acordo com Wang & He (2011), o mecanismo de retenção em colunas HILIC baseia-se na fina camada aquosa superficial que repousa sobre o leito cromatográfico. Solventes próticos, como a água,



competem efetivamente pelos sítios do leito, perturbando a formação da camada superficial polar, o que resultaria em uma fase estacionária mais “hidrofóbica” (WANG & HE, 2011). Assim, esperava-se que o NaCl eluísse com menor tempo de retenção, e o bornesitol, menos polar, permaneceria mais tempo retido no leito cromatográfico, alcançando posteriormente o detector sem supressão do sinal.

#### Condição cromatográfica D

A redução do modificador orgânico avaliada nas condições anteriores não resultou em resolução cromatográfica suficiente para a quantificação. Optou-se, então, pelo aumento na proporção de ACN (95%) no eluente, almejando uma maior estabilização da fina camada superficial polar, o que possibilitaria interação mais efetiva com o NaCl, e conseqüentemente eluição do bornesitol em menor tempo de retenção. Obteve-se uma maior retenção de ambos os analitos, porém novamente sem resolução cromatográfica adequada.

#### Condição cromatográfica E e F

A racionalidade das condições cromatográficas E e F foi a adição de ácido fórmico à ACN na concentração 0,1% como agente de resolução. A adição de agentes de resolução é uma estratégia valiosa em cromatografia líquida por deslocar o equilíbrio do analito para a forma protonada, minimizando a formação de caudas e resolvendo picos sobrepostos (MEYER, 2006). Nessa condição, observou-se a sobreposição dos picos do NaCl e bornesitol, de maneira semelhante ao obtido na condição B e C.

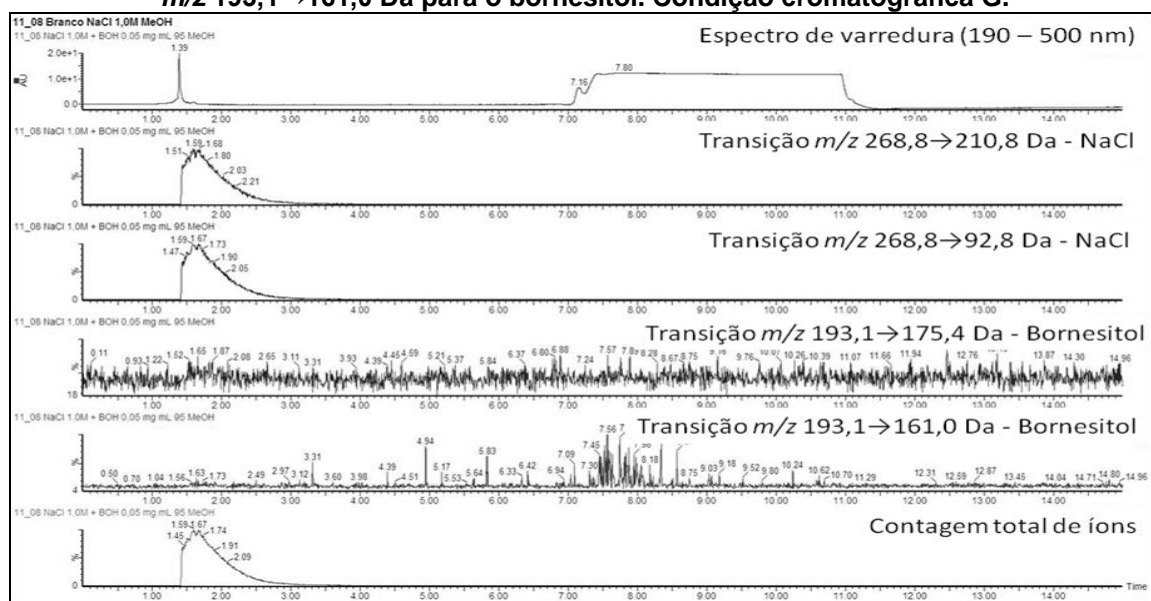
#### Condição cromatográfica G

Como última estratégia de modificação das condições cromatográficas, optou-se pela troca do modificador orgânico, substituindo a acetonitrila pelo metanol. A escolha desse solvente baseou-se na possibilidade de formação de um maior número de ligações de hidrogênio com a fina camada superficial polar da fase estacionária, instabilizando-a e tornando-a mais hidrofóbica (WANG & HE, 2011). Com essa estratégia, objetivava-se a eluição do NaCl em

um menor tempo de retenção, seguido do bornesitol, sem supressão do sinal no detector.

Em nenhuma das condições cromatográficas avaliadas observou-se resolução adequada entre o NaCl e o bornesitol. O Cromatograma obtido para a condição G é representado a seguir a título de exemplificação (**Figura 24**). Conforme exposto anteriormente, o efeito de matriz é influenciado principalmente pela concentração e competitividade das espécies na câmara de ionização. No presente caso, tem-se a coexistência dos dois efeitos: a concentração do NaCl é consideravelmente maior que a do bornesitol, o que descarta efeitos decorrentes da variação no fluxo, e a natureza iônica do NaCl, não dependendo da câmara de ionização para ionizar-se.

**Figura 24 –** Cromatogramas obtidos no modo de varredura no UV-Vis (190-500 nm) e em modo MRM para a solução de bornesitol contaminada com NaCl para as transições em  $m/z$  268,8→210,8 Da e  $m/z$  268,8→92,8 Da do sal, bem como em  $m/z$  193,1→175,4 Da e  $m/z$  193,1→161,0 Da para o bornesitol. Condição cromatográfica G.



A eliminação do ME via modificação das condições cromatográficas não se mostrou frutífera. Tentou-se, então, alterar as condições espectroscópicas no intuito de acentuar a detecção do analito, em detrimento do sal.

### 5.3.2.3 Otimização das condições espectroscópicas visando eliminar o efeito da matriz (ME)

*Análise do bornesitol em modo MRM no modo ESI+*

Diante da impossibilidade de quantificar o bornesitol no modo de ionização negativa (ESI-), optou-se por desenvolver um método MRM no modo positivo (ESI+) com base na fragmentação do aduto  $[M + Na]^+$  em  $m/z = 217$  Da. Conforme exposto anteriormente (item 5.3.1.2), os íons obtidos no modo ESI+ não apresentaram estabilidade suficiente para desenvolvimento de método MRM. Entretanto, a resposta da matriz contendo NaCl difere daquela avaliada anteriormente (item 5.3.1.2).

Não foi possível desenvolver um método de MRM para a quantificação do aduto em  $m/z = 217$  Da. Os íons formados eram pouco intensos e muito instáveis. Aplicou-se a energia máxima disponível no cone, mas ainda assim não se observou nenhum íon suficientemente estável para quantificação.

#### *Análise do bornesitol no modo SIR (Single Ion Reaction)*

Uma alternativa à quantificação por MRM em espectroscopia de massas é a aquisição no modo SIR (*Single Ion Reaction*) ou SIM (*Single Ion Monitoring*). Nessa modalidade, não se seleciona uma transição de fragmentação, mas sim fragmentos (HOFFMANN & STROOBANT, 2007). Para tanto, é necessário conhecer as características espectrais do composto. A quantificação por MRM permite obter maior ganho de seletividade e sensibilidade em relação ao SIR (HOFFMANN & STROOBANT, 2007); entretanto, diante dos resultados obtidos, foi uma alternativa encontrada para contornar o efeito de matriz.

Os fragmentos e adutos foram selecionados com base nas características espectroscópicas do bornesitol, observadas na infusão direta em tempo real, descrita no item 5.3.2. Assim, os canais foram ajustados para a detecção dos fragmentos em  $m/z = 199$   $[M-H_2O+Na]^+$  e  $m/z = 167,2$   $[M-H_2O-CH_3OH+Na]^+$ , bem como do aduto em  $m/z = 217$   $[M+Na]^+$ .

Os espectros obtidos indicaram considerável perda de sensibilidade e especificidade. Na análise do bornesitol em presença de NaCl (formado pela neutralização dos meios de degradação ácida e básica) não se observou os fragmentos em  $m/z = 199$  e  $m/z = 167$ . Somente foi detectado o aduto em  $m/z = 217$ . Já no espectro do branco de NaCl observou-se o sinal em  $m/z = 217$  e  $m/z = 199,1$ , que indicou a impossibilidade de quantificação via SIR.

Esgotadas as possibilidades espectroscópicas, partiu-se para as alterações no preparo da amostra. O objetivo dessa modificação é a extração seletiva do analito, eliminando o interferente (NaCl).

#### **5.3.2.4 Eliminação do efeito de matriz (ME) via preparo da amostra**

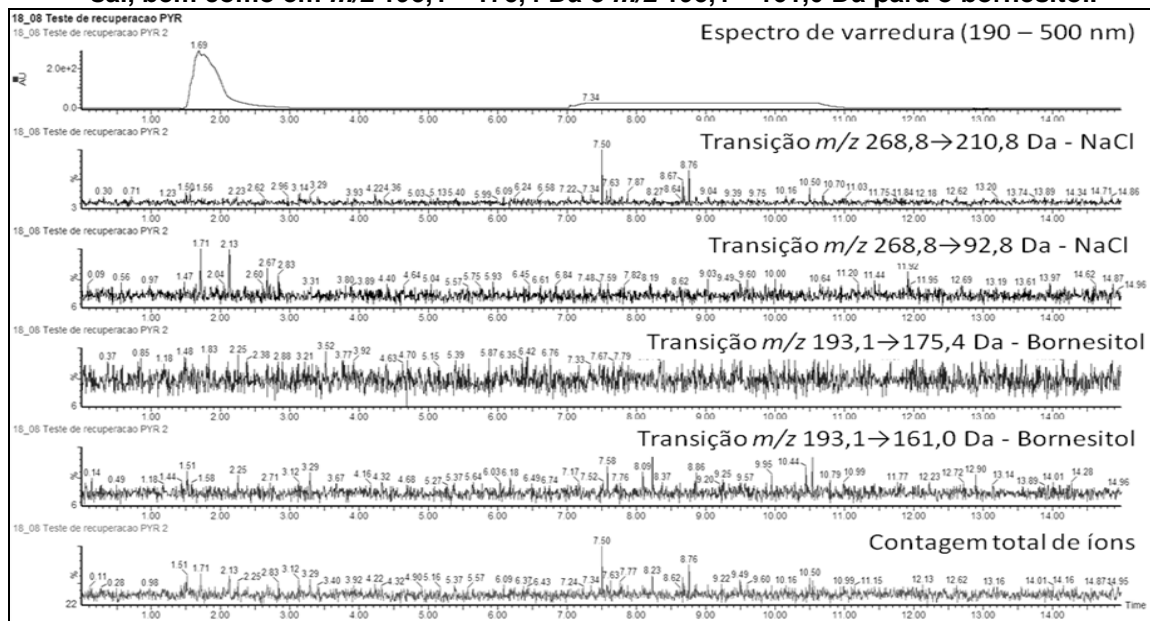
As diversas modificações cromatográficas e espectroscópicas realizadas anteriormente (item 5.3.2) não se mostraram adequadas para eliminar o ME, inviabilizando a análise quantitativa do bornesitol. Assim, buscou-se como alternativa alterar o preparo da amostra. Para tanto, avaliou-se a capacidade de solubilização do NaCl por solventes apróticos de alta constante dielétrica, tais como piridina (Pyr), dimetilsulfóxido (DMSO) e *N,N*-dimetilformamida (DMF). A racionalidade dessa estratégia baseia-se na solubilização seletiva do bornesitol, eliminando o NaCl interferente.

