



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

CAMILA SOARES DE FRANÇA

**NITRÓXIDOS COM POTENCIAL ANTIOXIDANTE: CARACTERIZAÇÃO,
DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO INDICATIVO DE ESTABILIDADE E
DEGRADAÇÃO FORÇADA**

NATAL-RN

2021

CAMILA SOARES DE FRANÇA

**NITRÓXIDOS COM POTENCIAL ANTIOXIDANTE: CARACTERIZAÇÃO,
DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO INDICATIVO DE ESTABILIDADE E
DEGRADAÇÃO FORÇADA**

Dissertação apresentado à Coordenação do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, como requisito para defesa no curso de Mestrado em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Cícero Flávio Soares Aragão.

NATAL-RN

2021

Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN

Sistema de Bibliotecas - SISBI

Catálogo de Publicação na Fonte. UFRN - Biblioteca Setorial do Centro Ciências da Saúde - CCS

França, Camila Soares de.
Nitróxidos com potencial antioxidante: caracterização,
desenvolvimento de método indicativo de estabilidade e degradação
forçada / Camila Soares de França. - 2021.
133f.: il.

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade
Federal do Rio Grande do Norte. Centro de Ciências da Saúde,
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Natal, RN,
2021.

Orientador: Prof. Dr. Cícero Flávio Soares Aragão.

1. Antioxidantes - Nitróxidos - Dissertação. 2. Matéria-prima -

Camila Soares de França

**NITRÓXIDOS COM POTENCIAL ANTIOXIDANTE:
CARACTERIZAÇÃO, DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO
INDICATIVO DE ESTABILIDADE E DEGRADAÇÃO FORÇADA**

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Cícero Flávio Soares Aragão
Presidente – UFRN

Prof. Dr. Fernando Henrique Andrade Nogueira
Examinador Interno – UFRN

Prof. Dr. Ticiano Gomes do Nascimento
Examinador Externo – UFAL

Natal, 22 de setembro de 2021



Emitido em 22/09/2021

DOCUMENTOS DE ACEITAÇÃO Nº 292/2021 - PPGCF/CCS (15.27)

(Nº do Documento: 12)

(Nº do Protocolo: NÃO PROTOCOLADO)

(Assinado digitalmente em 06/10/2021 22:36)

CICERO FLAVIO SOARES ARAGAO

PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR

DFARM/CCS (15.13)

Matricula: 1492900

(Assinado digitalmente em 07/10/2021 13:04)

FERNANDO HENRIQUE ANDRADE NOGUEIRA

PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR

DFARM/CCS (15.13)

Matricula: 2140814

(Assinado digitalmente em 10/10/2021 16:23)

TICIANO GOMES DO NASCIMENTO

ASSINANTE EXTERNO

CPF: 797.726.504-44

Para verificar a autenticidade deste documento entre em <https://sipac.ufrn.br/documentos/> informando seu número:
12, ano: **2021**, tipo: **DOCUMENTOS DE ACEITAÇÃO**, data de emissão: **06/10/2021** e o código de verificação:
a7ade76405

AGRADECIMENTOS

A minha família por todo amor e apoio incondicional.

Ao meu companheiro Joadir por viver os sonhos e pesadelos comigo.

Ao Professor Cícero Flávio Soares Aragão, meu orientador, por toda tranquilidade, ensinamentos e compreensão.

A Dayanne Porto, minha orientadora de bancada, por todos os conhecimentos, insights e broncas. Sem dúvida saí mais forte para qualquer desafio da vida!

As professoras Ana Paula Barreto, Cristiane Fernandes e Elissa Arantes por todas as inspirações e apoio durante esse projeto. Exemplos de mulheres na ciência!

Ao professor Alessandro Kappel que além de disponibilizar as amostras, sempre esteve acessível para qualquer dúvida. Além de fazer incansáveis reposições de material.

Aos professores, Diogo Texeira, Fernando Nogueira, Márcio Ferrari e Ticiano Gomes por participarem da minha banca e por todas as contribuições que lapidaram esse trabalho.

Aos meus amigos de pós graduação, Márcia do LCQMED, Elaine e Natasha da Farmacognosia, Talita e Douglas do LASID, Paulo da QF e Grazielle da Bromatologia, por fazerem as aulas e os trabalhos de bancada serem mais leves e divertidos. Sem dúvida, vocês tornaram minha dissertação interdisciplinar!

As minhas amigas Bruna e Karine por ouvirem incansavelmente minhas reclamações e aceitar meus sumiços por causa do cansaço;

Ao meu amigo de trabalho Natan Alves por toda compreensão e suporte;

Ao Instituto de Química, LABPMOL, NUPPRAR e GNMS pelas análises realizadas;

Ao programa de pós graduação em ciências farmacêuticas pela oportunidade de desenvolver esse trabalho e por todo suporte durante esse período conturbado de pandemia.

RESUMO

Nitróxidos são uma classe de substâncias com potencial promissor na indústria cosmética em virtude de suas ações antioxidantes que permitem o uso no tratamento do envelhecimento cutâneo a partir da inibição da ação dos radicais livres e, conseqüentemente, diminuição dos efeitos de envelhecimento da pele. Neste trabalho, três exemplares dessa classe: TEMPOL, BZTEMPOL e TSTEMPOL foram caracterizados a partir de diferentes técnicas analíticas, tais como: espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), espectroscopia de ressonância paramagnética (EPR), difração de raios-X (DRX), calorimetria exploratória diferencial (DSC), termogravimetria (TG), espectrometria de massas (LC-MS) e cromatografia líquida de ultra eficiência (UHPLC), além disso, um método indicativo de estabilidade por cromatografia líquida de ultra eficiência (UHPLC) foi desenvolvido e utilizado para estudos de degradação forçada dos compostos em questão. Com os resultados das técnicas de DRX, FTIR, EPR e LC-MS foi possível identificar a natureza cristalina dessas moléculas, confirmar a presença dos grupos funcionais e a natureza radicalar esperados para estrutura desses compostos, além garantir a identidade molecular e pureza das amostras estudadas. Já as técnicas termoanalíticas possibilitam conhecer o comportamento térmico desses três nitróxidos e para isso foram utilizadas quatro razões de aquecimento (5, 10, 15 e 20 °C.min⁻¹), sob atmosfera de nitrogênio. O TEMPOL, BZTEMPOL e TSTEMPOL apresentaram ponto de fusão em 72,2, 121 e 108,4 °C, respectivamente sendo o TEMPOL o nitróxido mais estável termicamente (152 °C). Com as curvas termogravimétricas também foi possível realizar o estudo cinético do tipo dinâmico através do método de Ozawa e como resultado o BZTEMPOL apresentou de maior energia de ativação. Quanto ao método analítico, foi desenvolvido adequadamente com base em um planejamento fatorial do tipo Box-Behnken para quantificação de forma individualizada dessas moléculas e posteriormente foi aplicado no estudo de degradação forçada, evidenciando sua eficiência. Dessa forma, esse estudo fornece subsídios úteis para o desenvolvimento de possíveis formulações cosméticas com essas substâncias de maneira segura, eficaz e com qualidade.

Palavras-chave: nitróxidos; matéria-prima; controle de qualidade; planejamento fatorial; degradação forçada.

ABSTRACT

Nitroxides are a class of substances with promising potential in the cosmetic industry due to their antioxidant actions that allow their use in the treatment of skin aging by inhibiting the action of free radicals and, consequently, reducing the effects of aging on the skin. In this work, three examples of this class: TEMPOL, BZTEMPOL, and TSTEMPOL were characterized using different analytical techniques, such as Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), paramagnetic resonance spectroscopy (EPR), X-ray diffraction (XRD), Differential Scanning Calorimetry (DSC), Thermogravimetry (TG), Mass Spectrometry (LC-MS) and Ultra Performance Liquid Chromatography (UHPLC), in addition to an indicative method of stability by ultra-performance liquid chromatography (UHPLC) was developed and used for forced degradation studies of the compounds in question. With the results of the DRX, FTIR, EPR, and LC-MS techniques, it was possible to identify the crystalline nature of these molecules, confirm the presence of functional groups and the radical nature expected for the structure of these compounds, in addition to guaranteeing the molecular identity and purity of the samples studied. The thermoanalytical techniques, on the other hand, make it possible to know the thermal behavior of these three nitroxides and for this four heating ratios (5, 10, 15, and 20 °C.min⁻¹) were used, under nitrogen atmosphere. TEMPOL, BZTEMPOL, and TSTEMPOL had a melting point of 72.2, 121, and 108.4 °C, respectively, with TEMPOL being the most thermally stable nitroxide (152 °C). With the thermogravimetric curves, it was also possible to carry out the kinetic study of the dynamic type through the Ozawa method and as a result, BZTEMPOL presented higher activation energy. As for the analytical method, it was properly developed based on a Box-Behnken factorial design for individual quantification of these molecules and was later applied in the study of forced degradation, showing its efficiency. Thus, this study provides useful support for the development of possible cosmetic formulations with these substances in a safe, effective, and quality manner.

Keywords: nitroxide; feedstock; quality control; factorial planning; forced degradation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Estrutura química geral dos nitróxidos.....	22
Figura 2	Representação da rota sintética para obtenção do TEMPOL (preto) e seus derivados BZTEMPOL (verde) e TSTEMPOL (azul).....	24
Figura 3	Etapas para o desenvolvimento de um método cromatográfico.....	35
Figura 4	Espectros de infravermelho TEMPOL.....	47
Figura 5	Espectros de infravermelho BZTEMPOL.....	48
Figura 6	Espectros de infravermelho TSTEMPOL.....	49
Figura 7	Espectro da primeira derivada de uma curva Lorentziana do TEMPOL.....	50
Figura 8	Espectro da primeira derivada de uma curva Lorentziana do BZTEMPOL.....	51
Figura 9	Espectro da primeira derivada de uma curva Lorentziana do TSTEMPOL.....	51
Figura 10	Difratograma TEMPOL.....	52
Figura 11	Difratograma BZTEMPOL.....	53
Figura 12	Difratograma TSTEMPOL.....	53
Figura 13	Sobreposição das curvas TG do TEMPOL nas razões de 5, 10, 15 e $20^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$	55
Figura 14	Curva DSC do TEMPOL na razão de aquecimento de $10^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$	56
Figura 15	Sobreposição das curvas TG do BZTEMPOL nas razões de 5, 10, 15 e $20^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$	57
Figura 16	Curva DSC do BZTEMPOL na razão de aquecimento de $10^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$	58
Figura 17	Sobreposição das curvas TG do TSTEMPOL nas razões de 5, 10, 15 e $20^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$	59
Figura 18	Curva DSC do TSTEMPOL na razão de aquecimento de $10^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$	60
Figura 19	Sobreposição das curvas TG dos nitróxidos: TEMPOL (A), BZTEMPOL (B) e TSTEMPOL (C) nas razões de 5,10,15 e $20^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$	61
Figura 20	Gráficos do logaritmo da razão de aquecimento ($\log\beta$) em função do inverso da temperatura absoluta (K), sendo TEMPOL (A), BZTEMPOL (B) e TSTEMPOL (C).....	62

Figura 21	Distribuição das espécies conforme mudança de pH para o (A) TEMPOL, (B) BZTEMPOL e (C) TSTEMPOL.....	63
Figura 22	Curvas DSC obtida a 10°C.min ⁻¹ para o TEMPOL (A) e BZTEMPOL (B).....	67
Figura 23	Estado reduzido e oxidado dos nitróxidos após eletroionização apresentando valores de massa molar exata (g/mol).....	69
Figura 24	Cromatograma de íons totais obtido para o TEMPOL (1- forma reduzida), BZTEMPOL (1- forma radicalar e 2- forma reduzida), E TSTEMPOL (1- impureza, 2- forma reduzida e 3- forma radicalar).....	70
Figura 25	Espectro MS1 do Íon precursor para o TEMPOL a 3 min na faixa de 50 – 200 <i>m/z</i>	71
Figura 26	Espectro MS1 do Íon da impureza do TEMPOL a 4 min na faixa de 50 – 200 <i>m/z</i>	71
Figura 27	Espectro MS1 do Íon precursor para o BZTEMPOL a 7 min na faixa de 50 – 350 <i>m/z</i>	72
Figura 28	Espectro MS1 do Íon precursor para o BZTEMPOL a 12 min na faixa de 50 – 350 <i>m/z</i>	72
Figura 29	Espectro MS1 do Íon precursor para TSTEMPOL a 7 min na faixa de 50 – 350 <i>m/z</i>	73
Figura 30	Espectro MS1 do Íon precursor para TSTEMPOL a 8 min na faixa de 50 – 350 <i>m/z</i>	74
Figura 31	Espectro MS1 do Íon precursor para TSTEMPOL a 14 min na faixa de 50 – 350 <i>m/z</i>	74
Figura 32	Espectro dos Íons produtos do TEMPOL a 3 min na faixa de 50 – 200 <i>m/z</i> com energia de colisão de 20.....	75
Figura 33	Espectro dos Íons produtos do TEMPOL a 3 min na faixa de 50 – 200 <i>m/z</i> com energia de colisão de 35.....	75
Figura 34	Espectro dos Íons produtos do BZTEMPOL a 7 min na faixa de 50 – 350 <i>m/z</i> com energia de colisão de 20.....	77
Figura 35	Espectro dos Íons produtos do BZTEMPOL a 7 min na faixa de 50 – 350 <i>m/z</i> com energia de colisão de 35.....	77
Figura 36	Espectro dos Íons produtos do BZTEMPOL a 12 min na faixa de 50 – 350 <i>m/z</i> com energia de colisão de 20.....	78

Figura 37	Espectro dos Íons produtos do BZTEMPOL a 7 min na faixa de 50 – 350 m/z com energia de colisão de 20.....	79
Figura 38	Espectro dos Íons produtos do TSTEMPOL a 8 min na faixa de 50 – 350 m/z com energia de colisão de 20.....	80
Figura 39	Espectro dos Íons produtos do TSTEMPOL a 8 min na faixa de 50 – 350 m/z com energia de colisão de 35.....	80
Figura 40	Espectro dos Íons produtos do TSTEMPOL a 14 min na faixa de 50 – 350 m/z com energia de colisão de 20.....	81
Figura 41	Espectro dos Íons produtos do TSTEMPOL a 14 min na faixa de 50 – 350 m/z com energia de colisão de 35.....	82
Figura 42	Cromatogramas obtido para o TEMPOL, BZTEMPOL E TSTEMPOL no método gradiente.....	83
Figura 43	Espectros UV dos nitróxidos TEMPOL, BZTEMPOL E TSTEMPOL.....	84
Figura 44	Gráficos de Pareto do TEMPOL referentes às respostas: A) tempo de retenção, B) Fator de retenção, C) Número de pratos teóricos, D) Área, E) Fator de cauda. A linha vertical define 95% ($p = 0,05$) de intervalo de confiança.....	91
Figura 45	Gráficos de superfície de resposta para TEMPOL. Resposta: Tempo de retenção; Fatores: A) %FMB e Fluxo, B) %FMB e Temperatura, C) Fluxo e Temperatura.....	93
Figura 46	Gráfico de superfície de resposta para TEMPOL. Resposta: Fator de retenção; Fatores: %FMB e Fluxo.....	94
Figura 47	Gráficos de superfície de resposta para TEMPOL. Resposta: número de pratos teóricos; Fatores: A) %FMB e Fluxo, B) %FMB e Temperatura.....	94
Figura 48	Gráfico de superfície de resposta para TEMPOL. Resposta: Área; Fatores: %FMB e Temperatura.....	95
Figura 49	Gráfico de superfície de resposta para TEMPOL. Resposta: Fator de cauda; Fatores: A) %FMB e Temperatura.....	96
Figura 50	Gráficos de Pareto do BZTEMPOL referentes às respostas: A) tempo de retenção, B) Fator de retenção, C) Número de pratos teóricos, D) Área, E) Fator de cauda. A linha vertical define 95% ($p = 0,05$) de intervalo de confiança.....	97

Figura 51	Gráficos de superfície de resposta para BZTEMPOL. Resposta: Tempo de retenção; Fatores: A) %FMB e Fluxo, B) %FMB e Temperatura.....	98
Figura 52	Gráficos de superfície de resposta para BZTEMPOL. Resposta: Fator de retenção; Fatores: A) %FMB e Fluxo.....	99
Figura 53	Gráficos de superfície de resposta para BZTEMPOL. Resposta: Número de pratos teóricos; Fatores: A) %FMB e Temperatura.....	99
Figura 54	Gráficos de superfície resposta para BZTEMPOL. Resposta: Fator de cauda; Fatores: A) %FMB e Fluxo.....	100
Figura 55	Gráficos de superfície resposta para BZTEMPOL. Resposta: Área; Fatores: A) %FMB e Temperatura.....	100
Figura 56	Gráficos de Pareto do TSTEMPOL referentes às respostas: A) tempo de retenção, B) Fator de retenção, C) Número de pratos teóricos, D) Área, E) Fator de cauda. A linha vertical define 95% ($p = 0,05$) de intervalo de confiança.....	102
Figura 57	Gráficos de superfície de resposta TSTEMPOL. Resposta: Tempo de retenção; Fatores: A) %FMB e Fluxo, B) Fluxo e Temperatura, %FMB e Temperatura.....	103
Figura 58	Gráficos de superfície de resposta TSTEMPOL. Resposta: Fator de retenção; Fatores: A) %FMB e Fluxo, B) Fluxo e Temperatura, C) %FMB e Temperatura.....	104
Figura 59	Gráficos de superfície de resposta TSTEMPOL. Resposta: número de pratos teóricos; Fatores: A) Fluxo e Temperatura, B) %FMB e Temperatura.....	104
Figura 60	Gráficos de superfície de resposta TSTEMPOL. Resposta: Fator de cauda; Fatores: A) %FMB e Fluxo, B) Fluxo e Temperatura, C) %FMB e Temperatura.....	105
Figura 61	Gráfico de superfície de resposta TSTEMPOL. Resposta: Área; Fatores: %FMB e Temperatura.....	106
Figura 62	Cromatograma referente a melhor condição experimental: TEMPOL.....	107
Figura 63	Cromatograma referente a melhor condição experimental: BZTEMPOL.....	108

Figura 64	Cromatograma referente a melhor condição experimental: TSTEMPOL.....	109
Figura 65	Percentagem remanescente de TEMPOL para as condições ácida, básica e oxidativa.....	110
Figura 66	Sobreposição dos cromatogramas do TEMPOL para o intervalo de 24 horas de degradação ácida.....	111
Figura 67	Desproporcionamento do TEMPOL catalisado por ácido e oxidação de TEMPOL em 4-oxo-TEMPO.....	112
Figura 68	Sobreposição dos cromatogramas do TEMPOL para o intervalo de 24 horas de degradação básica.....	113
Figura 69	Degradação do TEMPOL pela via do 4-OXO-TEMPO oxamônio.....	113
Figura 70	Sobreposição dos cromatogramas do TEMPOL para o intervalo de 24 horas de degradação oxidativa.....	114
Figura 71	Percentagem remanescente de TEMPOL para a condição fotolítica.....	115
Figura 72	Sobreposição dos cromatogramas do TEMPOL para o intervalo de 24 horas de degradação fotolítica.....	116
Figura 73	Percentagem remanescente de BZTEMPOL para as condições ácida, básica e oxidativa.....	117
Figura 74	Sobreposição dos cromatogramas do BZTEMPOL para o intervalo de 24 horas de degradação ácida (A), básica (B) e oxidativa (C).....	118
Figura 75	Percentagem remanescente de BZTEMPOL para a condição fotolítica.....	119
Figura 76	Sobreposição dos cromatogramas do BZTEMPOL para o intervalo de 24 horas de degradação oxidativa.....	120

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Condições para teste de estresse determinadas no guia 4 da Anvisa.....	30
Tabela 2	Programação corrida gradiente para UHPLC-MS-MS.....	39
Tabela 3	Programação corrida gradiente para UHPLC-DAD.....	40
Tabela 4	Programação corrida gradiente.....	42
Tabela 5	Fatores e seus respectivos níveis utilizados no desenho experimental para o TEMPOL.....	43
Tabela 6	Fatores e seus respectivos níveis utilizados no desenho experimental para o BZTEMPOL.....	43
Tabela 7	Fatores e seus respectivos níveis utilizados no desenho experimental para o TSTEMPOL.....	43
Tabela 8	Condições de estresse às quais os nitróxidos foram expostos durante a análise.....	44
Tabela 9	Dados das curvas termogravimétricas do TEMPOL nas razões de aquecimento 5,10, 15 e 20°C.min ⁻¹ em atmosfera de nitrogênio.....	55
Tabela 10	Dados termoanalíticos obtidos por DSC para o TEMPOL.....	56
Tabela 11	Dados termoanalíticos obtidos por DSC para o BZTEMPOL.....	58
Tabela 12	Dados termoanalíticos obtidos por DSC para o TSTEMPOL.....	60
Tabela 13	Valores dos parâmetros cinéticos obtidos a partir do estudo não-isotérmico.....	63
Tabela 14	Propriedades físico-químicas e características moleculares para cada um dos nitróxidos estudados.....	63
Tabela 15	Valores de pureza cromatográfica obtidos para cada amostra de nitróxido através das técnicas analíticas utilizadas.....	66
Tabela 16	Elucidação de possíveis subprodutos do TEMPOL por ESI.....	76
Tabela 17	Elucidação de possíveis subprodutos da forma reduzida do BZTEMPOL (T _R = 7 min) por ESI.....	78
Tabela 18	Elucidação de possíveis subprodutos da forma radicalar do BZTEMPOL (T _R = 12 min) por ESI.....	79
Tabela 19	Elucidação de possíveis subprodutos da forma reduzida do TSTEMPOL (T _R = 8 min) por ESI.....	81

Tabela 20	Elucidação de possíveis subprodutos da radicalar do TSTEMPOL ($T_R = 14$ min) por ESI.....	82
Tabela 21	Desenho experimental 33 Box-Behnken (27 condições com $n = 3$) e resultado das respostas para o TEMPOL.....	86
Tabela 22	Desenho experimental 33 Box-Behnken (27 condições com $n = 3$) e resultado das respostas para o BZTEMPOL.....	87
Tabela 23	Desenho experimental 33 Box-Behnken (27 condições com $n = 3$) e resultado das respostas para o TSTEMPOL.....	88
Tabela 24	Anova dos modelos para respostas cromatográficas do TEMPOL.....	89
Tabela 25	Anova dos modelos para respostas cromatográficas do BZTEMPOL.....	89
Tabela 26	Anova dos modelos para respostas cromatográficas do TSTEMPOL.....	90
Tabela 27	Cromatograma referente a melhor condição experimental: TEMPOL.....	107
Tabela 28	Cromatograma referente a melhor condição experimental: BZTEMPOL.....	107
Tabela 29	Cromatograma referente a melhor condição experimental: TSTEMPOL.....	108

Sumário

1	INTRODUÇÃO	19
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	20
2.1	ENVELHECIMENTO CUTÂNEO.....	20
2.2	ANTIOXIDANTES.....	21
2.3	NITRÓXIDOS.....	21
2.4	CARACTERIZAÇÃO DE NOVAS MOLÉCULAS.....	25
2.5	ESTUDO CINÉTICO DINÂMICO.....	28
2.6	ESTUDOS DE DEGRADAÇÃO FORÇADA.....	29
2.7	DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO ANALÍTICO.....	31
2.7.1	Planejamento Fatorial	32
2.8	VALIDAÇÃO.....	33
3	OBJETIVOS	36
3.1	OBJETIVO GERAL.....	36
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	36
4	MATERIAL E MÉTODOS	37
4.1	AMOSTRAS.....	37
4.2	CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS AMOSTRAS.....	37
4.2.1	Análise <i>in silico</i>	37
4.2.2	Espectrofotometria no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)	37
4.2.3	Espectrometria de Ressonância Paramagnética Eletrônica (EPR)	38
4.2.4	Cromatografia Líquida acoplada a Espectrometria de Massas (LC-MS)	38
4.2.5	Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (UHPLC/DAD)	39
4.2.6	Difratometria de Raios X	40
4.2.7	Análises térmicas	40
4.2.7.1	<i>Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)</i>	40
4.2.7.2	<i>Termogravimetria (TG)</i>	41
4.3	DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA ANALÍTICA DE ANÁLISE.....	41
4.3.1	Preparo da solução trabalho	41
4.3.2	Preparo da fase móvel	41

4.3.3	Condições cromatográficas.....	42
4.3.4	Desenvolvimento do método cromatográfico.....	42
4.4	ESTUDOS DE DEGRADAÇÃO FORÇADA.....	44
4.4.1	Preparo da solução estoque (SES).....	44
4.4.2	Preparação das soluções degradantes.....	44
4.4.3	Preparação das soluções de degradação e soluções de leitura.....	44
4.4.4	Análise cromatográfica das amostras submetidas a degradação forçada.....	45
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	46
5.1	ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR).....	46
5.2	ESPECTROMETRIA DE RESSONÂNCIA PARAMAGNÉTICA ELETRÔNICA.....	49
5.3	DIFRATOMETRIA DE RAIOS X.....	51
5.4	ANÁLISES TÉRMICAS.....	54
5.4.1	Comportamento térmico do TEMPOL.....	54
5.4.2	Comportamento térmico do BZTEMPOL.....	56
5.4.3	Comportamento térmico do TSTEMPOL.....	58
5.5	ESTUDO CINÉTICO DINÂMICO.....	60
5.6	DETERMINAÇÃO DE PROPRIEDADE FÍSICO-QUÍMICAS E CARACTERÍSTICAS MOLECULARES <i>IN SILICO</i>	63
5.7	AVALIAÇÃO DA PUREZA CROMATOGRÁFICA E POR DSC.....	65
5.8	IDENTIFICAÇÃO DOS NITRÓXIDOS POR LC-MS E ESTUDOS DE FRAGMENTAÇÃO.....	68
5.9	DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO INDICATIVO DE ESTABILIDADE	82
5.10	OTIMIZAÇÃO A PARTIR DO DESENHO EXPERIMENTAL.....	85
5.10.1	Análise da influência dos fatores através dos gráficos de superfície de resposta e Pareto para o TEMPOL.....	90
5.10.2	Análise da influência dos fatores através dos gráficos de superfície de resposta e Pareto para o BZTEMPOL.....	96

5.10.3	Análise da influência dos fatores através dos gráficos de superfície de resposta e Pareto para o TSTEMPOL.....	101
5.10.4	Desejabilidade.....	106
5.11	ESTUDO DE DEGRADAÇÃO FORÇADA EM SOLUÇÃO PARA OS NITRÓXIDOS.....	109
5.11.1	Degradação ácida, básica e oxidativa do TEMPOL.....	109
5.11.2	Degradação fotolítica para o TEMPOL.....	114
5.11.3	Degradação ácida, básica e oxidativa do BZTEMPOL.....	116
5.11.4	Degradação fotolítica para o BZTEMPOL.....	118
6	CONCLUSÕES.....	121
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	122

1. INTRODUÇÃO

O aumento da expectativa de vida tem sido acompanhado de intenso estudo acerca dos processos de envelhecimento cutâneo, em parte importante, com o objetivo de desenvolver novas tecnologias capazes de desacelerá-lo (MACHADO; SIGALES; SOLOVY, 2018). Os mecanismos de causa e aceleração do envelhecimento cutâneo são diversos, mas dentre eles deve-se destaque ao processo de estresse oxidativo, definido por Sies, Berndt e Jones (2017) como um desequilíbrio entre o desafio oxidativo (ação dos radicais livres) e a capacidade de defesa antioxidante do organismo.

Antioxidantes são substâncias capazes de inibir ou atrasar a oxidação de outras moléculas e, portanto, amplamente utilizadas com o intuito de inibir a ação dos radicais livres, retardando os efeitos do envelhecimento da pele (AMORES; BENAVIDES, 2018). Neste sentido, o desenvolvimento de formulações cosméticas antioxidantes de uso tópico é de grande interesse, visto sua capacidade de auxiliar, de maneira direcionada, o processo de correção, proteção e renovação cutânea, diminuindo os danos causados pelo estresse oxidativo (SANDOVAL; CAIXETA; RIBEIRO, 2015).

Na busca de alternativas para os antioxidantes já existentes, surgem os nitróxidos que compõem um grupo diverso de espécies radicalares sequestradoras de radicais livres. Esses têm recebido devida atenção em função de seu potencial terapêutico como agente inibidor do processo de estresse oxidativo (SHINTO et al., 2018).

Isso posto, é de grande relevância a realização de pesquisas acerca dos nitróxidos a fim de caracterizá-los e avaliar seu potencial como possíveis ativos em formulações estáveis e inovadoras para minimizar os efeitos do envelhecimento cutâneo: um interesse da sociedade e da indústria cosmética.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 ENVELHECIMENTO CUTÂNEO

Segundo a Organização Pan-Americana da Saúde, a população das Américas ganhou uma média de 16 anos na expectativa de vida nos últimos 45, um aumento de quase 2 anos a cada 5 anos (OPAS, 2017). A consequência direta deste crescimento é o aumento da proporção de pessoas em idades avançadas, acompanhado de também crescente estímulo à realização de estudos sobre o processo de envelhecimento cutâneo, visto que o estado da pele influencia diretamente no bem-estar emocional, na autoestima, nas relações interpessoais e, consequentemente, na qualidade de vida dessas pessoas (ALVES, R; CASTRO ESTEVES, T; TRELLES, M.A, 2013; MACHADO; SIGALES, SOLOVY, 2018).

O conhecimento sobre os mecanismos de envelhecimento da pele é de fundamental importância para o desenvolvimento de produtos eficientes ao cuidado da pele e que consigam retardar o processo de envelhecimento cutâneo, já que muitos estudos têm sugerido que a pele envelhecida não consegue exercer com eficiência seu papel como barreira protetora, resultando em uma pele seca e com maiores riscos para doenças de pele e malignidades (KAMMEYER; LUITEN, 2015).

O envelhecimento cutâneo pode ser classificado em: intrínseco (cronológico) e extrínseco (fotoenvelhecimento). O envelhecimento intrínseco é aquele natural que ocorre progressivamente ao longo de nossas vidas. É quase imperceptível e mostra uma variação significativa entre populações, indivíduos da mesma etnia e até mesmo em diferentes regiões do corpo na mesma pessoa. Muitas teorias tentaram explicar os diferentes aspectos fisiopatológicos do envelhecimento intrínseco. Entre eles estão as teorias da senescência celular, encurtamento dos telômeros e diminuição da capacidade proliferativa, inflamação crônica, mutações simples do DNA mitocondrial e radicais livres (ZOUBOULIS; MAKRANTONAKI; NIKOLAKIS, 2019).

Já o envelhecimento extrínseco está relacionado diretamente à exposição solar crônica na forma de radiação ultravioleta (MESA-ARANGO; FLÓREZ-MUÑOZ; SANCLEMENTE, 2016). Os sinais mais significativos do envelhecimento cutâneo são causados por esta radiação, que induz uma série de mudanças moleculares e celulares, desencadeando uma desordem na pele que inclui: rugas, aspereza, aparência de linhas finas, falta de elasticidade e marcas de hiperpigmentação (KAMMEYER; LUITEN, 2015; RAMOS-E-SILVA et al., 2013).

Isso acontece porque a radiação UV aumenta os níveis celulares de espécies reativas do oxigênio (ERO's) em detrimento dos antioxidantes endógenos, dando início ao processo de

estresse oxidativo na pele, que causa danos irreversíveis às estruturas celulares e contribui para as reações de queimadura solar, fotocarcinogênese, bem como o próprio envelhecimento. Em alternativa, a prevenção destes efeitos nocivos o uso de antioxidantes tópicos é sugerido como uma abordagem auspiciosa e tem gerado enormes esforços de investigação nos últimos tempos (AMORES; BENAVIDES, 2018; CEFALI et al., 2015; JARAMILLO-COLORADO; MARTÍNEZ-CÁCERES e DUARTE-RESTREPO, 2016; BURKE, 2018).

2.2 ANTIOXIDANTES

Antioxidantes são substâncias capazes de inibir ou atrasar a oxidação de outras moléculas e, portanto, amplamente utilizadas com o intuito de inibir a ação dos radicais livres, retardando os efeitos do envelhecimento da pele (AMORES; BENAVIDES, 2018).

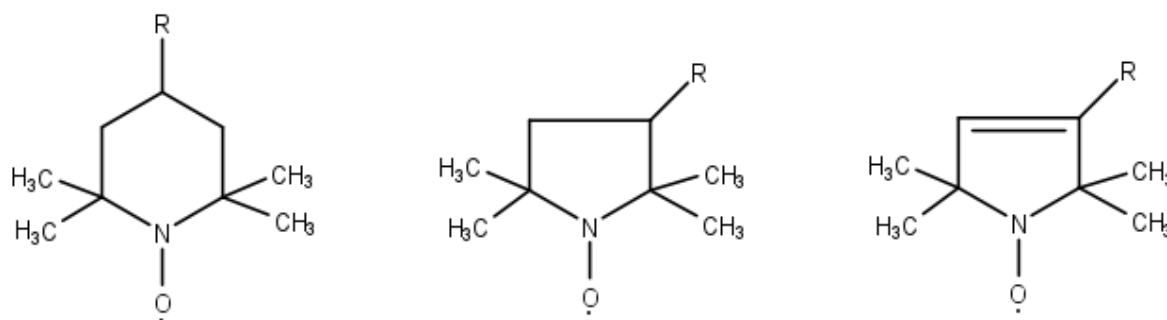
Naturalmente, a pele possui seus próprios sistemas antioxidantes para prevenir o efeito da radiação solar, pois essa defesa é constantemente necessária pela pele, devido sua extensa área e sua função protetora do organismo ao meio (BIGHETTI; SAMPAIO; GUSMÃO, 2018). Porém, a ação dos antioxidantes endógenos, ainda que aliado ao uso de filtros solares é insuficiente para impedir os danos oxidativos da pele mediados por UV e neste sentido, o desenvolvimento de formulações antioxidantes de uso tópico é de grande interesse, visto sua capacidade de auxiliar, de maneira direcionada, o processo de correção, proteção e renovação cutânea, diminuindo os danos causados pelo estresse oxidativo (SANDOVAL; CAIXETA; RIBEIRO, 2015).

Existem diversas substâncias antioxidantes no mercado de cosméticos, e dentre as mais utilizadas, estão: vitamina C, vitamina E, ácido ferúlico, flavonoides, carotenoides, entre outros (AMORES; BENAVIDES, 2018). Porém, infelizmente, a maioria dos antioxidantes não são estáveis e apresentam dificuldades para manterem sua atividade dentro de uma formulação cosmética, o que tem levado a constantes pesquisa por novas moléculas mais eficientes, estáveis, econômicas e de fácil obtenção.

2.3 NITRÓXIDOS

Desde 1988, os nitróxidos cíclicos consolidaram-se como agentes antioxidantes e têm despertado grande interesse nos mais diversos ramos da pesquisa científica relacionados a problemas com espécies reativas do oxigênio (SAMUNI et al., 2002). Os radicais nitroxila cíclicos são exemplos de substâncias estáveis sequestradoras de radicais livres e possuem uma estrutura básica bem definida (Figura 1) o que caracteriza a classe.

Figura 1- Estrutura química geral dos nitróxidos.



Fonte: adaptado de SOULE et al., 2007.

Essa estrutura consiste em um anel heterocíclico, que pode conter cinco membros (pirrolidina e pirrolina) ou seis membros (piperidina). Nesse anel há um átomo de nitrogênio, característico da classe, ligado a um átomo de oxigênio que confere a natureza radicalar da classe, devido a presença de um elétron desemparelhado. Também possuem em sua estrutura um grupamento que se torna fundamental para manutenção de sua estabilidade, o grupamento metil, este liga-se na posição alfa onde atua prevenindo a dismutação dos radicais livres e limitam sua reatividade (SOULE et al., 2007). Os demais elementos da molécula, são responsáveis por conferir particularidades nas propriedades físico-químicas de cada nitróxido e por isso devem ser levados em consideração nos estudos propostos.

Diversos mecanismos são apontados para explicar a ação antioxidante desses compostos e esses estão associados a regulação do estado redox das células. Em meios biológicos, mimetizam a ação da superóxido dismutase (SOD), modulam a atividade da catalase e de outras heme-proteínas, eliminam radicais livres reativos, suprimem a oxidação de materiais biológicos e inibem as reações de Fenton e Haber-Weiss a qual produz radicais hidroxila a partir do peróxido de hidrogênio e íon superóxido catalisados por íons de ferro (LEWANDOWSKI; GWOZDZINSKI, 2017).

Por desempenharem função antioxidante de maneira multifuncional, essas moléculas tornam-se promissoras em relação aos antioxidantes que atuam em apenas uma única via de redução de elétrons, visto que além de impedirem o início da cadeia oxidativa (SOD), evitam também sua propagação (demais reações), aumentando assim as chances de inibir o processo oxidativo e conseqüentemente os danos gerados (PRESCOTT; BOTTLE, 2016).