**Tabela 11 – Valores das constantes dielétricas dos solventes avaliados para solubilização seletiva do bornesitol em presença de cloreto de sódio.**

Solvente	Constante dielétrica ( $\epsilon$ )
Dimetilsulfóxido (DMSO)	46,7
Piridina (Pyr)	12,4
<i>N,N</i> -Dimetilformamida (DMF)	36,71

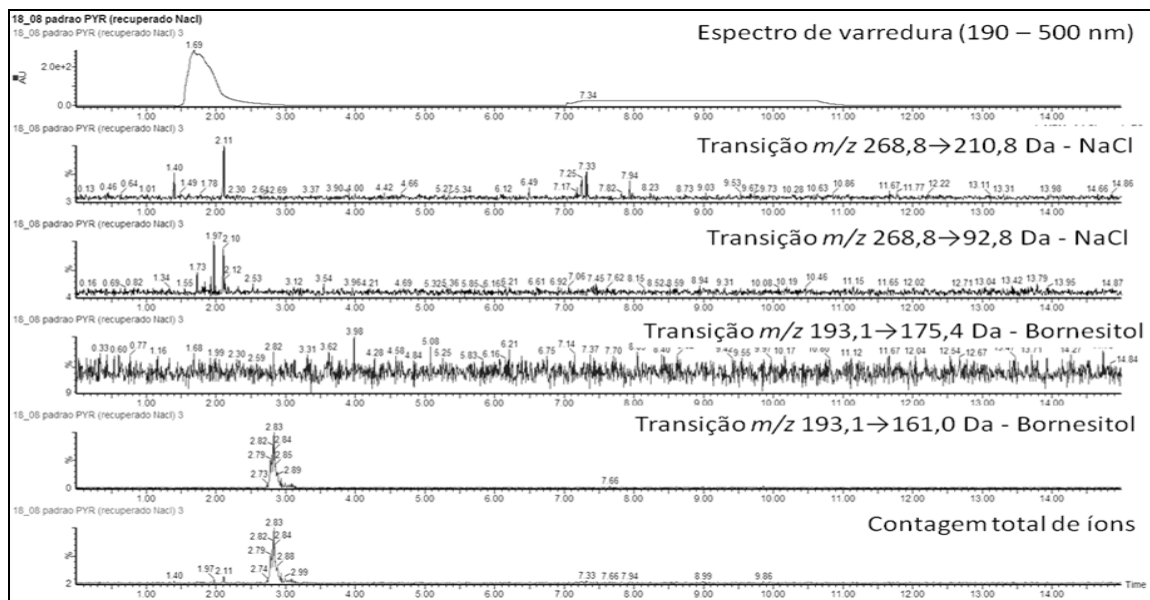
Inicialmente avaliou-se a capacidade dos solventes em solubilizar o NaCl adicionado ao meio. As amostras foram preparadas conforme descrito no item 4.7.1. Os cromatogramas obtidos indicaram que a piridina foi o único solvente capaz de não solubilizar o NaCl, uma vez que não foram detectadas as transições características do sal no modo MRM (**Figura 25**).

**Figura 25 – Cromatogramas obtidos no modo de varredura no UV-Vis (190-500 nm) e em modo MRM para as transições em  $m/z$  268,8→210,8 Da e  $m/z$  268,8→92,8 Da do sal, bem como em  $m/z$  193,1→175,4 Da e  $m/z$  193,1→161,0 Da para o bornesitol.**



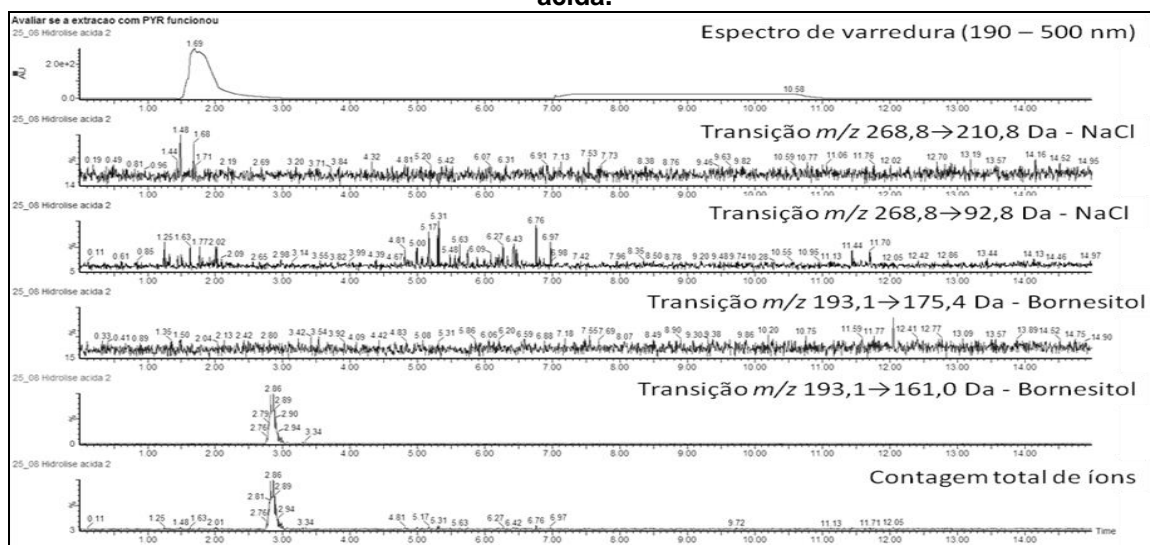
Na sequência, a análise dos três solventes (Pyr, DMSO e DMF) contaminados com bornesitol demonstrou a capacidade de detecção do analito. Não se observou supressão de ionização do ciclitol no modo MRM para nenhuma das amostras. Tendo em vista que a piridina foi o solvente que menos solubilizou o NaCl, ela foi selecionada para a condução dos estudos (Figura 26).

**Figura 26** – Cromatogramas obtidos no modo de varredura no UV-Vis (190-500 nm) e em modo MRM para as transições em  $m/z$  268,8→210,8 Da e  $m/z$  268,8→92,8 Da do sal (não foram observadas), bem como em  $m/z$  193,1→161,0 Da para o bornesitol, sem supressão de sinal.

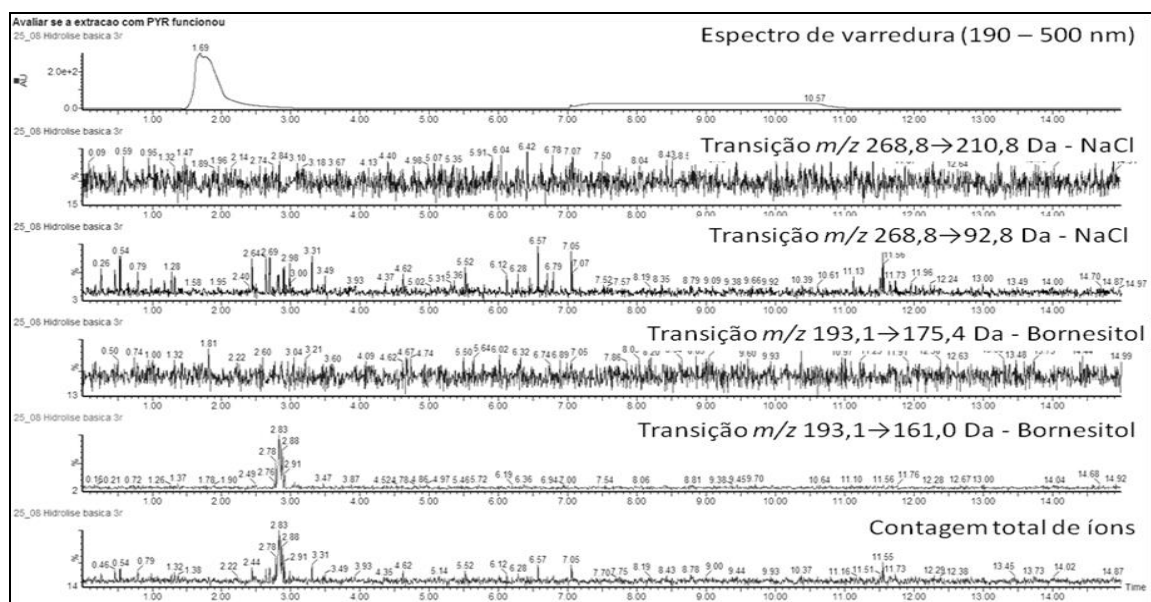


Por fim, analisou-se o bornesitol nas condições reais de degradação ácida (**Figura 27**) e básica (**Figura 28**), após neutralização e extração com piridina. Não se observou efeito de matriz e a extração com piridina foi adotada nos ensaios hidrolíticos catalisados por base e por ácido.

**Figura 27** – Cromatogramas obtidos no modo de varredura no UV-Vis (190-500 nm) e em modo MRM para as transições do sal, bem como do bornesitol, sem supressão de sinal do analito e sem presença de NaCl. Condição de degradação ácida.



**Figura 28**– Cromatogramas obtidos no modo de varredura no UV-Vis (190-500 nm) e em modo MRM para as transições do sal, bem como do bornesitol, sem supressão de sinal do analito e sem presença de NaCl. Condição de degradação básica.



#### 5.4 Validação de método analítico para quantificação de bornesitol por LC-MS/MS

A validação de metodologia analítica é condição imprescindível para análises quantitativas e qualitativas. Diversos órgãos apresentam normativos que dispõem sobre os requisitos mínimos necessários para a validação em laboratório, como o ICH (*International Conference on Harmonization*), AOAC (*Association of Analytical Communities*), IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*) e FDA (*Food and Drugs Administration*). No Brasil, as diretrizes básicas são preconizadas pela ANVISA, por meio da RDC 899. Vale ressaltar que em nenhum dos guias supracitados há limitação da técnica de detecção empregada, sendo indicados para os trabalhos no campo analítico.

Os critérios de aceitação podem variar dependendo do guia que se segue. Assim, o que se tem inicialmente é uma proposta básica, sendo que na maioria das vezes fica a cargo do analista eleger os parâmetros de validação relevantes para sua investigação, bem como elaborar seu protocolo de validação, estimar valores de referência e escolher os métodos de avaliação dos seus dados (KRUIVE et al., 2015). A literatura registra até mesmo alguns métodos analíticos em que a validação não segue nenhum dos guias

disponíveis (R.N. RAO et al., 2010; M.J. BOGUSZ et al., 2006; H. YAMAGUCHI et al., 2012; A. CLAUS et al., 2005).

#### **5.4.1 Parâmetros de validação avaliados**

##### **5.4.1.1 Especificidade e seletividade**

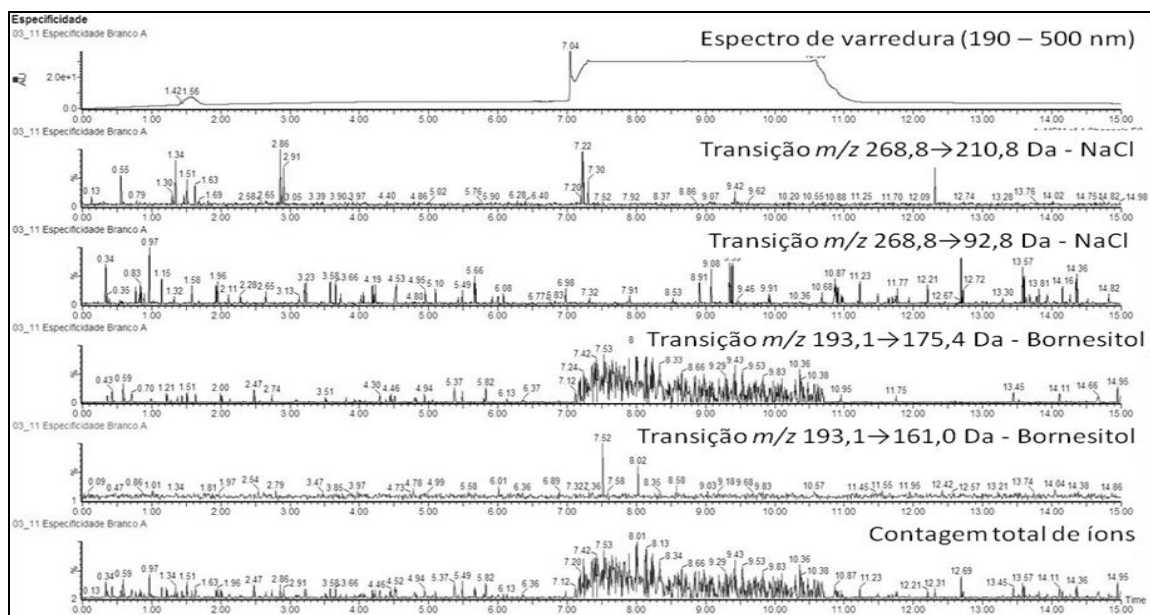
Especificidade e seletividade avaliam a capacidade de um método em quantificar essencialmente o analito de interesse (KRUIVE et al., 2015). De acordo com a IUPAC (2010), a seletividade de um método avalia a extensão da interferência de uma substância da matriz na quantificação de um analito, ao passo que a especificidade indica que nenhum interferente irá afetar a resposta do analito.

A especificidade visa garantir que os interferentes da matriz, produtos de degradação e metabólitos, entre outros, não alterem a resposta do analito (KRUIVE et al., 2010). Em LC-MS/MS, o interferente pode produzir um sinal equivalente ao do analito, suprimir ou mesmo acentuar o seu sinal (KRUIVE et al., 2010). De acordo com o normativo 2002/657/EC da Comunidade Europeia (*European Commission*, 2002), a especificidade pode ser avaliada pela análise de pelo menos 20 matrizes do branco e matrizes do branco fortificadas com compostos prováveis de interferir na quantificação do analito.

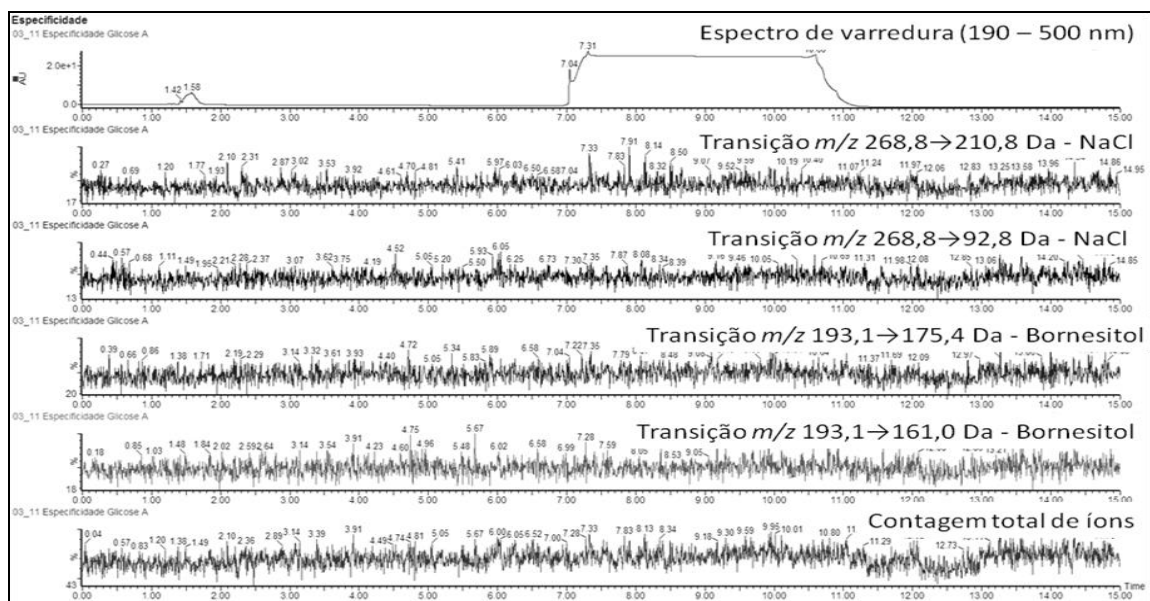
A especificidade da condição cromatográfica estabelecida (condição A) foi avaliada para as soluções reacionais descritas no item 4.8.3. Os cromatogramas obtidos demonstraram a ausência de interferentes que poderiam gerar falsos positivos nas matrizes do branco e do branco fortificado para a análise do bornesitol por MRM, empregando as transições selecionadas ( $m/z$  193→161 /  $m/z$  193→175), comprovando a especificidade do método (**Figuras 29, 30, 31, 32, 33 e 34**). As amostras do branco foram fortificadas com glicose, rutina, quercetina, ácido caféico e ácido clorogênico, substâncias presentes no extrato de *H. speciosa*, que poderiam eventualmente interferir na determinação do bornesitol.



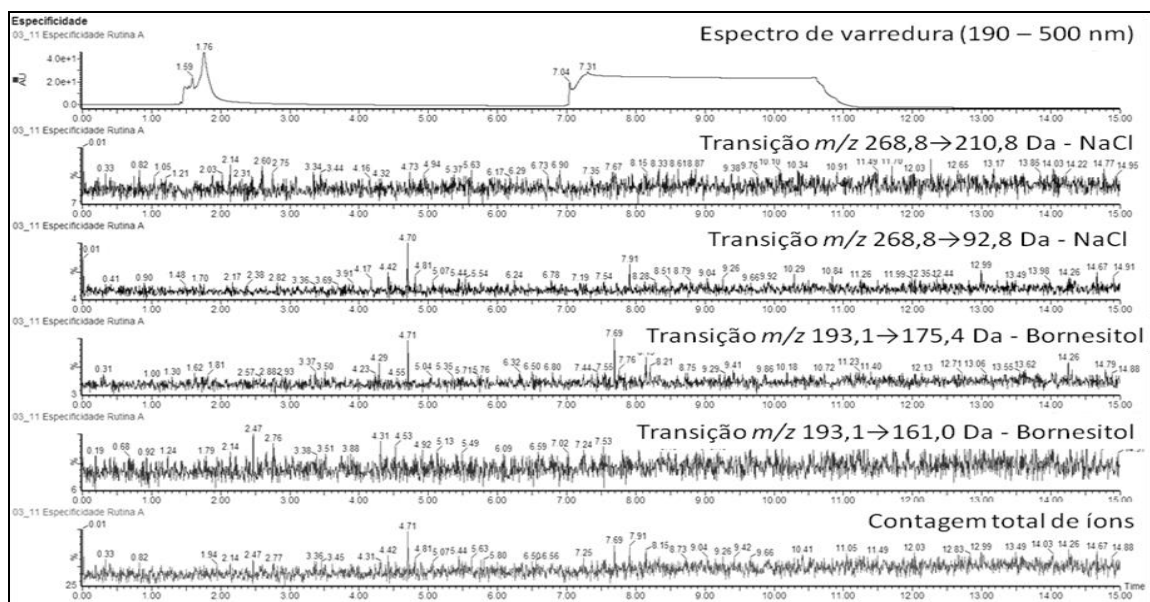
**Figura 29 – Cromatogramas obtidos para amostra branco (MeOH) na análise de bornesitol por UPLC-MS em MRM.**



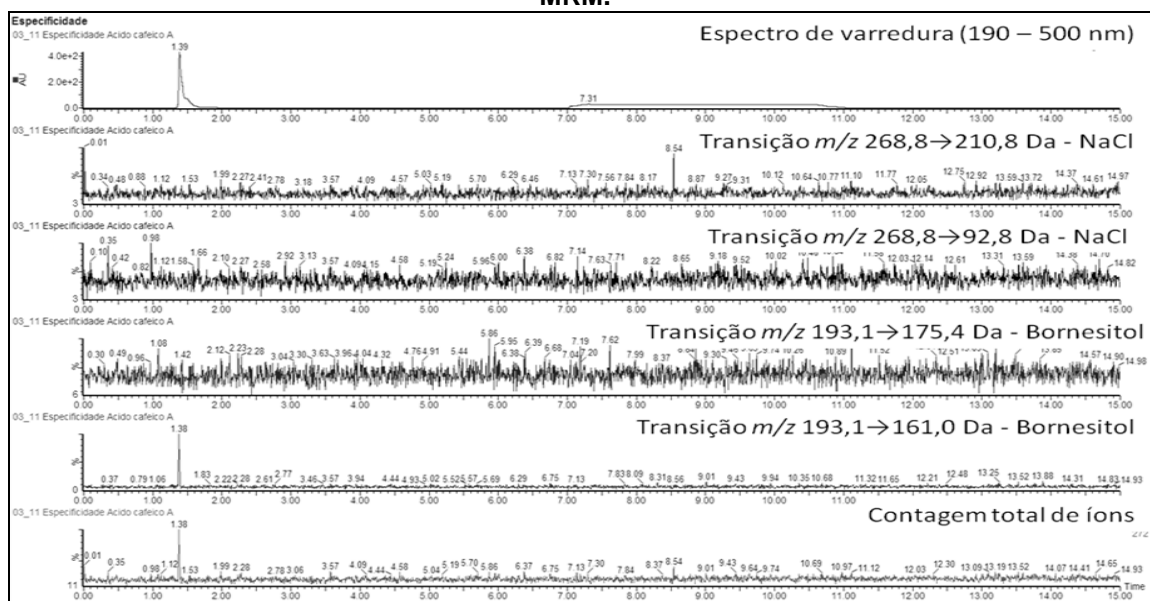
**Figura 30 – Cromatogramas obtidos para amostra de glicose por UPLC-MS em MRM.**



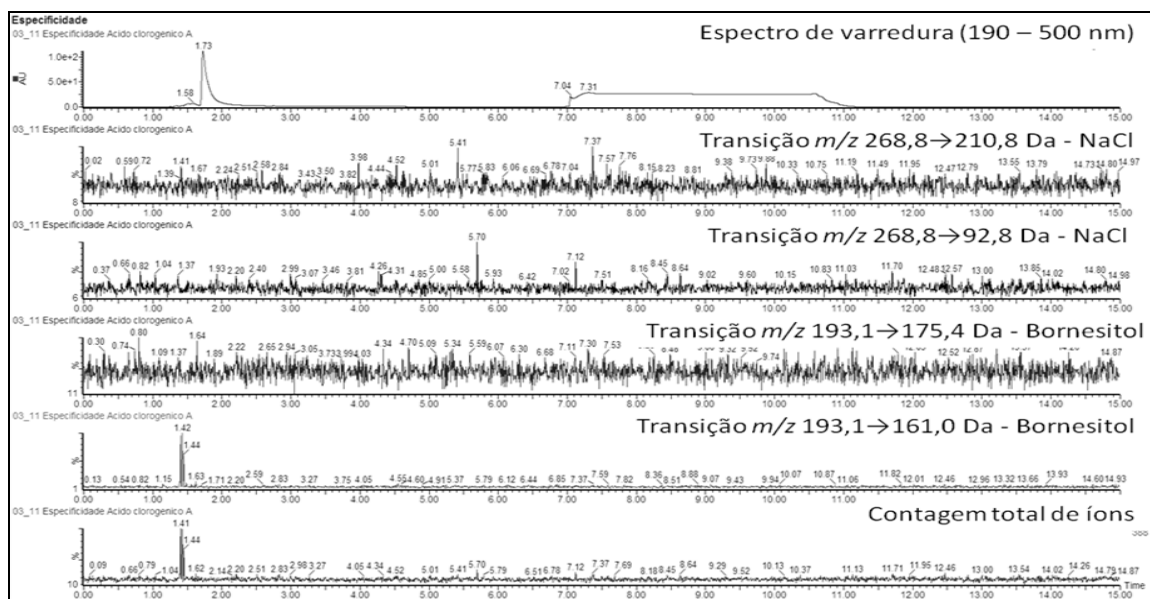
**Figura 31 – Cromatogramas obtidos para amostra de rutina por UPLC-MS em MRM.**



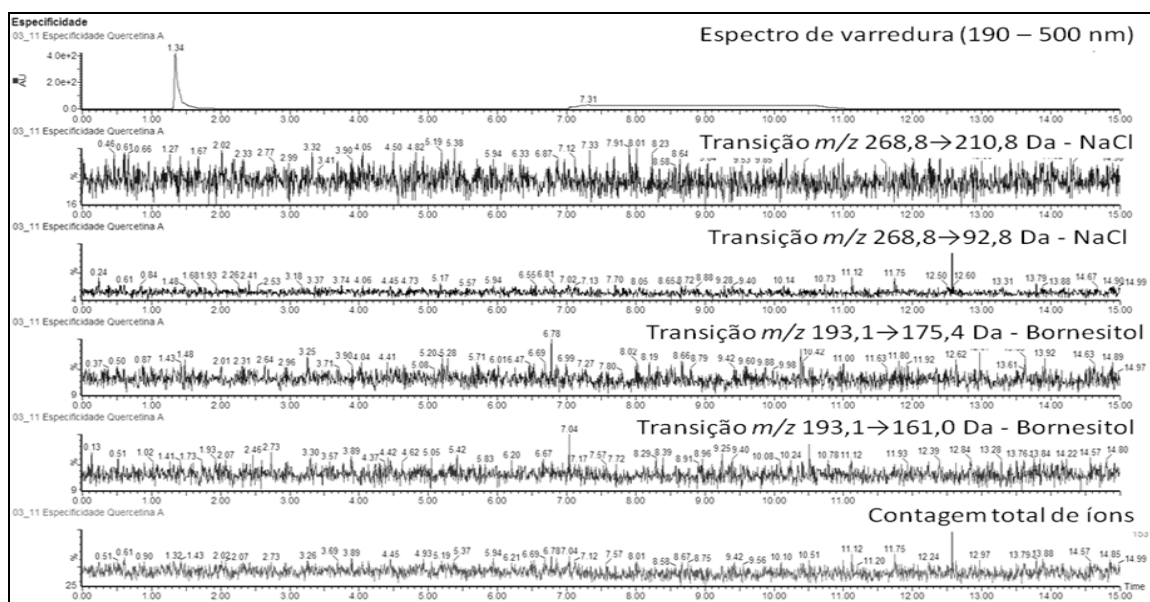
**Figura 32 – Cromatograma obtido para amostra de ácido caféico por UPLC-MS em MRM.**



**Figura 33 – Cromatograma obtido para amostra de ácido clorogênico por UPLC-MS em MRM.**



**Figura 34 – Cromatograma obtido para amostra de quercetina por UPLC-MS em MRM.**



#### 5.4.1.2 Linearidade

A faixa de massas definida para análise foi estabelecida a partir de ensaios preliminares de degradação em meio ácido, básico e neutro. O intervalo linear proposto para avaliar as possíveis variações no teor de bornesitol submetido à degradação foi de 100 a 300 ng.

A confirmação da resposta linear foi definida após a construção de duas curvas analíticas em dois dias consecutivos. A massa injetada de bornesitol e os valores de desvio padrão relativo para ambos os dias de análise estão representados na **Tabela 12**.