Estudos mostram que essa capacidade redox dos radicais nitroxila de modificar o estresse oxidativo permite que estes compostos possam ser explorados para uso terapêutico, como por exemplo, prevenção e tratamento do câncer, proteção contra radiação ionizante e no

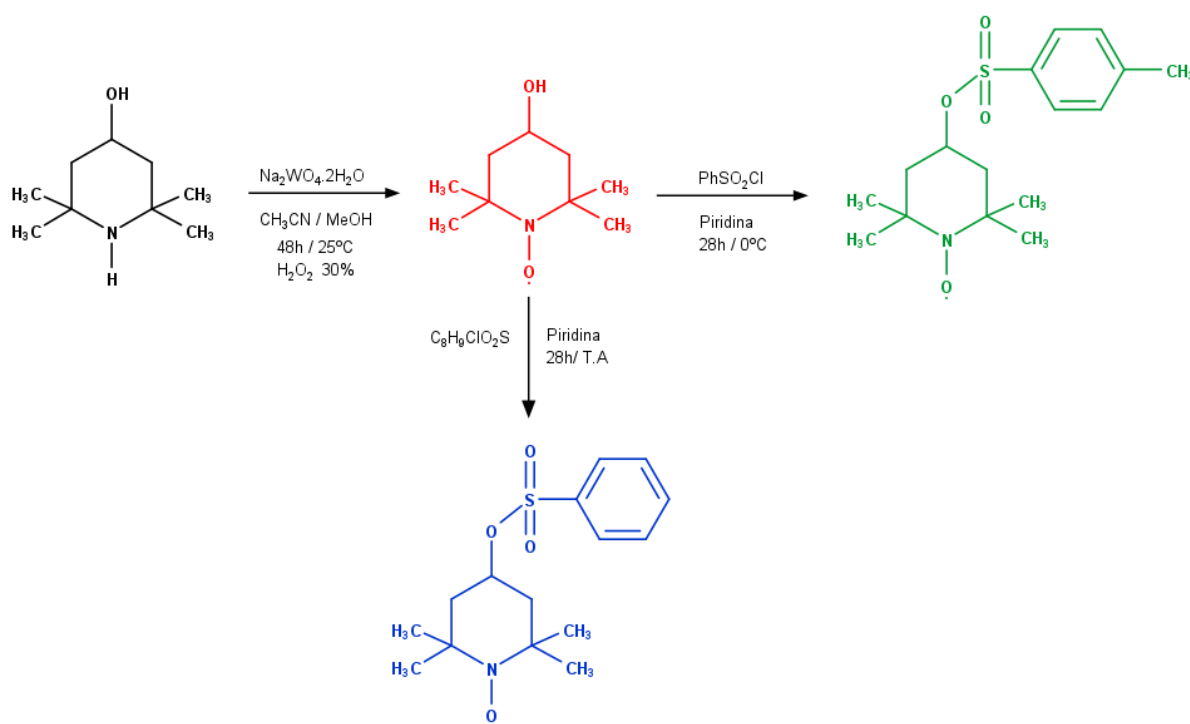
controle da hipertensão (HU et al., 2017; LI et al., 2017; NUNES et al., 2018; WC et al., 2015).

Um dos radicais nitroxila mais estudados em função da sua capacidade redox é o 4-hidroxi-2,2,6,6-tetrametilpiperidinil-1-oxi ou TEMPOL (BEIGREZAEI; NASRI, 2017). Estudos mostram que esta substância é permeável a membrana plasmática e tem capacidade de proteger os animais de laboratório do estresse oxidativo (MITRA et al., 2014; PATKI et al., 2015; ALZOUBI; RABABAH; YACOUB, 2017). Com isso, muitos derivados têm sido planejados e sintetizados baseados no TEMPOL, por exemplo, Queiroz e colaboradores (2012) sintetizaram o TEMPOL e mais três derivados com objetivo de avaliar sua capacidade de inibir a atividade de cloração *in vitro* de mieloperoxidases e inflamação induzida por carragenina em patas de ratos. Já Thaler et al. (2011), sintetizaram quatro derivados do TEMPOL com diferentes comprimentos de cadeia lateral para avaliar se a modificação melhoraria o desempenho em sua eficácia neuroprotetora.

Em outro estudo, duas séries de novos derivados de TEMPOL foram projetados e sintetizados, e sua atividade biológica antitumoral foi avaliada. Com os resultados, os autores evidenciaram a manutenção da atividade biológica e desempenho de funções distintas entre os derivados, porém, sua capacidade antioxidante tem sido atribuída a incorporação do anel 2,2,6,6-tetrametil-piperidinil-1-oxi (SUN et al., 2016).

Sendo assim, nesse trabalho, o TEMPOL e dois de seus derivados foram caracterizados pelas mais diversas técnicas analíticas, visando seu uso posterior em produtos cosméticos. A Figura 2 ilustra a rota sintética para obtenção dos dois derivados, BZTEMPOL (em verde) e TSTEMPOL (em azul).

Figura 2- Representação da rota sintética para obtenção do TEMPOL (vermelho) e seus derivados BZTEMPOL (verde) e TSTEMPOL (azul)



Fonte: autor, 2021

O interesse para uso dos nitróxidos como antioxidantes em produtos cosméticos antienvhecimento vem sendo amplamente discutido na literatura. Venditti et al. (2008) evidenciaram que os nitróxidos são inibidores mais eficientes a danos ao colágeno da pele do que as vitaminas antioxidantes C e E e que poderiam ser uma alternativa, por via tópica, para reduzir lesões oxidativas a pele provocada fatores exógenos ou endógenos. Foi demonstrado, em outro estudo do mesmo grupo o potencial dos compostos como uma estratégia para melhoria da eficácia de formulações tópicas contra o fotoenvhecimento e possivelmente a fotocarcinogênese (VENDITTI et al., 2011). Além disso, essas substâncias também exibiram capacidade de proteger de maneira notória danos lipídicos intensificados por exposição à radiação UVA e são classificadas como não irritante a pele humana, possuindo baixo potencial de causar toxicidade cutânea aguda ou subaguda. (FUCHS; GROTH; HERRLING, 1998; DAMIANI; CASTAGNA; GRECI, 2002).

Por essas características favoráveis, os nitróxidos vêm ganhando interesse para uso em aplicações tópicas e pesquisas para compreensão de novos mecanismos de proteção da pele vêm sendo realizados (GREENWALD et al., 2014). Neste sentido, estudos de caracterização físico-química para esses compostos visando o desenvolvimento de protocolos para controle de qualidade em novos produtos são urgentes. Pensando nisso, neste trabalho, o TEMPOL e os

derivados: BZTEMPOL e TSTEMPOL foram caracterizados a partir de diversas técnicas analíticas, visando o levantamento de informações que propiciem a elucidação do modo mais seguro e apropriado para utilizá-los em possíveis novas formulações antienvhecimento.

2.4 CARACTERIZAÇÃO DE NOVAS MOLÉCULAS

Para desenvolver um produto cosmético, não basta apenas ter conhecimento sobre a pele e mecanismos antioxidantes. Faz-se necessário também, assegurar aos consumidores a qualidade e estabilidade do produto tanto na prateleira quanto ao longo de seu tempo de consumo, tendo em vista que os produtos serão utilizados em uma área bastante sensível do corpo humano (LORES et al., 2016).

Devido à carência de dados acerca dos nitróxidos em cosméticos faz-se necessária a realização de estudos de caracterização físico-química e estudos de estabilidade intrínseca para as moléculas ativas, bem como formulação visando garantir um produto acabado, seguro, eficaz e de qualidade. Na caracterização de novas moléculas emprega-se as técnicas espectroscópicas (FTIR, EPR, RMN), cristalográficas (DRX), termoanalíticas (DSC, TG e DTA) e cromatográficas (ANACLETO et al., 2018; BEZERRA et al., 2016; LIMA et al., 2014; SILVA et al., 2015; SILVA et al., 2017; WU et al., 2018).

Uma técnica versátil que vem sendo bastante utilizada na indústria farmacêutica, em laboratórios de manufatura e no controle de qualidade é a espectrometria na região do infravermelho, pois fornece informações fundamentais da estrutura molecular de compostos orgânicos e inorgânicos, caracterizando-os já que permite identificação das substâncias tanto quantitativamente como qualitativamente (MIGNOLET et al., 2015; HASSIB et al., 2017).

A espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR) foi desenvolvida a fim de superar as limitações encontradas com instrumentos dispersivos, como por exemplo, longo tempo de análise. Com isso, passou-se a utilizar interferômetros o qual produz um tipo único de sinal que possui todas as frequências infravermelhas "codificadas". Apesar de resultar em medições extremamente rápidas e aumentar a razão sinal-ruído, o sinal resultante denominado interferograma não pode ser interpretado diretamente, pois o gráfico gerado é de intensidade em função do tempo. Portanto, uma técnica matemática conhecida como transformada de Fourier é necessária para que o gráfico seja representado em função da frequência e assim possa ser interpretado como espectro de infravermelho (DUTTA, 2017).

A análise baseia-se na capacidade das moléculas sofrerem deformações rotacionais e vibracionais em suas ligações ao absorverem energia eletromagnética em determinada frequência de ressonância na região do infravermelho. A região espectral do infravermelho é

dividida em próximo (NIR) (comprimento de ondas 0,8 e 2,5 μm , respectivamente e números de onda entre 12.500 e 4000 cm^{-1}), infravermelho médio (MIR) (comprimento de ondas entre 2,5 e 25 μm , respectivamente e números de onda entre 4000 e 400 cm^{-1}), a mais utilizada nos estudos devido sua alta capacidade de identificação espectral e infravermelho distante (FIR) (comprimento de ondas entre 25 e 1000 μm , respectivamente e números de onda entre 400 e 10 cm^{-1}). Sendo assim, durante análise a amostra será exposta a diferentes comprimentos de onda da região do infravermelho e o equipamento será responsável por avaliar em quais comprimentos de onda serão absorvidos, sendo estes, determinados pelas propriedades intrínsecas de cada molécula correspondente, servindo, portanto, como uma impressão digital (CHEN et al., 2015).

A aplicação dessa técnica tem se demonstrado eficiente e conveniente já que não requer nenhuma (ou quase nenhuma) preparação de amostra, não é destrutiva e não necessita de nenhum (ou apenas uma pequena quantidade) solventes. Todos esses aspectos resultam em uma técnica ecologicamente correta, que economiza tempo de análise e que ajuda a reunir informações essenciais sobre as amostras examinadas (DEIDDA et al., 2019).

Como outra técnica espectroscópica, temos a espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica (EPR) que é uma técnica que identifica espécies paramagnéticas, ou seja, espécies que contém elétrons desemparelhados e por isso consegue identificar quando a substância estudada apresenta natureza radicalar, como no caso dos nitróxidos (CAMMACK, 2013). Dessa forma, essa técnica é amplamente utilizada para caracterização desse tipo de material e não a Ressonância Magnética Nuclear (RMN) que avalia, comumente, espécies diamagnéticas.

Ambas metodologias são espectroscópicas e partem do mesmo princípio teórico: medem a absorção da radiação eletromagnética e são referidos conjuntamente como fenômenos de ressonância magnética do spin. Porém, o RMN é observado na região de radiofrequência e por isso avalia a excitação do spin do núcleo atômico, e como consequência, muitas vezes as informações acerca dos elétrons são limitadas ou até mesmo invisíveis nos espectros obtidos. Já o EPR é analisado na região de micro-ondas do espectro eletromagnético e fornece uma visão adicional acerca das moléculas que possuem configuração eletrônica de valência incompleta (KARUNAKARAN; BALAMURUGAN, 2018).

O EPR merece destaque por ser uma técnica analítica que requer pouca quantidade de amostra, é não destrutiva, versátil – analisa amostras tanto no estado sólido quanto líquido- e apresenta resultados de alta sensibilidade. Além disso, pode ser usada para uma variedade de aplicações, como por exemplo: estudo de processos de oxidação e redução nos mais diferentes

meios, seja biológicos ou em alimentos, para a identificação e estudos de reatividade de intermediários ativos de catalisadores industrialmente atraentes, além das aplicações nos campos da física (ALEKSIEVA; DIMOV; YORDANOV, 2014; LOBYSHEVA et al., 2017; TALSI, 2017; HUSEYNOV et al., 2021).

Já as técnicas de caracterização microestruturais, como a Difração de Raio-X, podem avaliar a compatibilidade, a capacidade de formar estruturas cristalinas diferentes e auxiliar a caracterização das moléculas (DANKAR et al., 2018; LIMA et al., 2014). Dessa forma, os dados obtidos por essa técnica servem como complemento aos obtidos por DSC na avaliação da existência ou não de diferentes formas cristalinas, evidenciando se há ou não formas polimórficas.

Esse método consiste em incidir feixes monocromático de raios-X, espalhados em ângulos específicos, no conjunto de planos de rede em uma amostra. Então, quando o comprimento de onda ocorrer na ordem de separação dos átomos, picos de difração de raios-X são produzidos por interferência construtiva. As intensidades desses picos são determinadas pela distribuição de átomos dentro da rede e como consequência, o padrão de difração de raios-X é a impressão digital de arranjos atômicos periódicos em um determinado material (BUNACIU; UDRIȘTIOIU; ABOUL-ENEIN, 2015).

Uma expressão muito importante para o estudo cristalográfico é a Lei de Bragg já que o feixe difratado é produzido por tal dispersão somente quando certas condições geométricas a satisfaz. A equação de Bragg encontra-se abaixo:

$$n\lambda = 2d\sin\theta \quad (1)$$

Onde d se relaciona com a distância entre os planos do cristal, θ o ângulo de difração dos feixes de raios-x e λ com o comprimento de onda da radiação monocromática utilizada. Esta lei relaciona o comprimento de onda da radiação eletromagnética com o ângulo de difração e o espaçamento da rede em uma amostra cristalina (BUNACIU; UDRIȘTIOIU; ABOUL-ENEIN, 2015).

A técnica apresenta uma série de vantagens e dentre elas destacam-se a simplicidade e rapidez para preparo e análise de uma amostra. Além disso, é um método não destrutivo que permite a identificação de amostras cristalinas com total garantia sobre sua identidade, podendo ser utilizado para elucidar estruturas de compostos inorgânicos e orgânicos simples, bem como sistemas mais complexos, carecendo pequenas quantidades de amostra para realização dos ensaios. E por fim, pode-se criar bancos de dados para identificação de amostras, não sendo

necessário padrão interno para análises qualitativas (TRZYBIŃSKI et al., 2013; JURÁSEK et al., 2019).

As Análises Térmicas abrangem um grupo de técnicas, através das quais uma propriedade física de uma substância e ou de seus produtos de reação é medida em função da temperatura, enquanto a substância é submetida a uma programação controlada de temperatura (ICTAC, 2014). Segundo Tamilmani e Pandey (2015) as técnicas térmicas mais comumente utilizadas são: calorimetria exploratória diferencial (DSC), análise térmica diferencial (DTA) e análise termogravimétrica (TG).

Para uma completa caracterização, é importante que o material seja analisado por mais de um método analítico e os resultados obtidos sejam interpretados em conjunto objetivando uma melhor descrição dos eventos associados a amostra. Cada técnica fornece dados que se complementam e quando nas mesmas condições de análise evitam possíveis equívocos durante a avaliação dos dados. Como a TG fornece resultados referentes a variação de massa (perda ou ganho) e a DSC analisa propriedades termodinâmicas, como eventos exotérmicos e endotérmicos, pode-se confirmar a interpretação de dado evento observando a coerência de ambas as curvas. Por exemplo, quando na curva DSC ocorre um processo endotérmico e há suspeita de fusão, na mesma região na curva TG não deve ocorrer variação de massa para que ocorra essa confirmação (SILVA; PAOLA e MATOS, 2007; PENALVER, 2020).

Simplicidade, facilidade, reprodutibilidade e rapidez são características vantajosas das termoanálises que justificam sua ampla aplicabilidade na área farmacêutica, como por exemplo: caracterização dos eventos térmicos dos fármacos, estudo da compatibilidade de formulações farmacêuticas (fármaco-fármaco e fármaco-excipiente), identificação de polimorfismo, cinética de degradação térmica, determinação da estabilidade, etc (BEZERRA et al., 2016; CAMPOS et al., 2017; LEITE et al., 2017; RIOS et al., 2016; SILVA, 2017).

2.5 ESTUDO CINÉTICO DINÂMICO

Como dito no tópico anterior, o estudo cinético pode ser realizado a partir das análises térmicas e tem como objetivo prever a estabilidade de fármacos e formulações farmacêuticas, fornecendo assim, informações valiosas sobre o tempo e as condições de armazenamento, além de elucidar a compatibilidade fármaco-fármaco e fármaco-excipiente (MOHAMED; ATTIA, 2016).

Para isso, a partir dos dados termoanalíticos, são obtidos parâmetros cinéticos, tais como: energia de ativação (E) descrita como a barreira energética requerida para converter reagentes em produtos, ou seja, iniciar uma reação. Fator frequência (A) que fornece uma

medida da frequência de ocorrência de uma situação da reação. E por fim, ordem de reação (n) que está relacionada com a variação da velocidade da reação com a concentração dos reagentes (CUINICA; MACÊDO, 2018).

A ordem de reação para decomposição de fármacos é normalmente classificada como uma entre as: ordem zero, primeira ou segunda ordem. A reação de ordem zero ocorre quando a perda ou decomposição do fármaco independe da concentração de reagente e é constante com relação ao tempo. Já a cinética de primeira ordem pode ser observada quando a degradação do fármaco for diretamente proporcional à concentração remanescente com relação ao tempo. Por fim, a cinética de segunda ordem ocorre quando a velocidade de reação for proporcional ao quadrado da concentração do reagente (OLIVEIRA; YOSHIDA; GOMES, 2011).

A decomposição térmica de fármacos é um processo bastante complexo e como consequência têm-se duas linhas de tratamentos teóricos para a cinética de decomposição, que são os métodos isotérmico e não-isotérmico. No primeiro caso, utiliza-se os dados de curvas com razão de aquecimento constante e próxima da temperatura de decomposição da amostra, e o cálculo da energia de ativação toma como base a equação de Arrhenius. Já o método não-isotérmico utiliza dados térmicos com aumento linear da temperatura, e permite o cálculo dos parâmetros cinéticos através de tratamentos matemáticos dos dados experimentais, como os propostos por Ozawa. (OZAWA, 1965; MOHAMED; ATTY; BANKS, 2017).

2.6 ESTUDOS DE DEGRADAÇÃO FORÇADA

Os testes de estabilidade são essenciais no processo de desenvolvimento de novos produtos, pois os testes fornecem indicações sobre o comportamento do produto, em determinado intervalo de tempo, frente a condições ambientais a que possa ser submetido, desde a fabricação até o término da validade. Ao longo de sua vida útil, as características do produto podem ser afetadas por diversos fatores, sejam eles extrínsecos e/ou intrínsecos (ANVISA, 2004).

A avaliação da degradação de fármacos e medicamentos geralmente se inicia por um estudo de degradação forçada. Esse processo envolve a degradação de fármacos e medicamentos em condições mais severas que aquelas de um estudo acelerado e, por isso, resulta em produtos de degradação que podem ser estudados para determinar a estabilidade da molécula inicial. Os estudos de degradação forçada têm os seguintes objetivos: estabelecer as rotas de degradação de fármacos e medicamentos; diferenciar os produtos de degradação relacionados ao fármaco somente daqueles gerados por excipientes em uma formulação; elucidar a estrutura dos produtos de degradação; determinar a estabilidade intrínseca de um

fármaco em uma formulação; revelar os mecanismos de degradação (como a hidrólise, oxidação, termólise, fotólise) do fármaco e da formulação; estabelecer métodos indicadores de estabilidade; entender as propriedades químicas dos fármacos; gerar formulações mais estáveis; produzir um perfil de degradação mais próximo daquele que ocorre naturalmente e, finalmente, resolver problemas relacionados à estabilidade (BLESSY et al., 2014).

Para obter resultados consistentes, é necessário que os testes promovam degradações superiores a 10% e inferiores àquelas que levariam à degradação completa das amostras, já que o objetivo não é degradar totalmente o composto, mas sim promover uma degradação de pequena extensão. Além disso, uma lista mínima de fatores de estresse é sugerida para realizar os estudos de degradação forçada, e são eles: hidrólise ácida (HCl), hidrólise básica (NaOH), degradação térmica, fotólise e oxidação (H₂O₂) (BRASIL, 2015). Essas condições estão descritas na tabela 1.

Tabela 1- Condições para teste de estresse determinadas no guia da Anvisa para obtenção do perfil de degradação, e identificação e qualificação de produtos de degradação em medicamentos (guia N° 04/2015).

Teste de estresse	Condição recomendada
Solução ácida	Utilizar solução tampão em pH abaixo de 7,0 ou um ácido mineral, como ácido clorídrico (HCl)
Solução Básica	Utilizar solução tampão em pH acima de 7,0 ou um hidróxido de metal alcalino, como hidróxido de sódio (NaOH)
Solução oxidativa	Utilizar peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂) ou outro agente oxidante
Fotolítica	Variar a quantidade de lux hora e/ou watt hora por metro.
Térmica	Realizar o aquecimento da amostra
Iônica	Utilizar íons de metal de transição, geralmente soluções de Ferro III ou cobre II.

Fonte: BRASIL, 2015

Não existe uma metodologia padronizada com as condições de estresse para realizar a degradação forçada, porém algumas orientações podem ser encontradas na literatura. Por exemplo, por ser mais prático, alguns autores iniciam os ensaios com condições extremas e

tempos mais curtos, já outros iniciam a degradação considerando que a substância avaliada é instável e aplicam condições mais amenas, e dependendo do comportamento, aumentam ou reduzem o estresse para obter a degradação suficiente (BLESSY et al., 2014).

A realização desse teste auxilia no desenvolvimento de um método indicativo de estabilidade que seja capaz de identificar e quantificar, no decorrer do tempo, o ingrediente farmacêutico ativo, produtos de degradação e impurezas, sem interferência. Além disso, o estudo de degradação demonstra a especificidade e seletividade do método desenvolvido já que são capazes de identificar mudanças na concentração dos IFAs (BRASIL, 2017).

O teste de estresse é realizado para demonstrar a especificidade do método desenvolvido para medir as mudanças na concentração da substância medicamentosa quando há pouca informação disponível sobre o produto de degradação potencial. O desenvolvimento de um método de indicação de estabilidade adequado fornece uma base para os estudos de pré-formulação, estudos de estabilidade e o desenvolvimento de requisitos de armazenamento adequados. De acordo com o guia para obtenção do perfil de degradação, e identificação e qualificação de produtos de degradação em medicamentos (guia N° 04/2015) da ANVISA (BRASIL, 2015), a técnica recomendada para separação e quantificação de impurezas é a cromatografia líquida de ultra eficiência acoplado a um detector de arranjo de diodos.

Após o desenvolvimento do método indicativo de estabilidade, para garantir que os resultados obtidos são adequados, consistentes e confiáveis para o que se espera, deve ser realizada a validação analítica de acordo com a RDC 166/2017 (BRASIL, 2017).

2.7 DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO ANALÍTICO

Em complemento à caracterização das novas substâncias antioxidantes, é necessário o desenvolvimento de método analítico para quantificação dos insumos farmacêuticos ativos e de produtos de degradação que podem interferir na eficácia e segurança do produto. Normalmente, o método analítico de quantificação mais versátil é a cromatografia líquida de alta eficiência e, mais recentemente a cromatografia líquida de ultra eficiência (UHPLC) (BERTOLDI, F. et al, 2016; SOLON et al, 2015).

A cromatografia líquida é uma técnica de separação baseada na migração seletiva de componentes de uma amostra, entre duas fases. Sendo uma fase móvel líquida que flui através de uma fase estacionária (YASHIN e YASHIN, 2012). Uma das grandes vantagens de utilizar uma fase móvel líquida é a possibilidade de modificar o sistema (polaridade ou tipo de solvente) de acordo com as características dos analitos que estão sendo testados durante a corrida cromatográfica (NIKOLIN et al, 2004).

Dentre os diversos métodos de cromatografia líquida, destaca-se a cromatografia líquida de ultra eficiência. Esse método opera com colunas com tamanho de partícula inferior a 2 μm e também trabalha em pressões na faixa de 6000-15000 psi, o que resulta em uma resolução aumentada e conseqüentemente aumento da razão sinal/ruído. Além disso, as análises são 40 vezes mais rápidas que em métodos convencionais por HPLC (ZHAO et al., 2014).

O desenvolvimento de métodos por UHPLC apresenta diversas aplicações na área farmacêutica, por exemplo: SCHETTINO, L *et al.* (2021) desenvolveram um método para determinação de canabidiol em produtos cosméticos, objetivando o controle de qualidade de produtos cosméticos que possuem CBD em sua composição de forma rápida e fácil. Já Gaspar et al. (2010) avaliaram a influência de dois fotoestabilizadores comumente utilizados em formulações cosméticas. Para isso desenvolveram um método por UHPLC capaz de avaliar a redução da eficácia e segurança dessas formulações.

2.7.1 Planejamento Fatorial

O desenvolvimento de um novo método analítico é um processo bastante complexo, demorado e, muitas vezes, oneroso. Entretanto, um planejamento adequado e visando a otimização das análises pode incorrer em uma redução significativa do número de experimentos e, conseqüentemente, do consumo de reagentes e outros insumos necessários para sua formulação.

Nesse sentido, o planejamento fatorial pode ser utilizado para otimizar as condições cromatográficas, contribuindo para uma separação satisfatória e obtenção de respostas desejáveis, já que é capaz de avaliar a influência, bem como a significância estatística dos fatores estudados nos parâmetros de separação cromatográfica (FERREIRA et al., 2007).

No desenvolvimento de um desenho experimental para cromatografia, o procedimento univariado tradicional não é satisfatório, pois envolve a mudança de nível em apenas um fator enquanto os outros permanecem inalterados, necessitando assim de mais recursos e tempo para sua realização (CARABAJAL et al., 2020). Por outro lado, o planejamento fatorial completo compreende a interação de vários fatores ao mesmo tempo. Uma forma de abordar o desenvolvimento de uma metodologia a partir deste princípio é a proposta por Box e Behnken (que carrega o nome de seus idealizadores: planejamento Box-Behnken), baseada na combinação de análises fatoriais em blocos (CZYRSKI e SZN, 2019).

GOMES et al. (2017) empregou um planejamento Box-Behnken para otimizar um método de extração de compostos fenólicos, principalmente flavonóides, de espécies de *Passiflora*. Em outro estudo, o planejamento de Box-Behnken foi adotado para validação da

robustez de um método desenvolvido por HPLC-DAD para análise de rotina de amoxicilina tri-hidratada a granel e em formulações (BEG et al., 2012).

Nesse tipo de planejamento fatorial ocorre a combinação de três fatores que são estudados em três níveis diferentes (-1, 0 e +1) onde o ponto ótimo dos experimentos se encontra próximo ao ponto médio dos fatores. Esses fatores podem influenciar de forma linear e/ou quadrática nas respostas escolhidas para análise e o número de experimentos a ser realizado baseia-se na equação $2k(k-1) + n_c$, onde k é o número de fatores e n_c é o número de repetições no ponto central que geralmente são adicionados para mensurar o erro (BOX e BEHNKEN, 1960; FERREIRA et al., 2007).

2.8 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

A resolução 166/2017 estabelece critérios para garantir a adequabilidade do método e para isso alguns parâmetros deverão ser avaliados: seletividade, linearidade, exatidão, precisão, limite de quantificação, limite de detecção e robustez (BRASIL, 2017).

A seletividade é um critério que avalia a capacidade do método de identificar com precisão o analito de interesse na presença de interferentes endógenos ou exógenos que possam existir na amostra, sendo esse dado de suma importância visto que o ensaio deve ser capaz de reconhecer produtos de degradação formados (conhecidos ou não), impurezas provenientes da rota de síntese, impureza dos solventes utilizados no preparo e execução do experimento, excipientes enantiômeros, etc (GOUVEIA et al., 2020). E por essa razão, para garantir a fidedignidade dos resultados para métodos cromatográficos, deve ser comprovada a pureza cromatográfica do sinal do analito (BRASIL, 2017).

Já para obtenção da linearidade são necessários a elaboração de uma curva analítica com cinco concentrações crescentes da solução padrão e que o método consiga respostas diretamente proporcionais a concentração do analito. Esses resultados são avaliados por meio de métodos estatísticos, onde respostas reprodutíveis apresentam um nível de significância de 5%, coeficiente de correlação acima de 0,990 e coeficiente angular significativamente diferente de zero (BRASIL, 2017).

Exatidão e precisão são dois conceitos amplamente discutidos e por vezes confundidos durante o estudo de técnicas analíticas. Exatidão pode ser definida como a capacidade de obter resultados concordantes, ou seja, expressa a proximidade entre um valor tomado como referência e o valor obtido (real). Para obter essa resposta, deve-se verificar no mínimo nove pontos dentro o intervalo linear do método desenvolvido com três concentrações: baixa, média e alta e em triplicata (BRASIL, 2017). Enquanto isso, a precisão avalia a proximidade entre os

resultados alcançados feitos em diversas amostragens e é expressa por meio do desvio padrão relativo (DPR) que é calculado a partir da seguinte equação:

$$DPR = \left(\frac{DP}{CMD} \right) \times 100 \quad (2)$$

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

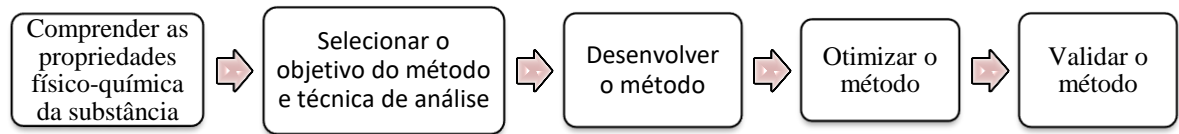
A precisão considera três níveis: repetibilidade (precisão intra-corrída), precisão intermediária (precisão inter-corrída) ou a reprodutibilidade (precisão inter-laboratorial), também com no mínimo nove pontos e em triplicada. E é juntamente com os resultados dos estudos de linearidade que se determina uma faixa de trabalho já que os resultados do intervalo avaliado devem ser precisos e exatos para a aplicação desejada (BRASIL, 2017).

Outros dois critérios para validar metodologias analíticas são o limite de detecção que estima a menor quantidade identificada, mas não necessariamente quantificada do analito de interesse, onde para métodos instrumentais como UHPLC é determinado a partir da relação sinal-ruído que deve ser maior ou igual a 2:1. E o limite de quantificação, que indica a menor quantidade do analito em uma amostra determinada quantitativamente com precisão e exatidão adequada, para sua determinação segue o mesmo procedimento para o limite de detecção, porém a razão sinal-ruído deve ser no mínimo 10:1 (BRASIL, 2017).

Por fim, temos a robustez que avalia a capacidade do método permanecer inalterado mesmo com pequenas e intencionais variações nos parâmetros cromatográficos, como por exemplo: pH, composição da fase móvel, taxa de fluxo e temperatura da coluna (DADHICH; GOYA; AGARWAL, 2020). Dessa forma, o resultado desse teste indica a confiabilidade do método para uso na rotina laboratorial e caso haja alguma susceptibilidade a variações nas condições analíticas, deve-se descrever como remedia-las.

A validação é a última das cinco etapas do processo de desenvolvimento de uma nova metodologia analítica (Figura 3), porém não menos importante. É necessário que haja o entendimento que esse procedimento não se limita apenas a cumprir as exigências regulatórias da ANVISA para obtenção de um parecer e sim assegurar metodologias de qualidade e com resultados confiáveis para a rotina prática nos laboratórios, garantindo segurança tanto para seus usuários quanto para seu desenvolvedor (SANAP; ZAREKAR; PAWAR, 2017).

Figura 3 – Etapas para o desenvolvimento de um método cromatográfico



Fonte: autor, 2021

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

O presente estudo visa a caracterização de nitróxidos com potencial antioxidante e desenvolvimento de método indicativo de estabilidade.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a pureza pós síntese
 - Cromatografia Líquida acoplada a Espectrometria de Massas (LC-MS);
 - Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (UHPLC-DAD);
 - Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)
- Caracterizar as novas moléculas antioxidantes por técnicas não térmicas:
 - Determinação de propriedade físico-químicas e características moleculares *in silico*
 - Espectrofotometria no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR);
 - Difractometria de Raios X (DRX);
 - Espectroscopia de Ressonância Paramagnética (EPR)
- Caracterizar as novas moléculas antioxidantes por técnicas térmicas:
 - Termogravimetria (TG);
 - Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC);
- Desenvolver método analítico indicador de estabilidade para as novas moléculas antioxidantes por Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (UHPLC/DAD):
 - Otimização por Delineamento do Desenho Experimental (3^3 Box-Behnken);
 - Avaliar os efeitos frente os parâmetros cromatográficos: Tempo de Retenção, Fator de retenção, Número de pratos teóricos, Área e Fator de cauda ;
 - Determinar a desejabilidade para a análise desses compostos por UHPLC-DAD;
- Avaliar o perfil de degradação forçada em solução para os nitróxidos

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 AMOSTRAS

As amostras que foram utilizadas neste estudo são derivadas de nitróxidos cíclicos e foram cedidas pelo professor Alessandro Kappel Jordão da UFRN. A síntese do TEMPOL foi realizada conforme metodologia descrita por Rauckman, Rosen e Abou-Donia (1975), a partir de uma reação de oxidação utilizando o sistema acetonitrila-metanol-peróxido de hidrogênio-tungstato de sódio objetivando um maior rendimento. Já para obtenção do BZTEMPOL-oxidado a partir do TEMPOL- utilizou Piridina e Cloreto de benzenossulfonila a 0 °C. Por fim, o TSTEMPOL foi obtido a partir da oxidação do TEMPOL utilizando a Piridina e o Cloreto de 4-metilbenzilsulfonila como agente oxidante em temperatura ambiente.

4.2 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS AMOSTRAS

4.2.1 Análise *in silico*

Nesse estudo, utilizou-se o *Software MarvinSketch*® para calcular, por meio das estruturas químicas das moléculas (TEMPOL, BZTEMPOL E TSTEMPOL), as seguintes propriedades físico-químicas: massa molecular, coeficiente de partição e distribuição das espécies na faixa do pH. Tais informações serviram de suporte para escolha e seleção da fase móvel utilizadas nas análises cromatográficas.

4.2.2 Espectrofotometria na região do Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

As amostras foram homogeneizadas em brometo de potássio, e em seguida, prensadas para obtenção de pastilhas para leitura no espectrômetro, onde os espectros foram registrados em termos de transmitância em função do número de onda na região do infravermelho médio (400 - 4000 cm^{-1}). O equipamento utilizado para as medidas foi o espectrômetro da Shimadzu, modelo FTIR-8400S, série *Iraffinity-1*, *software Irsolution*, versão 1.60, com número de varredura de 32 e resolução 4 cm^{-1} . Os espectros foram plotados no *Origin 8.0*.

Essas análises foram realizadas no Laboratório de Espectroscopia da Central Analítica no Instituto de Química da Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

4.2.3 Espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica (EPR)

Os espectros de ressonância magnética de elétrons (EPR) dos nitróxidos foram obtidos em temperatura ambiente utilizando um espectrômetro da marca Bruker, modelo EMXmidro. Para realizar essa análise, as amostras foram colocadas em tubos de quartzo (3 mm de diâmetro, comprimento 150 mm e espessura da parede de cerca 0,1 mm) e os seguintes parâmetros foram utilizados no equipamento: potência de radiação de micro-ondas de 1 mW, amplitude de modulação de 1 Gauss, frequência de modulação de 100 kHz e tempo de varredura de 60 segundos.

Essas análises foram realizadas no Laboratório de Nanoestruturas Magnéticas e Semicondutoras do Departamento de Física da Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

4.2.4 Cromatografia Líquida acoplada a Espectrometria de Massas (LC-MS)

Objetivando a confirmação da identidade molecular dos nitróxidos estudados, foi utilizado um sistema de cromatografia líquida Dionex Ultimate 3000, utilizado para separação cromatográfica, constituído de bomba binária (Bomba Ultimate 3000), amostrador automático (Amostrador automático *Ultimate 3000*), forno de coluna (*Ultimate 3000 Column Compartment*) e um Detector de Diode Array (*Ultimate 3000 Diode Array Detector*). As seguintes condições cromatográficas foram adotadas para realização das análises: coluna cromatográfica ShimPack XR-ODS (30 mm de comprimento x 2,0 mm de diâmetro interno; e tamanho de partícula de 2,2 μm - Shimadzu); volume de injeção de 1 μL , temperatura de 30 $^{\circ}\text{C}$, fluxo de 0,5 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ e o comprimento de onda utilizado para detecção foi de 240 nm. A fase móvel A era composta por 0,1% de ácido fórmico em água ultrapura e fase móvel B por acetonitrila. A solução dos nitróxidos foi preparada com metanol, obtendo uma concentração final de 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. O modo de eluição utilizado foi tipo gradiente obedecendo as proporções descritas na tabela abaixo:

Tabela 2- Programação corrida gradiente para UHPLC-MS-MS

Tempo (min)	Fase móvel orgânica (%)
00,01	0
30,00	100
35,00	100
35,01	0
40,00	0

Fonte: autor, 2021

O sistema cromatográfico foi acoplado a um espectrômetro de massa linear triplo quadrupolo ion trap (3200 QTRAP[®] LC-MS / MS, *AB Sciex*), com Turbo Ion *SprayTM* (*AB Sciex*) como fonte de íons, operando no modo positivo. O controle, aquisição e processamento dos dados dos instrumentos foram realizados utilizando os softwares Analyst[®]1.5 e *Chromeleon[®] 6.8*, por meio da plataforma *Dionex Chromatography MS Link*. As seguintes condições de detecção foram aplicadas: uma fonte *Turbo Spray* de ionização por *eletrospray* (ESI) operando a 600 °C com as configurações apropriadas: gás de cortina (nitrogênio) 20 psi, gás de fonte de íons (GS1) 45 psi, gás de fonte de íons (GS2) 45 psi, o gás de colisão (nitrogênio) na posição média e a voltagem do *IonSpray* de 4500 V para o modo positivo. A aquisição de dados de varredura completa foi realizada, varrendo de 50 a 400 m.z⁻¹, em modo de espectrometria de massa aprimorada / aquisição dependente de informação / íon de produto aprimorado (MS IDA EPI).