As curvas analíticas comprovam a relação linear entre a massa de bornesitol injetada (ng) *versus* a área do pico correspondente para a primeira transição ( $m/z$  193→161) do bornesitol. Os coeficientes de determinação ( $r^2$ ) obtidos atendem o estabelecido pela ANVISA (BRASIL, 2003), com valores superiores a 0,99. Os dados da análise de regressão linear obtidos para as duas curvas analíticas, bem como a curva analítica média estão representados na **Figura 35** e **TABELA 13**.

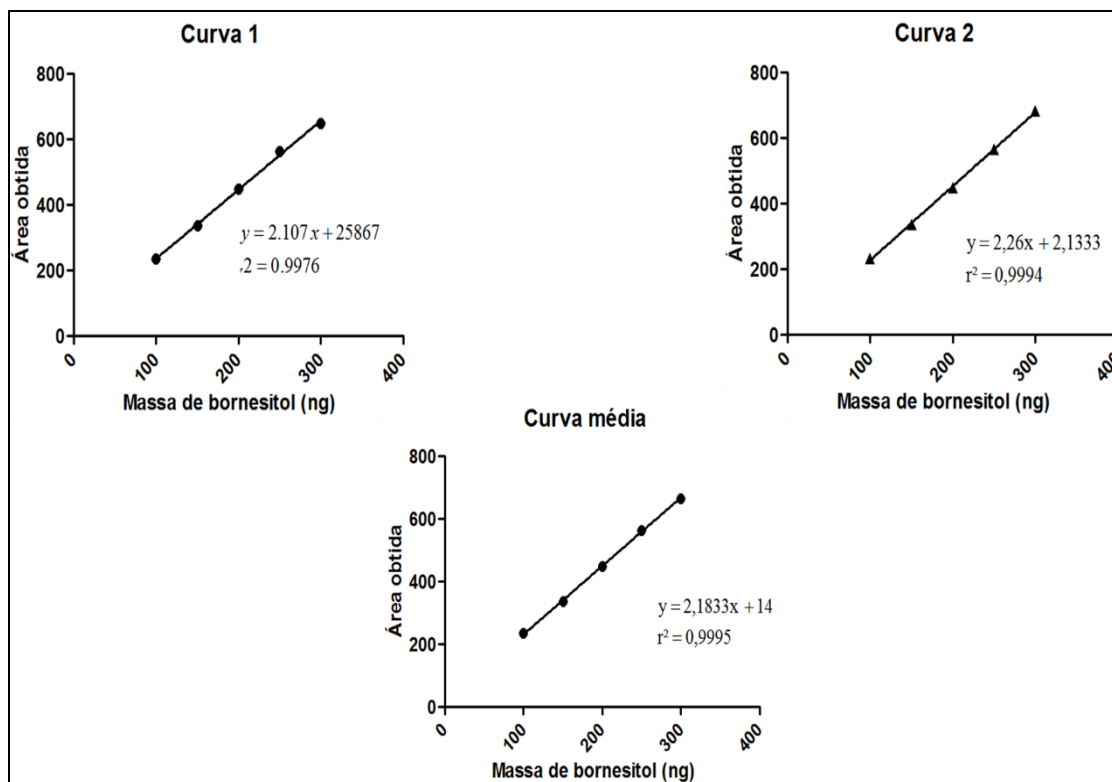
**Tabela 12 – Volumes de injeção e massas injetadas na avaliação da linearidade do método para quantificação de bornesitol, obtidos em dois dias consecutivos de análise.**

Volume injetado ( $\mu\text{L}$ )	Massa injetada (ng)	Dia 1		Dia 2	
		Área média (n=3)	DPR (%)	Área média (n=3)	DPR (%)
1,0	100	233,33	1,31	236	2,65
1,5	150	337,33	3,03	336,33	2,19
2,0	200	450	1,68	450,67	4,69
2,5	250	566	0,98	564,33	2,63
3,0	300	684	0,64	648,67	1,83

**Tabela 13 - Resultados da regressão linear para as curvas analíticas do bornesitol, obtidas em dois dias consecutivos de análise.**

Parâmetros estatísticos	Bornesitol	
	Dia 1	Dia 2
Faixa linear (ng)	100-300	
Coefficiente de determinação ( $r^2$ )	0.9976	0.9994
Inclinação	2.107	2.260
Erro padrão da inclinação ( $\times 10^2$ )	5.96	3.16
Intercepto ( $\times 10^{-1}$ )	25.87	2.133
Erro padrão do intercepto	12.65	6.7

**Figura 35- Curvas analíticas para a quantificação de bornesitol obtidas por UPLC-MS/MS modo MRM em dois dias consecutivos de análise e curva média resultante.**



As curvas obtidas em dois dias consecutivos de análise não apresentaram diferenças estatisticamente significativas ( $p > 0,05$ ). Dessa maneira, o método apresentou resposta linear dentro da faixa de massas avaliada para o analito.

#### **5.4.1.3 Limite de quantificação e Limite de detecção**

Os limites de quantificação e detecção de bornesitol foram calculados empregando-se os parâmetros da curva analítica média obtida em dois dias consecutivos (item 4.8.4), sendo obtidos os valores de 28,14 ng e 9,39 ng, respectivamente.

#### **5.4.1.4 Precisão**

##### **5.4.1.4.1 Precisão intradia**

A determinação da precisão foi realizada conforme descrito no item 4.8.7. De acordo com os critérios da ANVISA (BRASIL, 2003), valores de DPR

inferiores a 5,00% indicam que o método apresenta precisão intradia adequada. Os resultados obtidos confirmam a precisão do método desenvolvido (**TABELA 14**).

**Tabela 14 – Dados da precisão intradia do método para quantificação de bornesitol por UPLC-MS/MS modo MRM.**

<b>Amostra</b>	<b>Área obtida</b>
1	462,67
2	478,33
3	476
4	446
5	457
6	453,33
<b>Área média</b>	462,20
<b>DPR (%)</b>	2,77

#### 5.4.1.4.2 Precisão interdias

A determinação da precisão interdia foi realizada em dois dias consecutivos de análise com analistas diferentes ( $n = 12$ ), conforme descrito no item 4.8.7 De acordo com os critérios da ANVISA (BRASIL, 2003), valores de DPR inferiores a 5,00% indicam que o método apresenta precisão interdias adequada. Os resultados obtidos confirmam a precisão do método desenvolvido (**TABELA 15**).

As áreas obtidas na quantificação não diferiram entre o primeiro e o segundo dia de análise pelo teste  $t$  de Student ( $p > 0,05$ ).

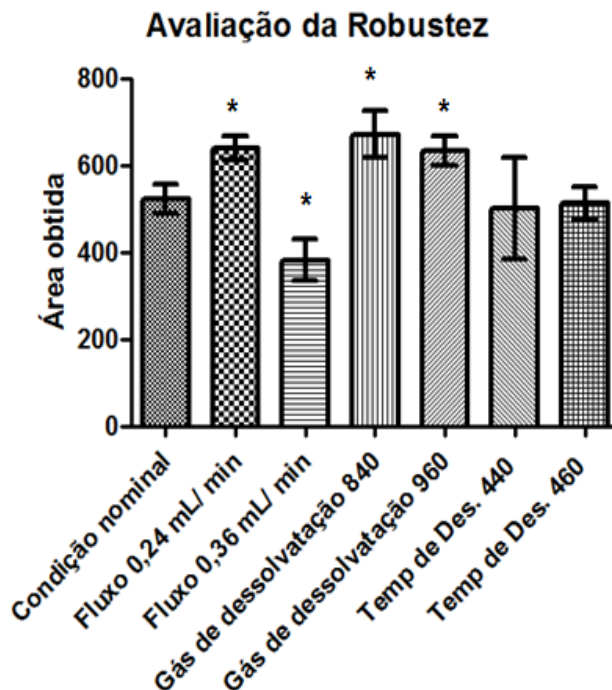
**Tabela 15 – Dados da precisão interdias do método para quantificação de bornesitol por UPLC-MS/MS modo MRM**

<b>Dia</b>	<b>Amostra</b>	<b>Área obtida</b>
<b>1</b>	1	462,67
	2	478,33
	3	476
	4	446
	5	457
	6	453,33
<b>2</b>	7	453,33
	8	449
	9	455
	10	462,33
	11	473,667
	12	432,67
<b>Área média</b>		458,28
<b>DPR (%)</b>		2,90

#### **5.4.1.5 Robustez**

A robustez do método foi avaliada com base nos parâmetros sugeridos por Krue e colaboradores (2015). As quantificações foram realizadas na condição analítica e frente a alterações deliberadas desta, tais como temperatura de dessolvatação (440 e 460 °C), fluxo da fase móvel (0,24 e 0,36 mL/min) e fluxo do gás de dessolvatação (840 e 960 L/h). Os resultados obtidos no estudo de robustez para o método de quantificação de bornesitol estão apresentados graficamente na **Figura 36**.

**Figura 36 – Avaliação da robustez do método para quantificação de bornesitol por UPLC-MS/MS modo MRM. As médias para a condição nominal e avaliação do fluxo e do gás de dessolvatação diferiram entre si após a análise de variância ( $p < 0,05$ ), ao passo que, para a temperatura de dessolvatação e a condição nominal as médias não diferiram entre si após análise de variância ( $p > 0,05$ ).**



Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA), que indicou diferenças estatisticamente significativas entre as áreas médias obtidas para o bornesitol na condição nominal e aquelas resultantes de variações deliberadas na condição cromatográfica definida ( $p < 0,05$ ). Com exceção das alterações na temperatura de dessolvatação (440 e 460 °C) ( $p > 0,05$ ), todas as demais variações resultaram em diferenças significativas em relação à condição nominal.

### 5.5 Avaliação da estabilidade do bornesitol em diferentes condições de estresse

A comprovação da estabilidade é essencial para produtos farmacêuticos. Um fármaco não alcança a prateleira sem que antes seja atestada sua integridade química e física, bem como sua eficácia terapêutica e segurança microbiológica e toxicológica (SILVA et al., 2009). Assim, estudos de



estabilidade constituem uma ferramenta indispensável no desenvolvimento e produção de fármacos e medicamentos.

A despeito da necessidade de avaliação da estabilidade de insumos farmacêuticos, a legislação vigente é pouco específica para os critérios de condução e aceitação dos estudos de estabilidade. Grande parte do planejamento experimental fica a cargo do analista, o que gera divergências sobre qual agente degradante utilizar, qual concentração e até qual ponto uma condição é representativa das situações reais de exposição (BRASIL, 2014). Apesar disso, os parâmetros importantes a serem avaliados, e que oferecerão subsídios concretos para definir o período de vida útil de um medicamento estão bem definidos (BRASIL, 2014).

No caso de produtos naturais e derivados de drogas vegetais, os estudos de estabilidade são ainda mais escassos e mal definidos. Assim, a implementação de protocolos de degradação, com a definição de tempos de degradação, agentes estressantes e temperaturas são usualmente definidos de acordo com a necessidade do analista ou com base na natureza química do analito em questão.

A avaliação do comportamento de um medicamento ou insumo farmacêutico ativo frente aos estudos de estresse é feito por métodos indicativos de estabilidade (BRASIL, 2014). Para que um método analítico possa ser utilizado com esse propósito, ele deve ser capaz de determinar somente o teor do fármaco, identificar somente os produtos de degradação, ou ambos (BRASIL, 2014). No presente estudo, o método indicativo de estabilidade desenvolvido foi responsável por indicar somente o teor do analito. Devido a sua alta especificidade, o método de MRM identifica única e exclusivamente a transição de fragmentação otimizada.

No presente estudo, a classificação de estabilidade adotada foi sugerida por Singh e Bakshi (2000). De acordo com os autores, pode-se classificar os fármacos em seis categorias, de acordo com a condição de estresse empregada (**Tabela 16**).

**Tabela 16 – Classificação da estabilidade de fármacos com base na extensão de degradação observada em condições diferentes de exposição.**

<b>Classificação</b>	
Classe I	Extremamente lábil
Classe II	Muito lábil
Classe III	Lábil
Classe IV	Estável
Classe V	Muito estável
Classe VI	Praticamente estável

Assim, o que se fez foi empregar a classificação de estabilidade para cada parâmetro avaliado individualmente, com base na condição de exposição e extensão de degradação observada.

#### **5.5.1 Degradação ácida e básica**

A estabilidade do bornesitol em meio ácido e básico foi avaliada em três níveis (brando, moderado e drástico), de acordo com o tempo reacional e concentração do agente estressante utilizada, conforme descrito no item 4.9.1. Os dados de degradação do bornesitol em meio ácido e básico estão dispostos na **Tabela 17** e **Tabela 18**, respectivamente.

**Tabela 17 – Teor de bornesitol obtido após degradação em condições de degradação ácida.**

<b>Condição</b>	<b>Teor de bornesitol (% ± d.p.)</b>
Branda	71,96 ± 14,05
Média	40,73 ± 3,94
Drástica	32,93 ± 2,28

**Tabela 18 – Teor de bornesitol obtido após degradação em condições de degradação básica.**

Condição	Teor de bornesitol (% ± d.p.)
Branda	77,37 ± 6,74
Média	71,6 ± 28,7
Drástica	39,03 ± 1,72

Nos ensaios de degradação ácida, básica ou neutra, a extensão da degradação é considerada suficiente quando se obtém entre 20-80% de decomposição do ativo, o que permite a classificação supracitada (**Tabela 16**). Para o estudo de degradação ácida, quando se empregou a condição branda (0,1 N; 8 h; refluxo) observou-se uma decomposição de cerca de 28% do bornesitol (**Tabela 17**), portanto, suficiente. Assim, de acordo com a **Tabela 19**, o bornesitol deve ser classificado como lábil frente ao pH ácido, ou seja, inclui-se na Classe III.

No caso da degradação básica, da mesma maneira, quando se empregou a condição branda (0,1 N; 8 h; refluxo), a extensão da decomposição situou-se na faixa desejada (23%, aproximadamente). Dessa forma, com base na classificação de Singh e Bakshi (2000), o bornesitol é considerado lábil frente ao pH básico, ou seja, Classe III (**Tabela 19**).

Nesse estudo, não se objetivou isolar os produtos de degradação do bornesitol. Caso esse fosse o interesse, deveria-se provocar uma decomposição de 80-100% do analito (SINGH e BAKSHI, 2000).

**Tabela 19 – Condições sugeridas para a condução de estudos de degradação ácida e básica que permitem a classificar a estabilidade do fármaco com base na degradação suficiente (20-80%). Fonte: Singh & Bakshi, 2000.**

Categoria do fármaco	Força do ácido / base	Tempo de exposição	Temperatura	Extensão
Praticamente estável (VI)	5,0 N	2 dias	Refluxo	Nenhuma
Muito estável (V)	2,0 N	1 dia	Refluxo	Suficiente
Estável (IV)	1,0 N	12 h	Refluxo	Suficiente
Lábil (III)	0,1 N	8 h	Refluxo	Suficiente
Muito lábil (II)	0,01 N	8 h	40 °C	Suficiente
Extremamente lábil (I)	0,01 N	2 h	25 °C	Suficiente

### 5.5.2 Hidrólise neutra

A estabilidade do bornesitol em meio aquoso neutro foi avaliada em três níveis (hidrólise branda, moderada e drástica), de acordo com o tempo da reação (1, 2 ou 5 dias, respectivamente), conforme descrito no item 4.9.2. Os resultados obtidos estão dispostos na **Tabela 20**.

**Tabela 20 – Teor de bornesitol obtido após degradação em condições de hidrólise neutra.**

Condição	Teor de bornesitol (% ± d.p.)
Branda	84,00 ± 3,20
Média	80,66 ± 1,30
Drástica	74,97 ± 0,52

No caso da hidrólise neutra, o alcance da faixa ideal de degradação (aproximadamente 25%) se deu na condição drástica (5 dias, refluxo) de análise. Entretanto, de acordo com Singh e Bakshi (2000), para que o bornesitol fosse classificado como Classe VI, não deveria haver degradação em nenhuma extensão. Assim, o que se propõe é a classificação do bornesitol como Classe V, ou muito estável (**Tabela 21**).

**Tabela 21 - Condições sugeridas para a condução dos estudos de hidrólise neutra que permitem a classificação da estabilidade do fármaco com base na degradação suficiente (20-80%). Fonte: Singh & Bakshi, 2000.**

Categoria do fármaco	Tempo de exposição	Temperatura	Extensão
Praticamente estável (VI)	5 dias	Refluxo	Nenhuma
Muito estável (V)	2 dias	Refluxo	Suficiente
Estável (IV)	1 dia	Refluxo	Suficiente
Lábil (III)	12 h	Refluxo	Suficiente
Muito lábil (II)	8 h	40 °C	Suficiente
Extremamente lábil (I)	2 h	25 °C	Suficiente

### 5.5.3 Oxidação em presença de peróxidos

A oxidação é preconizada em estudos de estabilidade por ser uma reação comum, em função do oxigênio presente no ar. Três principais vias da

reação são possíveis: oxidação mediada por transferência de elétrons, oxidação iniciada por radicais (auto-oxidação) e oxidação mediada por peróxidos (BAERTSCHI; ALSANTE; REED, 2005).

A avaliação da degradação oxidativa em presença de peróxidos é importante em virtude da presença de compostos dessa classe em níveis variáveis em certos excipientes, como, por exemplo, polissorbatos, polietilenoglicol, povidona e hidroxipropilcelulose (REIS, 2015). Aliado a isso, os peróxidos podem ser gerados por processos auto-oxidativos com o decorrer do tempo de armazenamento (WASYLASCHUK; HARMON; WAGNER, 2007).

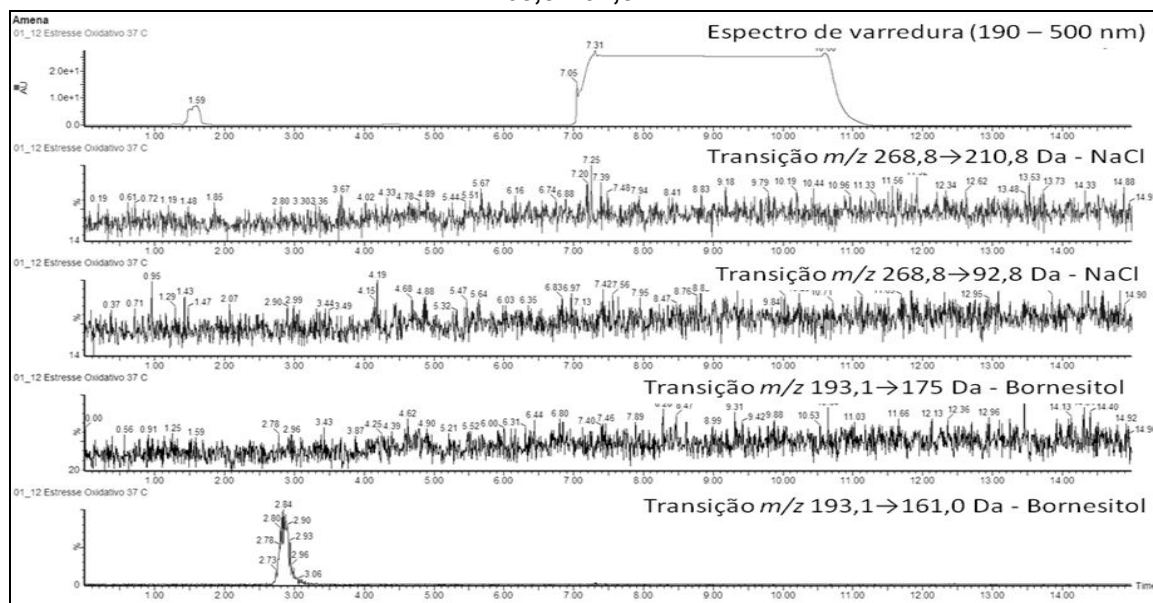
No presente trabalho, a avaliação da estabilidade do bornesitol em presença de peróxidos foi realizada com base no protocolo proposto por Singh e Bakshi (2000), com modificações. Foram avaliados três condições oxidativas (branda, moderada e drástica), em função da concentração da solução de peróxido de hidrogênio empregada (3%, 10% e 30%, respectivamente) e os resultados obtidos estão dispostos na **Tabela 22**.

**Tabela 22 – Teor de bornesitol obtido após degradação por peróxido de hidrogênio.**

<b>Condição</b>	<b>Teor de bornesitol (% ± d.p.)</b>
Branda	100,63 ± 1,47
Média	96,78 ± 1,10
Drástica	90,09 ± 0,56

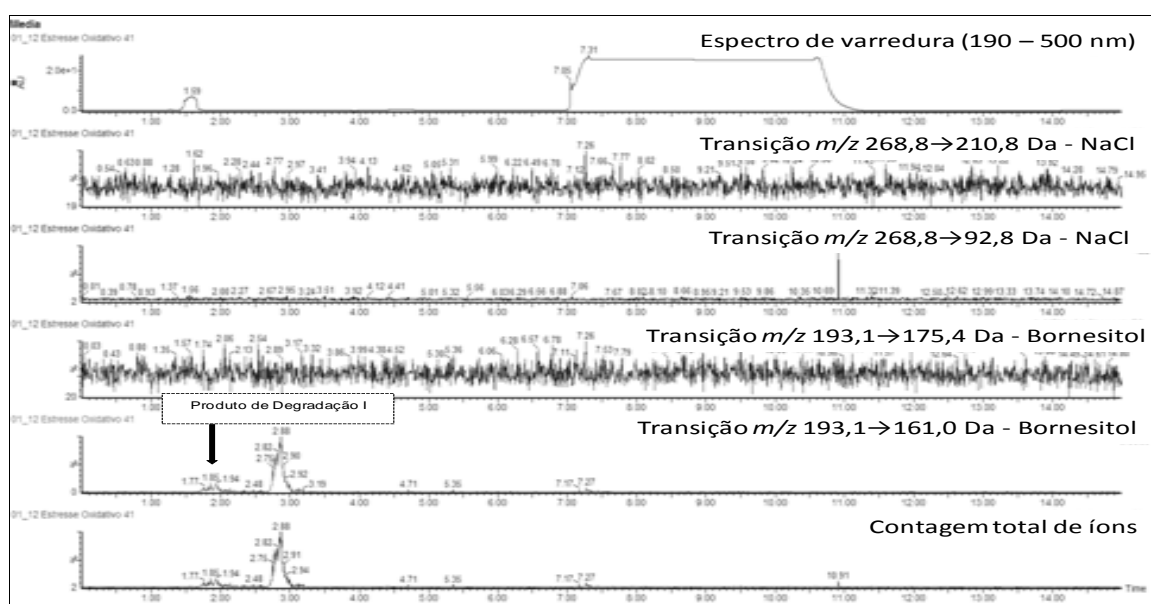
O bornesitol foi estável na condição de degradação branda, com teor de aproximadamente 100%. Os cromatogramas em modo MRM e UV-Vis obtidos para a degradação em meio brando estão representados na **Figura 37** para uma das replicatas. A análise dos dados cromatográficos confirma a ausência de formação de produtos de degradação.

**Figura 37 – Cromatogramas obtido para bornesitol após degradação oxidativa branda no modo de varredura no UV-Vis (190-500 nm) e em modo MRM para as transições em  $m/z$  268,8→210,8 Da e  $m/z$  268,8→92,8.**



Os cromatogramas obtidos por UPLC-MS/MS em modo MRM e com detecção no UV-Vis para a degradação do bornesitol na condição média estão representados na **Figura 38**. Nesses cromatogramas, pode-se identificar um pico com  $t_R = 1,85$  min detectado no MRM do bornesitol.

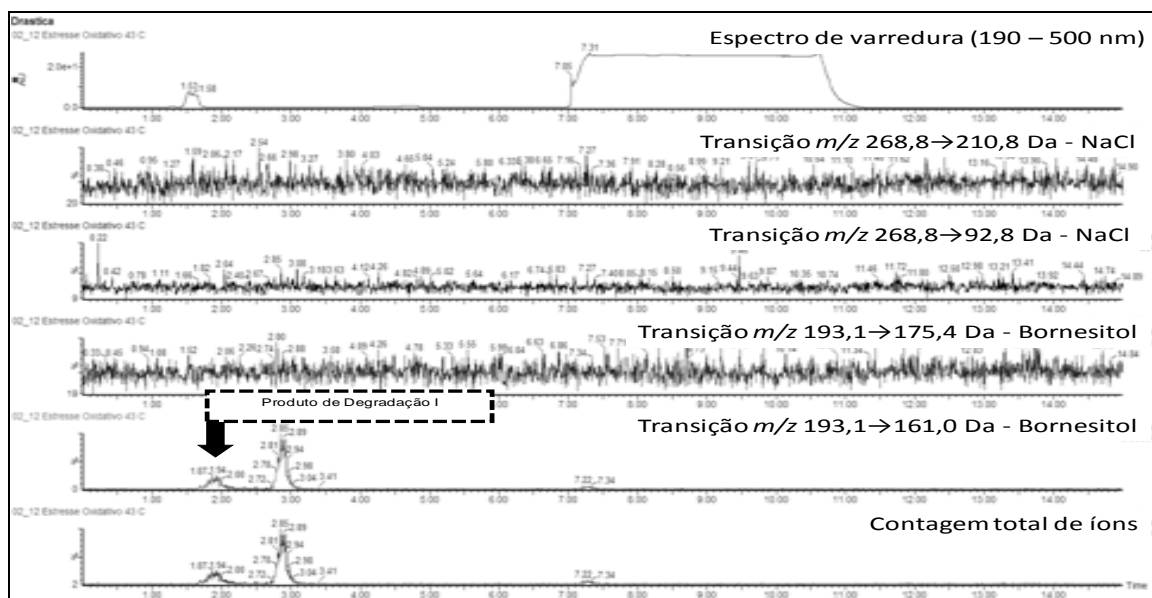
**Figura 38 – Cromatogramas obtidos para o bornesitol após degradação oxidativa média no modo de varredura no UV-Vis (190-500 nm) e em modo MRM para as transições em  $m/z$  268,8→210,8 Da e  $m/z$  268,8→92,8.**



A observação desse produto de degradação com mesma transição do bornesitol ( $m/z$  193,1→161 Da) não era esperada, devido à alta especificidade do método.