Essas análises foram realizadas no Núcleo de Processamento Primário e Reuso de Água Produzida e Resíduos (NUPRRAR) da Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

4.2.5 Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (UHPLC/DAD)

As análises de todos os compostos foram realizadas a 25 °C em cromatógrafo líquido de ultra eficiência, modelo Shimadzu Prominence UFLC-XR[®] (Shimadzu, Japan), equipado com duas bombas LC 20-ADXR, autoinjeter (SIL-20ACXR), degaseificador (DGU-20A3), forno de coluna (CTO-20AC) e detector com arranjo de fotodiodos (SPD-M20A). Foi utilizada uma coluna de fase reversa C18 Shim Pack XR-ODS (30 mm de comprimento x 2,0 mm de diâmetro interno; e tamanho de partícula de 2,2 µm - Shimadzu). A fase móvel A foi constituída por água e a fase móvel B por acetonitrila. A programação gradiente utilizada e que melhor se adequou está descrita na tabela abaixo:

Tabela 3- Programação corrida gradiente para UHPLC-DAD

Tempo (min)	Fase móvel orgânica (%)
00,01	0
30,00	100
35,00	100
35,01	0
40,00	0

Fonte: autor, 2021

As amostras foram bombeadas a $0,5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, o volume de injeção foi de $1 \mu\text{L}$ e o comprimento de onda utilizado para a detecção foi de 240 nm . A solução dos nitróxidos foi preparada com etanol, obtendo uma concentração final de $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

Essas análises foram realizadas no Laboratório de Controle de Qualidade de Medicamentos (LCQMed) do Departamento de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

4.2.6 Difractometria de Raios X

Os nitróxidos foram caracterizados por Difractometria de Raios X na faixa angular 2θ de 10 a 80° , com velocidade de varredura de $5^\circ\cdot\text{min}^{-1}$, em modo contínuo. As análises foram realizadas utilizando um difratômetro Bruker D2Phaser, com radiação $\text{CuK}\alpha$ ($\lambda=1,54 \text{ \AA}$) com um filtro de Ni, corrente de 30 mA e voltagem de 30 kV . Os dados foram plotados no *software Origin 8.0* para a confecção dos difratogramas.

Essas análises foram realizadas no Laboratório de Peneiras Moleculares (LBAPEMOL) da Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

4.2.7 Análise térmica

4.2.7.1 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

As amostras foram hermeticamente fechadas em cadinho de alumínio e analisadas em um calorímetro modelo Q20, fabricado pela TA Instruments®, e utilizando massa de amostra de $2,0 \text{ mg}$ ($\pm 0,1 \text{ mg}$). Todas as medidas foram realizadas sob atmosfera dinâmica de nitrogênio a $50 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, a razão de aquecimento de $10 \text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ de 25 até $400 \text{ }^\circ\text{C}$. O detector DSC foi previamente calibrado usando o metal Índio quanto à temperatura ($156,6 \text{ }^\circ\text{C}$) e entalpia ($28,5 \text{ J/g}$). Os parâmetros como temperaturas máximas (T_{pico}), o início da temperatura (T_{onset}),

temperatura de e o calor envolvido no evento (ΔH) para cada amostra foram medidos a partir das curvas DSC.

Essas análises foram realizadas no Laboratório Análises Térmicas da Central Analítica no Instituto de Química da Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

4.2.7.2 Termogravimetria (TG)

As curvas TG das amostras foram obtidas em uma Termobalança SDT Q600, da TA Instruments[®], usando cadinho de alumina com cerca de 5 mg de amostra, com fluxo de nitrogênio 50 mL.min⁻¹, nas razões de aquecimento de 5, 10, 15 e 20 °C.min⁻¹ até 900 °C. Antes das análises foram realizadas: uma curva de limpeza e branco de método utilizando cadinhos vazios, sendo um para cada razão de aquecimento descrita anteriormente. As curvas obtidas para esses brancos foram utilizadas para correção de linha base das análises de mesma razão de aquecimento.

A obtenção da derivada primeira das curvas termogravimétricas (DTG), bem como a caracterização das etapas de decomposição e perda de massa, foi realizada através software *Universal Analysis da TA Instruments*[®].

Ainda com os resultados das curvas termogravimétricos dinâmicas, foi possível calcular os parâmetros cinéticos: energia de ativação (E_a), fator de frequência (A) e temperatura de meia vida, segundo o modelo de OZAWA. Esse tratamento matemático foi feito a partir do software *Specialty Library da TA Instruments*[®].

Essas análises foram realizadas no Laboratório Análises Térmicas da Central Analítica no Instituto de Química da Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

4.3 DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA OS NITRÓXIDOS

4.3.1 Preparo da solução trabalho

Inicialmente pesou-se 1 mg de cada amostra (TSTEMPOL, BZTEMPOL e TEMPOL) em balança analítica. Cada nitróxido foi diluído em 10 ml de Etanol PA atingindo uma concentração final de 0,1 mg.mL⁻¹.

4.3.2 Preparo da fase móvel

A fase móvel orgânica constituiu em acetonitrila (grau UHPLC) – fabricante Dinâmica química contemporânea Ltda[®] e fase móvel aquosa constituída de água ultrapura. Todo o

conteúdo foi filtrado em membrana de *nylon* com 0,22 μm de diâmetro de poro e degaseificada antes de circular no sistema cromatográfico.

4.3.3 Condições cromatográficas

As análises foram realizadas em cromatógrafo líquido de ultra eficiência, modelo Shimadzu Prominence UFLC-XR® (Shimadzu, Japan), equipado com duas bombas LC 20-ADXR, autoinjeter (SIL-20ACXR), degaseificador (DGU-20A3), forno de coluna (CTO-20AC) e detector com arranjo de fotodiodos (SPD-M20A). Coluna cromatográfica em fase reversa ShimPack XR-ODS (30 mm de comprimento x 2,0 mm de diâmetro interno; e tamanho de partícula de 2,2 μm - Shimadzu). Fase móvel com acetonitrila seguindo a seguinte programação gradiente:

Tabela 4- Programação corrida gradiente para o desenvolvimento do método

Tempo (min)	Fase móvel orgânica (%)
00,01	0
30,00	100
35,00	100
35,01	0
40,00	0

Fonte: autor, 2021.

O volume de injeção foi de 2 μL , fluxo de 0,5 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ e o comprimento de onda utilizado para a detecção foi de 240 nm.

4.3.4 Desenvolvimento do método cromatográfico

Inicialmente foram realizadas corridas no modo gradiente com objetivo de determinar a concentração de solvente orgânico (%FMB) para eluição dos nitróxidos estudados. Esse valor foi determinado com base nas equações abaixo:

$$\%FMB = \frac{\text{Concentração final de FMB(\%)} - \text{Concentração inicial de FMB(\%)}}{\text{tempo de gradiente (min)}} \times T_R \quad (3)$$

Após determinar o %FMB de eluição de cada composto, um planejamento experimental de três fatores e três níveis experimentais tipo Box-Behnken foi empregado para a definição das melhores condições analíticas para o desenvolvimento do método cromatográfico.

O delineamento do desenho experimental foi realizado com auxílio do software *Statistica*[®] com 3 variáveis independentes (fatores) em três níveis: mínimo (-1), ponto central (0) e máximo (+1). Os fatores utilizados nesse estudo foram: temperatura do forno, fluxo de fase móvel e concentração de fase móvel orgânica, conforme mostrado nas tabelas abaixo. Os demais parâmetros cromatográficos foram mantidos constantes: volume de injeção (2,0 µL), coluna cromatográfica, comprimento de onda do detector (240 nm) e concentração da amostra (0,1 mg.mL⁻¹) e as respostas avaliadas foram: tempo de retenção, fator de retenção, número de pratos teóricos, fator de cauda e área.

Tabela 5- Fatores e seus respectivos níveis utilizados no desenho experimental para o TEMPOL

Fator	-1	0	1
A – Fluxo (mL.min ⁻¹)	0,3	0,5	0,7
B – Acetonitrila (%)	5	10	15
C – Temperatura (°C)	25	30	35

Fonte: autor, 2021

Tabela 6- Fatores e seus respectivos níveis utilizados no desenho experimental para o BZTEMPOL

Fator	-1	0	1
A – Fluxo (mL.min ⁻¹)	0,3	0,5	0,7
B – Acetonitrila (%)	30	40	50
C – Temperatura (°C)	25	30	35

Fonte: autor, 2021

Tabela 7- Fatores e seus respectivos níveis utilizados no desenho experimental para o TSTEMPOL

Fator	-1	0	1
A – Fluxo (mL.min ⁻¹)	0,3	0,5	0,7
B – Acetonitrila (%)	35	45	55
C – Temperatura (°C)	25	30	35

Fonte: autor, 2021

Deve-se ressaltar que todos os parâmetros cromatográficos (respostas), tais como: área do pico cromatográfico, fator de retenção, fator de cauda, número de pratos teóricos e tempo de retenção foram avaliados. Porém, apenas os fatores estatisticamente significativos, ou seja, $p > 0,5$, foram escolhidos para construção dos modelos e gráficos de superfície de resposta e, posteriormente obtenção da função de desejabilidade com a condição ótima para os fatores estudados.

4.4 ESTUDOS DE DEGRADAÇÃO FORÇADA

Para o estudo de degradação forçada foram realizados testes sob condições variadas de estresse, que estão descritas na tabela abaixo:

Tabela 8- Condições de estresse às quais os Nitróxidos foram expostos durante a análise

Degradação	Recomendação
Solução (A) - Hidrólise Ácida	Utilizar HCl 0,1 M durante 24 horas
Solução (B) - Hidrólise Básica	Utilizar NaOH 0,1 M durante 24 horas
Solução (C) - Oxidação	Utilizar H ₂ O ₂ 10% (v/v) durante 24 horas
Temperatura	Água à 60 (°C)
Fotoestabilidade	Câmara de luz

Fonte: autor, 2021

4.4.1 Preparo da solução estoque (SES)

Inicialmente pesou-se 2 mg de cada amostra (TEMPOL e BZTEMPOL) em balança analítica. Cada conteúdo foi diluído em 10 mL de Etanol PA atingindo uma concentração final de 0.2 mg.mL⁻¹.

4.4.2 Preparação das soluções degradantes

O preparo da solução A de ácido clorídrico 0,1 M foi realizada pela diluição de 0,822 mL (822 µL) de HCl concentrado em água purificada e o volume foi completado à 100 mL. Em seguida, foi adicionado lentamente sob constante agitação em um béquer contendo cerca de 70 mL de água purificada e transferido para balão volumétrico de 100 mL onde completou-se o volume. Essa solução foi armazenada em frasco de vidro.

O preparo da solução B de Hidróxido de Sódio 0,1 M foi realizada pela pesagem de 0,4 g de NaOH que foi dissolvido em água. Em um balão volumétrico completou-se o volume para 100 mL. Essa solução foi armazenada em frasco de plástico.

O preparo da solução C de peróxido de hidrogênio foi realizada pela diluição de 33,3 mL de peróxido de hidrogênio em água purificada e o volume completado à 100 mL. Essa solução foi armazenada em frasco de vidro.

4.4.3 Preparação das soluções de degradação e soluções de leitura

As soluções de degradação dos nitróxidos em cada tempo de análise 1, 0; 3, 0; 6, 0; 9, 0; 12; 18 e 24 h e para as condições de degradação ácida, básica e oxidativa, foram preparadas

por diluição da solução estoque para obtenção de solução final leitura (SL) na concentração de 0,1 mg. mL⁻¹ todas em triplicata.

Os agentes estressantes, diluente da amostra e o padrão fase móvel empregados no teste de degradação forçada também foram avaliados isoladamente, visando identificar os sinais cromatográficos provenientes dos mesmos, para que esses sinais não fossem confundidos com produtos de degradação.

Para o estudo de fotodegradação, inicialmente pesou-se 1 mg de cada amostra (BZTEMPOL, TEMPOL, TSTEMPOL) em balança analítica. Cada conteúdo foi dissolvido em 10 ml de Etanol PA atingindo uma concentração final de 0,1 mg.mL⁻¹. As amostras foram submetidas a uma exposição em câmara de fotoestabilidade com controle de temperatura, (radiação UV, lâmpada fluorescente e, iluminação > 1,2 milhões de lux.hora, em concordância com diretrizes ICH Q1B) e nos tempos 1,3,6,9,12,15,18,21 e 24 retirou-se alíquotas dessas amostras e controles para realização dos testes. As amostras e os controles (solução apenas com o diluente) foram submetidas ao teste no mesmo momento.

4.4.4 Análise cromatográfica das amostras submetidas a degradação forçada

Os efeitos dos agentes degradantes nas amostras estudadas foram avaliados a partir do aumento e/ou redução da área do pico cromatográfico (equação x) específico para cada nitróxido utilizando, para tanto, o método cromatográfico desenvolvido (vide tópico 4.3).

$$\text{Taxa de degradação (\%)} = \frac{\text{Área do pico do padrão}}{\text{Área do pico após o estresse}} \times 100\% \quad (4)$$

Para o estudo de degradação forçada, a ANVISA preconiza que após realização dos testes o teor do ativo deve permanecer entre 10 e 30% e caso a degradação seja inferior ao limite mínimo, deve-se aumentar as condições de estresse. Quando não houver mudança mesmo com a intensificação das condições é necessário apresentar uma justificativa fundamentada.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

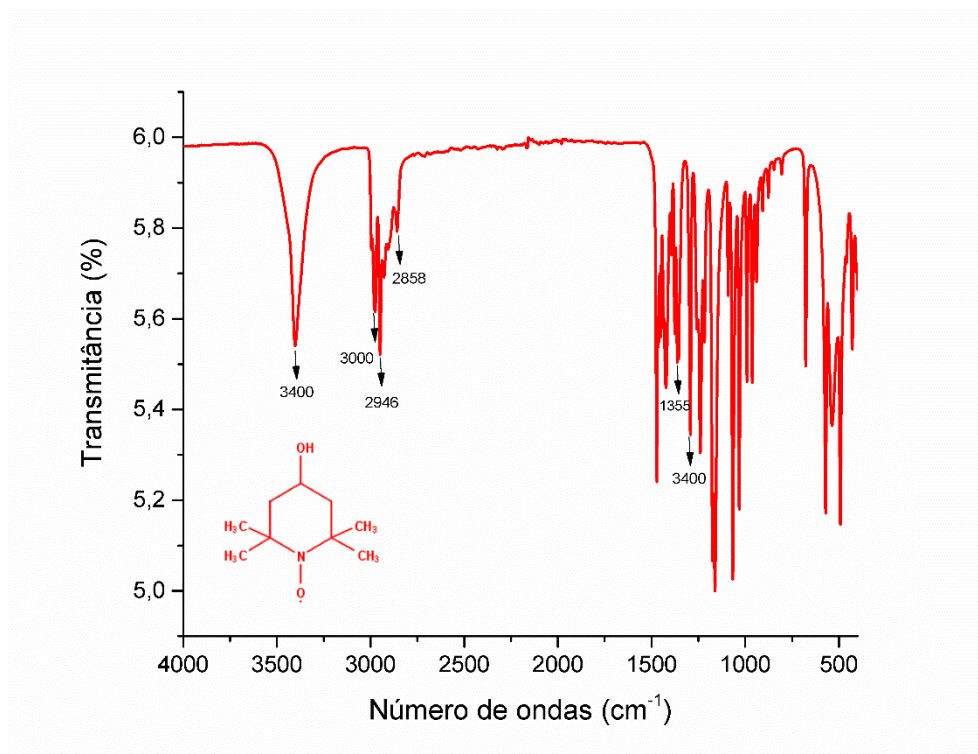
Uma vez obtidos por síntese química conforme descrito por Cunha et al. (2020) é necessário a caracterização dos nitróxidos em estudo visando a obtenção de padrões de trabalho para cada uma das substâncias e melhor entendimento das propriedades físico-químicas e características moleculares. Nesse trabalho, a caracterização molecular envolveu o emprego das seguintes técnicas: análise *in silico*, FTIR, DSC, TG, EPR, DRX, UHPLC-MS-MS e UHPLC-DAD. Essas informações, além de auxiliarem na compreensão química das moléculas, fornecem subsídios para o aprimoramento das etapas de síntese, desenvolvimento de métodos cromatográficos e estabilidade físico-química, necessários ao desenvolvimento de formulações.

5.1 ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)

Os espectros de FTIR de TEMPOL e seus derivados BZTEMPOL e TSTEMPOL foram obtidos a fim de caracterizar a estrutura química, em relação a presença de grupos funcionais característicos do material utilizado no projeto.

No espectro obtido para o TEMPOL (Figura 4) pode-se observar a existência de grupos funcionais característicos da molécula, tais como: uma banda forte na região 3400 cm^{-1} , característica do grupo hidroxila (O-H), bandas de absorção em 3000 , 2946 e 2858 cm^{-1} características do estiramento C—H sp^3 e entre 1362 e 1300 cm^{-1} características do grupo nitro (N-O).

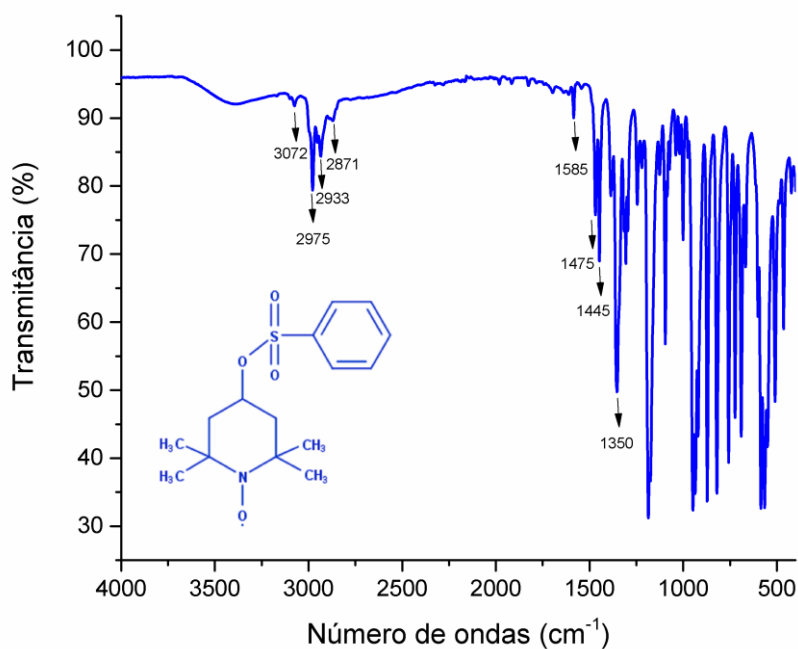
Figura 4- Espectro de infravermelho do TEMPOL



Fonte: autor, 2021

Já para o BZTEMPOL (Figura 5), o espectro apresenta bandas características do estiramento dos grupos C—H sp^2 em 3072 e C—H sp^3 em 2975, 2933 e 2871 cm^{-1} . Também apresentam bandas representativas do grupamento sulfona S=O no intervalo de 1350 e 1175 cm^{-1} e vibrações C=C de aromático em 1475 e em 1445 cm^{-1} .

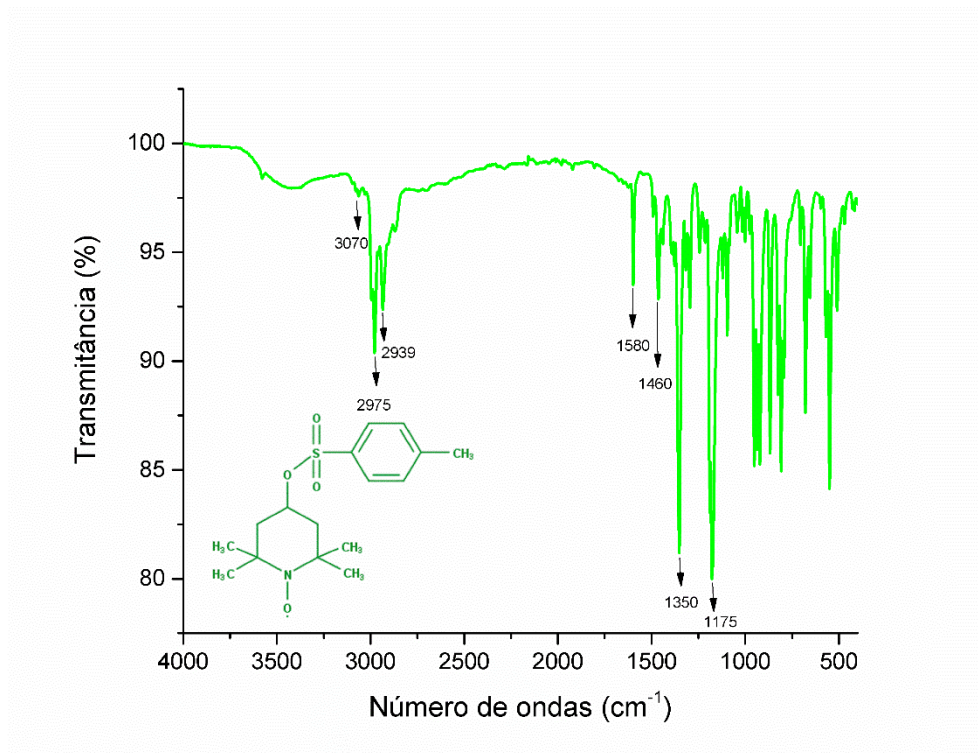
Figura 5- Espectros de infravermelho do BZTEMPOL



Fonte: autor, 2021

Os espectros do TSTEMPOL (Figura 6) apresentam bandas características do estiramento C—H sp² em 3070 e C—H sp³ em 2975 e 2939 cm⁻¹. É possível observar também uma banda em 1590 e 1460 cm⁻¹ atribuída às vibrações C=C de aromático e bandas representativas do grupo S=O no intervalo de 1350 e 1175 cm⁻¹.

Figura 6- Espectros de infravermelho do TSTEMPOL



Fonte: autor, 2021

5.2 ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA PARAMAGNÉTICA ELETRÔNICA

Comumente RMN é a técnica de escolha para determinação estrutural a partir das vibrações magnéticas de C e/ou H. Essa técnica espectroscópica baseia-se na capacidade do núcleo atômico sofrer deslocamento de seus níveis de energia quando expostos a um campo magnético artificial, gerando um sinal de intensidade diretamente proporcional ao número de núcleos ressonantes (YIP; WONG; CHOI, 2011). Para análises RMN é necessário que as moléculas sejam diamagnéticas ou que estejam no estado sólido (o que limita a sensibilidade do método). Tendo em vista que os nitróxidos apresentam características paramagnéticas, ou seja, apresentam elétrons desemparelhados na estrutura, a técnica de escolha é o EPR.

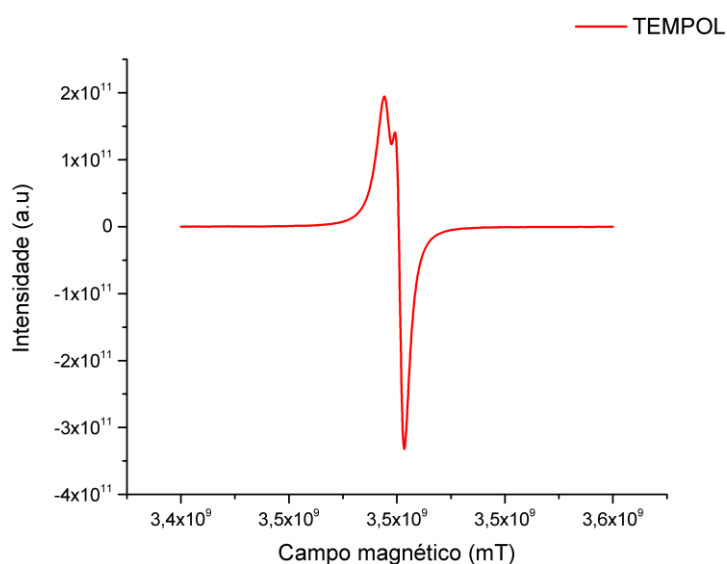
Isso porque, o EPR é capaz de observar e medir a absorção de energia eletromagnética por elétrons desemparelhados em um campo magnético. As figuras 7, 8 e 9 apresentam as análises EPR para os nitróxidos em estudo. A presença do grupo NITRO responsável pela propriedade paramagnética é confirmada pela presença de sinal da análise por EPR, para todos os nitróxidos estudados e, sendo proporcional e atribuído a presença de radicais livres (ROMANET et al., 2021). Este sinal, devido ao método usado na detecção, aparece no espectro sob a forma matemática da derivada da curva da absorção e a concentração dos radicais livres presentes pode ser calculada através da área sob a curva resultante. Além disso, a identidade

dos radicais livres presentes na amostra pode ser determinada pelo aspecto característico do espectro de EPR obtido.

Por essa razão, as diferenças obtidas nos espectros de EPR para os nitróxidos são atribuídas às características particulares de cada composto. Além disso, observamos que dentre as substâncias estudadas o TEMPOL apresenta uma maior intensidade e conseqüentemente uma maior quantidade de radicais livres. Seguido do TSTEMPOL e por último o BZTEMPOL.

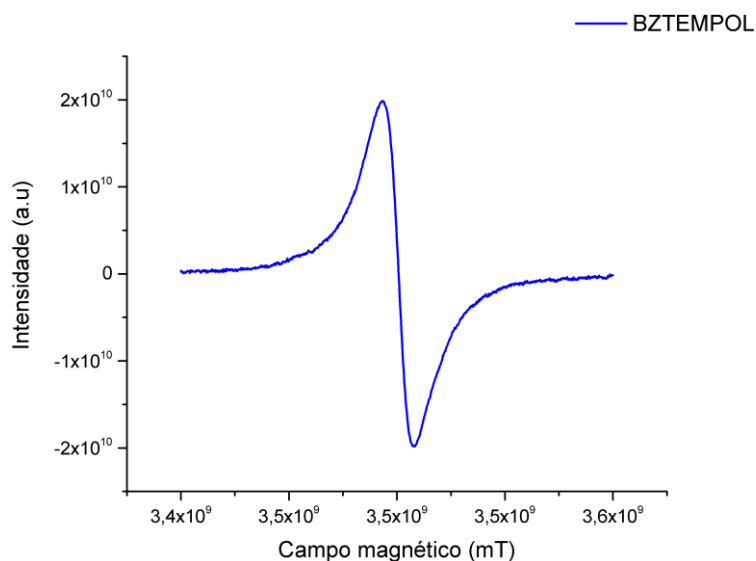
Esses resultados, referentes aos espectros das substâncias isoladas, poderão ser utilizados como referência para fins comparativos quando forem desenvolvidas formulações com esses ingredientes farmacêuticos ativos, sendo, portanto, de extrema importância para o controle de qualidade do produto final.

Figura 7- Espectro da primeira derivada de uma curva Lorentziana do TEMPOL



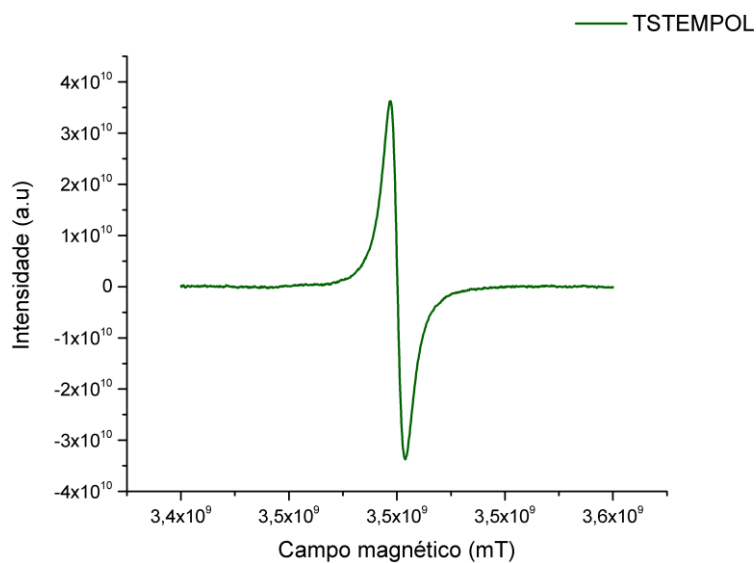
Fonte: autor, 2021

Figura 8- Espectro da primeira derivada de uma curva Lorentziana do BZTEMPOL



Fonte: autor, 2021

Figura 9- Espectro da primeira derivada de uma curva Lorentziana do TSTEMPOL



Fonte: autor, 2021

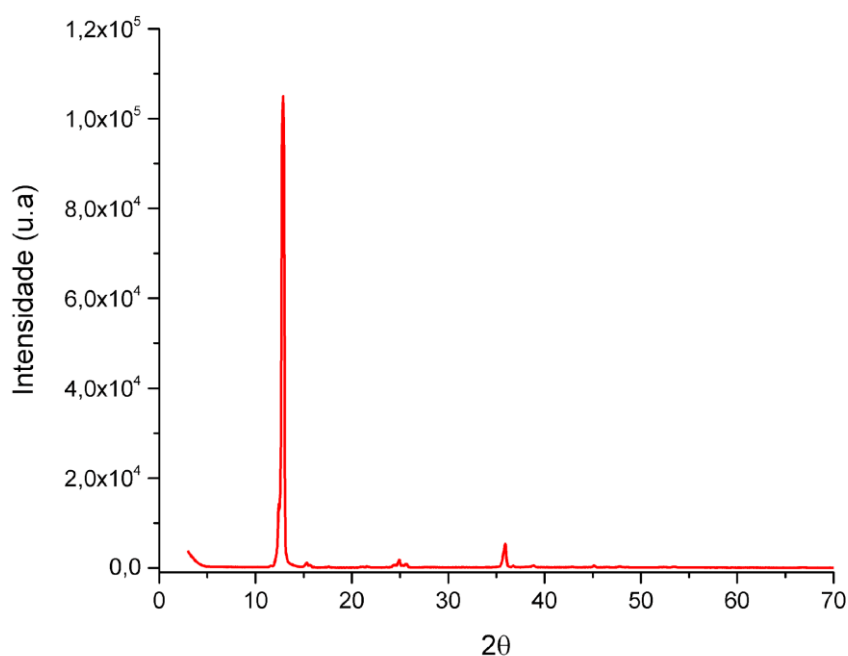
5.3 DIFRATOMETRIA DE RAIOS X

Com os resultados do DRX foi possível caracterizar o perfil de cristalinidade entre os diferentes nitróxidos estudados.

O difratograma do TEMPOL (Figura 10) obtido à temperatura ambiente (25 ° C) mostra que esse ingrediente ativo farmacêutico possui um perfil altamente cristalino com três picos:

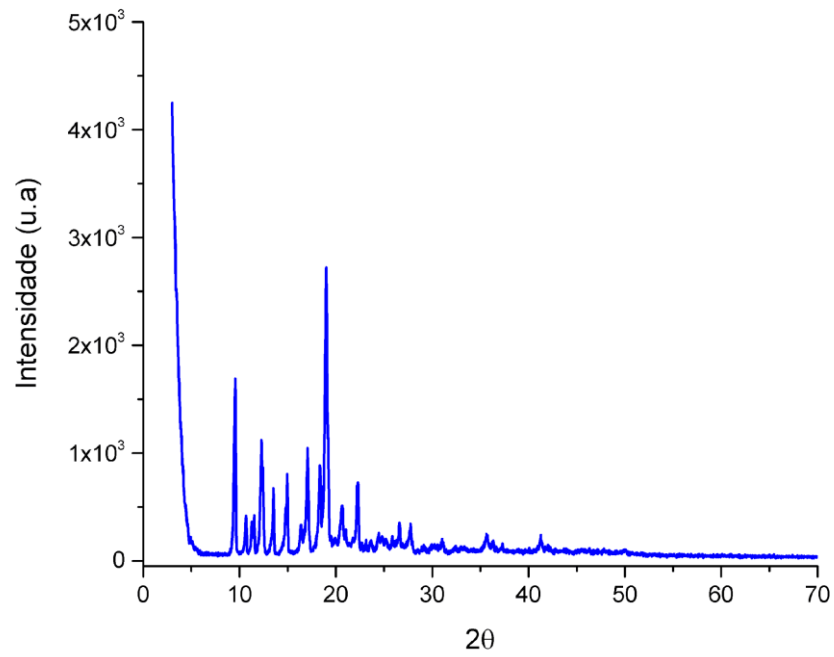
um pico principal de maior intensidade, em $12,9^\circ$ e dois picos de menor intensidade em $25,13^\circ$ e $35,9^\circ$. Já o BZTEMPOL e o TSTEMPOL apresentaram mais de uma fase cristalina com um pico de maior intensidade em $19,02^\circ$ e $9,06^\circ$, respectivamente (Figura 11 e 12). O TEMPOL mostrou-se mais uniforme e com reflexões cristalinas mais intensas, sugerindo que ele possui um elevado grau de ordenamento estrutural. O conhecimento detalhado do perfil cristalográfico dos nitróxidos é de suma importância para compreensão de suas características físico-químicas e conseqüentemente na atividade farmacológica (THAKRAL; ZANON; KELLY; THAKRAL, 2018).

Figura 10- Difratoograma TEMPOL



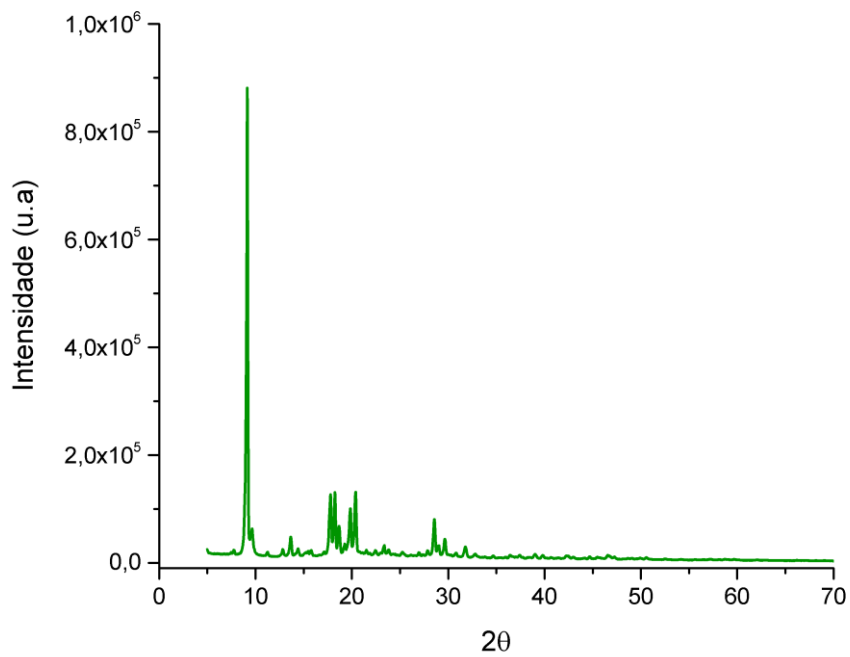
Fonte: autor,2021

Figura 11- Difratoograma BZTEMPOL



Fonte: autor, 2021

Figura 12- Difratoograma TSTEMPOL



Fonte: autor, 2021

Com a identificação dos picos cristalinos característicos do TEMPOL, BZTEMPOL e TSTEMPOL foram determinados seus respectivos percentuais de cristalinidade. Para isso, é essencial deconvoluir os espectros de difração de raio X das amostras para encontrar a área dos picos amorfos e cristalinos (DONOSO et al., 2018). Após a deconvolução, o percentual de cristalinidade foi calculado por meio da equação:

$$\%C = 100 \frac{\Sigma A_{\text{pico cr}}}{\Sigma A_{\text{pico não cr}}} \quad (5)$$

Onde: C (%) é o percentual de fase cristalina, o termo $\Sigma A_{\text{pico cr}}$ corresponde a soma das contribuições cristalinas de cada pico e o termo $\Sigma A_{\text{pico não cr}}$, a contribuição não cristalina do difratograma.

Feito isso, os percentuais de cristalinidade estimados para o TEMPOL, BZTEMPOL e TSTEMPOL foram de 90,49; 55,94 e 64,50% respectivamente. Com esses resultados podemos inferir que dentre os compostos o TEMPOL, possui maior estabilidade por apresentar maior cristalinidade entre as amostras estudadas

5.4 ANÁLISES TÉRMICAS

A caracterização da estabilidade térmica e eventos térmicos, para os nitróxidos estudados, foi realizada através do emprego de análises termogravimétricas (TG) e Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) e serão discutidas em conjunto para cada um dos nitróxidos. É importante frisar que associação das técnicas TG/DTG com DSC é fundamental, pois a primeira indica eventos térmicos relacionados a variação de massa, enquanto a segunda detecta eventos associados ou não a perda de massa, além de fornecer as temperaturas em que ocorrem e a energia envolvida no processo (GERMANO et al., 2021).