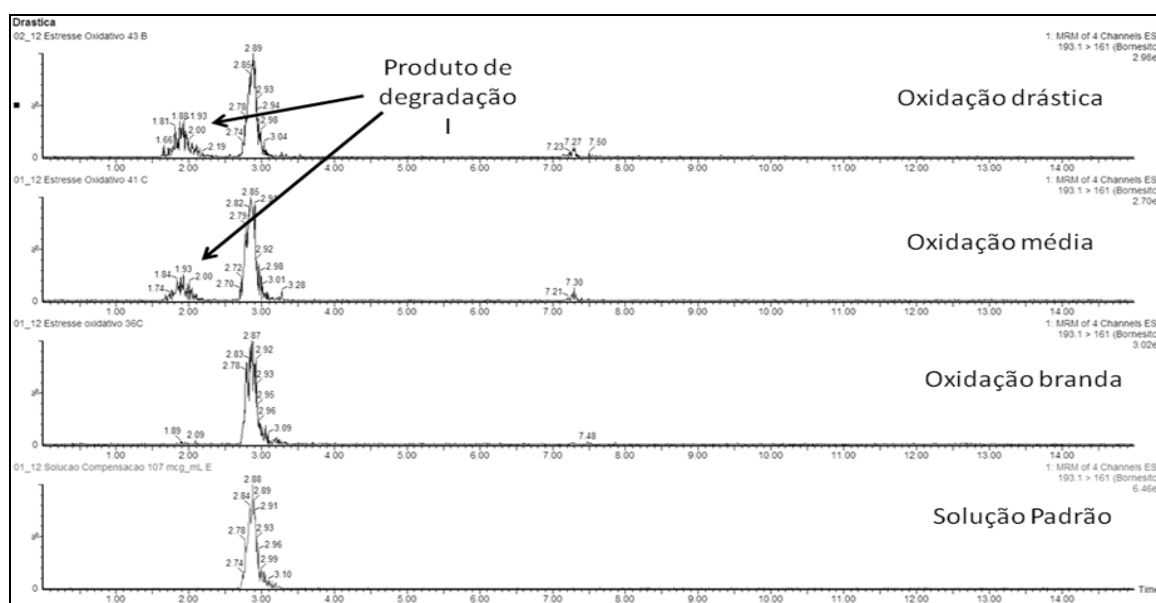
Quando submetido à condição de oxidação drástica, o teor de bornesitol determinado foi de  $90,09 \pm 0,56\%$  (Tabela 22), evidenciando uma extensão de degradação de aproximadamente 10%. De maneira semelhante ao observado na condição oxidativa média, o cromatograma registrado para a condição drástica revelou o pico em 1,85 min, com maior intensidade, correspondente ao produto de degradação do bornesitol (Figura 39).

**Figura 39 – Cromatogramas obtidos para o bornesitol após degradação oxidativa drástica no modo de varredura no UV-Vis (190-500 nm) e em modo MRM para as transições em  $m/z$  268,8→210,8 Da e  $m/z$  268,8→92,8.**



A comparação dos cromatogramas obtidos para a transição 1 do bornesitol ( $m/z$  193,1→161 Da) para a solução de compensação, estresse oxidativo brando, médio e drástico permite constatar a proporcionalidade entre a intensidade da exposição e a intensidade pico correspondente ao produto de degradação, com TR = 1,85 min (Figura 40).

**Figura 40 – Cromatogramas obtidos para o bornesitol após diferentes condições oxidativas e solução padrão não submetida à degradação. As setas indicam o produto de degradação formado ( $t_r = 1,9$  min).**



O bornesitol pode ser classificado como Classe V, ou muito estável, frente à degradação oxidativa mediada por peróxidos (Tabela 23). Semelhantemente ao ocorrido com a hidrólise neutra, a degradação obtida para a condição média foi inferior a 20%; entretanto, na condição drástica houve aproximadamente 10% de degradação do ativo, o que impossibilita classificá-lo como praticamente estável.

**Tabela 23 - Condições sugeridas para a condução dos estudos de degradação oxidativa que permitem a classificação da estabilidade do fármaco com base na degradação suficiente (20-80%). Fonte: Singh & Bakshi, 2000.**

<b>Categoria do fármaco</b>	<b>Concentração de peróxido</b>	<b>Tempo de exposição</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Extensão</b>
Praticamente estável	30%	48 h	Ambiente	Nenhuma
Muito estável	10%	24 h	Ambiente	Suficiente
Estável	3%	24 h	Ambiente	Suficiente
Lábil	3%	6 h	Ambiente	Suficiente
Muito lábil	1%	3 h	Ambiente	Suficiente
Extremamente lábil	1%	30 min	Ambiente	Suficiente

#### 5.5.4 Fotólise

A degradação fotolítica foi realizada sob condições de exposição branda (1,2 milhões de Lux hora) e drástica (6,0 milhões de Lux hora), segundo



preconizado por Singh & Bakshi (2000). A faixa de comprimento de onda da radiação deve situar-se acima de 300 nm, uma vez que exposições abaixo desse valor dificilmente ocorreriam durante o ciclo de vida de um fármaco (BAERTSCHI; ALSANTE; REED, 2005).

O efeito de fotodegradação não é exclusivamente dependente da quantidade de radiação incidente em uma molécula, mas varia também de acordo com a quantidade de radiação absorvida pelo composto (BAERTSCHI; ALSANTE; REED, 2005).

De acordo com os resultados obtidos nesse ensaio (**Tabela 24**), o bornesitol pode ser classificado como praticamente estável, ou Classe VI, uma vez que não se observou uma degradação em grande extensão. O próprio desvio padrão das análises permite inferir que o analito está presente em concentrações próximas a 100%.

**Tabela 24 – Teor de bornesitol obtido após degradação por fotólise.**

<b>Teor de bornesitol (%) ± dp</b>	
1,2 milhões de Lux Hora	99,43 ± 0,87
6,0 milhões de Lux Hora	98,78 ± 1,5

#### **5.5.5 Degradação em presença de íons metálicos**

Avaliou-se a estabilidade do bornesitol frente ao  $\text{Cu}^{2+}$ , conforme descrito no item 4.9.4. Não foram avaliadas outras condições de exposição, pois em função da característica catalisadora ou promotora de reações dos íons metálicos, a variação dos parâmetros de concentração e temperatura não é relevante (BRASIL, 2014).

O teor de bornesitol encontrado após exposição aos íons metálicos foi de 34,67 % ± 3,67. Não se esperava uma redução tão brusca nessa condição. Cabe destacar, no entanto, que esse valor pode estar subestimado, pois o sulfato de cobre pode ter suprimido o sinal do analito. Assim, não será confiável classificar o bornesitol como sensível ou não frente aos íons metálicos.

### 5.5.6 Termólise

O termo termólise se aplica à quebra de ligações covalentes promovidas por altas temperaturas. Nesse contexto, qualquer mecanismo de degradação que possa ser catalisado pelo aumento da temperatura, como as vias hidrolíticas, reações de isomerização / epimerização, rearranjos, entre outros, são exemplos de vias termolíticas (BAERTSCHI; ALSANTE; REED, 2005).

No presente trabalho avaliou-se a estabilidade do bornesitol à 70 °C, conforme preconizado por Baertschi e colaboradores (2005). Segundo os autores, essa temperatura pode fornecer informações importantes acerca da estabilidade da maioria dos fármacos no estado sólido.

A extensão da degradação obtida na termólise para o bornesitol foi de de 79,70% ± 1,13.

Não foram encontrados descritos na literatura valores ideais para classificar um fármaco como estável frente a íons metálicos ou a temperaturas elevadas. Muito se discute acerca da necessidade de formação dos produtos de degradação para notificação às agências regulatórias. Assim, optou-se por não classificar o bornesitol com base nesses dois quesitos.

## 6 CONCLUSÃO

A avaliação do perfil de degradação do bornesitol demonstrou a instabilidade do composto frente ampla faixa de pH, bem como a temperaturas elevadas. O mesmo não ocorre com a hidrólise neutra, onde o analito mostrou-se estável à ação da água. O bornesitol demonstrou-se estável também frente às degradações promovidas pela luz ultravioleta e pela adição de peróxidos. O estudo com íons metálicos foi inconclusivo, uma vez que se acredita na supressão iônica do sinal do bornesitol, o que será checado em momento oportuno.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, E.R. **Plantas medicinais brasileiras: conhecimentos populares e científicos**. Hemus, 341p. 1993.

ALPERT, A.J. Hydrophilic-interaction chromatography for the separation of peptides, nucleic acids and other polar compounds. **Journal of Chromatography**, V. 499, 177–196, 1990.

ANDERSON, L.; TAKEDA, R.; ANGYAL, S. J.; McHUGH, D. J. Cyclitol Oxidation by *Acetobacter suboxydans*. II. Additional Cyclitols and the “Third Specificity Rule”. **Archives of biochemistry and biophysics**. v 78, p518-531, 1958.

ARRUA, R.D., TALEBIA, M., CAUSONA, T.J., F., HILDER, E.F. Review of recent advances in the preparation of organic polymer monoliths for liquid chromatography of large molecules **Analytica Chimica Acta** Volume 738, 13 Pages 1–12, 2012.

BAERTSCHI, S. W.; ALSANTE, K. M.; REED, R. A. **Pharmaceutical stress testing: predicting drug degradation**. Taylor & Francis Group, 2nd ed., 2005.

BAKOWSKA-BARCZAK, A. M.; KOLODZIEJCZYK, P.P. Black currant polyphenols: Their storage stability and microencapsulation. **Industrial crops and products**. V.34(2): 1301-1309, ago 2011.

BAUMGARTNER, S.; GENNER-RITZMANN, R.; HAAS, J.; AMADB, R.; NEUKOM, R.; Isolation and Identification of Cyclitols in Carob Pods (*Ceratonia siliqua* L.). **Journal of aricultural food chemistry**, V34, p 827-829, 1986.

BARROS, I.M.C. *Contribuição ao estudo químico e biológico de Hancornia speciosa Gomes (Apocynaceae)*. Brasília: Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília, 2008. 194p.

BATHENA<sub>1</sub>, S<sub>2</sub>P.; HUANG<sub>1</sub>, J.; EPSTEIN<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>A.; GENDELMAN<sub>1</sub>, H<sub>2</sub>E.; BOSKA M<sub>2</sub>D.; ALNOUTI<sub>1</sub>, Y. Rapid and reliable quantitation of amino acids and myo-inositol in mouse brain by high performance liquid chromatography and tandem

mass spectrometry. **Journal of Chromatography. B Analytical Technologies Biomedical Life Science**, V. 893-894, p. 15-20, 2012.

BIEN, S. & GINSBURG, D. The structure of Bornesitol. **Israel institute of technology**. p. 3189-94, 1958.

BILIA, A.R.; ETERNO, F.; BERGONZI, M.C.; MAZZI, G.; VINCIERI, F.F. Evaluation of the content and stability of the constituents of mother tinctures and tinctures: The case of *Crataegusoxycantha*L. and *Hiperacium pilosella*L. **Journal of pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v 44, 70-78 p, 2007 [b].

BILIA, A.R.; BERGONZI, M.C.; MORGENNI, F.; MAZZI, G.; VINCIERI, F.F. Evaluation of chemical stability of St. John's wort commercial extract and some preparations. **International Journal of Pharmaceutics**, v 213, 199-208 p, 2001[a].

BOGUSZ, M.J.; HASSAN, H.; AL-ENAZI, E.; IBRAHIM, Z.; AL-TUFAIL, M. Application of LC-ESI-MS-MS for detection of synthetic adulterants in herbal remedies, **Journal of Pharmaceutical Biomedicine Analysis**, V.41, 554-564, 2006.

Buszewski, B. & NOGA, S. Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC)—a powerful separation technique. **Analytical and Bioanalytical Chemistry** Volume 402, Issue 1, pp 231-247, 2012.

BRAGA, F.C.; ENDRINGER, D.C.; SILVA, G.C.; CORTÊS, S.F. *Extrato e fração padronizados de folhas de Hancorniaspeciosa e sua composição farmacêutica*. Patente, n. PI0802004-3 A2, 2009.

BRAGA, F.C.; WAGNER, H.; LOMBARDI, J.A.; OLIVEIRA, A.B. Screening the Brazilian flora for antihypertensive plant species for in vitro angiotensin I-converting enzyme inhibitions activity. **Phytomedicine**, v.7, n.3, p.245-250, 2000.