5.4.1 Comportamento térmico do TEMPOL

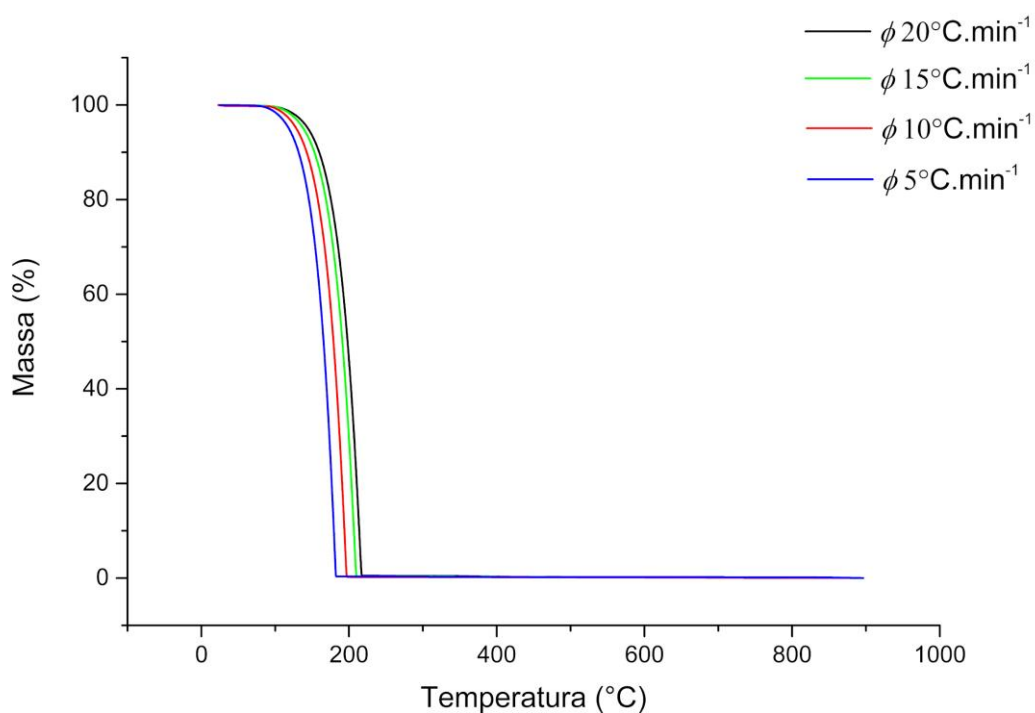
A derivada primeira das curvas TG sugerem apenas uma etapa de decomposição, cujas temperaturas *onset* (início) e *endset* (fim) foram determinadas a partir do método da tangente. A escolha desse método de determinação se justifica pela maior reprodutibilidade dessas temperaturas em razões de aquecimento distintas (BEZERRA, 2017). Os cálculos das perdas de massa foram realizados a partir das curvas DTG. São apresentados, na Tabela 9, os valores das curvas termogravimétricas do TEMPOL nas diferentes razões, e a Figura 13, as curvas TG do TEMPOL, obtidas nas diferentes razões de aquecimento.

Tabela 9- Dados das curvas termogravimétricas do TEMPOL nas razões de aquecimento 5,10, 15 e 20°C/min em atmosfera de nitrogênio

β (°C.min ⁻¹)	Etapa única de decomposição		
	T _{onset1} (°C)	T _{endset1} (°C)	Δm_1 (%)
5	152,04	182,21	100
10	162,81	196,64	100
15	175,17	209,75	100
20	179,18	216,95	100

Fonte: autor, 2021

Figura 13- Sobreposição das curvas TG do TEMPOL nas razões de 5, 10, 15 e 20°C.min⁻¹



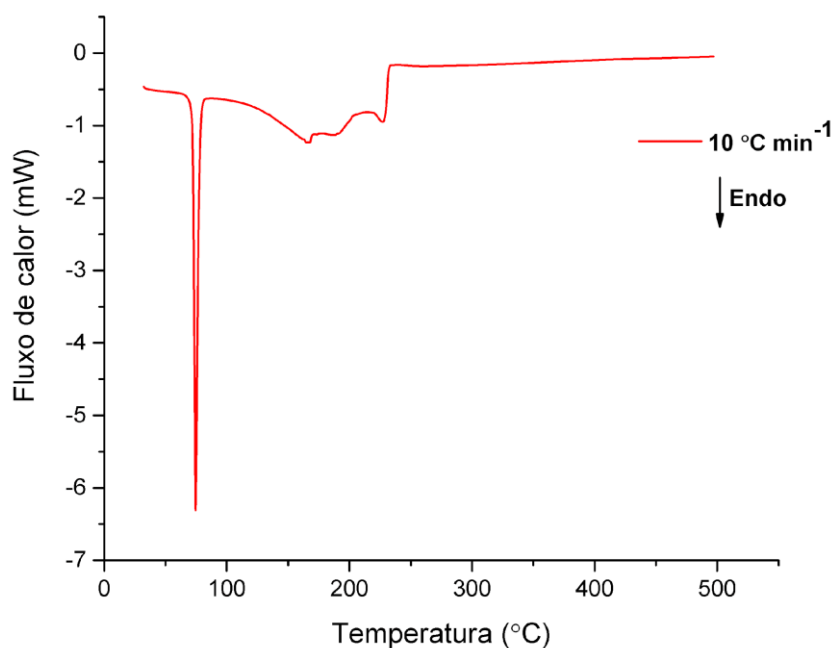
Fonte: autor, 2021

Constata-se após análise das curvas TG/DTG do TEMPOL que a substância é estável termicamente até, aproximadamente, 152 °C, com degradação em etapa única e total em aproximadamente 200 °C.

A curva DSC do TEMPOL (Figura 14) apresentou um pico principal endotérmico com início por volta de 72,22 °C, atribuído a fusão da amostra. O segundo evento é de natureza endotérmica e se refere a decomposição da amostra com oxidação da matéria orgânica e/ou dos

produtos gasosos gerados pela decomposição térmica do material. Os resultados da análise por DSC são apresentados na Tabela 10.

Figura 14- Curva DSC do TEMPOL na razão de aquecimento de 10°C.min⁻¹



Fonte: autor, 2021

Tabela 10- Dados termoanalíticos obtidos por DSC para o TEMPOL

β (°C.min ⁻¹)		1° Evento	2° Evento
10	T_{onset}	72,2	168,61
	T_{endset}	77,8	230,86
	T_{pico}	73,6	208,14
	ΔH (J/g)	120,7	124,1

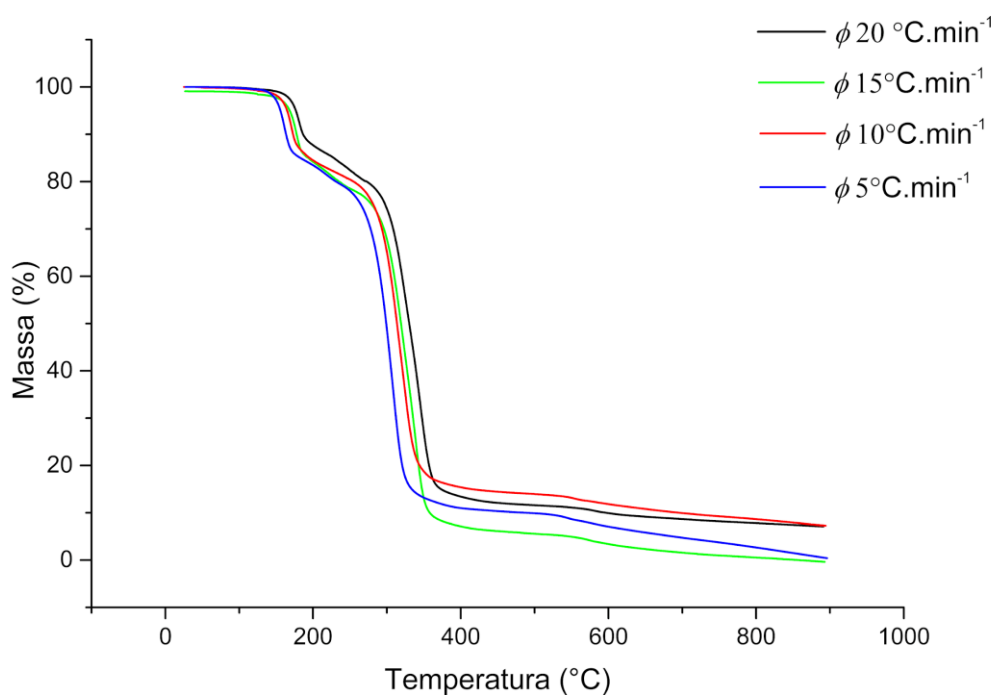
Fonte: autor, 2021

5.4.2 Comportamento térmico do BZTEMPOL

A análise dos resultados das curvas TG/DTG do BZTEMPOL (Figura 15) mostra que a substância é estável termicamente até aproximadamente 150 °C, e após esta temperatura ocorre à decomposição térmica gradual da amostra até 900 °C. O perfil da curva DTG sugere que a decomposição ocorre em três etapas. O primeiro evento ocorre entre 150°C e 167°C com perda

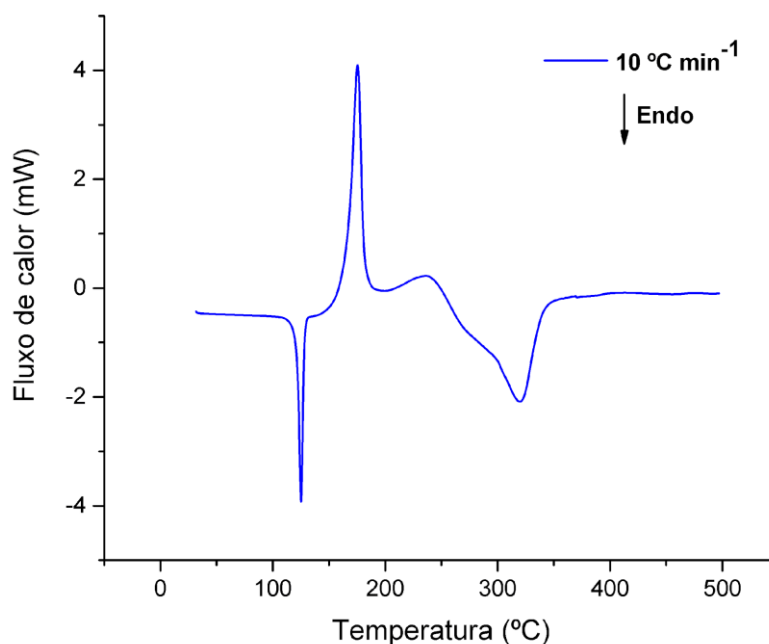
de massa de 15,43%, o segundo ocorre entre 207°C e 227°C com perda de massa de 4,6%. Por fim, a última etapa que ocorre de 283°C até 322°C obteve uma perda de massa equivalente a 67,77%.

Figura 15- Sobreposição das curvas TG do BZTEMPOL nas razões de 5, 10, 15 e 20°C.min-1



Fonte: autor, 2021

A curva DSC, ilustrada na Figura 16, apresentou cinco eventos. O primeiro (por volta de 121°C) é atribuído à fusão do composto, enquanto os demais: dois eventos exotérmicos que se seguem, coincidentes às perdas de massa em 165 °C e 229 °C, e os dois últimos e endotérmicos a 268,01 °C e 315 °C, respectivamente, referem-se aos processos de decomposição térmica em etapas do material e de seus produtos de degradação.

Figura 16- Curva DSC do BZTEMPOL na razão de aquecimento de 10°C.min⁻¹

Fonte: autor, 2021

A Tabela 11 mostra a T_{onset} , T_{endset} e a variação de entalpia das transições para o BZTEMPOL.

Tabela 11- Dados termoanalíticos obtidos por DSC para o BZTEMPOL

β (°C.min ⁻¹)	1ª Evento	2ª Evento	3ª Evento	4ª Evento	5ª Evento	
10	T_{onset}	121,6	165,8	229,60	268,01	315,69
	T_{endset}	127,7	181,2	247,17	300,01	337,34
	T_{pico}	125,3	175,4	239,73	280,37	322,09
	ΔH (J/g)	95,66	275,7	49,90	11,45	72,91

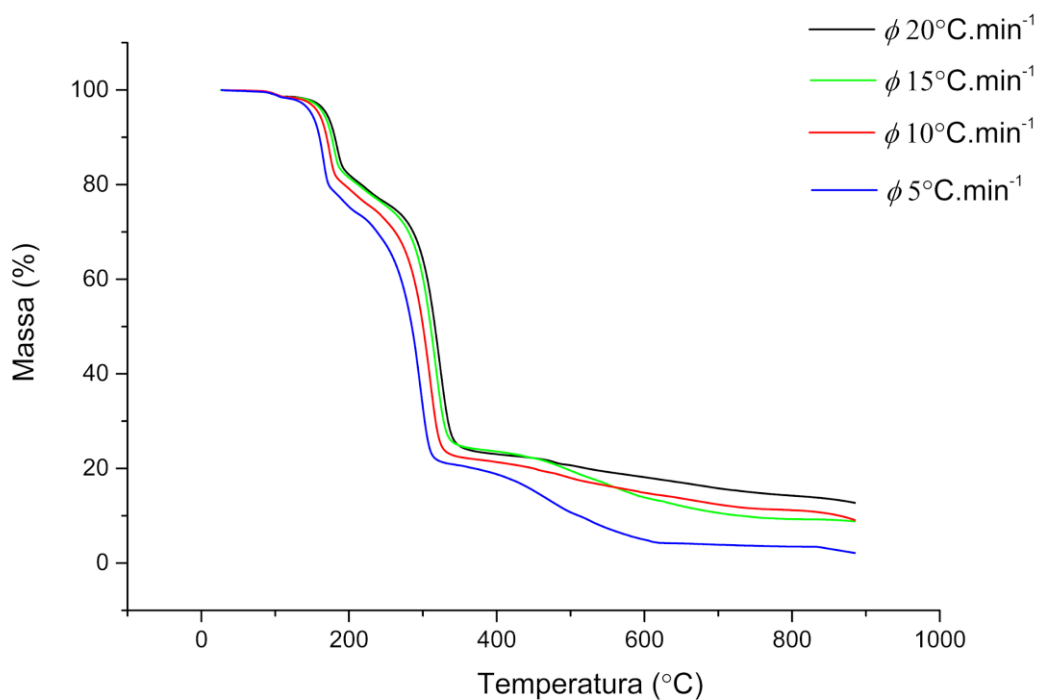
Fonte: autor, 2021

5.4.3 Comportamento térmico do TSTEMPOL

A curva TG sugere que o composto é estável termicamente até aproximadamente 90 °C e que a decomposição ocorre em quatro etapas. O primeiro evento ocorre entre 90°C e 107°C com perda de massa de 1,12%, o segundo ocorre de 153°C a 170 °C com perda de massa de 19,49%. O terceiro evento ocorre entre 202°C e 226°C com perda de massa de 7,65% e o quarto

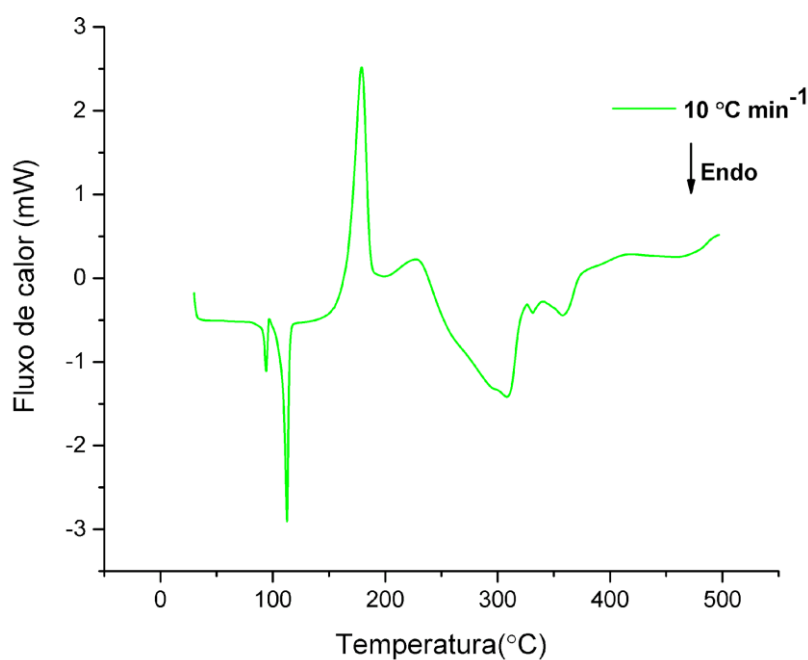
e último evento ocorre entre 277°C a 308°C com perda de massa de 48,27%. A Figura 17 representa a sobreposição das curvas TG nas diferentes razões de aquecimento.

Figura 17- Sobreposição das curvas TG do TSTEMPOL nas razões de 5, 10, 15 e 20°C.min⁻¹



Fonte: autor, 2021

O TSTEMPOL apresenta uma curva de DSC (Figura 18) com 5 eventos. O primeiro e o segundo evento são endotérmicos e ocorreram respectivamente em 91,81 °C e 108,39 °C. O primeiro evento é referente a perda de massa, e o segundo característico de fusão da amostra. Quanto ao terceiro evento exotérmico a 167,35 °C, trata-se da perda de massa da amostra. Assim como, o quarto e quinto eventos endotérmicos há 220,88 e 283,77, respectivamente.

Figura 18- Curva DSC do TSTEMPOL na razão de aquecimento de 10°C.min⁻¹

Fonte: autor, 2021

A Tabela 12 mostra a T_{onset} , T_{endset} e a variação de entalpia das transições para o TSTEMPOL

Tabela 12- Dados termoanalíticos obtidos por DSC para o TSTEMPOL

β (°C.min ⁻¹)	1ª Evento	2ª Evento	3ª Evento	4ª Evento	5ª Evento	
10	T_{onset}	91,81	108,39	167,35	220,88	283,77
	T_{endset}	96,24	114,77	180,69	232,50	308,76
	T_{pico}	94,08	112,63	179,04	228,61	312,56
	ΔH (J/g)	8.961	69,10	216,4	20,82	215,2

Fonte: autor, 2021

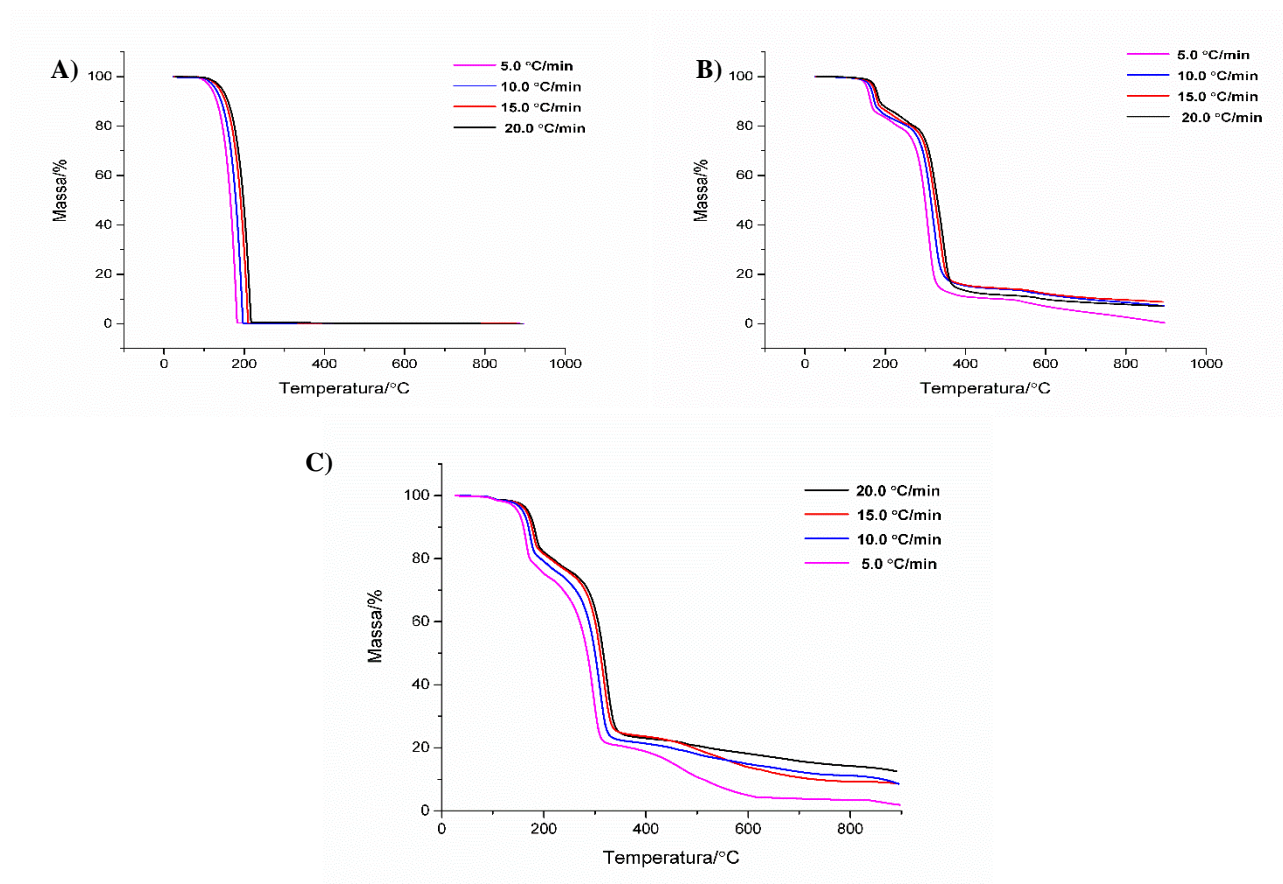
5.5 ESTUDO CINÉTICO DINÂMICO

Além da caracterização térmica, os dados das curvas termogravimétricas possibilitaram estimar parâmetros cinéticos acerca dos nitróxidos. Esses resultados são de suma importância para fornecer subsídios sobre a estabilidade dessas substâncias. Dessa forma, com auxílio do

software *Specialty Library*, foi determinado a energia de ativação (E_a), Fator de Frequência (A) e o tempo de meia vida.

O software aplica o método de Ozawa para cálculo desses parâmetros, sendo assim é necessário utilizar pelo menos três razões de aquecimento para o tratamento dos dados e obtenção dos resultados. Nesse estudo, foi utilizado curvas termogravimétricas dinâmicas nas razões de 5, 10, 15 e 20 °C min⁻¹ e a figura 19 apresenta a sobreposição das curvas TG obtidas para os nitróxidos nessas diferentes razões de aquecimento

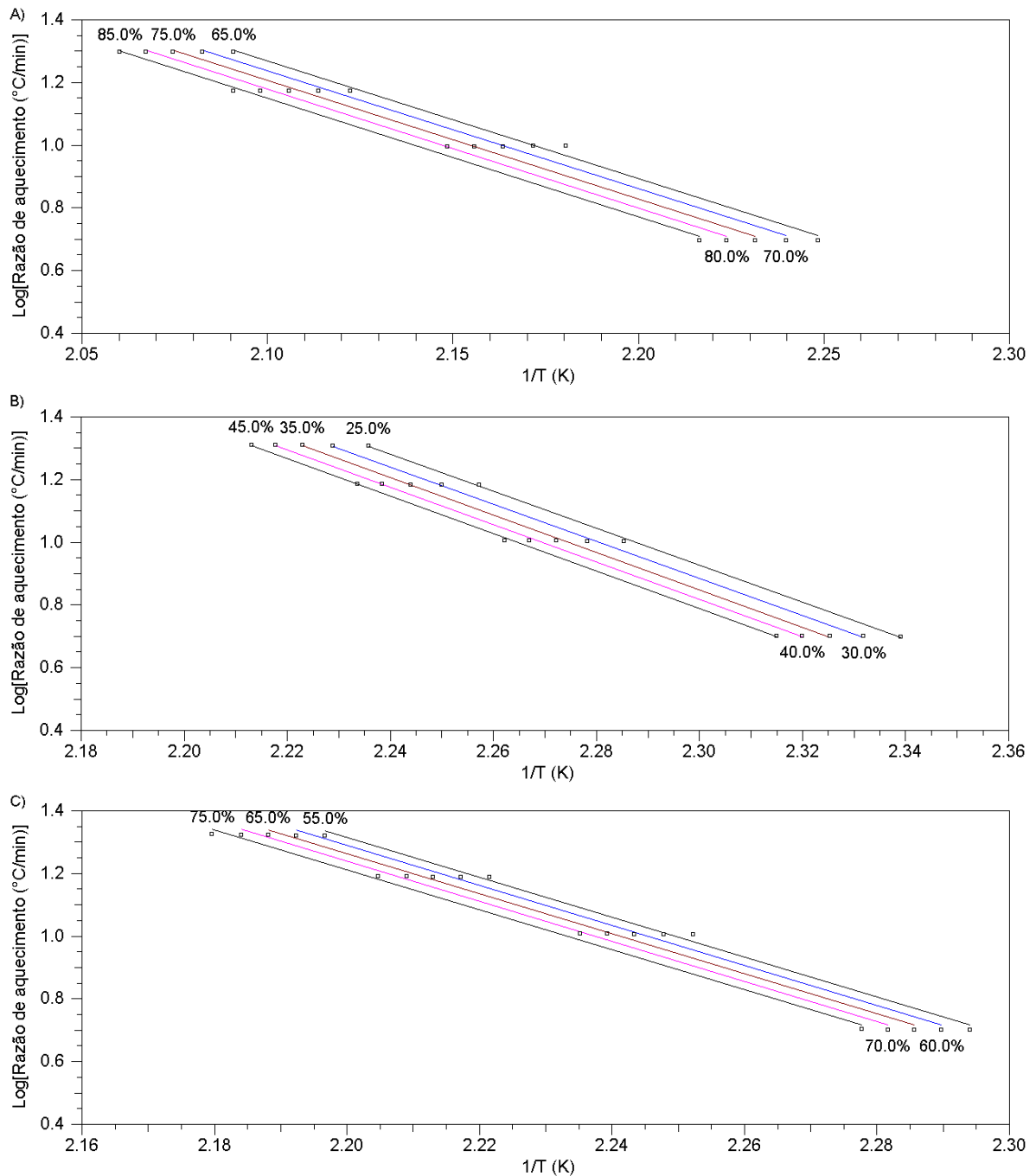
Figura 19- Sobreposição das curvas TG dos nitróxidos: TEMPOL (A), BZTEMPOL (B) e TSTEMPOL (C) nas razões de 5, 10, 15 e 20 °C min⁻¹



Fonte: autor, 2021

Inicialmente foi determinada as taxas das conversões utilizadas para calcular os parâmetros cinéticos. Isso foi feito a partir de uma análise estatística que consistiu em escolher o intervalo com melhor correlação linear e menor desvio padrão. Para O TEMPOL o intervalo de fração decomposta foi: 65, 70, 75, 80 e 85%, já para o BZTEMPOL de 25, 30, 35, 40 e 45% e por fim o TSTEMPOL com 55, 60, 65, 70 e 75%. A Figura 20, evidencia os gráficos do logaritmo da taxa de aquecimento em função do inverso da temperatura absoluta. É possível observar que as cinco retas paralelas estão ajustadas aos pontos experimentais.

Figura 20- Gráficos do logaritmo da razão de aquecimento ($\log\beta$) em função do inverso da temperatura absoluta (K), sendo TEMPOL (A), BZTEMPOL (B) e TSTEMPOL (C)



Fonte: autor, 2021

Com o intervalo de conversão bem definido, foram calculados a média para a energia de ativação, fator de frequência e a temperatura necessária para atingir a meia vida do ativo. A tabela 13 apresenta os valores para cada um dos nitróxidos.

Tabela 13- Valores dos parâmetros cinéticos obtidos a partir do estudo não-isotérmico

Amostra	Energia de ativação (KJ.mol ⁻¹)	Log [Fator Pré exponencial (min ⁻¹)]	Temperatura de meia vida (°C)
TEMPOL	62	7	101
BZTEMPOL	108	12	122
TSTEMPOL	107	12	116

Fonte: autor, 2021

Com esses resultados, pode-se inferir que o BZTEMPOL apresenta maior estabilidade seguido do TSTEMPOL, já que ambos apresentam os maiores valores de energia de ativação e quanto maior essa energia, maior será a barreira para iniciar reações decomposição. Isso também fica evidente no valor da temperatura que deve ser atingida para que reduza suas meias vidas. Como o BZTEMPOL e TSTEMPOL apresentam estruturas semelhantes, provavelmente o grupamento substituinte de ambos é responsável pelo aumento na estabilidade desses compostos.

5.6 DETERMINAÇÃO DE PROPRIEDADE FÍSICO-QUÍMICAS E CARACTERÍSTICAS MOLECULARES *IN SILICO*

A partir da estrutura molecular dos nitróxidos, foram calculados algumas propriedades físico-químicas e características moleculares (Log P, MM e pKa) *in silico*, utilizando o *software* MarvinSketch (ChemAxon), conforme apresentado na Tabela 14. Esse entendimento inicial é norteador do desenvolvimento de método e análises LC-DAD e LC-MS.

Tabela 14- Propriedades físico-químicas e características moleculares para cada um dos nitróxidos estudados

Nitróxido	MM	Log P
TEMPOL	172,24	0,22
BZTEMPOL	312,13	2,27
TSTEMPOL	326,13	2,79

Fonte: autor, 2021

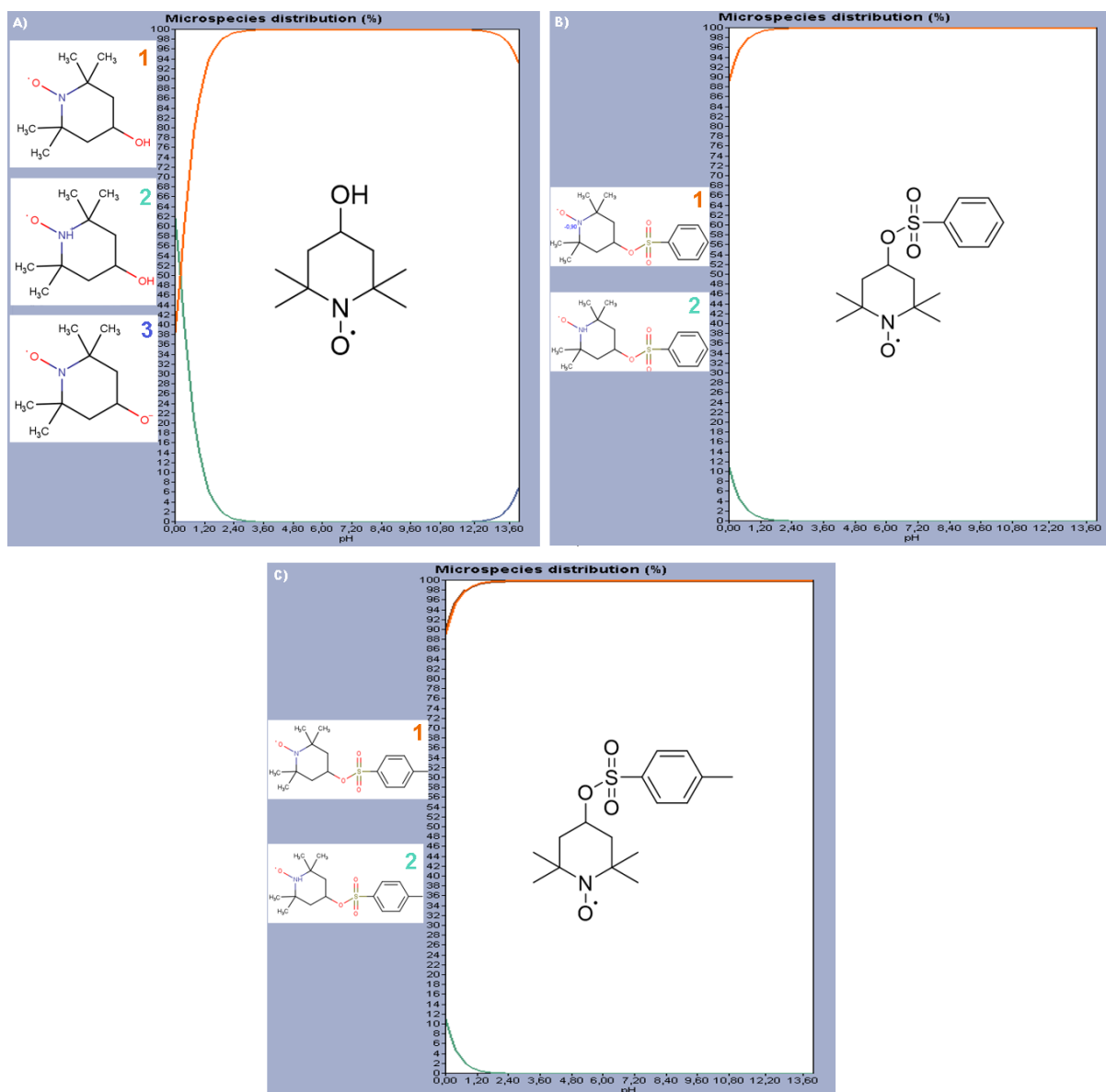
A partir da Tabela 14 podemos observar que todos os nitróxidos apresentam valores de Log P positivos e, portanto, o modo hidrofóbico de eluição utilizando colunas C18 é uma estratégia possível de ser realizada, desde que exista um valor de pH no qual todas as

substâncias se encontrem no modo não ionizado. Existe uma diferença evidente nos valores de Log P encontrados para as três substâncias, sendo os valores encontrados para o BENZILTEMPOL e TSTEMPOL mais próximos entre si, evidenciando a necessidade de maiores proporções de solvente orgânico para eluição destes últimos nitróxidos, de forma que, uma análise no modo de eluição gradiente é imprescindível para determinação da proporção adequada de solvente orgânico. O TEMPOL apresenta menor coeficiente de partição (Log P) sugerindo menor necessidade de solvente orgânico para eluição quando comparado aos demais que apresentam um grupo substituinte maior e mais lipofílico.

Como os analitos podem alternar seu estado de ionização com mudanças nos valores de pH da fase móvel, e conseqüentemente apresentar diferentes comportamentos de eluição, torna-se imprescindível a compreensão das características ácido-base de cada substância para realizar os ajustes necessários nos parâmetros cromatográficos escolhidos.

A Figura 21 (A, B e C) ilustra a distribuição das formas ionizantes dos nitróxidos frente ao pH. Os valores evidenciam que os nitróxidos apresentam-se não-ionizados em uma ampla faixa de pH (4 – 10) e, portanto, não necessitam de agentes acidificantes ou tamponantes na fase móvel para manutenção de sua forma molecular, já que apenas em pH extremamente ácido ou básico esses compostos sofrem ionização. Diante disto, é possível a utilização de colunas cromatográficas de fase reversa C18 utilizando acetonitrila como solvente orgânico e água como solvente aquoso, sem necessidade de controle de pH, em modo gradiente como estratégia inicial para o desenvolvimento do método cromatográfico indicativo de estabilidade.

Figura 21. Distribuição das espécies conforme mudança de pH para o (A) TEMPOL, (B) BZTEMPOL e (C) TSTEMPOL



Fonte: autor, 2021.

5.7 AVALIAÇÃO DA PUREZA CROMATOGRÁFICA E POR DSC

Todas as moléculas sintetizadas foram avaliadas quanto a pureza cromatográfica frente análises LC-MS e LC-DAD, ambas em modo gradiente e por DSC. Os resultados foram demonstrados na Tabela 15.

Tabela 15- Valores de pureza cromatográfica obtidos para cada amostra de nitróxido através das técnicas analíticas utilizadas

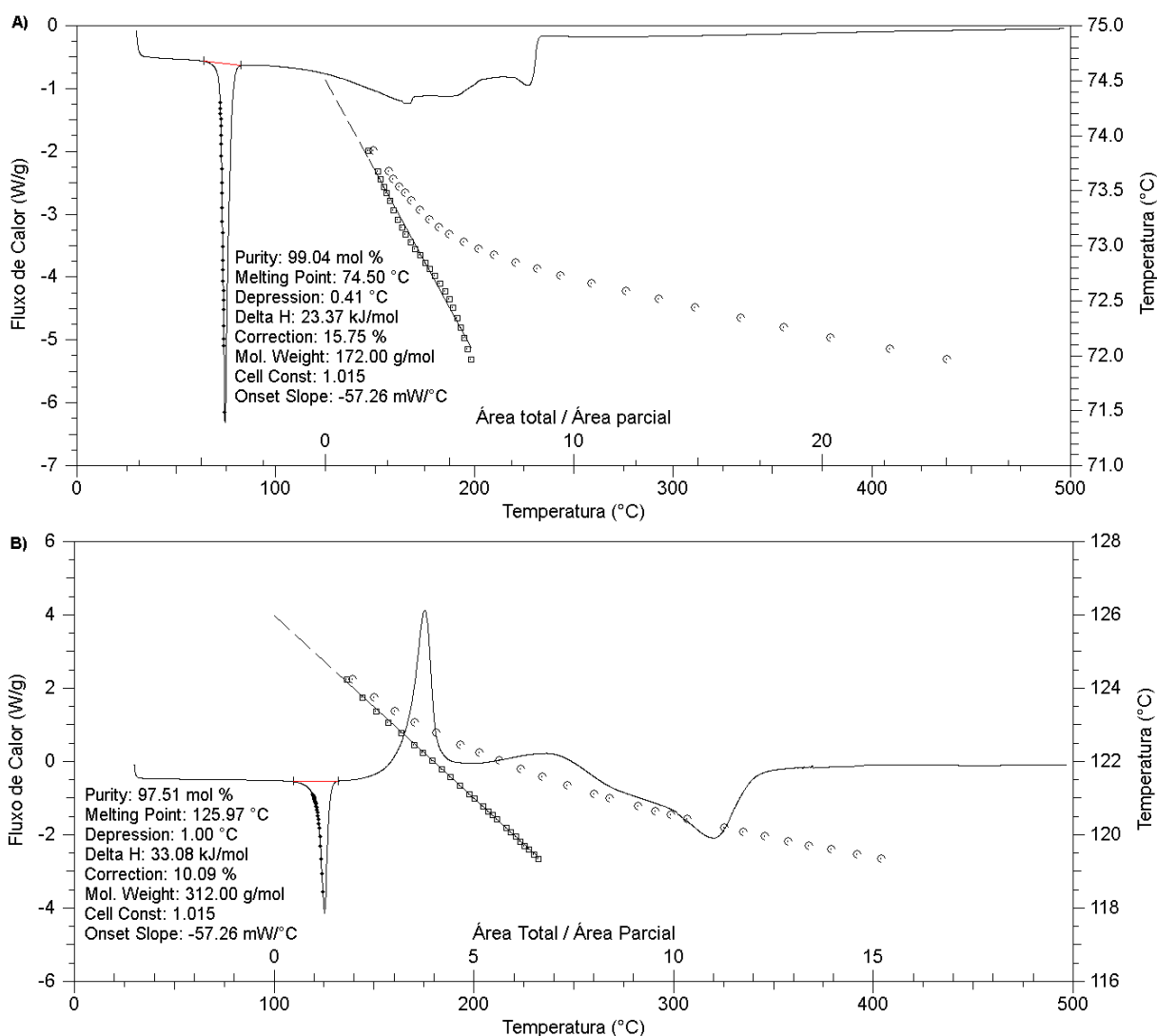
Nitróxidos	T _R (min)	UHPLC-DAD (%)	UHPLC-MS (%)	DSC - Van't Hoff
TEMPOL	3,0	100	96,00	99,04
TEMPOL IMPUREZA	3,5	ND	4,00	0,96
BZTEMPOL (RADICALAR + REDUZIDO)	7,0- 12,0	ND	100,00	97,57
TSTEMPOL IMPUREZA	7,0	ND	11,80	-
TSTEMPOL RADICALAR + REDUZIDO	8,0 – 14,0	ND	88,63	*

T_R= tempo de retenção; ND= não detectado.

Fonte: autor, 2021

Os valores de pureza cromatográfica foram obtidos a partir da determinação dos valores de área para todos os picos identificados no cromatograma, excetuando-se àqueles presentes na análise do branco. A razão da área do pico do analito interesse pela somatória dos picos identificados multiplicados por um fator de 100, expressou a pureza, conforme técnica de análise utilizada, em percentagem, para cada amostra estudada.

Além da cromatografia, também é possível estimar a pureza de materiais por DSC de forma bastante simples e rápida (ATTIA; ABDEL-MOETY; ABDEL-HAMID, 2017). No entanto, seu uso para essa finalidade não deve ser realizado de maneira isolada já que apresenta algumas limitações, como: necessidade de alto grau de pureza das substâncias, carece também de um pico de fusão bem definido, sem apresentar outros eventos térmicos que interferem com o ponto de fusão do composto (WANG et al., 2021). Então de forma complementar, também foi calculado a pureza dos nitróxidos através da equação de Van't Hoff do evento de fusão com auxílio do software *Specialty library* (Figura 22).

Figura 22- Curvas DSC obtida a $10^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ para o TEMPOL (A) e BZTEMPOL (B)

Fonte: autor, 2021

Na Tabela 15 verificamos diferenças entre os valores de pureza conforme o nitróxido e, entre as diferentes técnicas. A técnica LC-MS é capaz de detectar substâncias que não apresentem grupos cromóforos, porém, estejam na forma ionizada durante as análises, o que justifica as diferentes purezas encontradas. Foram detectados diferentes estados de ionização para o BZTEMPOL e TSTEMPOL, portanto a pureza cromatográfica destas substâncias a partir da técnica LC-MS, foi determinada pela soma das contribuições das diferentes formas ionizáveis detectadas para cada análises (Tabela 15). Assim, obteve-se um percentual de pureza de 100% para BZTEMPOL (22% da forma radicalar e 78% da forma reduzida) não sendo detectada impureza. Para o TSTEMPOL o somatório das contribuições para as duas formas ionizáveis detectadas foi de 88,63%, sendo detectado uma impureza em 7 min com teor de 11,83%. A técnica LC-DAD não foi capaz de detectar, durante análise exploratória, a impureza

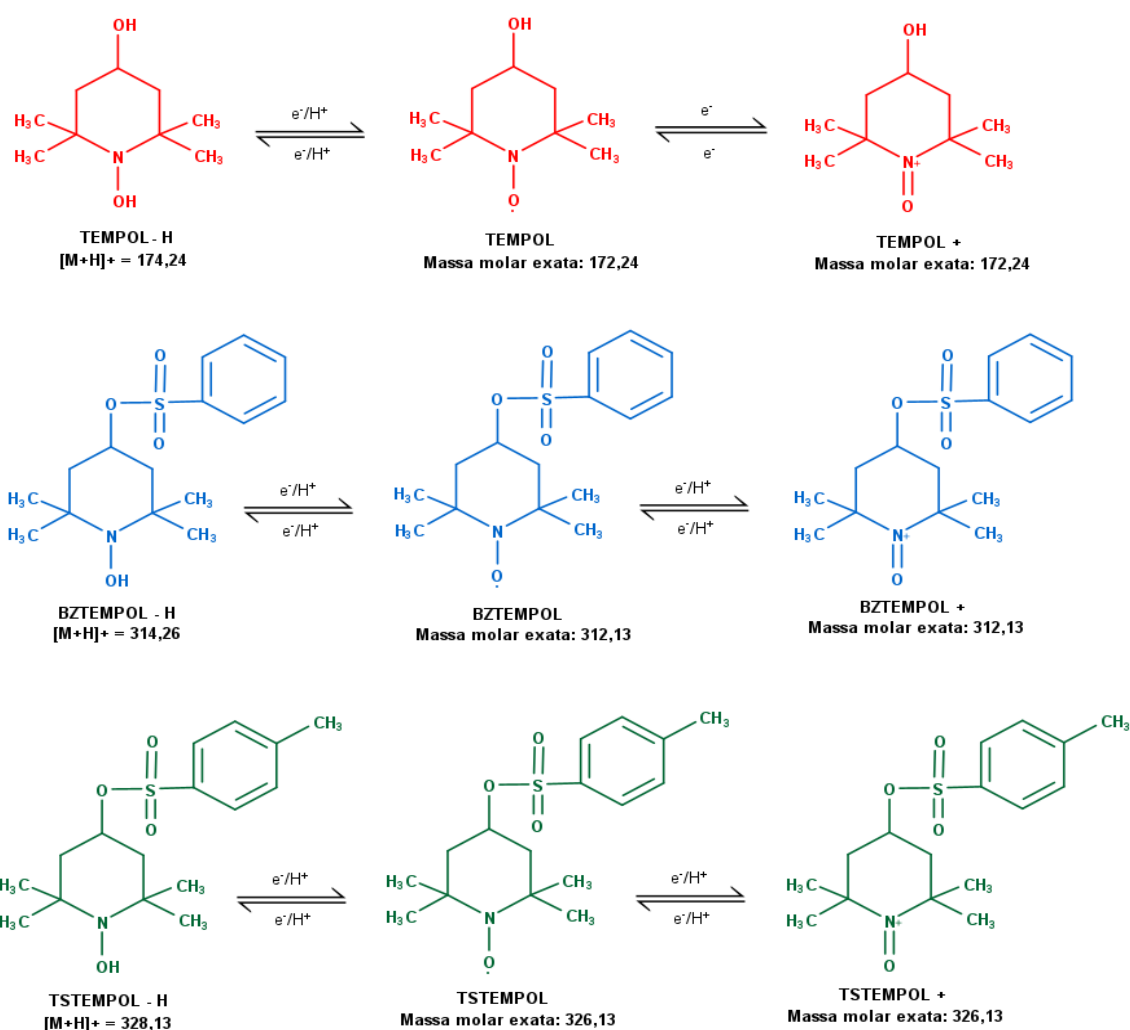
para o TEMPOL, apresentando teor em LC-MS de 96%, com uma impureza detectada em 3, 5min. Quanto aos resultados obtidos por DSC, podemos observar na tabela que o TEMPOL apresentou pureza de 99% e o BZTEMPOL 97%. Foram calculados os valores de pureza apenas para esses dois nitróxidos, pois apresentaram picos de fusão bem definidos sem nenhum evento térmico próximo, diferente do TSTEMPOL.

Estes resultados evidenciam que avaliação da pureza de uma substância deve ser utilizados diversas técnicas analíticas, já que os valores obtidos por DSC e por UHPLC-DAD E UHPLC-MS-MS não foram equivalentes.

5.8 IDENTIFICAÇÃO DOS NITRÓXIDOS POR LC-MS E ESTUDOS DE FRAGMENTAÇÃO

Para garantir a identidade molecular e pureza das amostras estudadas, foi realizado uma análise por cromatografia líquida acoplada ao espectrômetro de massas, com um detector de massas do tipo linear triplo quadrupolo *ion trap* de alta resolução. Quando em solução e durante a ionização por eletroionização, os nitróxidos sofrem reações de transferência de um elétron, originando formas reduzidas (hidroxilaminas) e oxidadas (oxo-amônio) (Figura 23).

Figura 23- Estado reduzido e oxidado dos nitróxidos após eletroionização, apresentando valores de massa molar exata (g/mol)

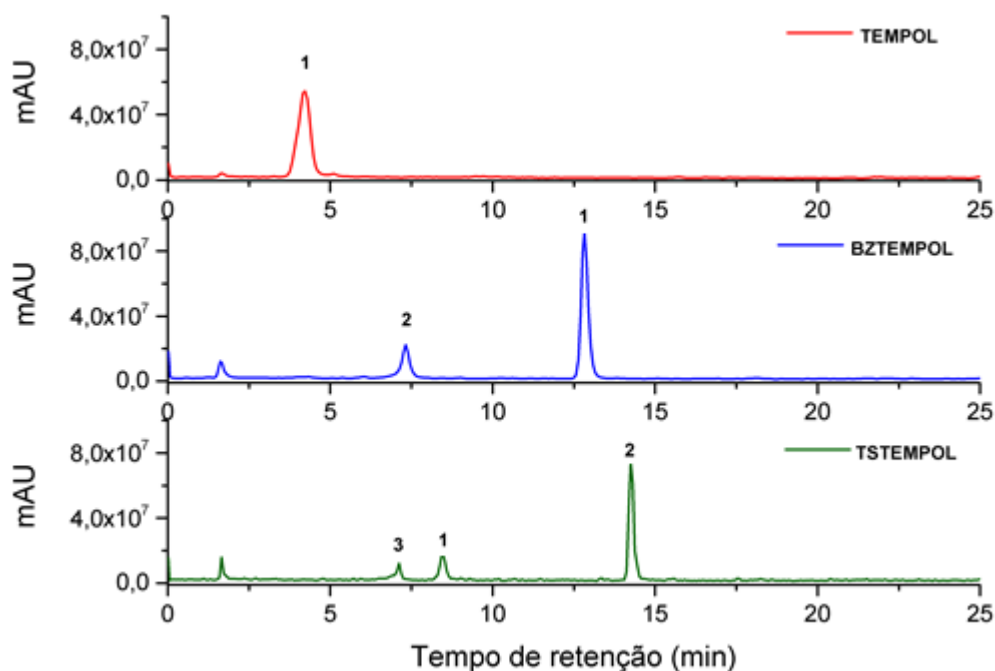


Fonte: autor, 2021

Pennington, Cohen, Tian e Boulineau (2015) desenvolveram um método por LC-MS para identificação de um nitróxido denominado TEMPO e observaram que a eficiência de ionização foi considerada muito maior para a forma reduzida desse nitróxido quando comparada as outras duas formas, devido ao nitrogênio básico. Desta forma, para análises LC-MS foram utilizadas as mesmas condições e fases móveis utilizadas no UHPLC/DAD, com inclusão de ácido fórmico (agente redutor) em ambas as fases móveis objetivando a manutenção da estabilidade dos nitróxidos estudados durante a análise.

A figura 24 apresenta o cromatograma de íons Totais (TIC) obtido para cada um dos nitróxidos em modo positivo, a partir do qual foi extraído o espectro de massas (MS1) para os picos apresentados.

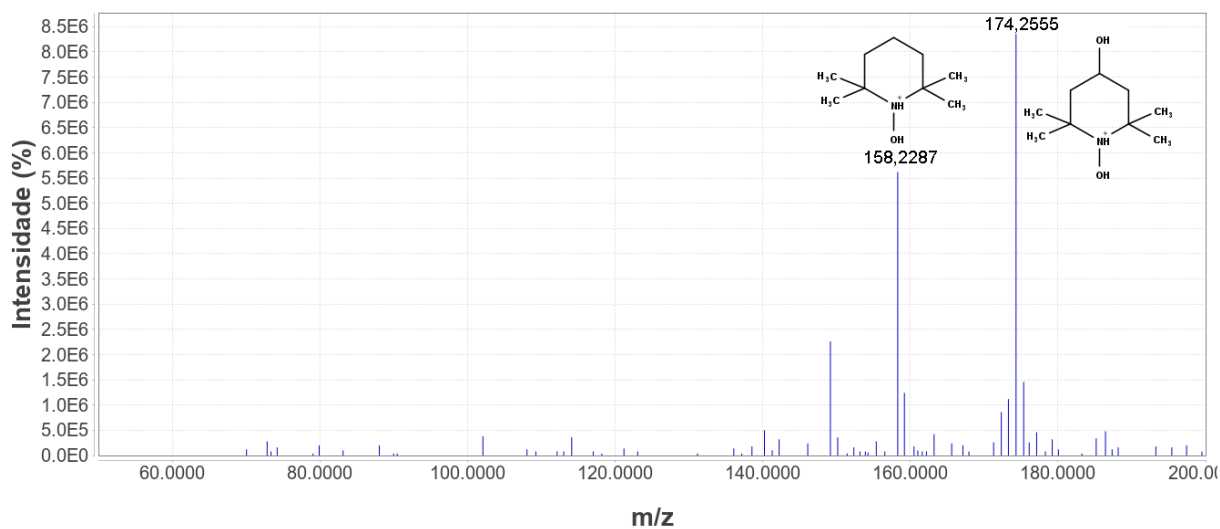
Figura 24- Cromatograma de íons totais obtido para o TEMPOL (1- forma reduzida), BZTEMPOL (1- forma radicalar e 2- forma reduzida), E TSTEMPOL (3- impureza, 1- forma reduzida e 2- forma radicalar)



Fonte: autor, 2021

O TEMPOL (1) foi detectado em aproximadamente 3 minutos com uma impureza em 3,5 minutos (Figura 24). A transição iônica (íon precursor-íon produto) escolhida para caracterização do TEMPOL foi de razão massa/carga de 174,2555 (Figura 25), atribuída ao TEMPOL protonado $[M+H]^+$, em sua forma mais estável (reduzida), resultando em um sinal com qualidade e abundância satisfatória. Salientamos que é evidente a existência de fragmentação parcial do TEMPOL na fonte de ionização em virtude da detecção de outras razões massa/carga, tal como $m/z = 158,2287$.

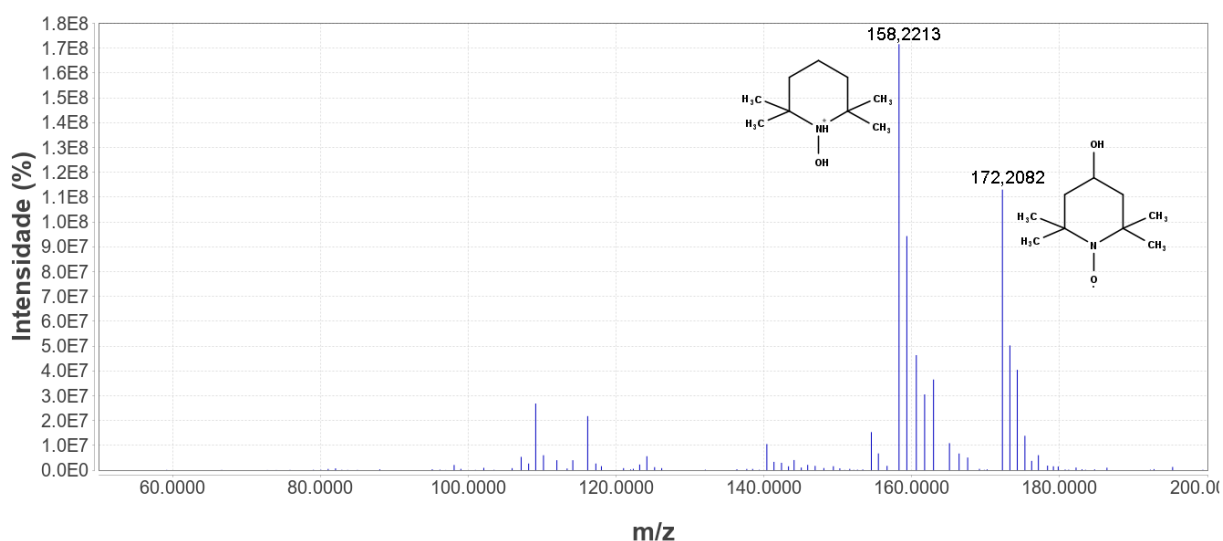
Figura 25 – Espectro MS1 do Íon precursor para o TEMPOL a 3 min na faixa de 50 – 200 m/z



Fonte: autor, 2021

A impureza detectada para o TEMPOL é sugestiva de resíduos provenientes da rota sintética, já que, conforme demonstrado no espectro de massa (Figura 26) o íon de razão massa/carga de 158,2212 corresponde ao peso molecular do TEMPO, reagente utilizado durante a síntese do TEMPOL. Como o grau de conversão durante esse processo não foi 100% (rendimento de 70%), foi possível detectá-lo nos espectros obtidos na análise por LC-MS.

Figura 26– Espectro MS1 do Íon da impureza do TEMPOL a 4 min na faixa de 50 – 200 m/z

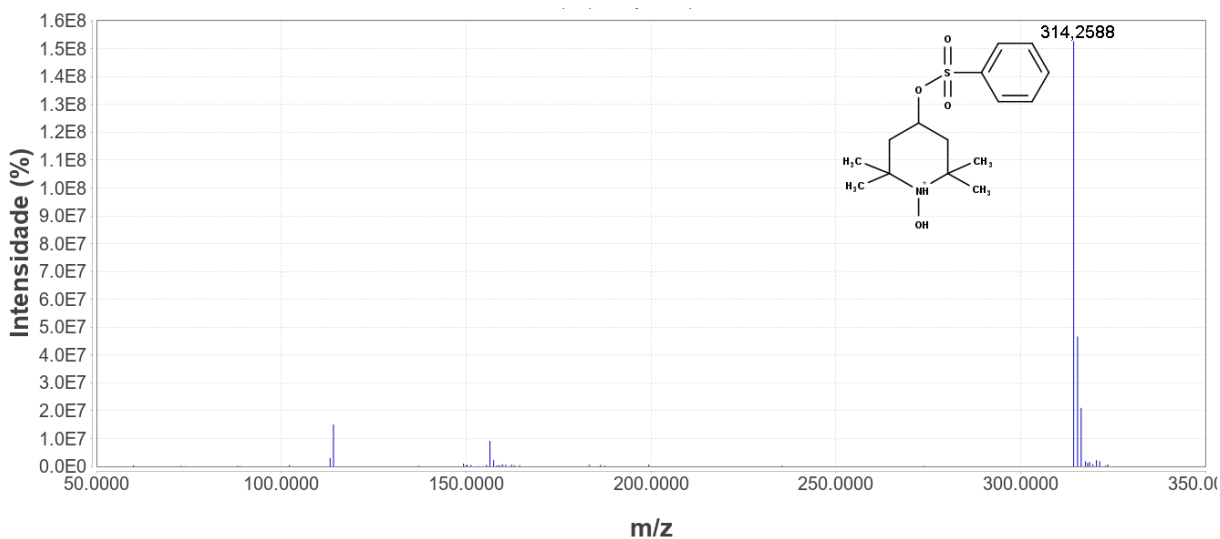


Fonte: autor, 2021

Para BZTEMPOL foram detectados 2 picos referentes a dois estados de ionização: em 7 minutos em sua forma reduzida protonada (1), bem como em 12 minutos em sua forma radicalar (2) (Figura 24). A transição iônica (íon precursor-íon produto) escolhida para

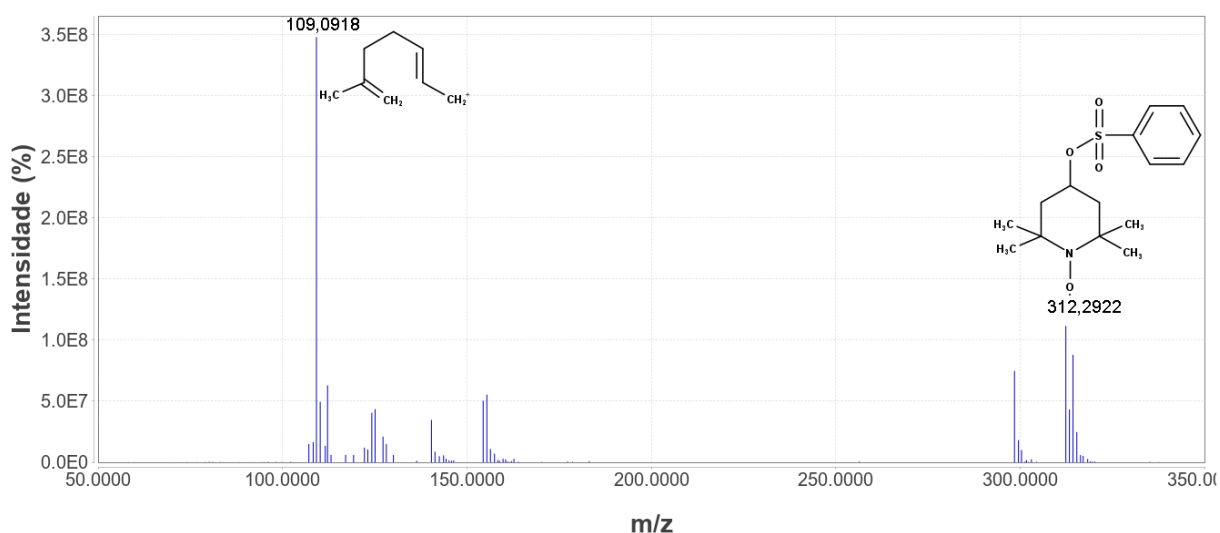
caracterização do BZTEMPOL foi de razão massa/carga de 314,2588 (Figura 27), atribuída ao BZTEMPOL protonado $[M+H]^+$ e a de m/z de 312,2922, referente a sua forma radicalar $[M]^\bullet$ (Figura 28), com ionização na fonte formando o íon de $m/z = 109.0918$. Ambos estados de ionização resultaram sinal com qualidade e abundância satisfatória e por essa razão ambos foram caracterizados.

Figura 27 – Espectro MS1 do Íon precursor para o BZTEMPOL a 7 min na faixa de 50 – 350 m/z



Fonte: autor, 2021

Figura 28 – Espectro MS1 do Íon precursor para BZTEMPOL a 12 min na faixa de 50 – 350 m/z



Fonte: autor, 2021

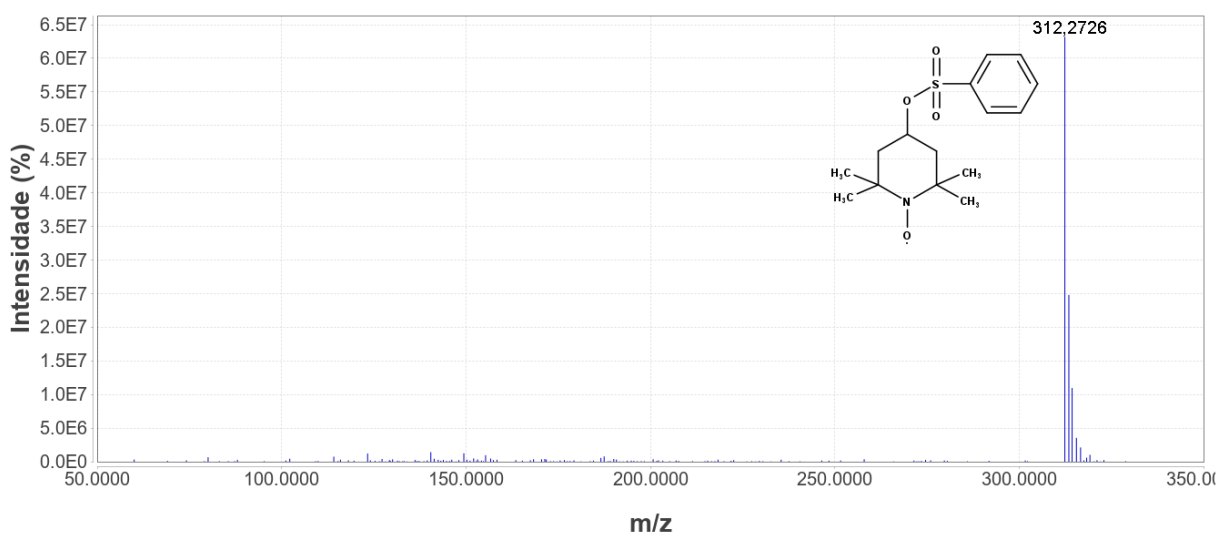
Por fim, para o TSTEMPOL foram detectados 3 picos, sendo um em aproximadamente 7 min, atribuído a uma impureza com $m/z = 312,2726$, e os demais referentes a dois estados de ionização: em 8 minutos atribuído a forma reduzida ($m/z = 328,2259$) e em 14 minutos atribuída

a sua forma radicalar ($m/z = 326,3246$) (Figura 24), perfil semelhante ao apresentado pelo BZTEMPOL.

Para a impureza detectada para o TSTEMPOL, sugere-se contaminação durante o processo de síntese, isso porque o íon de razão massa/carga de 312,2776 (Figura 29) corresponde ao peso molecular do BZTEMPOL, cujo reagente utilizado para sua síntese diferencia-se do TSTEMPOL apenas por um grupamento metil.

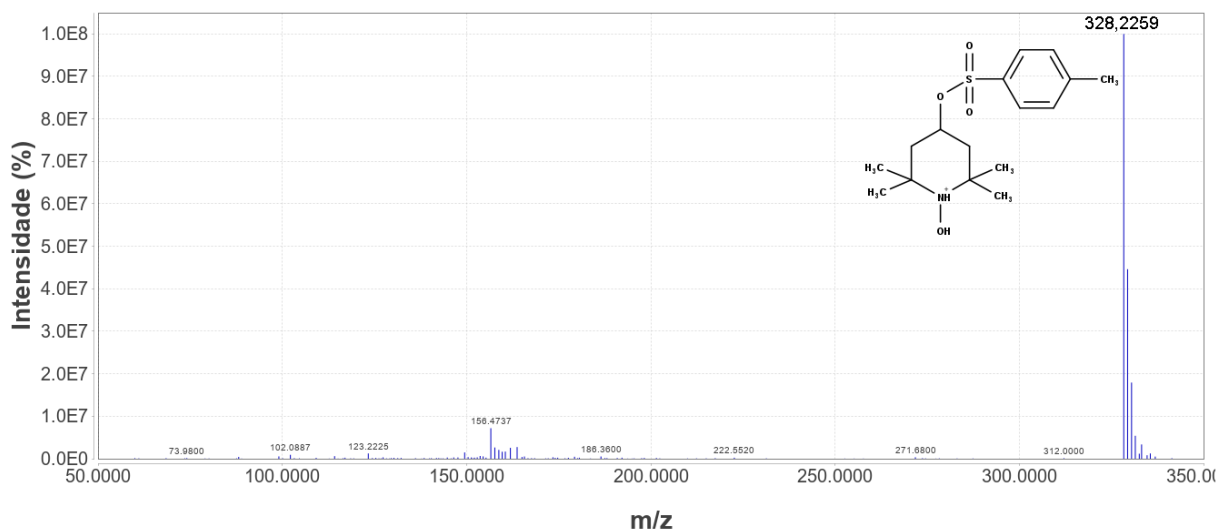
Já transição iônica (íon precursor-íon produto) escolhida para caracterização do TSTEMPOL foi de razão massa/carga de 328,2259 (Figura 30), atribuída a sua forma reduzida (protonado $[M+H]^+$) e a de razão massa/carga de 326,3245 (Figura 31), relativo ao TSTEMPOL, em sua forma radicalar, já que ambos resultaram em um sinal com qualidade e abundância satisfatória. Também foi verificado fragmentação parcial para o TSTEMPOL na fonte de ionização em virtude da detecção de outras razões massa/carga para a forma radicalar com formação de íon de $m/z = 109,0800$ e $m/z = 155,3526$.

Figura 29 – Espectro MS1 do Íon precursor para TSTEMPOL a 7 min na faixa de 50 – 350 m/z



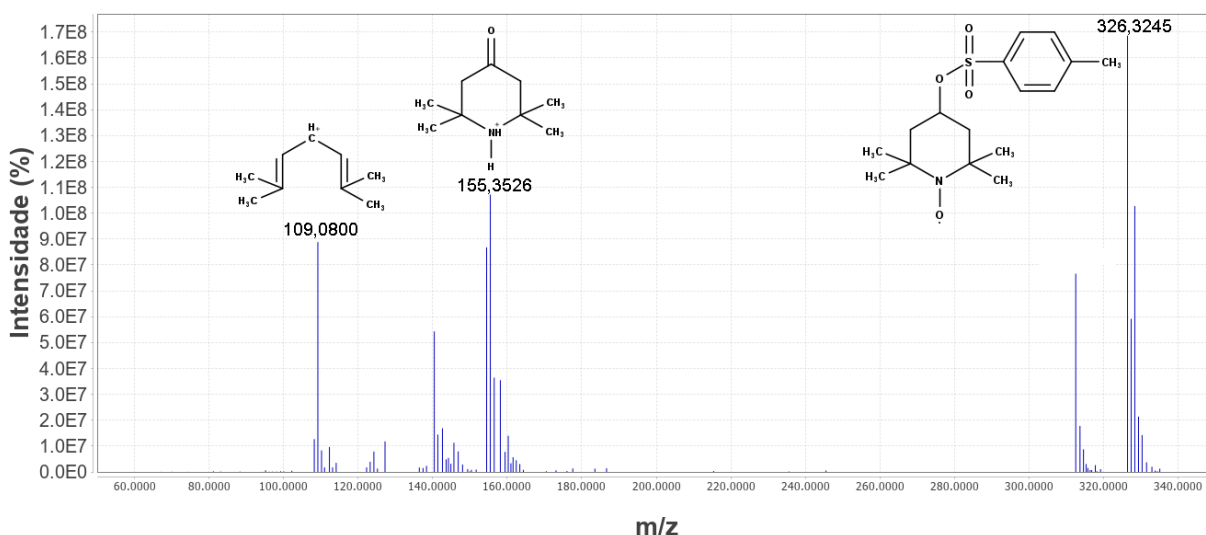
Fonte: autor, 2021

Figura 30 – Espectro MS1 do Íon precursor para TSTEMPOL a 8 min na faixa de 50 – 350 m/z



Fonte: autor, 2021

Figura 31 – Espectro MS1 do Íon precursor para TSTEMPOL a 14 min na faixa de 50 – 350 m/z



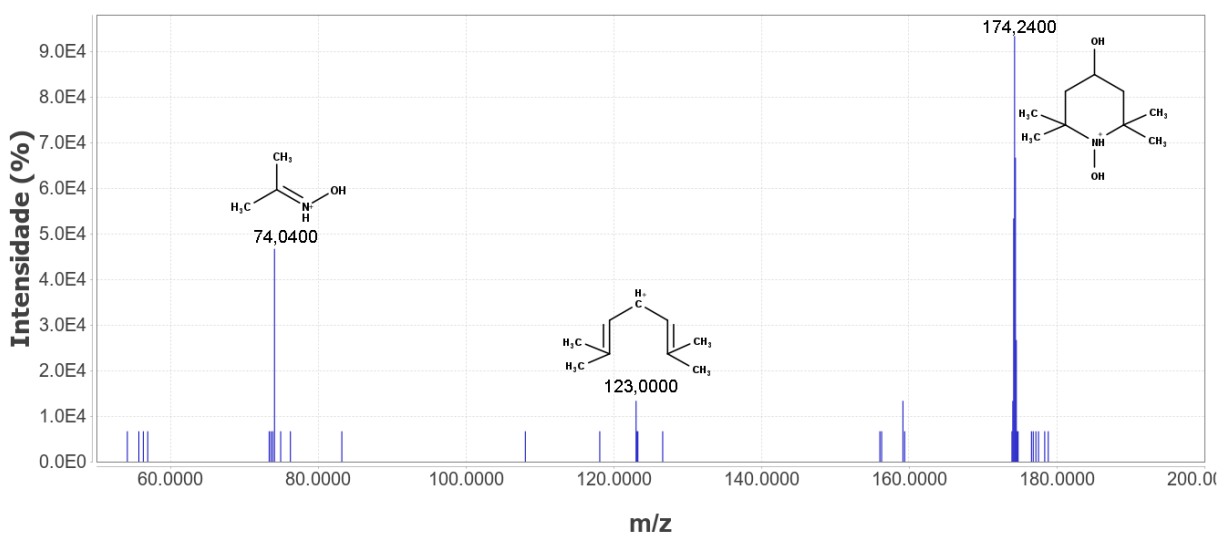
Fonte: autor, 2021

Uma vez identificado o íon precursor para cada uma das formas ionizadas dos nitróxidos, passou-se a caracterização dos produtos de fragmentação formados através da utilização de duas configurações de energia de colisão: 20 e 35eV cujos espectros de massa (MS2) foram agrupados em figuras conforme o nitróxido estudado.

Para o TEMPOL, espectros MS2 são apresentados nas figuras 31 e 33 e as sugestões de estrutura química para os fragmentos formados. Evidenciamos que o perfil de fragmentação diferiu com o aumento da energia de colisão. A tabela 16 apresenta a fórmula molecular, massa molecular, razão massa/carga real e teórica e erro puro, para o íon precursor e os íons produto determinados. A hidroxilamina decorrente da perda do grupo nitro é o íon produto mais estável

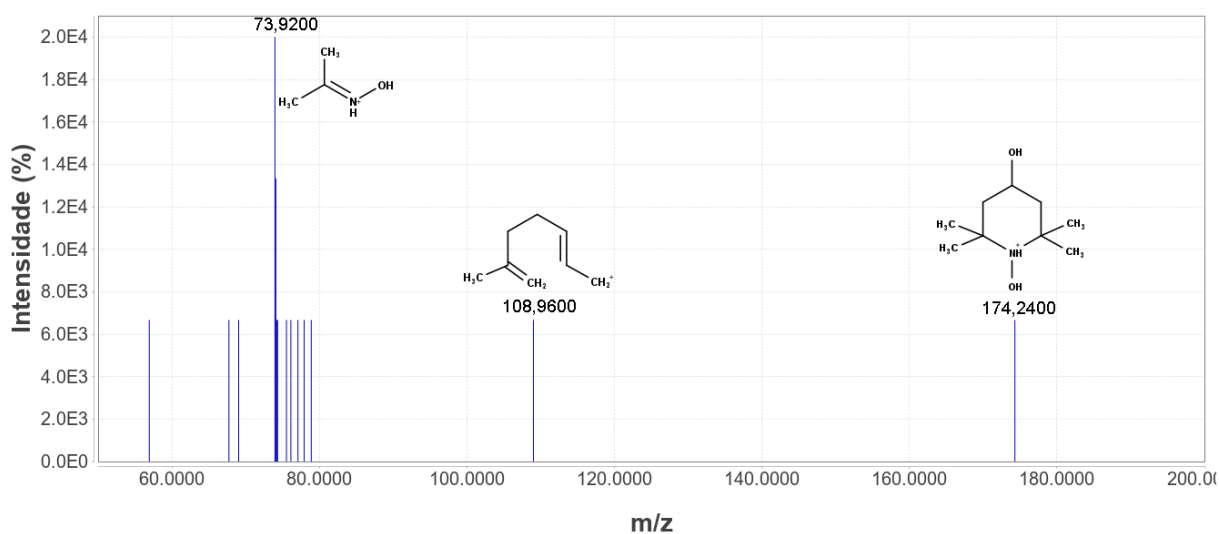
e abundante, sendo os demais subprodutos decorrentes da ausência do grupo nitro. Esse perfil de fragmentação corrobora com estudos já realizados na literatura para o TEMPOL (SMITH et al., 2000; GAUDEL-SIRI et al., 2019), onde também verificamos a formação dos íons produtos: TEMPOL reduzido (m/z :174,2400), acetona oxima protonada (m/z :74,0400) e dois íons produtos de razão massa carga de m/z :123,0000 e m/z :108,9600 decorrente da perda da hidroxilamina.