BRASIL. Boletim Agropecuário - n.º 67 - p. 1-12 Lavras/MG GOVERNO DO BRASIL 1984.

BRASIL. Resolução no 899, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos [Internet]. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Poder executivo, Brasília, DF, **Diário Oficial da União**, 2 jun 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº 14 de 31.03.10. Determina a Publicação do “Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos”. **Diário Oficial da União**.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº 14 de 09.08.12. Determina a Publicação do “*Dispõe sobre a realização de estudos de estabilidade de insumos farmacêuticos ativos.*”. **Diário Oficial da União**, 9 ago 2012.

BRASIL. Consulta Pública nº 68, de 29 de agosto de 2014 – Determina a publicação do guia regulatório para obtenção do perfil de degradação, e identificação e qualificação de produtos de degradação. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Poder Executivo, Brasília, DF, **Diário Oficial da União**, 1 set. 2014.

CAMARGO, S.P.S. **Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para a determinação de canabidiol e tetraidrocanabinol em amostras de plasma por cromatografia em fase gasosa/ espectrometris de massas.** Universidade de São Paulo, 57p., 2008.

CAMPBELL, N.R.C. & CHEN, GUANMIN; Canadian efforts to prevent and control hypertension. **The canadian journal of carciology**. V 26, 14C-17C, ago.-set. 2010.

CHANG, Q.; ZUO, Z.; CHOW, M.S.S.; HO, W.K.K. Effect of storage temperature on phenolics stability in hawthorn(*Crataeguspinnatifida* var. major) fruits and a hawthorn drink. **Food Chemistry**. V 98, 426-430, 2006

CHOBANIAN, A.V.; BAKRIS, G.L.; BLACK, H.R.; CUSHMAN, W.C.; CREEN, L.A.; IZZO, J.L.; JONES, D.W.; MATERSON, B.J.; OPARIL, S.; WRIGHT, J.T. Jr.; ROCELLA, E. J. The seventh report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. **JAMA**, v.289, n.19, p.2560-2572, 2003.

CLAUS, A.; WEISZ, G.M.; KAMMERER, D.R.; CARLE R.; SCHIEBER, A. A method for the determination of acrylamide in bakery products using ion trap LC–ESI–MS/ MS, **Molecular Nutritional Food Research**, V 49918–925, 2005

COSTA, E.S.; HIRUMA-LIMA, C.A.; LIMA, E.O.; SUCUPIRA, G.C.; BERTOLIN, A.O.; LOLIS, S.F.; ANDRADE, F.D.P.; VILEGAS, W.E.; SOUZA-BRITO, A.R.M. Antimicrobial activity of some medicinal plants of the cerrado, Brazil. **Phytotherapy Research**, v.22, p.705-707, 2008.

[DABROWSKI](#), A.; [PODKOŚCIELNY](#), P.; HUBICKI, Z.; [BARCZAK](#), M. Adsorption of phenolic compounds by activated carbon—a critical review. **Chemosphere**, V. 58 (8), p. 1049-1070, 2005.

DADÁKOVÁ, E.; VRCHOTOVÁ, N.; CHMELOVÁ, S.; SERÁ, B; The stability of rutin and chlorogenic acid during the processing of Black Elder (*Sambucus nigra*) inflorescence. **International journal of food**, V 40, 2010

ENDRINGER, D.C.; OLIVEIRA, O.V.; BRAGA, F.C. In vitro and in silico inhibition of angiotensin-converting enzyme by carbohydrates and cyclitols. **Chemical Papers**, v.68, p.37–45, 2014.

ENDRINGER, D.C.; VALADARES, Y.M.; CAMPANA, P.R.V.; CAMPOS, J.J.; GUIMARÃES, K.G.; PEZZUTO, J.M.; BRAGA, F.C. Evaluation of brazilian plants on câncer chemoprevention targets in vitro. **Phytotherapy Research**, v.24, p.928–933, 2010.

ENDRINGER, D.C.; OLIVEIRA, O.V.; BRAGA, F.C. In vitro and in silico inhibition of angiotensin-converting enzyme by carbohydrates and cyclitols. **Chemical Papers**, v.68, p.37–45, 2014.

ENDRINGER, D.C. **Química e atividades biológicas de Hancornia speciosa Gomes (Apocynaceae): inibição da enzima conversora de angiotensina (ECA) e efeito na quimioprevenção de câncer**. Belo Horizonte: Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, 2007. 260p.

ENDRINGER, D.C.; PEZZUTO, J.M.; BRAGA, F.C. NF- $\kappa$ B inhibitory activity of cyclitols isolated from *Hancornia speciosa*. **Phytomedicine**, v.16, p.1064–1069, 2009.

European Commission, Decision 2002/657/EC of 12 August 2002. **J. European Union**, L221, p. 8–36, 2012.

FANG, Z.; BHANDARI, B. Effect of spray drying and storage on the stability of bayberry polyphenols. **Food chemistry**, V129, p.1139-1147, 2011.

FERREIRA, H.C.; SERRA, C.P.; ENDRINGER, D.C.; LEMOS, V.S.; BRAGA, F.C.; CORTES, S.F. Endothelium-dependent vasodilation induced by *Hancorniaspeciosain* rat superior mesenteric artery. **Phytomedicine**,v.14, p.473-478, 2007a.

FERREIRA, H.C.; SERRA, C.P.; LEMOS, V.S.; BRAGA, F.C.; CORTES, S.F. Nitric oxide-dependent vasodilatation by ethanolic extract of *Hancorniaspeciosavia* phosphatidylinositol-3-kinase. **Journal of Ethnopharmacology**, v.109, n.1, p.161-164, 2007[b].

Friedman, M; Jürgens, H. S. Effect of pH on the Stability of Plant Phenolic Compounds. **Journal of agricultural and food chemistry**, V 48 (6), p2101-2110, 2000.

GADELHA, C.A.G. Desenvolvimento e Saúde: em busca de uma nova utopia. **Saúde em Debate**. Rio de Janeiro, v. 19, n. 71, p. 326-327, 2007.

GIULIETTI, A.M.; HARLEY, R.M.; QUEIROZ, L.P.; WANDERLEY, M.G.L.; BERG, C.D.V. Biodiversidade e conservação das plantas no Brasil. **Megadiversidade**, v.1, 2005.

HARDMAN, J.G.; LIMBIRD, L.E. **Goodman Gilman As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. McGraw Hill, 11 ed. 2006.

HOFFMANN, E.; STROOBANT, V. **MASS SPECTROMETRY: PRINCIPLES AND APPICATIONS**. Inglaterra, Wiley, 3 ed., 489 p., 2007.

HUGHES, N.C.; WONG, E.Y.K.; FAN, J.; BAJAJ, N. Determination of Carryover and Contamination for Mass Spectrometry – Based Chromatographic Assays. **The AAPS Journal**, V.9 (23), p. E353-E360, 2007



ICH - International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceutical for Human Use - ICH Harmonised Tripartite Guideline. **Validation of Analytical Procedures: Methodology, Q2B (CPMP/ICH/281/96)**. London: European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, 1996.

IGLESIAS, A.H., **Introdução ao Acoplamento Cromatografia Líquida – Espectrometria de Massas**. Waters Technologies do Brasil, Barueri, SP. Disponível em <http://www.cnpsa.embrapa.br/portalmet/images/arquivos/17MET/minicursos/introducao%20ao%20acoplamento%20cromatografia%20liquida%20-%20espectrometria%20de%20massas.pdf> . Acesso em: 20 jun. 2015.

ITO, K., Advantages of Shodex[™] NH2P series, polymer-based amino HILIC column, over silica-based amino HILIC columns **LC-GC North America**. 29.6: pS56. 2011

JAINDL, M.; POPP, M.; Cyclitols protect glutamine synthetase and malate dehydrogenase against heat induced deactivation and thermal denaturation. **Biochemical and Biophysical research Communications**. v. 345, p. 761-765, 2006.

JANDERA, P. Stationary and mobile phases in hydrophilic interaction chromatography: a review. **Analytica Chimica Acta** Volume 692, Issues 1–2, 29, Pages 1–25, 2011

KAPLAN, N.M.; OPIE, L.H. Controversies in hypertension. **Lancet**, v.367, p.168-76, 2006.

KLEIN, A. Ação hipoglicemiante da Hancornia SP em diabetes induzido por aloxana. In: **SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL**, 14, Florianópolis. Resumos...Florianópolis: Universidade Federal do Paraná, p. 133, 1996 *apud* ENDRINGER, D.C. **Química e atividades biológicas de Hancorniaspeciosa Gomes (Apocynaceae): inibição da enzima conversora de angiotensina (ECA) e efeito na quimioprevenção de câncer**. Belo

Horizonte: Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais. 260 p. 2007

KRUBE, A.; REBANE, R.; KIPPER, K.; OLDEKOP, M.L.; EVARD, H.; HERODES, K.; RAVIO, P.; LEITO, I. Tutorial review on validation of liquid chromatography–mass spectrometry methods: Part I, **Analytic=Ca Chimica Acta**, V. 870, p. 29-44, 2015

KRUBE, A.; REBANE, R.; KIPPER, K.; OLDEKOP, M.L.; EVARD, H.; HERODES, K.; RAVIO, P.; LEITO, I. Tutorial review on validation of liquid chromatography–mass spectrometry methods: Part II, **Analytic=Ca Chimica Acta**, V. 870, p. 9-28, 2015.

LA CRUZ, M. G. D. **O acesso aos fitoterápicos e plantas medicinais e a inclusão social – diagnóstico situacional da cadeia produtiva farmacêutica no estado de mato grosso**. Governo do Estado de Pernambuco. Secretaria de Estado de Saúde. p. 1-91, 2005.

LEDERMAN, I. E.; SILVA JR., J. F. DA; BEZERRA, J. E. F; ESPÍNDOLA, A. C. de M. Mangaba (*Hancorniaspeciosa* Gomez). Jaboticabal: Funep, 2000, 35 p. **Série Frutas Nativas, 2**.

[LIANG, Z.](#); [T'KIND, R.](#); [DECUYPERE, S.](#); [VON FREYEND, S.J.](#); [COOMBS G.H.](#); [WATSON D.G.](#) Profiling of lipids in *Leishmania donovani* using hydrophilic interaction chromatography in combination with Fourier transform mass spectrometry. **Rapid communication in Mass Spectrometry**. V.24 (14), p. 2074-82, 2010.

LIMA, J.C.S.; MARTINS, D.T. *Screening* farmacológico de plantas medicinais utilizadas popularmente como antiinflamatória. In: *SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL*, 14, Florianópolis. Resumos...Florianópolis: Universidade Federal do Paraná, p.89, 1996 *apud* ENDRINGER, D. C. **Química e atividades biológicas de *Hancorniaspeciosa* Gomes (*Apocynaceae*): inibição da enzima conversora de angiotensina (ECA) e efeito na quimioprevenção de câncer**. Belo Horizonte: Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, 2007. 260 p.

LIU, P.; YANG, B.; KALLIO, H.; Characterization of phenolic compounds in Chinese hawthorn (*Crataegus pinnatifida* Bge. var. *major*) fruit by high performance liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry. **Food chemistry**, V.121(4), p.1188-1197, 2010.

MALTA D. C, MOURA L., SOUZA F. M., ROCHA F.M., FERNANDES F. M. Doenças crônicas não-transmissíveis: mortalidade e fatores de risco no Brasil, 1990 a 2006 in Saúde Brasil 2008. **Ministério da Saúde**, Brasília. 2009. Pág 337–362.

MANCIA, G.; BACKER, G.; DOMINICZAK, A.; CIFKOVA, R.; FAGARD, R.; GERMANO, G.; GRASSI, G.; HEAGERTY, A.M.; KJELDSEN, S.E.; LAURENT, S.; NARKIEWICZ, K.; RUILOPE, L.; RYNKIEWICZ, A.; SCHMIEDER, R.E.; BOUDIER, H.A.J.S.; ZANCHETTI, A. Guidelines for the management of arterial hypertension. The task force for the management of arterial hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC). **Journal of Hypertension**, v.25, p.1105-1187, 2007.

MAKRIS, D.P.; ROSSITER, J.T. Heat-induced, metal-catalyzed oxidative degradation of quercetin and rutin (Quercetin 3-O-rhamnosylglucoside) in aqueous model systems. **Journal of agricultural food chemistry**, V. 48 (9) 3830-3838, 2000.

MARINHO D.G.; ALVIANO, D.S.; MATHEUS, M.E.; ALVIANO, C.S.; FERNANDES, P.D. The latex obtained from *Hancorniaspeciosa* Gomes possesses anti-inflammatory activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v.135, p.530-537, 2011.

MARTINELLI, G. & MORAES, M.A. **Livro vermelho da flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://cncflora.jbrj.gov.br/arquivos/arquivos/pdfs/LivroVermelho.pdf>>. Acesso em: 20 jan. 2016.