Figura 32 – Espectro dos Íons produtos do TEMPOL a 3 min na faixa de 50 – 200 m/z com energia de colisão de 20



Fonte: autor, 2021

Figura 33 – Espectro dos Íons produtos do TEMPOL a 3 min na faixa de 50 – 200 m/z com energia de colisão de 35



Fonte: autor, 2021

Tabela 16 - Elucidação de possíveis subprodutos do TEMPOL por ESI

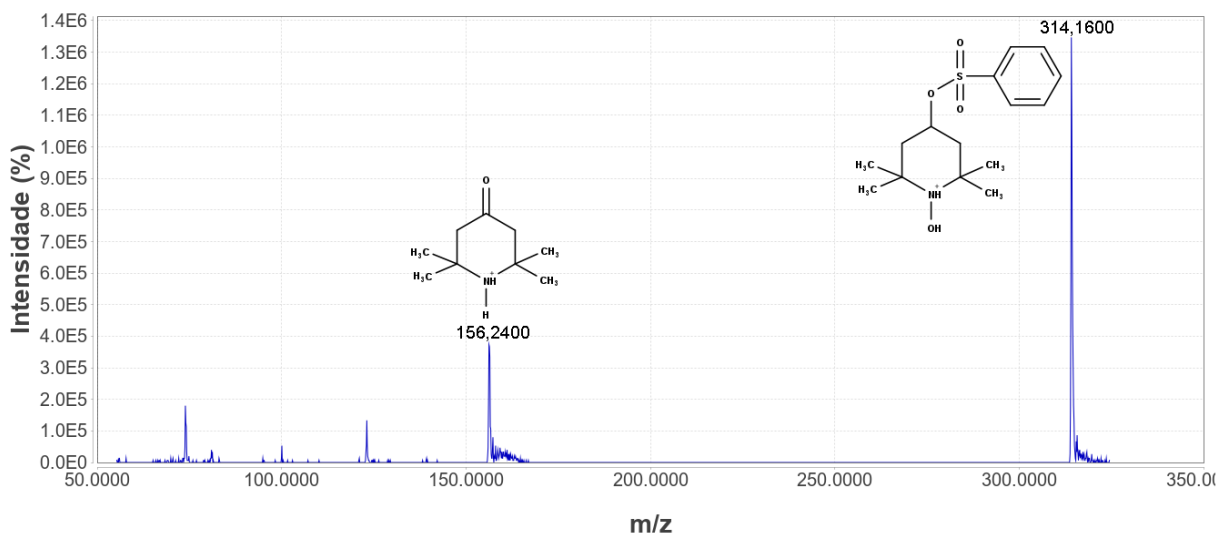
Íon precursor (<i>m/z</i>)	Íon produto	Fórmula molecular	<i>m/z</i> Teórica	<i>m/z</i> Experimental	Erro (ppm)
174,25	1	C ₉ H ₂₀ NO	158,1539	158,228	0,0748
	2	C ₉ H ₂₀ NO ₂	174,1488	174,2555	0,1067
	3	C ₃ H ₈ NO	74,0600	74,0400	-0,02
	4	C ₉ H ₁₅	123,1168	123,0000	-0,1168
	5	C ₈ H ₁₃	109,191	108,9600	0,8661

Fonte: autor, 2021

Para o BZTEMPOL, como dito, no TIC foi observado dois picos e, por essa razão, foi feita a caracterização da sua forma reduzida (*m/z*: 314,2588) e sua forma radicalar (*m/z*: 312,2922). Como não há dados na literatura referente ao mecanismo de fragmentação desse nitróxido, sugestões de possíveis produtos foram feitas baseadas na fragmentação do TEMPOL.

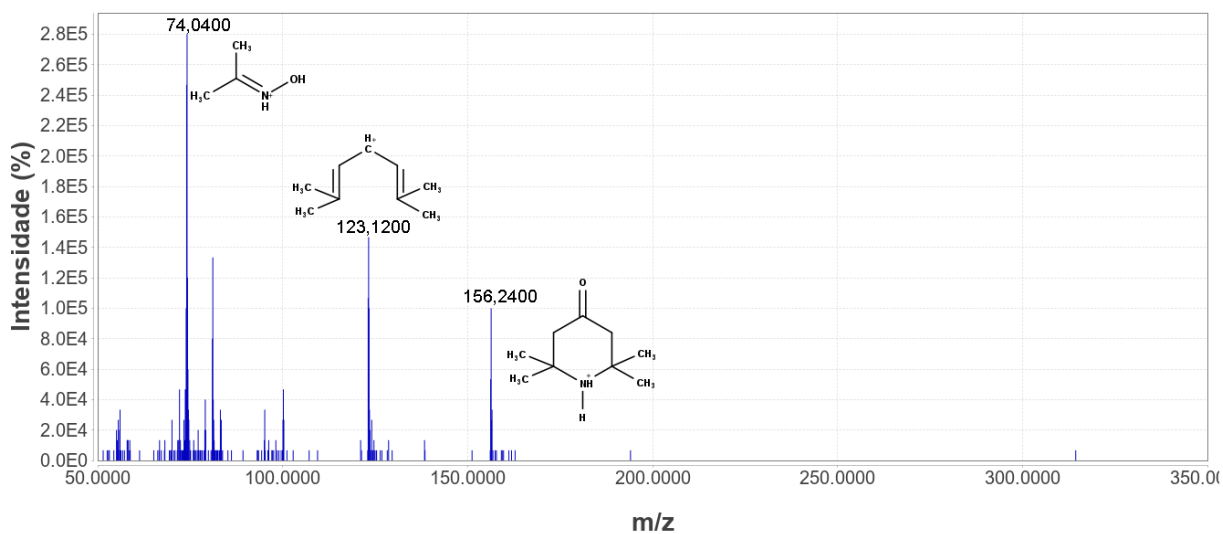
Com isso, na figura 34 (CE=20) nota-se a presença do mesmo fragmento encontrado para o TEMPOL com razão *m/z* de 74,92 correspondente a acetona oxima protonada. Um outro produto, possivelmente formado pela fragmentação do grupo sulfóxido, corresponde ao nitróxido: 4-amino-2,2,6,6-tetrametilpiperidina (*m/z*:156,2400) que também foi observado por Marshall et al. (2011). E, adicionalmente um íon com *m/z* de 123,1200 que sugerimos tratar-se do produto da fragmentação do ciclohexano, após a saída da hidroxilamina. Para esta energia de colisão a fragmentação não foi completa e, um sinal intenso para a forma reduzida do BZTEMPOL (*m/z*=314,1600) ainda foi detectado. Os mesmos íons foram encontrados quando energia de colisão foi aumentada para 35 (Figura 35). Os valores de erro inferiores a 1 ppm fornecem confiabilidade as fórmulas moleculares propostas (Tabela 17).

Figura 34 – Espectro dos Íons produtos do BZTEMPOL a 7 min na faixa de 50 – 350 m/z com energia de colisão de 20



Fonte: autor, 2021

Figura 35 – Espectro dos Íons produtos do BZTEMPOL a 7 min na faixa de 50 – 350 m/z com energia de colisão de 35



Fonte: autor, 2021

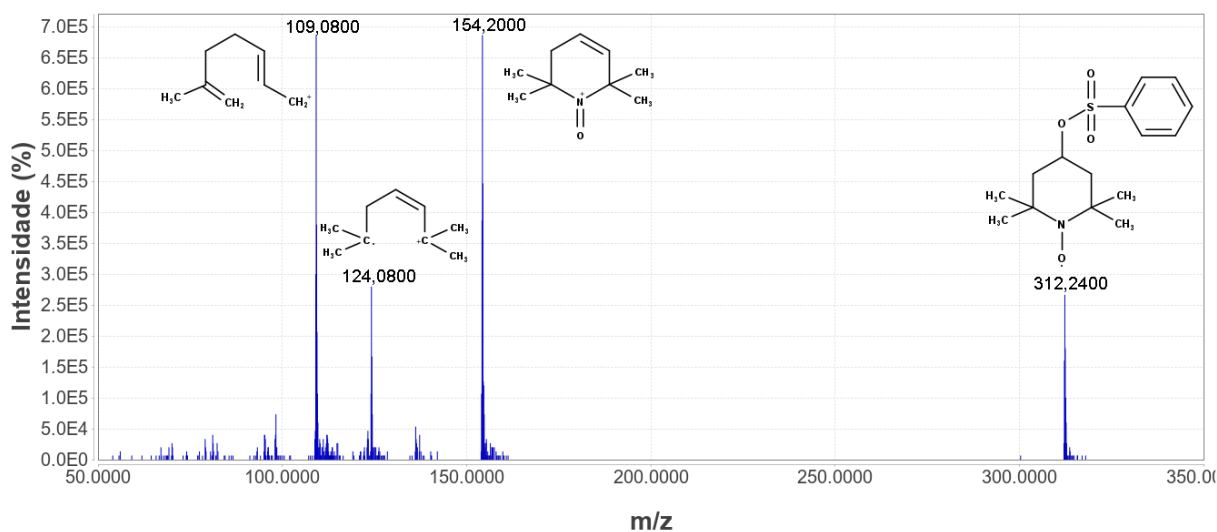
Tabela 17 - Elucidação de possíveis subprodutos da forma reduzida do BZTEMPOL ($T_R = 7$ min) por ESI

Íon precursor (m/z)	Composto	Fórmula molecular	m/z Teórica	m/z Experimental	Erro (ppm)
314,25	1	$C_{15}H_{24}NO_4S$	314,1420	314,2588	0,1168
	2	C_3H_8NO	74,0600	74,0400	-0,02
	3	$C_9H_{18}NO$	156,1382	156,2400	0,1018
	4	C_9H_{15}	123,1168	123,1200	0,0032

Fonte: autor, 2021

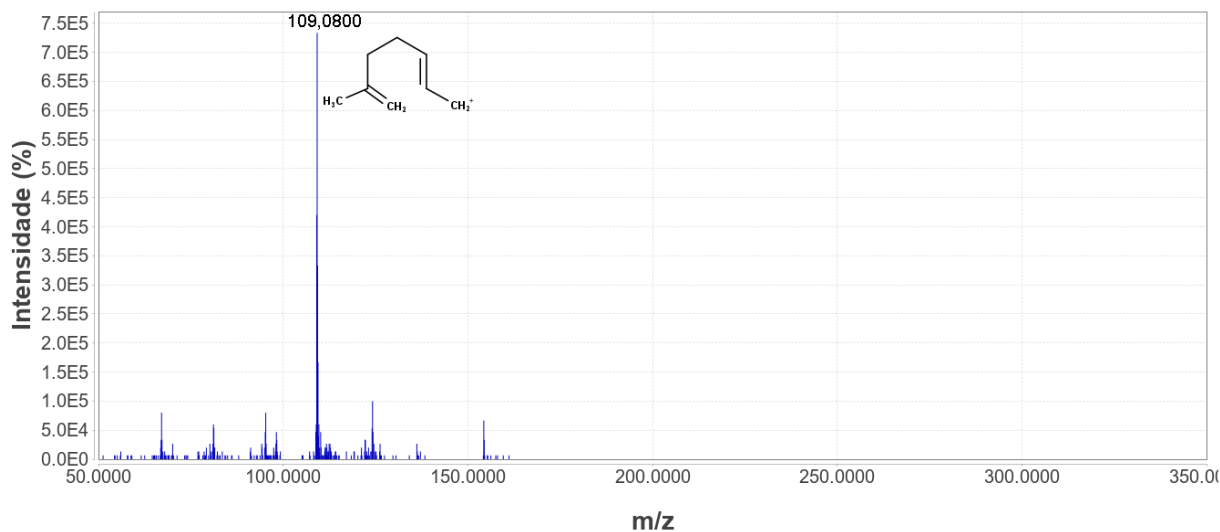
Por fim, o pico em 12 minutos identificado no TIC do BZTEMPOL (figura 24) tratava-se do BZTEMPOL em sua forma radicalar (312,1269). Na figura 36, encontramos os íons produtos apresentados para o íon precursor descrito. Os íons com m/z de 109,0800, 124,0800 e 154,2000 correspondem a formas fragmentadas do nitróxidos de piperidina (SMITH et al., 2000). O fragmento correspondente a forma radicalar do BZTEMPOL com m/z de 312,2400 também é observado. Com o aumento da energia de colisão (35kV) (Figura 37) observamos uma abundância proeminente do fragmento de m/z 109,0800, com a detecção reduzida dos demais fragmentos anteriormente observados, além da total fragmentação do íon precursor que não foi detectado. Na tabela 18 está elucidado os possíveis subprodutos da forma radicalar do BZTEMPOL por ESI

Figura 36 – Espectro dos Íons produtos do BZTEMPOL a 12 min na faixa de 50 – 350 m/z com energia de colisão de 20



Fonte: autor, 2021

Figura 37 – Espectro dos Íons produtos do BZTEMPOL a 12 min na faixa de 50 – 350 m/z com energia de colisão de 35



Fonte: autor, 2021

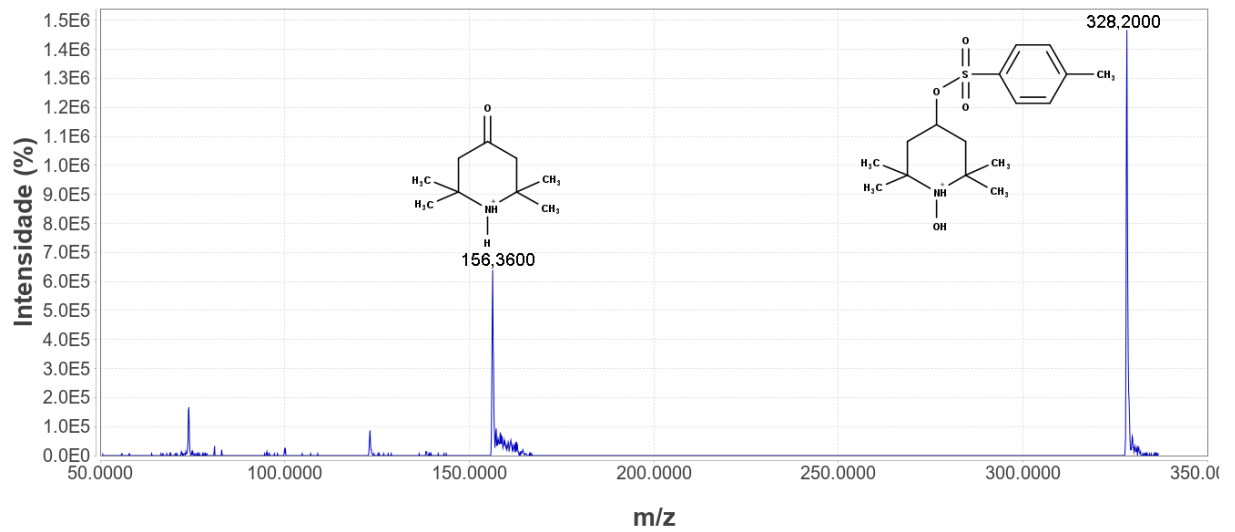
Tabela 18 - Elucidação de possíveis subprodutos da forma radicalar do BZTEMPOL ($T_R = 12$ min) por ESI

Íon precursor (m/z)	Composto	Fórmula molecular	m/z Teórica	m/z Experimental	Erro (ppm)
	1	C_8H_{13}	109,1910	109,0918	-0,0992
	2	C_9H_{16}	124,1246	124,0800	-0,0446
109,19	3	$C_9H_{16}NO$	154,1226	154,2000	0,0774
	4	$C_{15}H_{22}NO_4S$	312,1269	312,2400	0,1131

Fonte: autor, 2021

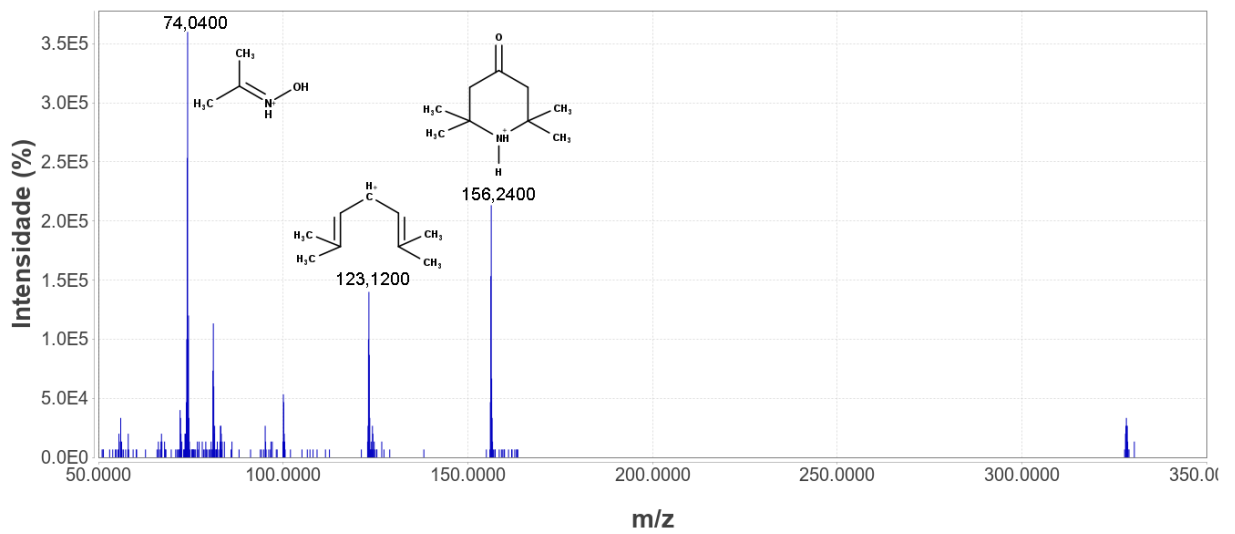
A estrutura química do TSTEMPOL é bastante semelhante ao BZTEMPOL, diferindo apenas do grupo metil na posição *para*, do anel aromático, sugerindo um perfil de fragmentação similar ao BZTEMPOL. Para o TSTEMPOL no tempo de retenção de 8 minutos foi possível observar íons produtos referentes a forma reduzida ($m/z = 328,2000$), além de fragmentos dos nitróxidos de piperidina ($m/z = 123,1200$ e $74,0400$) nas energias de colisão 20 e 35. O fragmento correspondente ao nitróxido 4-amino-2,2,6,6-tetrametilpiperidina com razão massa carga de 156,3526, também foi detectado (Figura 38 e 39).

Figura 38 – Espectro dos Íons produtos do TSTEMPOL a 8 min na faixa de 50 – 350 m/z com energia de colisão de 20



Fonte: autor, 2021

Figura 39 – Espectro dos Íons produtos do TSTEMPOL a 8 min na faixa de 50 – 350 m/z com energia de colisão de 35



Fonte: autor, 2021

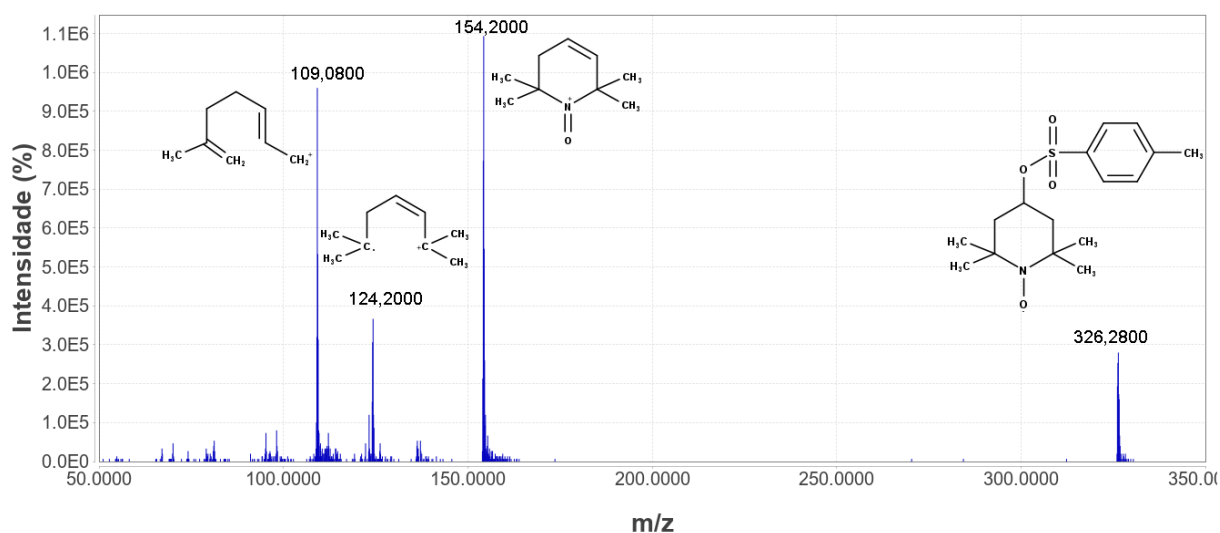
Tabela 19 - Elucidação de possíveis subprodutos da forma reduzida do TSTEMPOL ($T_R = 8$ min) por ESI

Íon precursor (m/z)	Composto	Fórmula molecular	m/z Teórica	m/z Experimental	Erro (ppm)
328,2000	1	$C_9H_{18}NO$	156,1382	156,3600	0,2318
	2	$C_{16}H_{26}NO_4S$	328,1577	328,2000	0,0423
	3	C_3H_8NO	74,0600	74,0400	0,0200
	4	C_9H_{15}	123,1168	123,1200	-0,0032

Fonte: autor, 2021

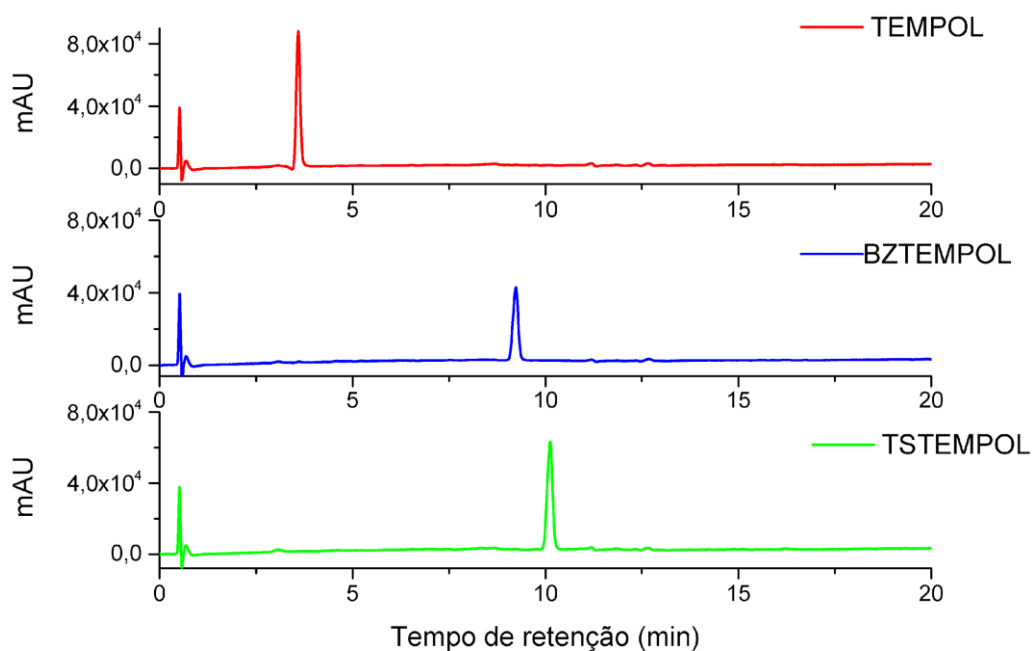
No tempo de retenção de 14 minutos, onde foi identificado o TSTEMPOL em sua forma radicalar ($m/z = 326,1426$), observamos que não houve alteração no padrão de fragmentação entre os íons produtos quando comparados com os obtidos na forma radicalar, para ambas as energias de colisão (Figuras 40 e 41). Da mesma forma que para o BZTEMPOL, não houve fragmentos referentes ao grupo sulfóxido apresentando, portanto, padrão de fragmentação bastante similar.

Figura 40 – Espectro dos Íons produtos do TSTEMPOL a 14 min na faixa de 50 – 350 m/z com energia de colisão de 20



Fonte: autor, 2021

Figura 42- Cromatogramas obtido para o TEMPOL, BZTEMPOL E TSTEMPOL no método gradiente

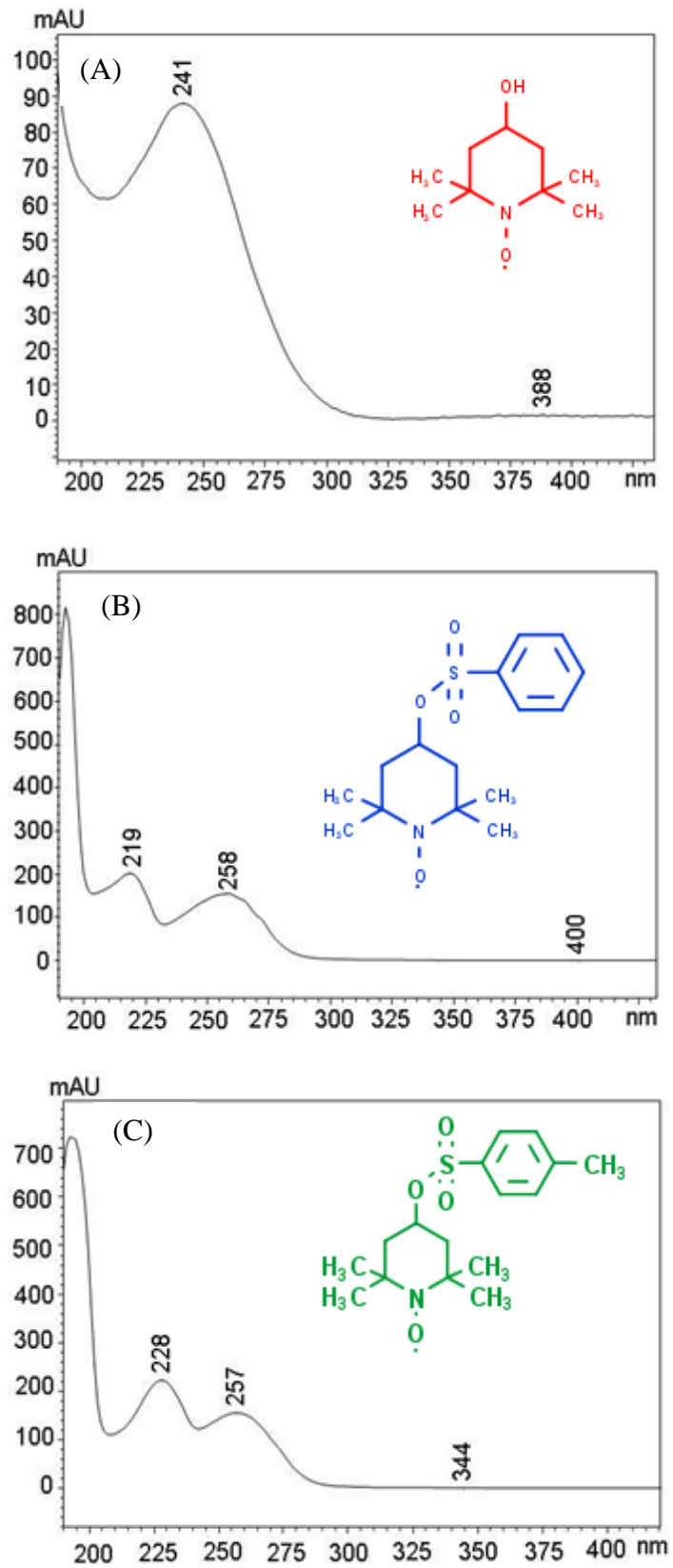


Fonte: autor,2021

Todos os nitroxídeos foram detectados e apresentaram os seguintes T_R : 3, 12 e 13 min, respectivamente para o TEMPOL, BZTEMPOL e TSTEMPOL. Buscando redução do tempo de análise e obtenção de método de quantificação no modo de eluição isocrático, foi determinado a melhor composição de fase orgânica (acetonitrila) através do cálculo da taxa de eluição conforme descrito na metodologia (PORTO et al, 2020), visto que este modo de eluição permite análises mais rápidas, além de melhor reprodutibilidade e robustez (SOLON, 2015), e valores encontrados foram: 10% para o TEMPOL, 40% para o BZTEMPOL e 43% para o TSTEMPOL.

Além disso, a partir dos espectros na região do ultravioleta para os picos majoritários detectados em cada uma das corridas foi determinado o melhor comprimento de onda para determinação isolada dos compostos. O TEMPOL apresenta apenas um pico máximo de absorção em 24 nm, BZTEMPOL E TSTEMPOL apresentam dois picos máximos de absorção cada, sendo 219 nm e 258 nm e 228 nm e 257 nm, respectivamente, conforme visualizados na Figura 43.

Figura 43- Espectros UV dos nitróxidos TEMPOL (A), BZTEMPOL(B) E TSTEMPOL (C)



Fonte: autor,2021

Feito isso, iniciou-se o processo de otimização do método cromatográfico afim de racionalizar os experimentos e obter resultados cromatográficos satisfatórios. Para tanto, utilizou-se da estratégia de desenho experimental do tipo Box-Behnken visando obtenção de um método com menor tempo de retenção e redução do fator de retenção (k), com valores ideais no intervalo de $2 < k < 10$ e fator de cauda entre $0,8 < T_f < 1,2$ (BRUCE; MINKKINEN; RIEKKOLA, 1998). O planejamento experimental do tipo Box-Behnken será apresentado no item subsequente.

5.10 OTIMIZAÇÃO A PARTIR DO DESENHO EXPERIMENTAL

O delineamento do desenho experimental foi realizado com auxílio do software *Statistica*[®], utilizando como ferramenta estatística o desenho experimental Box-Behnken design com 3 variáveis independentes (fatores), que foram temperatura do forno, fluxo de fase móvel e concentração de FMB, 3 níveis com 3 repetições no ponto central, totalizando 27 condições cromatográficas, que foram realizadas em triplicata ($n = 3$), de forma randomizada para minimizar o efeito de variáveis não previstas. Os planejamentos podem ser visualizados nas tabelas 21, 22 e 23 junto com os valores das respostas obtidas para cada respectiva condição.

Os demais parâmetros cromatográficos foram mantidos constantes: volume de injeção (1,0 μL), coluna cromatográfica, comprimento de onda do detector (240 nm) e concentração da amostra (0,1 mg. mL^{-1}).

Tabela 21- Desenho experimental 3³ Box-Behnken (27 condições com n = 3) para o TEMPOL e resultado médio para as respostas estudadas

Condição	T (°C)	Fluxo (mL/min ⁻¹)	FMB (%)	t _R (min)	T _f (UA)	A (UA)	k	N
1	25	0,3	5	3,41	1,27	184580	3	1494
2	25	0,5	5	2,12	1,02	112873	2	1453
3	25	0,7	5	1,56	1,09	91509	1	1317
4	25	0,3	10	1,52	1,27	199326	1	791
5	25	0,5	10	0,94	1,20	123502	0	736
6	25	0,7	10	0,69	1,30	92831	0	705
7	25	0,3	15	0,92	1,43	214344	0	579
8	25	0,5	15	0,57	1,45	118092	0	442
9	25	0,7	15	0,42	1,52	87337	0	402
10	30	0,3	5	3,25	1,12	186727	4	1456
11	30	0,5	5	1,99	1,40	118466	2	1435
12	30	0,7	5	1,47	1,51	145588	1	1118
13	30	0,3	10	1,48	1,31	206102	1	778
14	30	0,5	10	0,92	1,30	130481	0	739
15	30	0,7	10	0,68	1,35	96810	0	656
16	30	0,3	15	0,92	1,45	199120	0	478
17	30	0,5	15	0,57	1,45	120576	0	451
18	30	0,7	15	0,42	1,52	86377	0	403
19	35	0,3	5	3,1	1,08	214859	3	1268
20	35	0,5	5	1,92	1,17	119712	2	1320
21	35	0,7	5	1,41	1,29	97632	1	1177
22	35	0,3	10	1,46	1,28	212173	1	764
23	35	0,5	10	0,90	1,25	128159	0	664
24	35	0,7	10	0,94	1,32	93394	0	602
25	35	0,3	15	0,91	1,40	199580	1	566
26	35	0,5	15	0,56	1,43	118874	0	446
27	35	0,7	15	0,41	1,47	87833	0	394

T = Temperatura; FMB = Fase Móvel B; t_R = Tempo de retenção; T_f = Fator de cauda; A = Área do pico cromatográfico; k= Fator de retenção;

N= Número de pratos teóricos.

Fonte: autor, 2021

Tabela 22- Desenho experimental 3³ Box-Behnken (27 condições com n = 3) para o BZTEMPOL e resultado médio para as respostas estudadas

Condição	T (°C)	Fluxo (mL/min ⁻¹)	FMB (%)	t _R (min)	T _f (UA)	A (UA)	k	N
1	25	0,3	30	9,32	1,17	292412	25	2022
2	25	0,5	30	5,82	1,16	355341	9	2035
3	25	0,7	30	4,31	1,17	261282	6	1910
4	25	0,3	40	2,91	1,24	593947	4	1727
5	25	0,5	40	1,82	1,30	361815	2	1603
6	25	0,7	40	1,33	1,31	259517	1	1419
7	25	0,3	50	1,32	1,42	609601	1	839
8	25	0,5	50	0,82	1,59	382380	0	781
9	25	0,7	50	0,60	1,54	272959	0	670
10	30	0,3	30	8,53	1,21	601432	13	2036
11	30	0,5	30	5,35	1,24	366931	8	2026
12	30	0,7	30	3,99	1,23	265132	6	1916
13	30	0,3	40	2,73	1,25	595546	4	1626
14	30	0,5	40	1,70	1,33	363827	2	1499
15	30	0,7	40	1,25	1,37	260133	1	1365
16	30	0,3	50	1,27	1,50	619119	1	779
17	30	0,5	50	0,79	1,58	376398	3	688
18	30	0,7	50	0,57	1,55	272473	3	619
19	35	0,3	30	7,59	1,20	604907	20	2038
20	35	0,5	30	4,71	1,26	375597	20	2072
21	35	0,7	30	2,10	1,24	136010	6	1418,
22	35	0,3	40	2,51	1,22	592952	3	1612
23	35	0,5	40	1,55	1,28	360568	2	1498
24	35	0,7	40	1,14	1,32	257561	1	1412
25	35	0,3	50	1,11	1,44	464348	1	667
26	35	0,5	50	0,74	1,55	380956	0	645
27	35	0,7	50	0,55	1,56	271088	0	593

T = Temperatura; FMB = Fase Móvel B; t_R = Tempo de retenção; T_f = Fator de cauda; A = Área do pico cromatográfico; k= Fator de retenção;

N= Número de pratos teóricos.

Fonte: autor, 2021

Tabela 23- Desenho experimental 3³ Box-Behnken (27 condições com n = 3) para o TSTEMPOL e resultado médio para as respostas estudadas

Condição	T (°C)	Fluxo (mL/min ⁻¹)	FMB (%)	t _R (min)	T _f (UA)	A (UA)	k	N
1	25	0,3	35	8,33	1,21	548353	13	2034
2	25	0,5	35	5,30	1,24	337897	8	2011
3	25	0,7	35	3,97	1,23	246826	6	1864
4	25	0,3	45	2,76	1,36	582762	4	1509
5	25	0,5	45	1,69	1,39	354015	2	1379
6	25	0,7	45	1,24	1,38	254969	1	1235
7	25	0,3	55	1,29	1,39	561933	1	828
8	25	0,5	55	0,79	1,45	338954	0	728
9	25	0,7	55	0,59	1,50	263911	0	618
10	30	0,3	35	7,57	1,19	562995	12	2043
11	30	0,5	35	4,74	1,22	373508	7	2064
12	30	0,7	35	3,54	1,22	307411	5	1948
13	30	0,3	45	2,53	1,31	705692	3	1483
14	30	0,5	45	1,58	1,35	429117	2	1397
15	30	0,7	45	1,14	1,38	254732	1	1266
16	30	0,3	55	1,23	1,38	565677	1	787
17	30	0,5	55	0,76	1,45	352933	0	702
18	30	0,7	55	0,56	1,49	255548	0	619
19	35	0,3	35	6,91	1,17	575911	11	2107
20	35	0,5	35	4,66	1,21	427497	7	2072
21	35	0,7	35	3,18	1,18	316308	4	1997
22	35	0,3	45	2,08	1,28	525154	2	1418
23	35	0,5	45	1,53	1,31	432672	1	1363
24	35	0,7	45	1,08	1,33	312464	1	1238
25	35	0,3	55	1,17	1,34	730191	1	746
26	35	0,5	55	0,72	1,39	441275	0	664
27	35	0,7	55	0,73	1,39	443578	0	662

T = Temperatura; FMB = Fase Móvel B; t_R = Tempo de retenção; T_f = Fator de cauda; A = Área do pico cromatográfico; k= Fator de retenção;

N= Número de pratos teóricos.

Fonte: autor, 2021

Para avaliar a influência dos fatores na corrida cromatográfica, foram monitoradas algumas respostas: tempo de retenção, fator de retenção, número de pratos teóricos, fator de cauda e área. Os fatores foram codificados em nível mínimo (-1), ponto central (0) e máximo (+1) e com os dados utilizados na tabela da análise fatorial foi possível escolher o modelo adequado para prever a melhor condição cromatográfica.

A escolha do modelo foi realizada pela análise de Variância (ANOVA) e as medidas de correlação utilizadas para estimá-lo foi o coeficiente de determinação (R^2) e a soma de quadrados do erro para cada resposta cromatográfica avaliada. De forma que quanto mais próximo o R^2 da unidade e menor a soma de quadrados do erro, maior seria a qualidade do ajuste do modelo em questão (CZYRSKI; SZNURA, 2019). As Tabelas 24 a 26 apresentam os resultados da ANOVA para os nitróxidos estudados.

Tabela 24- Anova dos modelos para respostas cromatográficas do TEMPOL

Resposta	Modelo	Sem interação	Linear	Quadrático
Tempo de retenção	R^2	0,91738	0,98423	0,99881
	Erro	1,56547	0,29877	0,02246
Fator de retenção	R^2	0,94507	0,98883	0,99557
	Erro	1,96750	0,39994	0,15878
Número de pratos teóricos	R^2	0,98205	0,98781	0,99476
	Erro	69308	47071	20243
Área	R^2	0,93892	0,95869	0,9597
	Erro	$3,5 \times 10^9$	$2,4 \times 10^9$	$1,2 \times 10^9$
Fator de cauda	R^2	0,69915	0,73952	0,86148
	Erro	0,154182	0,133492	0,070988

Fonte: autor, 2021

Tabela 25- Anova dos modelos para respostas cromatográficas do BZTEMPOL

Resposta	Modelo	Sem interação	Linear	Quadrático
Tempo de retenção	R^2	0,91482	0,98775	0,99772
	Erro	11,2657	1,6200	0,3813
Fator de retenção	R^2	0,91513	0,98798	0,94886
	Erro	31,2135	4,4211	58,826
Número de pratos teóricos	R^2	0,99523	0,99757	0,98646
	Erro	37613	19157	10,4646
Área	R^2	0,89205	0,90892	0,89827
	Erro	$5,5 \times 10^{10}$	$4,7 \times 10^{10}$	$5,4 \times 10^{10}$
Fator de cauda	R^2	0,96605	0,98681	0,99121
	Erro	0,008584	0,003334	0,004825

Fonte: autor, 2021

Tabela 26- Anova dos modelos para respostas cromatográficas do TSTEMPOL

Resposta	Modelo	Sem interação	Linear	Quadrático
Tempo de retenção	R ²	0,91482	0,98775	0,99772
	Erro	11,2657	1,6200	0,3813
Fator de retenção	R ²	0,91513	0,98798	0,94886
	Erro	31,2135	4,4211	58,826
Número de pratos teóricos	R ²	0,99523	0,99757	0,98646
	Erro	37613	19157	10,4646
Área	R ²	0,89205	0,90892	0,89827
	Erro	5,5 x 10 ¹⁰	4,7 x 10 ¹⁰	5,4 x 10 ¹⁰
Fator de cauda	R ²	0,96605	0,98681	0,99121
	Erro	0,008584	0,003334	0,004825

Fonte: autor, 2021

Analisando as tabelas, pode-se observar que para todas as respostas cromatográficas avaliadas para o TEMPOL, BZTEMPOL E TSTEMPOL o modelo mais adequado para prever a melhor condição de análise é o quadrático e, portanto, foi escolhido para elaboração dos gráficos de Pareto e de superfície de resposta que serão apresentados no subtópico abaixo. Esses dados permitiram a interpretação de como cada fator influenciou em cada resposta, além de evidenciar as regiões que promovem acréscimo ou decréscimo da resposta.

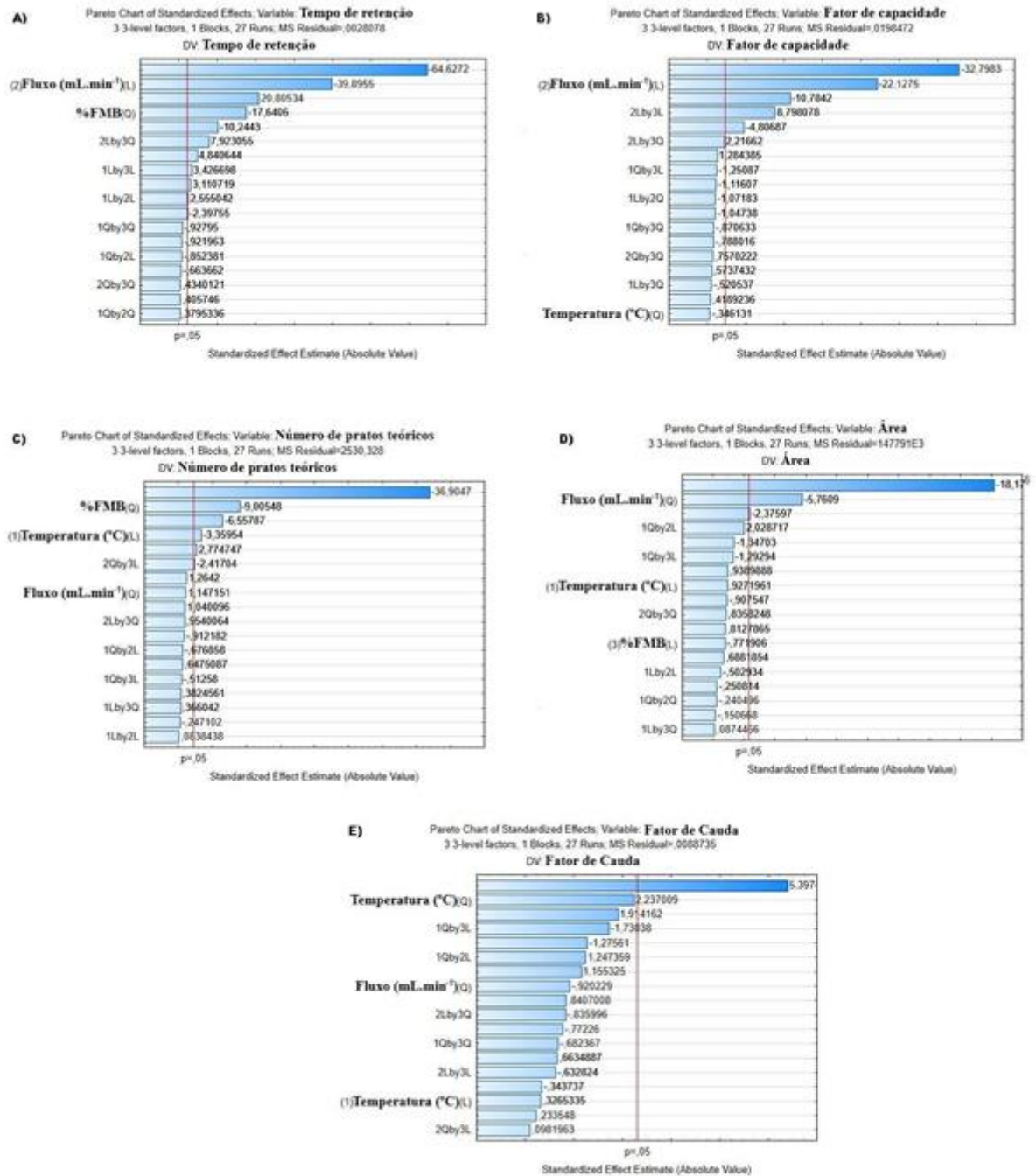
5.10.1 Análise da influência dos fatores através dos gráficos de superfície de resposta e Pareto para o TEMPOL

A. Análise da influência dos fatores através dos gráficos de Pareto para o TEMPOL

O gráfico de Pareto demonstra a influência estatisticamente significativa, Linear (L) e/ou quadrática (Q), que cada variável exerce na resposta avaliada (BARABADI et al., 2019)

A análise dos gráficos de Pareto, presentes na figura 44, evidenciou que o tempo de retenção sofre influência significativa pelo fator Fluxo, sendo essa influência desempenhada apenas de forma linear e, também, sofre influência do %FMB, porém de forma quadrática. Já o fator de retenção, sofre influência linear apenas pelo fluxo. Quanto as variações nos números de pratos teóricos, observa-se na figura 44 que majoritariamente a %FMB influencia nessa resposta de forma quadrática, porém há também, em proporções menores, a influência da temperatura de maneira linear. Já o parâmetro área, é influenciado exclusivamente pelo fator fluxo de forma quadrática. Por fim, o parâmetro fator de cauda demonstrou serem influenciados somente pelo fator temperatura de forma quadrática e pelo fator %FMB de forma quadrática, respectivamente.

Figura 44- Gráficos de Pareto do TEMPOL referentes às respostas: A) tempo de retenção, B) Fator de retenção, C) Número de pratos teóricos, D) Área, E) Fator de cauda. A linha vertical define 95% (p = 0,05) de intervalo de confiança



Fonte: autor, 2021

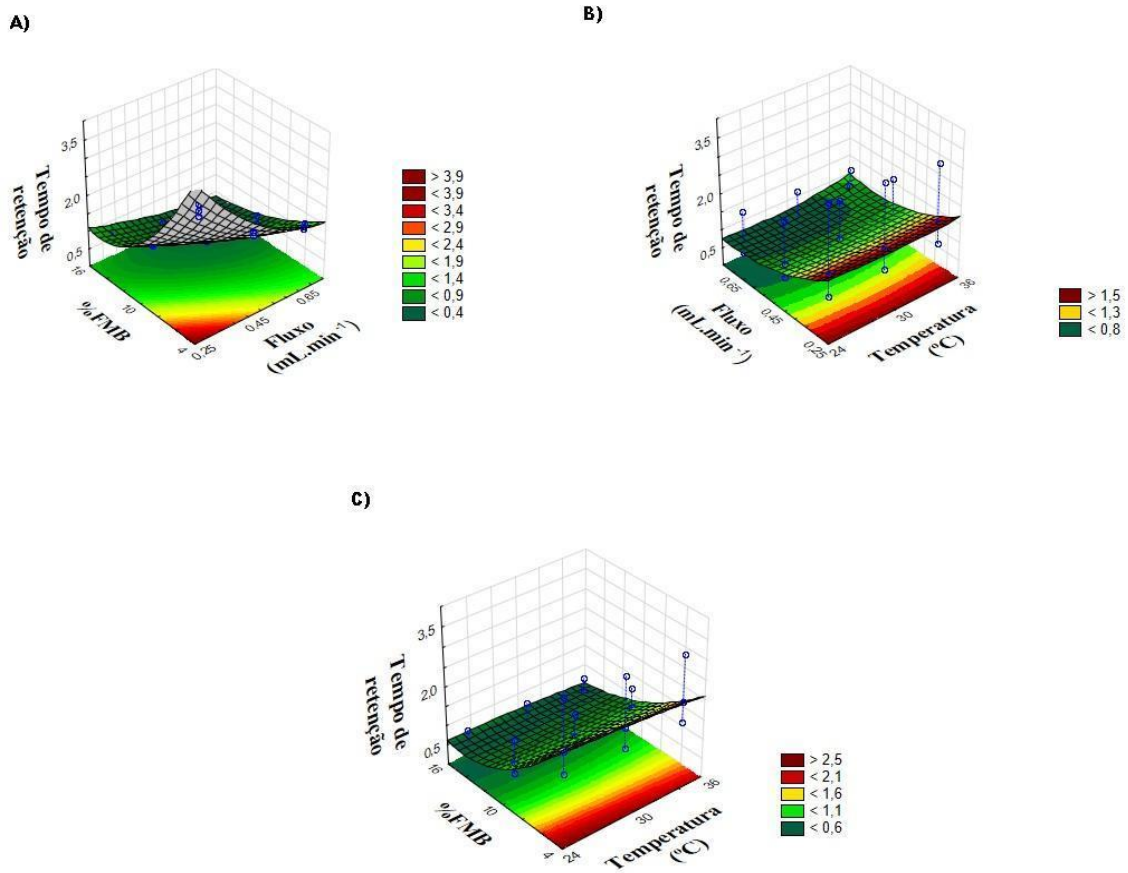
B. Análise da influência dos fatores através dos gráficos de superfície de resposta para o TEMPOL

Os gráficos de superfície de resposta demonstram como os fatores, estatisticamente significativos de Pareto, influenciam nas respostas e quais as regiões de combinações de fatores são ótimas para executar a análise (MOU et al., 2017).

a) Tempo de Retenção

Nas análises cromatográficas existe uma necessidade de corridas com menor tempo de retenção possível, objetivando otimização do tempo da análise e menor consumo de solvente (BULDUK, 2021). A Figura 45 evidenciou que o fator fluxo exerceu maior influência sobre o tempo de retenção, onde ele diminui com o aumento do fluxo. Isso, porque a fase móvel contendo o analito, irá deslocar-se mais rapidamente pela coluna e conseqüentemente irá diminuir sua interação, levando a tempos de retenção mais baixos. A proporção de solvente orgânico também influenciou de maneira inversamente proporcional, ou seja, quanto menor o %FMB maior o tempo de retenção do TEMPOL, já que a concentração de fase móvel promove alterações termodinâmicas no sistema responsável pela retenção do analito.

Figura 45- Gráficos de superfície de resposta para TEMPOL. Resposta: Tempo de retenção; Fatores: A) %FMB e Fluxo, B) %FMB e Temperatura, C) Fluxo e Temperatura.

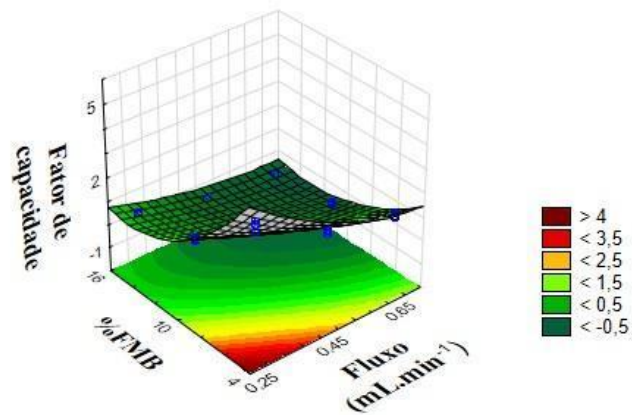


Fonte: autor, 2021

b) Fator de retenção

Outro fator que se correlaciona diretamente com o tempo da análise é o fator de retenção. Essa resposta demonstra a capacidade da coluna de reter o soluto durante a corrida, logo quanto maior o fator capacidade, maior será o tempo de retenção e conseqüentemente maior o tempo da análise e maior será o gasto de solventes (MOLDOVEANU; DAVID, 2013). A Figura 46 indica que o fluxo desempenha maior influência sobre o fator de retenção, onde o aumento do fluxo provoca redução do fator de retenção. Também fica evidente que o %FMB provoca um efeito negativo na resposta, já que sua redução prova um aumento no fator de retenção.

Figura 46- Gráfico de superfície de resposta para TEMPOL. Resposta: Fator de retenção; Fatores: %FMB e Fluxo

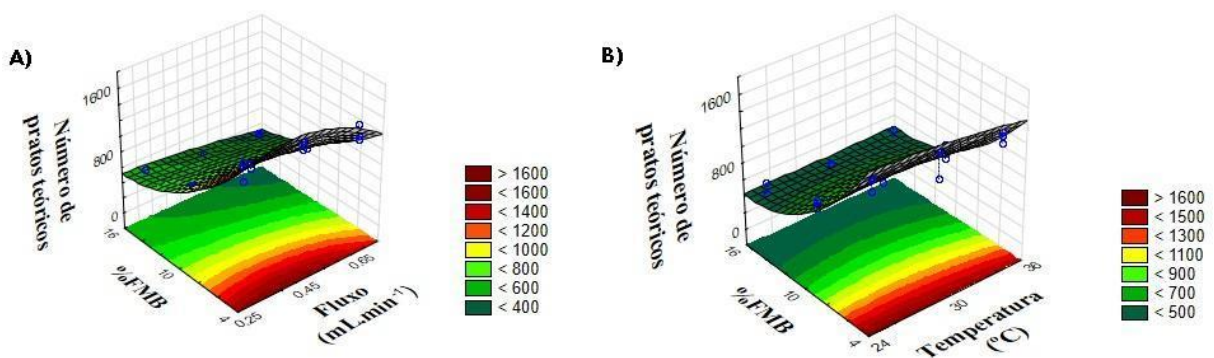


Fonte: autor, 2021

c) Número de pratos teóricos

A separação e identificação de forma mais eficiente dos analitos está diretamente associada com o número de pratos teóricos da coluna cromatográfica, onde colunas com números elevados de pratos são mais eficientes e originam picos considerados ideais: gaussianos (PETERSSON et al., 2011). A Figura 47 mostra que o fator %FMB desempenhou maior influência sobre número de pratos teóricos, onde ele aumenta com a redução do %FMB. A mesma observação foi feita no gráfico de Pareto. Como menores %FMB provocam redução na força de eluição, possibilita, portanto, maior tempo de interação do analito com a fase estacionária e como consequência maior número de pratos teóricos.

Figura 47- Gráficos de superfície de resposta para TEMPOL. Resposta: número de pratos teóricos; Fatores: A) %FMB e Fluxo, B) %FMB e Temperatura

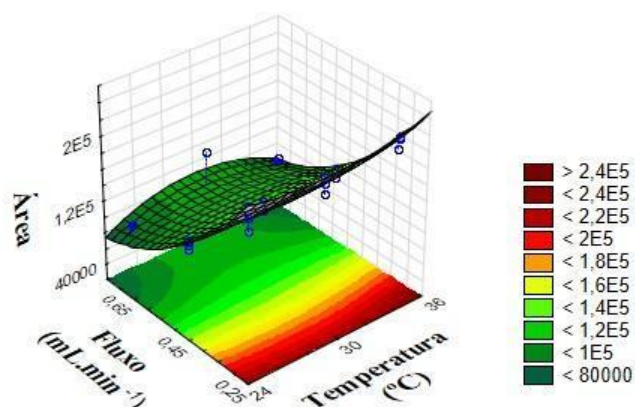


Fonte: autor, 2021

d) Área

O gráfico de superfície de resposta para a resposta área do pico cromatográfico (Figura 48) evidencia que a diminuição do fluxo tende a promover um aumento nos valores de área evidenciando um alargamento do pico. Os valores da área tornam-se relevantes, pois é partir dela que ocorre a quantificação do analito no método final.

Figura 48- Gráfico de superfície de resposta para TEMPOL. Resposta: Área; Fatores: %FMB e Temperatura

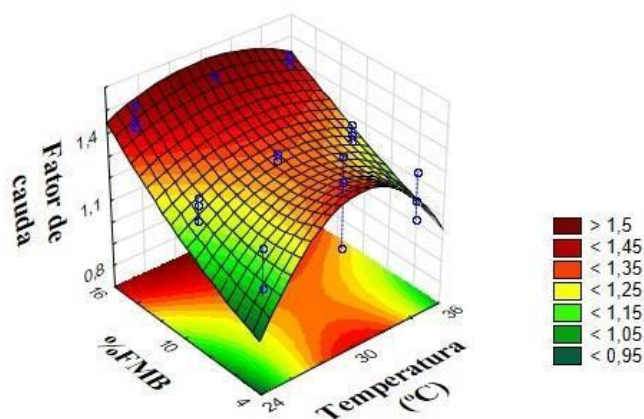


Fonte: autor, 2021

e) Fator de cauda

Avaliar o fator de cauda durante o desenvolvimento de um método cromatográfico é de fundamental importância, tendo em vista que, picos caudados prejudicam a integração e consequentemente afetam a quantificação do analito em questão (AZEVEDO et al., 2017). A figura 49 indica que a temperatura desempenha maior influência sobre o fator de cauda, onde os valores extremos (temperaturas mais baixas e mais altas) provoca redução do fator de cauda. No gráfico de superfície de resposta também fica evidente que valores mais baixos de %FMB provocam uma redução no fator de cauda.

Figura 49- Gráfico de superfície de resposta para TEMPOL. Resposta: Fator de cauda; Fatores: A) %FMB e Temperatura



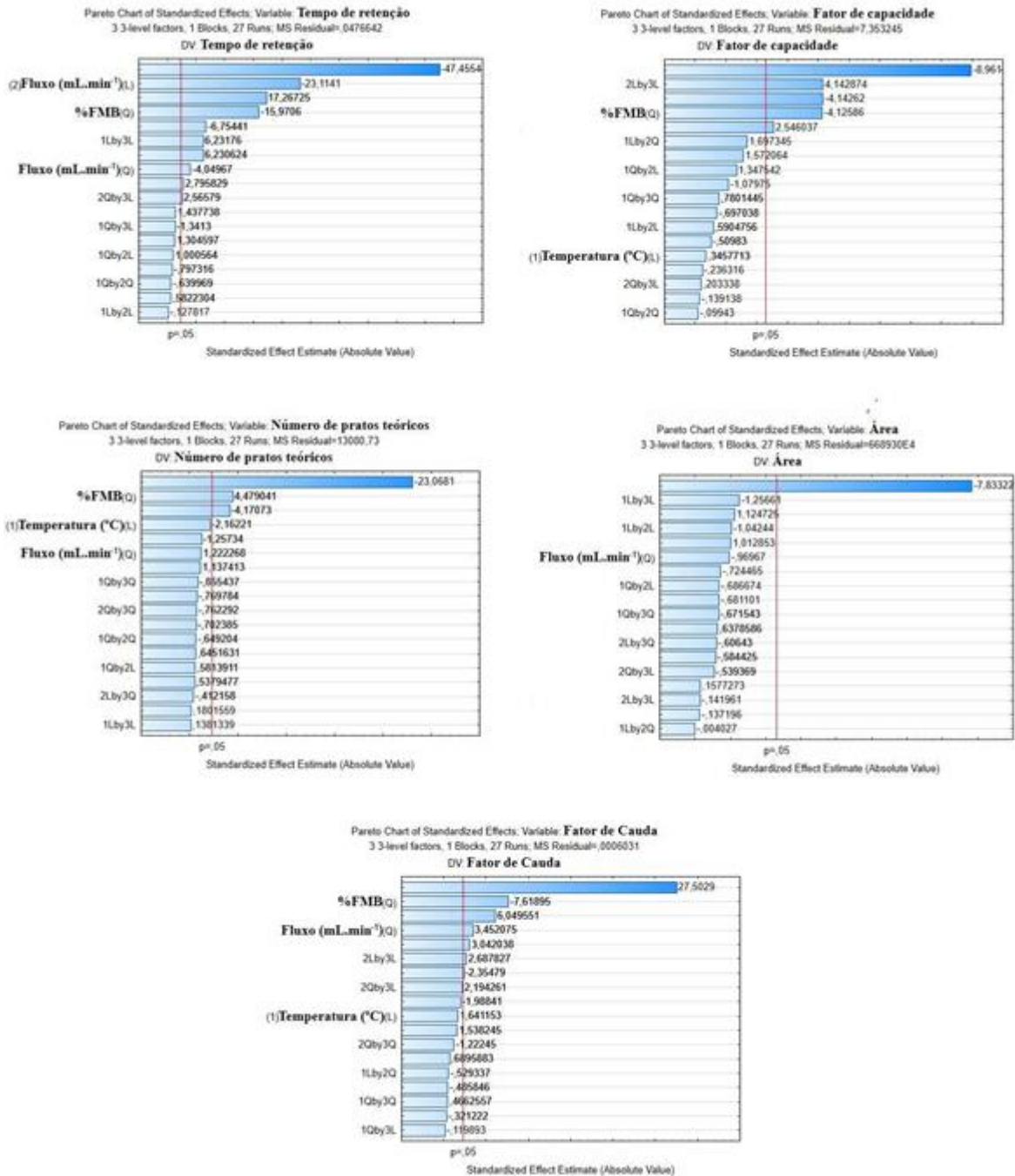
Fonte: autor, 2021

5.10.2 Análise da influência dos fatores através dos gráficos de superfície de resposta e Pareto para o BZTEMPOL

A. Análise da influência dos fatores através dos gráficos de Pareto para o BZTEMPOL

O gráfico de Pareto para o BZTEMPOL (Figura 50) mostra que para o tempo de retenção, a variável de maior efeito nos resultados avaliados foi o fluxo que, influenciou tanto de forma linear quanto quadrática, seguido do %FMB, de forma quadrática. Interações de segunda ordem entre: %FMB (linear) e temperatura (linear) e, %FMB (linear) e fluxo (quadrático) também exerceram influência no tempo de retenção. A interação de segunda ordem fluxo (linear) e %FMB (quadrático) representa o principal efeito de significância estatística para o fator de retenção. O %FMB também exerceu influência de primeira ordem no modo quadrático. Quanto a resposta número de pratos teóricos, houve influência apenas do %FMB de forma quadrática. Para área, apenas o efeito da interação entre temperatura (linear) e %FMB (linear) houve relevância significativa. Por fim, o fator de cauda, que também sofreu influência apenas de segunda ordem, porém exercida entre %FMB e fluxo.

Figura 50- Gráficos de Pareto do BZTEMPOL referentes às respostas: A) tempo de retenção, B) Fator de retenção, C) Número de pratos teóricos, D) Área, E) Fator de cauda. A linha vertical define 95% (p = 0,05) de intervalo de confiança



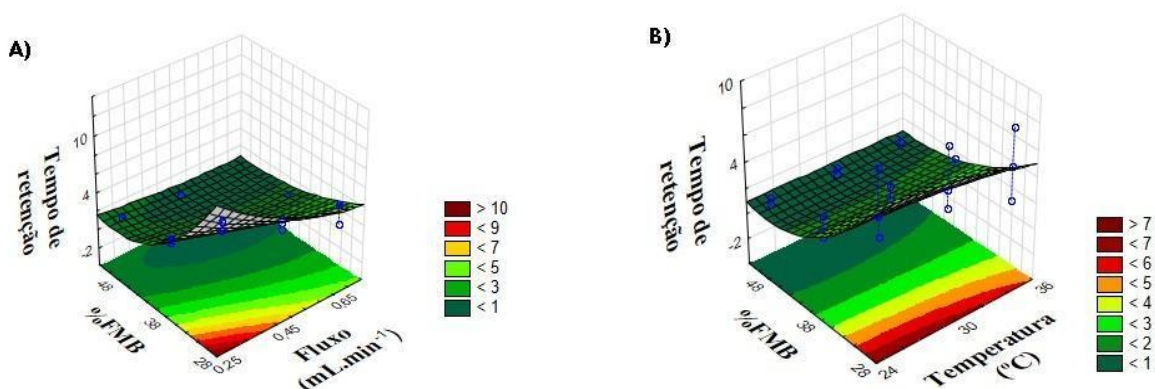
Fonte: autor, 2021

B. Análise da influência dos fatores através dos gráficos de superfície de resposta para o BZTEMPOL

a) Tempo de retenção

A Figura 51 indica que o fator %FMB desempenha maior influência sobre o tempo de retenção, onde ele aumenta com a redução do %FMB. Como o BZTEMPOL necessita de um maior percentual de fase orgânica para ser eluído, esse resultado era esperado, já que a redução da concentração do solvente orgânico provoca alteração no sistema responsável pela retenção do analito e conseqüentemente diminuição da força de eluição, aumentando assim o tempo de retenção do analito. Outro fator que influenciou, em menor proporção, foi o fluxo onde o aumento do tempo de retenção é favorecido pela redução do fluxo.

Figura 51-Gráficos de superfície de resposta para BZTEMPOL. Resposta: Tempo de retenção; Fatores: A) %FMB e Fluxo, B) %FMB e Temperatura

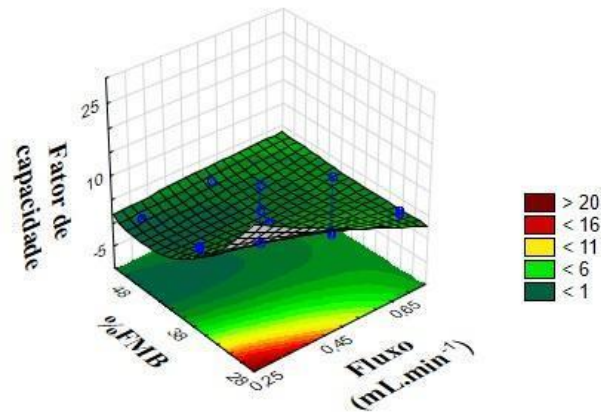


Fonte: autor, 2021

b) Fator de retenção

A Figura 52 apresenta os gráficos superfície resposta para a resposta fator de retenção e indica que o %FMB desempenha maior influência sobre o fator de retenção, onde o aumento do %FMB provoca redução do fator de retenção. Outro fator relevante foi o fluxo onde o aumento dessa variável prova uma diminuição na resposta avaliada.

Figura 52- Gráficos de superfície de resposta para BZTEMPOL. Resposta: Fator de retenção; Fatores: A) %FMB e Fluxo

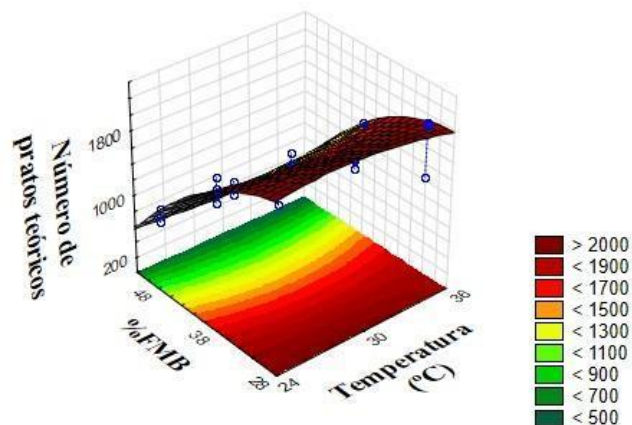


Fonte: autor, 2021

c) Número de pratos teóricos

A Figura 53 indica que apenas o fator %FMB desempenhou influência sobre o número de pratos teóricos, onde o aumento da %FMB provoca redução no número de pratos teóricos, já que quanto maior a força eluotrópica do sistema, menor será a interação do analito com a coluna e conseqüente menor será a eficiência dessa corrida cromatográfica.

Figura 53- Gráficos de superfície de resposta para BZTEMPOL. Resposta: Número de pratos teóricos; Fatores: A) %FMB e Temperatura

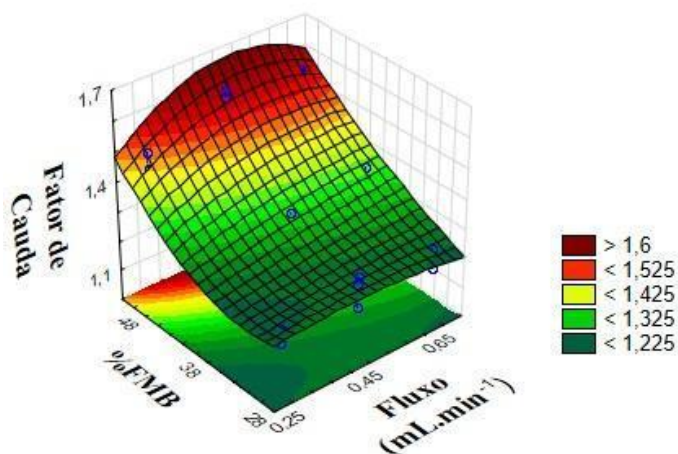


Fonte: autor, 2021

d) Fator de cauda

O gráfico de superfície de resposta (Figura 54) evidencia que em condições onde o fluxo é menor e com baixos valores de %FMB, ocorre uma redução no fator de cauda.

Figura 54- Gráficos de superfície resposta para BZTEMPOL. Resposta: Fator de cauda; Fatores: A) %FMB e Fluxo

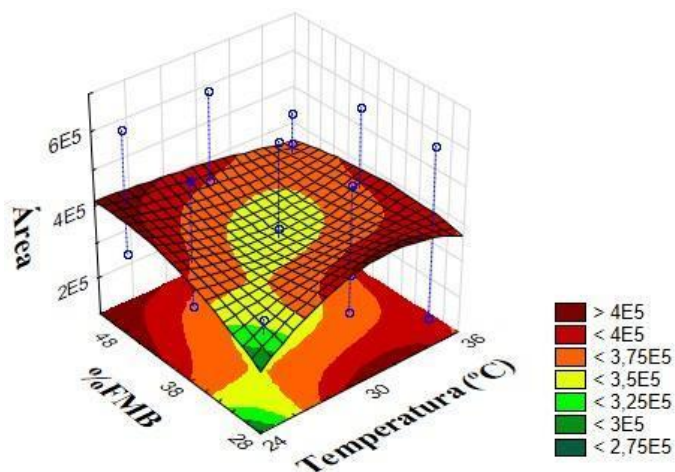


Fonte: autor, 2021

e) Área

Para área (Figura 55), apenas o efeito da interação entre temperatura (linear) e %FMB (linear) afetou de forma significativa, de forma que quando maior essas variáveis, maior será essa resposta.

Figura 55- Gráficos de superfície resposta para BZTEMPOL. Resposta: Área; Fatores: A) %FMB e Temperatura



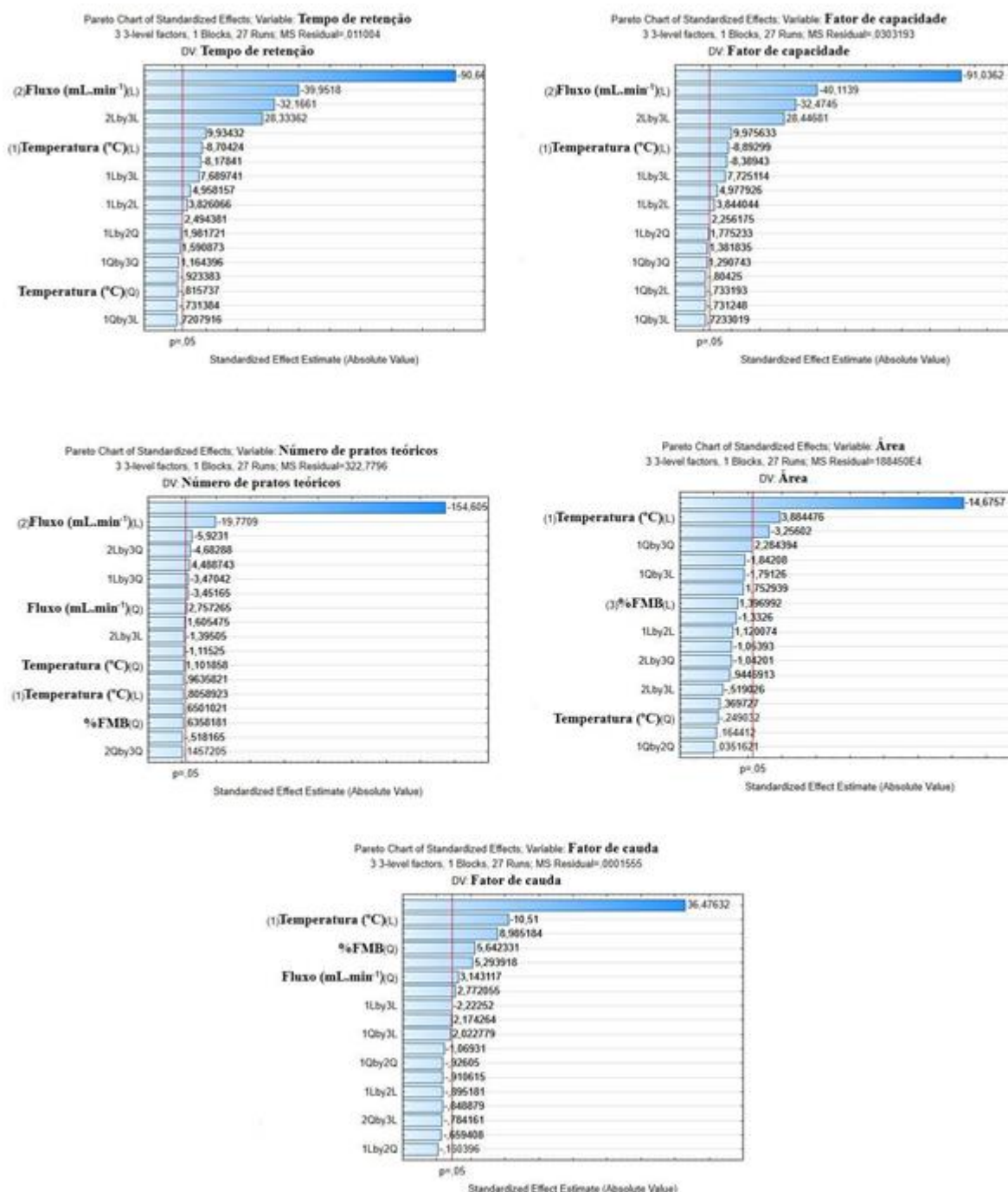
Fonte: autor, 2021

5.10.3 Análise da influência dos fatores através dos gráficos de superfície de resposta e Pareto PARA O TSTEMPOL

A. Análise da influência dos fatores através dos gráficos de Pareto para o TSTEMPOL

O gráfico de Pareto para o TSTEMPOL (Figura 56) mostra que os fatores que influenciaram significativamente o tempo de retenção e fator de retenção foram os mesmos, sendo o fluxo a variável de maior efeito nos resultados avaliados, seguido da interação de segunda ordem entre o fluxo (linear) e %FMB (linear) e Temperatura (linear) com Fluxo (linear) e %FMB (LINEAR). Para a resposta número de pratos teóricos, o fluxo influenciou de maneira tanto linear quanto quadrática. Também houve interações de segunda ordem, tais como: fluxo (linear) com %FBM (quadrática) e temperatura (linear) com %FMB (quadrática). Já a área sofreu influência da temperatura de forma linear e de segunda ordem com a temperatura linear com a fase móvel orgânica de forma quadrática. Por último, o fator de cauda que sofreu influência apenas de primeira ordem das variáveis temperatura, %FMB e Fluxo de forma linear, quadrática e quadrática, respectivamente.