MEYER, V.R. **Practical High-Performance Liquid Chromatography**. John Wiley & Sons, 3. Auflage, ISBN 0-471-98373-X, 2006.

MINISTÉRIO DA SAÚDE [Internet]. Secretaria Executiva. DATASUS. Informações de Saúde. Informações epidemiológicas e morbidade. Disponível em: <<http://www.datasus.gov.br>> Acesso em: 17 jan 2016.

MOLDAVEANU, S.C.; DAVIS, F.M. Analysis of quinic acid and *myo*-Inositol in tobacco. **Beiträge zur Tabakforschung International**, V.25 (4), p.498-506, 2012

MORAES, T.M.; RODRIGUES, C.M.; KUSHIMAA, H.; BAUABC, T.M.; VILLEGAS, W.; PELLIZZON, C.H.; BRITO, A.R.M.S.; HIRUMA-LIMA, C.A. *Hancorniaspeciosa*: Indications of gastroprotective, healing and anti-*Helicobacter pylori* actions. **Journal of Ethnopharmacology**, v.120, p.161-168, 2008.

MOREIRA, Y.A. *As plantas que curam*. v.1, **LI-BRA**, 1984. 410p.

NOGUEIRA, P.C.L.; ANDRADE, M.S.; SAMPAIO, T.S.; RIBEIRO, A.S.; MORAES, V. R.S.; MACHADO, S.M.F.; ALVES, P.B.; OLIVA, G.; THIEMANN, O.H.. Estudo fitoquímico e avaliação farmacológica de plantas da família Apocynaceae e Guttiferae do estado de Sergipe. **II Seminário de Pesquisa FAP-SE**, Aracajú, 2004.

NISHIBE, S.; SAKUSHIMA, A.; TAKEMURA, T.; NOGUCHI, Y. Cyclitols from Apocynaceae leaves. **Natural Medicine**. v 55, 268-271p. 200.

OLIVEIRA, L.G; GILBERT B.; BÔAS G.K.V. Oportunidades para inovação no tratamento da leishmaniose usando o potencial das plantas e produtos naturais como fontes de novos fármacos. **Revista Fitos**, Rio de Janeiro, Vol. 8(1): 1-72, jan.-mar., 2013.

ORTBAUER, M.; POPP, M.; Functional role of polyhydroxy compounds on protein structure and thermal stability studied by circular dichroism spectroscopy. **Plant physiology and biochemistry** v. 46, p. 428-434, 2008.

PAZOUREK, J. Fast separation and determination of free *myo*-inositol by hydrophilic liquid chromatography. **Carbohydrate research**. V. 391, p. 55-60, 2014.

PEREIRA, A. B. D.; VERÍSSIMO, T. M.; OLIVEIRA, M. A.; ARAÚJO, I. A.; ALVES, R. J.; BRAGA, F. C. Development and validation of an HPLC-DAD method for quantification of bornesitol in extracts from *Hancorniaspeciosa* leaves after derivatization with p-toluenesulfonyl chloride. **Journal of Chromatography B**, v. 887-888, p. 133-137, 2012.

PIERONI, J.P.; CAPANEMA, L.X.L.; NETO, C.R.S.; SOUZA, J.O.B.; SILVA, L.G. Terceirização da P&D de medicamentos: panorama do setor de testes pré-clínicos no Brasil. **BNDES Setorial**, Rio de Janeiro, n. 29, p. 131-158, mar. 2009

POST, G. G.; ANDERSON, L. Cyclitols and their methyl ethers. IV. The absolute configurations of the myo-inositol monomethyl ethers. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 84, n. 3, p. 478-480, 1962.

QIAO, L., SHI, X., XU, G. Recent advances in development and characterization of stationary phases for hydrophilic interaction chromatography. **TrAC Trends in Analytical Chemistry** Volume 81, Pages 23–33, July–August 2016

RAINVILLE, P.D.; SMITH, N.W.; COWAN, D.; PLUMB, R.S. Comprehensive investigation of the influence of acidic, basic, and organic mobile phase compositions on bioanalytical assay sensitivity in positive ESI mode LC/MS/MS. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, V.59, p.138-150, 2012.

RAO, R.N.; MAURYA, P.K.; RAMESH, M.; SRINIVAS, R.; AGWANE, S.B. Development of a validated high-throughput LC–ESI–MS method for determination of sirolimus on dried blood spots, **Biomedical Chromatography**, V.24, 1356–1364, 2010

RATES, S.M.K. Promoção do uso racional de fitoterápicos: uma abordagem no ensino da farmacognosia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. 2001; 11(2): 57-69.

RODRIGUES, C.M.; BRITO, A.R.M.S.; HIRUMA-LIMA, C.A.; VILEGAS, W. Constituintes químicos das cascas de *Hancorniaspeciosa* Gom. (Apocynaceae)

*In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA*, 29, Águas de Lindóia. Resumos...São Paulo, 2006.

RODRIGUES, V.E.G.; CARVALHO, D.A. **Plantas Medicinais no domínio dos Cerrados**. UFLA. 65p, 2001.

RUFINO, M.S.M.; FERNANDES, F.A.N.; ALVES, R.E.; BRITO, E.S. Free radical-scavenging behaviour of some north-east Brazilian fruits in a DPPH system. **FoodChemistry**, v.114, p.693-695, 2009.

SANTOS, P.O.; BARBOSA JUNIOR, A.M.; MÉLO, D.L.F.M.; TRINDADE, R.C. Investigação da atividade antimicrobiana do látex da mangabeira (*Hancorniaspeciosa*GOMES). **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, Botucatu, v.9, n.2, p.108-111, 2007.

SANTOS, E.A.; SAMPAIO, T.S.; FEITOSA, J.G.R.; RIBEIRO, A.O.; NOGUEIRA, P.C.L. Constituintes voláteis das folhas de *Hancorniaspeciosa*(Apocynaceae). *In REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA*, 29, Águas de Lindóia.**Resumos....**São Paulo, 2006.

SERRA, C.P.; CORTES, S.F.; LOMBARDID, J.A.; OLIVEIRA, A.B.; BRAGA, F.C. Validation of a colorimetric assay for the in vitro screening of inhibitors of angiotensin-converting enzyme (ACE) from plant extracts. **Phytomedicine**, v.12, p.424-432, 2005.

SHEVTS, V. I. The chemistry of myoinositol. **Russian Chemistry Review**, v. 43, n. 6, p. 488-502, 1974.

SILVA, G.C. **Efeito hipotensor e vasodilatador de uma fração padronizada de Hancorniaspeciosa Gomes (mangaba) em camundongos**. Belo Horizonte: Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, 2010. 87p.

SILVA, G.C.; BRAGA, F.C.; LIMA, M.P.; PESQUERO, J.L.; LEMOS, V.S.; CORTES, S.F. *Hancorniaspeciosa*Gomes induces hypotensive effect through

inhibition of ACE and increase on NO. **Journal of Ethnopharmacology**, v.137, p.709-713, 2011.

SILVA, K.E.R.; ALVES, L.D.S.; SOARES, M.F.R.; PASSOS, R.C.S.; FARIA, A.R.; ROLIM NETO, P.J. Modelos de Avaliação da Estabilidade de Fármacos e Medicamentos para a Indústria Farmacêutica. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**. v. 30 (2), p. 129-135, 2009.

SILVEIRA, P.F.; BANDEIRA, M.A.M.; ARRAIS, P.S.D. Farmacovigilância e reações adversas às plantas medicinais e fitoterápicos: uma realidade. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 18(4): 618-626, out.-dez. 2008.

SIMAO, A. A. **Composição química, eficácia e toxicidade de plantas medicinais utilizadas no tratamento da obesidade**, Lavras, 2003. Disponível em: <[http://repositorio.ufla.br/bitstream/1/1712/1/TESE\\_Composi%C3%A7%C3%A3o%20qu%C3%ADmica,%20efic%C3%A1cia%20e%20toxicidade%20de%20plantas%20medicinais%20utilizadas%20no%20tratamento%20da%20obesidade.pdf](http://repositorio.ufla.br/bitstream/1/1712/1/TESE_Composi%C3%A7%C3%A3o%20qu%C3%ADmica,%20efic%C3%A1cia%20e%20toxicidade%20de%20plantas%20medicinais%20utilizadas%20no%20tratamento%20da%20obesidade.pdf)>. Acesso em: 20 jan. 2016, 16:54:55.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5 ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS / Editora UFSC, 2003.

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

SOUZA, C.R.F.; RAMOS, D.N., CORTES-ROJAS D.F.; OLIVEIRA, W.P. Stability Testing and Shelf Life Prediction of a Spouted Bed Dried Phytopharmaceutical Preparation From *Maytenus ilicifolia*. **The Canadian journal of chemical engineering**, V.91, p.1847–1855, 2013.

STOLKER, A. A. M.; STEPHANY, R. W.; GINKEL, L. A. Identification of residues by LC-MS. The application of new EU guidelines. **Analysis**, V.28 (10), 947-951, 2000

TAO S; WETZEL S.J.; JOHNSON M.E.; SURLLOW B.A., PATTON-VOGT J. Development and validation of a hydrophilic interaction liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the quantification of lipid-related

extracellular metabolites in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Chromatography B, Analytical Technological Biomedical Life Science**. V. 897, p. 1-9, 2012.

TOLEDO, A.C.O.; HIRATA, L.L., BUFFON, M.C.M.; MIGUEL, M.D.; MIGUEL, O.G. Fitoterápicos: uma abordagem farmacotécnica. **Revista Lecta 2003**; 21(1/2): 7-13.

VI DIRETRIZES BRASILEIRAS DE HIPERTENSÃO ARTERIAL. **Revista Hipertensão**, v.13, nº01, p.1-68, 2010.

VIEIRA NETO, R. D. Recomendações técnicas para o cultivo da mangabeira. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2001. 20 p. **Embrapa Tabuleiros Costeiros**. Circular Técnica, 20.

WAGNER, H.; BLADT, S.; ZGAINSKI, E.M. **Plant Drug Analysis**. Berlin:Springer Verlag, 320 p., 1996

WAGNER, H.E; ULRICH-MERZENICH, G. Synergy research: Approaching a new generation of phytopharmaceuticals. **Phytomedicine**, v.16, p.97-110, 2009.

WANG, P.G.; HE W. **Hidrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) and advanced applications**. New York: CRC Press Taylor and Francis Group, LLC, 596 p., 2011.

WASYLASCHUK, W. R.; HARMON P. A.; WAGNER G. Evaluation of hydroperoxides in common pharmaceutical excipients. **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 96, p. 106–16, 2007.

WHO. World Health Organization. **Prevention of Cardiovascular Disease Guidelines for assessment and management of cardiovascular risk**, 2007.

WHO. World Health Organization. International Society of hypertension Writing Group 2003. WHO/ISH statement on management of hypertension. **Journal of Hypertension**, v.21, p.1983-1992, 2003.



WHO, World Health Organization. **Global Atlas on Cardiovascular Diseases Prevention and Control**, 2011.

WILLIAMS, B. The year in hypertension. **Journal of the American College of Cardiology**. 55(1): 66–73, 2010.

VISWANATHAN, C.T. ; BANSAL, S.; BOOTH, B.; DESEPHANO, A.J.; ROSE, M.J.; SAILSTAD, J.; SHAH, V.P.; SKELLY, J.P.; SWANN, P.G.; WEINER, R. Quantitative bioanalytical methods validation and implementation: best practices for chromatographic and ligand binding assays. **Pharmaceutical Research**, V.24 (10), p. 1962-1973, 2007.

WONG, A.S.Y.; HO, E.N.M.; WAN, T.S.M. Detection of *myo*-inositol trispyrophosphate in equine urine and plasma by hydrophilic interaction chromatography-tandem mass spectrometry. **Drug Testing and Analysis**, V. 4 (5), p. 355-361, 2012

ZVEZDANOVIC, J.B.; STANOJEVIC, J.S.; MARKOVIC, D.Z.; CVETKOVIC, D.J. Irreversible UV-induced quercetin and rutin degradation in solution studied by uv spectrophotometry and HPLC chromatography. **Journal of the serbian chemical society**, V. 77 (3) 297-312, 2012.

YAMAGUCHI, H.; FUJIKAWA, A.; ITO, H.; TANAKA, T.; FURUGEN, A.; MIYAMORI, K.; TAKAHASHI, N.; OGURA, J.; KOBAYASHI, M.; YAMADA, T.; MANO, N.; ISEKI, K. A rapid and sensitive LC/ESI-MS/MS method for quantitative analysis of docetaxel in human plasma and its application to a pharmacokinetic study, **Journal of Chromatography B**, 893–894, 157–161, 2012.

YATSU, F.K.; BORGHETTI, G.S.; BASSANI, V.L. Technological characterization and stability of *Ilex paraguariensis* St. Hil. Aquifoliaceae (Maté) spray-dried powder. **Journal of Medicinal food**. 14(4) apr 413-9 2011.