Figura 56- Gráficos de Pareto do TSTEMPOL referentes às respostas: A) tempo de retenção, B) Fator de retenção, C) Número de pratos teóricos, D) Área, E) Fator de cauda. A linha vertical define 95% ($p = 0,05$) de intervalo de confiança



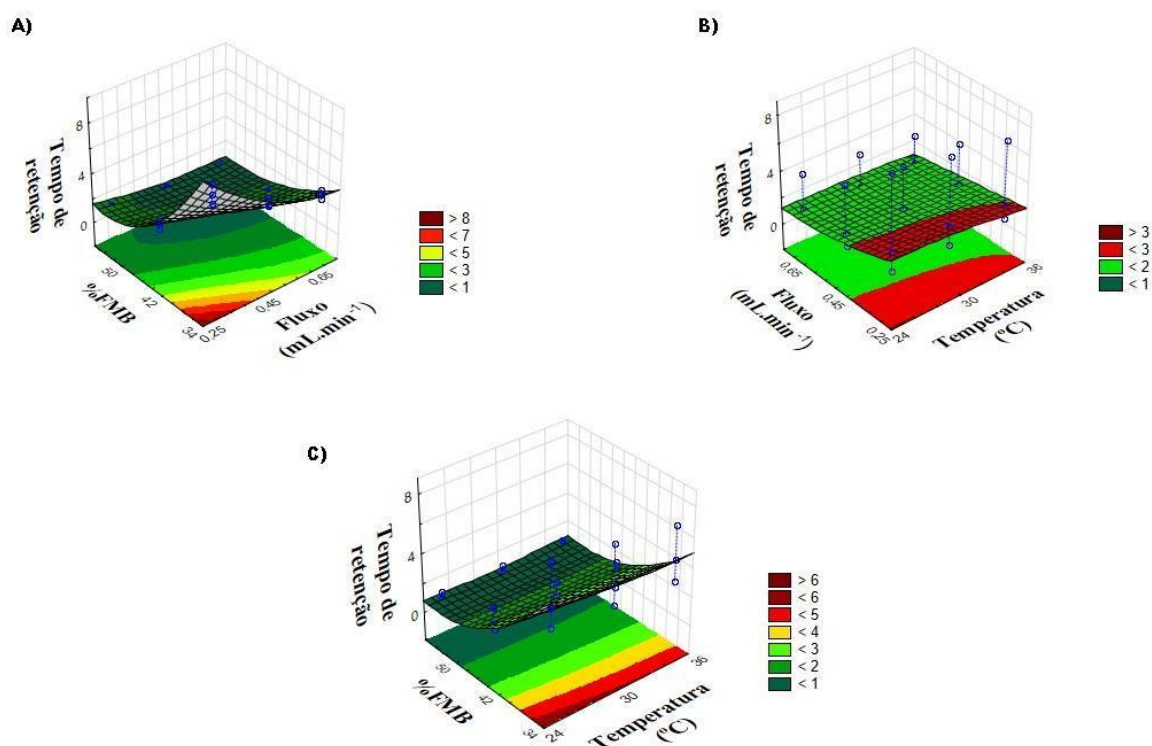
Fonte: autor, 2021

B. Análise da influência dos fatores através dos gráficos de superfície de resposta para o TSTEMPOL

a) Tempo de retenção

A Figura 57 indica que o fator fluxo representa maior influência sobre o tempo de retenção, onde menores fluxos levam a maiores tempos. Já o %FMB desempenhou menor influência, onde o tempo de retenção aumenta com a redução da %FMB.

Figura 57- Gráficos de superfície de resposta TSTEMPOL. Resposta: Tempo de retenção; Fatores: A) %FMB e Fluxo, B) Fluxo e Temperatura, %FMB e Temperatura

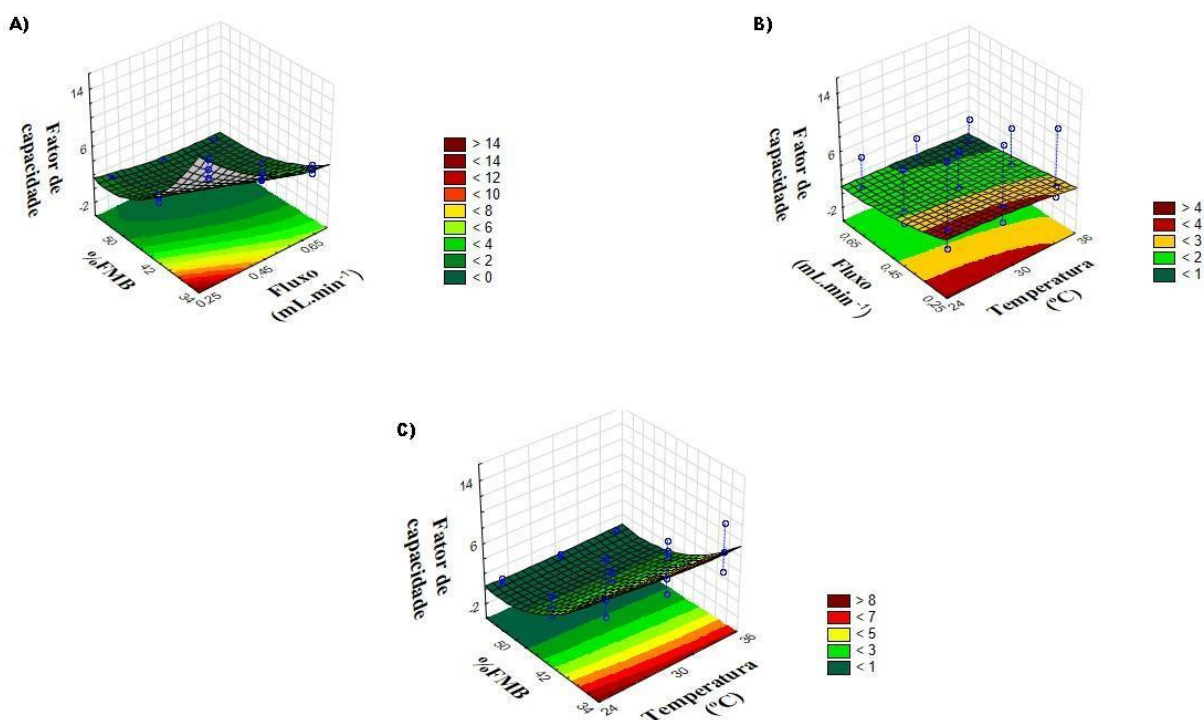


Fonte: autor, 2021

b) Fator de retenção

A Figura 58 apresenta os gráficos superfície resposta para a resposta fator de retenção e indica que o fluxo desempenha maior influência sobre o fator de retenção, onde o aumento do fluxo provoca redução do fator de retenção. Outro fator relevante foi o %FMB onde a redução dessa variável também prova uma redução na resposta avaliada, já que com concentrações menores de fase orgânica, gera uma maior interação com a fase estacionária e consequentemente uma maior retenção.

Figura 58- Gráficos de superfície de resposta TSTEMPOL. Resposta: Fator de retenção; Fatores: A) %FMB e Fluxo, B) Fluxo e Temperatura, C) %FMB e Temperatura

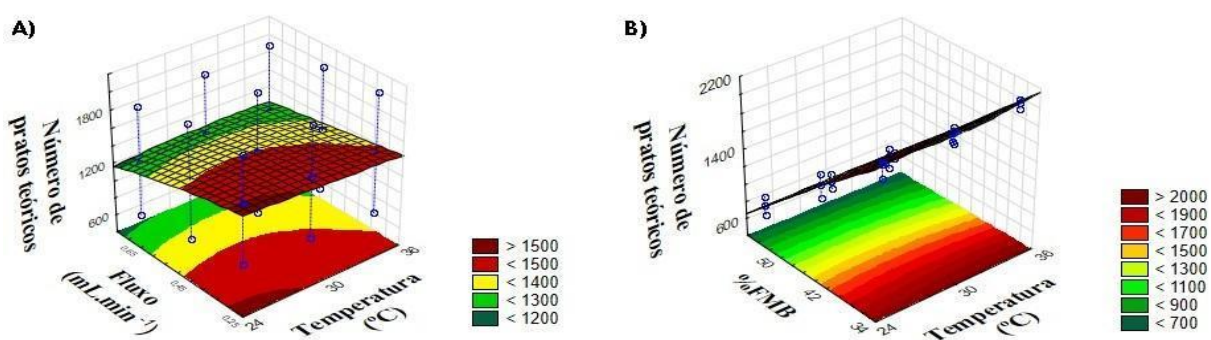


Fonte: autor, 2021

c) Número de pratos teóricos

A Figura 59 mostra que o fator fluxo desempenhou maior influência sobre número de pratos teóricos, onde ele aumenta com a redução do fluxo. Essa mesma observação foi feita no gráfico de Pareto. Também pode-se observar que valores baixos de %FMB aumenta o número de pratos teóricos.

Figura 59- Gráficos de superfície de resposta TSTEMPOL. Resposta: número de pratos teóricos; Fatores: A) Fluxo e Temperatura, B) %FMB e Temperatura

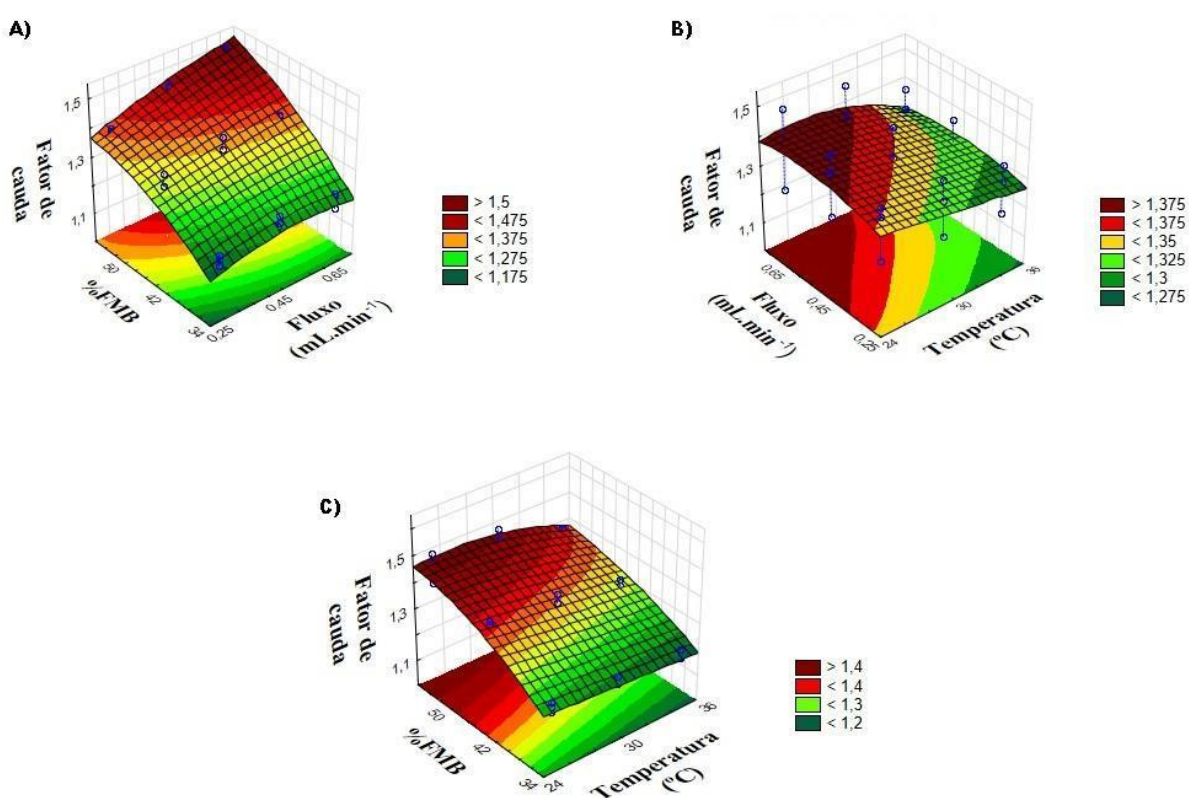


Fonte: autor, 2021

d) Fator de cauda

O gráfico de superfície de resposta (Figura 60) indica que em fluxos maiores ocorre um aumento no fator de cauda. Além disso, nota-se um aumento no fator de cauda quando ocorre um aumento na proporção de fase orgânica na fase móvel.

Figura 60- Gráficos de superfície de resposta TSTEMPOL. Resposta: Fator de cauda; Fatores: A) %FMB e Fluxo, B) Fluxo e Temperatura, C) %FMB e Temperatura

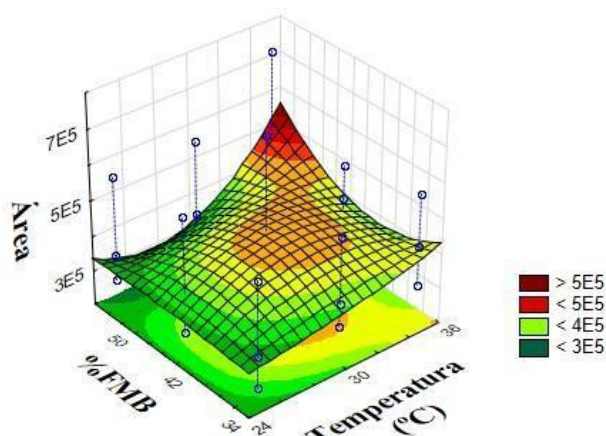


Fonte: autor, 2021

e) Área

É apresentado, na Figura 61 apresenta, o gráfico superfície resposta para a resposta área do pico do TSTEMPOL em função dos fatores estaticamente significativo. Para área, apenas o efeito da temperatura houve relevância, onde a área aumenta com o aumento desse fator.

Figura 61- Gráfico de superfície de resposta TSTEMPOL. Resposta: Área; Fatores: %FMB e Temperatura



Fonte: autor, 2021

5.10.4 Desejabilidade

Após analisar os gráficos de superfície de resposta e Pareto para cada nitróxido, foi definido os valores, para cada variável experimental (fatores), de forma a otimizar uma ou mais respostas, mantendo-as em faixas desejáveis. Esse procedimento foi feito através da função desejabilidade, presente no *software* Statistica® e proposta por Derringer e R. Suich (1980). Inicialmente cada resposta individual é convertida em uma função individual de desejabilidade, em uma escala que varia entre $0 \leq d \leq 1$, onde valores próximos de 0 são inaceitáveis e valores próximos de 1 são mais desejáveis. Posteriormente, foi calculada a desejabilidade geral (D) em função da média geométrica das desejabilidades individuais para cada resposta. Dessa forma, as variáveis independentes são escolhidas de modo a maximizar a desejabilidade global e para esse estudo, foi estabelecido que valores menores de tempo de retenção e fator de retenção são mais desejáveis, uma vez que implicam em menor tempo de análise e menor gasto de solvente. Já para o parâmetro número de pratos teóricos ficou determinado que valores maiores são mais desejados, já que um maior número de pratos teóricos implica em uma maior eficiência de separação.

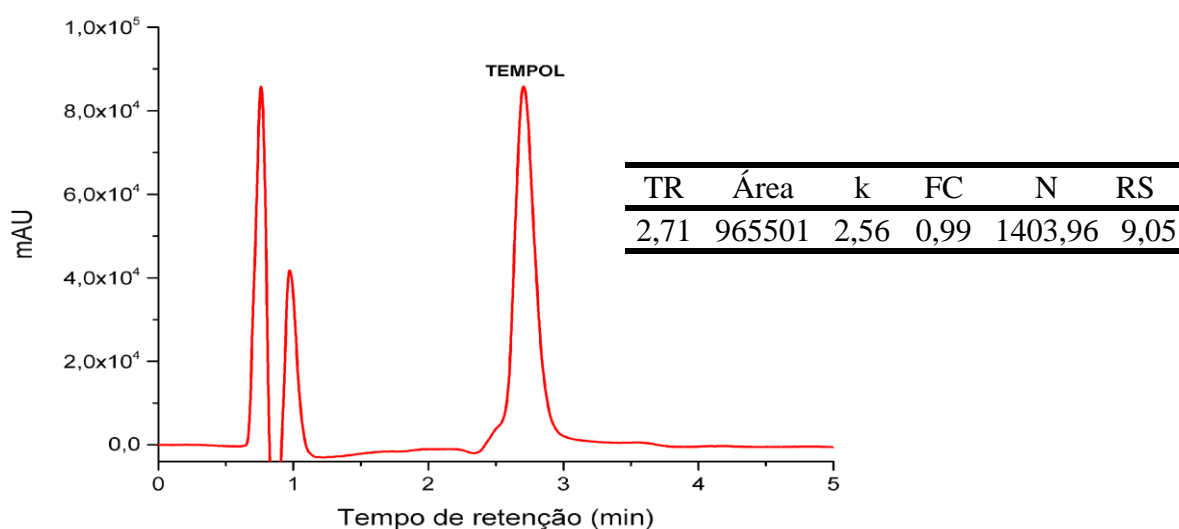
As melhores condições experimentais para o TEMPOL, BZTEMPOL e TSTEMPOL encontram-se respectivamente nas Tabelas 25, 26 e 27 e os cromatogramas obtidos experimentalmente, referentes a cada condição otimizada, encontram-se nas Figuras 62, 63 e 64.

Tabela 27- Melhor condição experimental: TEMPOL

Parâmetros	Condições
Fase estacionária	C18 (30 mm de comprimento x 2,0 mm de diâmetro interno; e tamanho de partícula de 2,2 μm)
Fase móvel	5% Acetonitrila e 95% água
Concentração da amostra	100 ppm
Fluxo ($\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$)	0,3
Volume de injeção(μL)	2
Comprimento de onda (nm)	240
Temperatura	35°C

Fonte: autor, 2021

Figura 62- Cromatograma referente a melhor condição experimental: TEMPOL



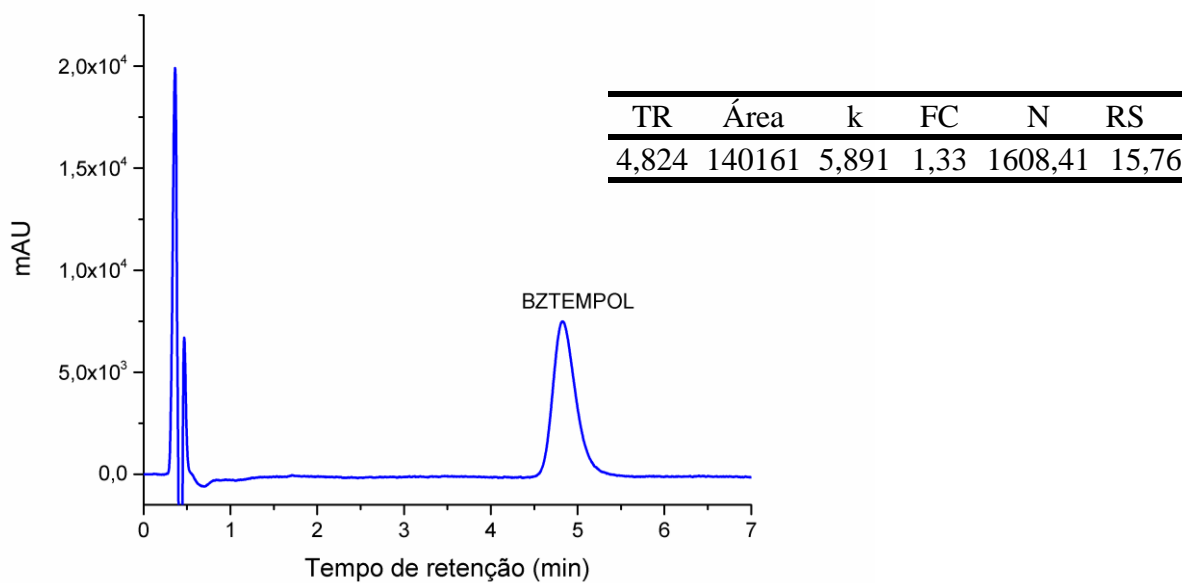
Fonte: autor, 2021

Tabela 28- Melhor condição experimental: BZTEMPOL

Parâmetros	Condições
Fase estacionária	C18 (30 mm de comprimento x 2,0 mm de diâmetro interno; e tamanho de partícula de 2,2 μm)
Fase móvel	35% Acetonitrila e 65% água
Concentração da amostra	100 ppm
Fluxo ($\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$)	0,3
Volume de injeção (μL)	2
Comprimento de onda (nm)	258
Temperatura	25°C

Fonte: autor, 2021

Figura 63- Cromatograma referente a melhor condição experimental: BZTEMPOL



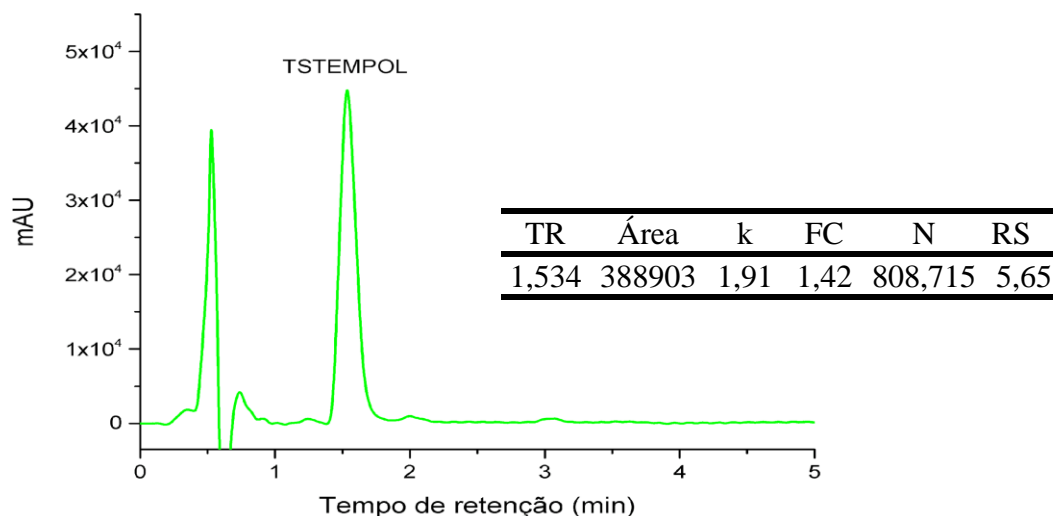
Fonte: autor, 2021

Tabela 29- Melhor condição experimental: TSTEMPOL

Parâmetros	Condições
Fase estacionária	C18 (30 mm de comprimento x 2,0 mm de diâmetro interno; e tamanho de partícula de 2,2 μm)
Fase móvel	40% Acetonitrila e 60% Água
Concentração da amostra	100 ppm
Fluxo ($\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$)	0,3
Volume de injeção (μL)	1
Comprimento de onda (nm)	240
Temperatura	32,5°C

Fonte: autor, 2021

Figura 64- Cromatograma referente a melhor condição experimental: TSTEMPOL



Fonte: autor, 2021

5.11 ESTUDO DE DEGRADAÇÃO FORÇADA EM SOLUÇÃO PARA OS NITRÓXIDOS

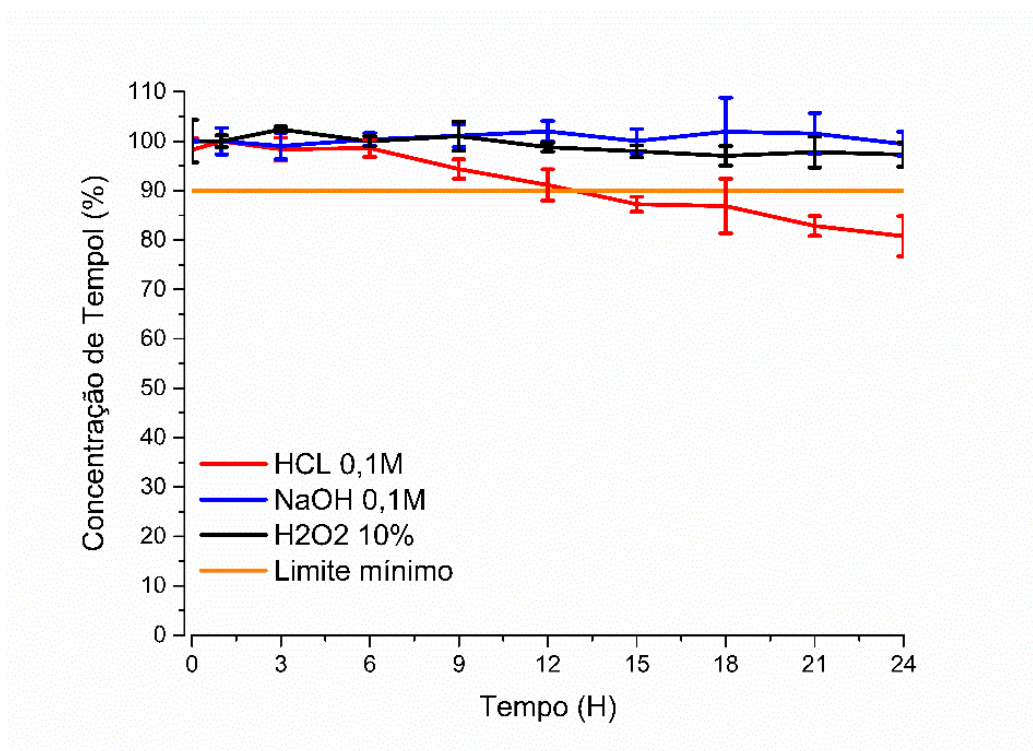
Após o desenvolvimento e otimização do método cromatográfico, é necessário realizar estudos de degradação forçada, para só então validá-lo como método indicativo de estabilidade com especificidade e seletividade adequada. No estudo de degradação forçada em solução é utilizado diferentes condições de estresse, como: luz, temperatura, hidrólise ácida/ básica e oxidação. Além disso os resultados alcançados são úteis na identificação da suscetibilidade dos nitróxidos frente as diferentes condições de estresse avaliadas.

De acordo com a RDC 53 de 2015 a degradação deve ser extensa o suficiente para permitir que seja avaliado a formação de produtos de degradação, sendo superior a 10% e inferior àquela que levaria à degradação completa da amostra já que isso comprometeria a análise (ANVISA, 2015). Nesse estudo de degradação forçada foram avaliados o TEMPOL e o BZTEMPOL em um período de 24 horas, com intervalo de 3h para avaliação das amostras expostas as condições de estresse.

5.11.1 Degradação ácida, básica e oxidativa do TEMPOL

A partir da análise dos dados de percentagem remanescente de TEMPOL, presentes na Figura 65, é possível observar que o TEMPOL foi susceptível apenas a degradação ácida (12% de decaimento após 12h), não sendo verificada degradação superior a 10% para as condições básica e oxidativa em 24h.

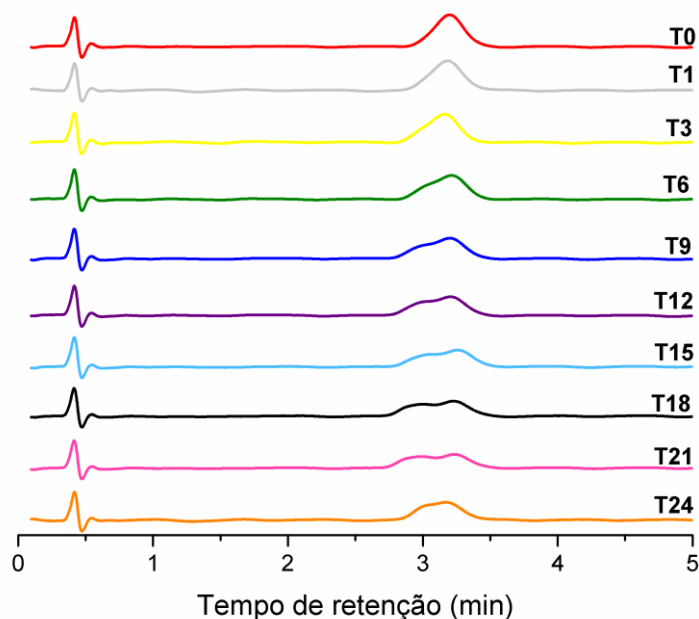
Figura 65 – Percentagem remanescente de TEMPOL para as condições ácida, básica e oxidativa.



Fonte: autor, 2021

Após as considerações em relação a percentagem remanescente de TEMPOL também foram avaliados os cromatogramas referentes a cada degradação. A Figura 66 apresenta todos os cromatogramas para degradação ácida nos diferentes tempos de coleta.

Figura 66 – Sobreposição dos cromatogramas do TEMPOL para o intervalo de 24 horas de degradação ácida.

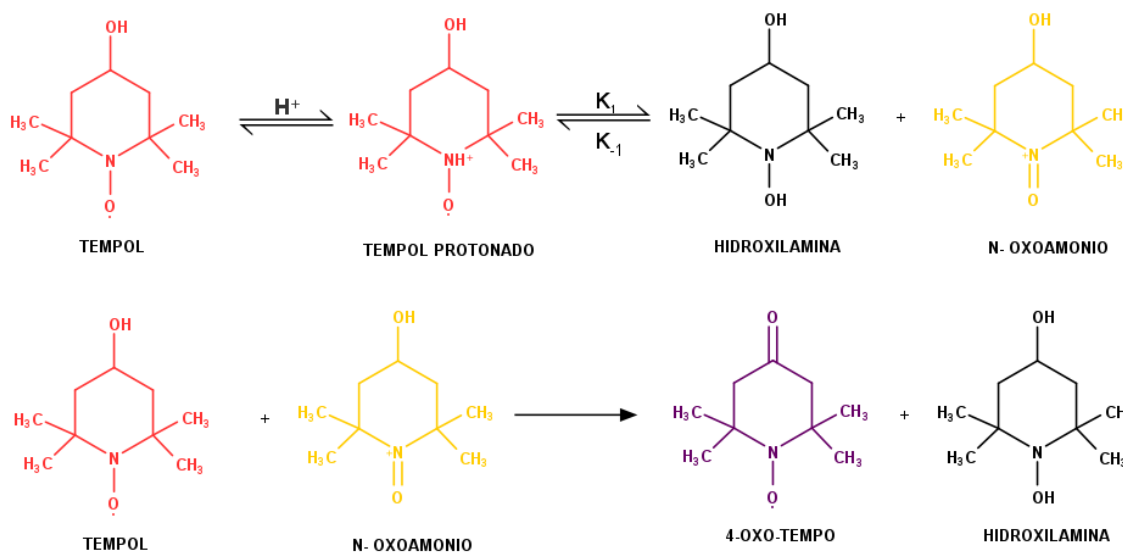


Fonte: autor, 2021

Com intuito determinar o perfil cromatográfico do TEMPOL quando em contato com o agente estressor, o tempo 0 foi utilizado como referência para avaliar as demais corridas cromatográficas. Sendo assim, fica evidente que após 6 horas o pico característico da substância passou a sofrer mudanças em sua conformação, e essas aumentaram ao longo do tempo. Porém, apesar da degradação significativa (10-30%) após 12 horas, não foi visualizado nenhum outro pico referente a possível impureza ou produtos de degradação, apenas o característico do nitróxido, até o fim da análise.

Esse decaimento do TEMPOL em condições ácidas pode ser explicado por uma reação conhecida por desproporção TEMPO que é catalisada em meios ácidos. Derivados do TEMPO, como é o caso do TEMPOL, podem ser protonados em ácidos originando uma desproporção em duas formas: a hidroxilamina correspondente e o sal de N-oxoamônio (MA, 2010) (figura 67).

Figura 67- Desproporcionamento do TEMPOL catalisado por ácido e oxidação de TEMPOL em 4-oxo-TEMPO

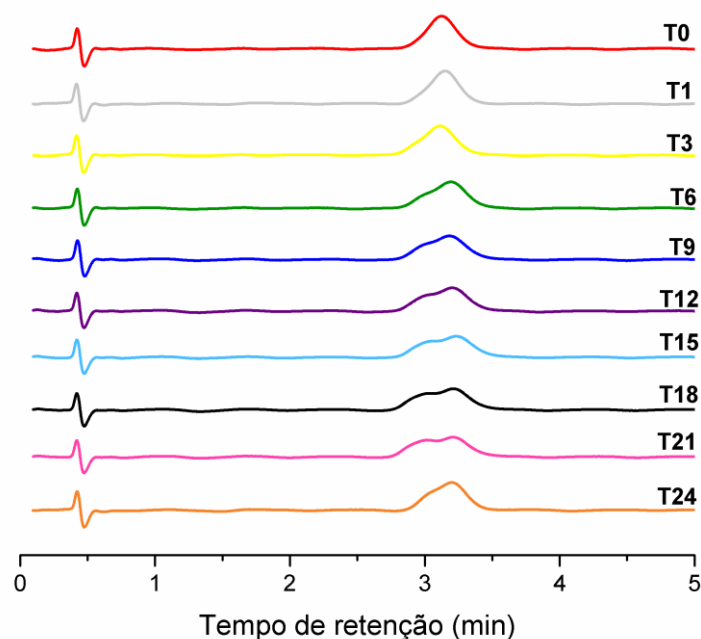


Fonte: adaptado de MA,2010

Como ilustrado na figura 67 o cátion N-oxoamônio por ser um potente oxidante, oxida o TEMPOL originando a forma 4-OXO-TEMPO e dessa forma surge uma mistura das duas formas no sistema. E, caso a taxa da desproporção entre TEMPOL e o 4-OXO-TEMPO seja significativamente irrelevante torna difícil a visualização no cromatograma na forma de outro pico cromatográfico, já que essas formas estão em equilíbrio químico.

Em relação a hidrólise básica podemos observar que ocorreram mudanças no perfil do pico cromatográfico durante as 24 horas (Figura 68), porém nenhum pico adicional foi evidenciado. Além disso, a degradação do TEMPOL foi inferior ao limite mínimo estabelecido pela ANVISA de 10% (Figura 65).

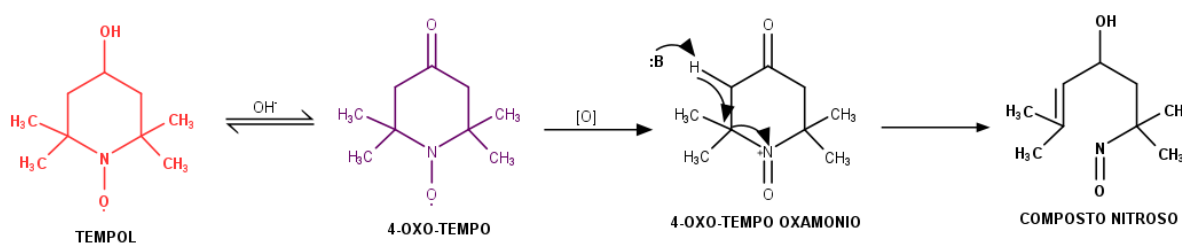
Figura 68- Sobreposição dos cromatogramas do TEMPOL para o intervalo de 24 horas de degradação básica.



Fonte: autor, 2021

A desproporção oxidativa dos nitroxídios também ocorre em meio alcalino originando seus intermediários de oxoamônio, porém segundo Nilsen e Braslau (2005) o TEMPOL não deve usado em condições alcalinas, pois diferentemente do que acontece em meio ácido, o TEMPOL é oxidado diretamente em 4-OXO-TEMPO ficando desproporcional ao sal oxoamônio correspondente a esse nitroxídeo, originando compostos nitrosos que sofrem decomposição (Figura 69). Como não atingiu o limite mínimo de 10%, sugere-se prolongar tempo de exposição ou aumentar a concentração para a condição com NaOH e observar seu comportamento.

Figura 69- Degradação do TEMPOL pela via do 4-OXO-TEMPO oxamônio.

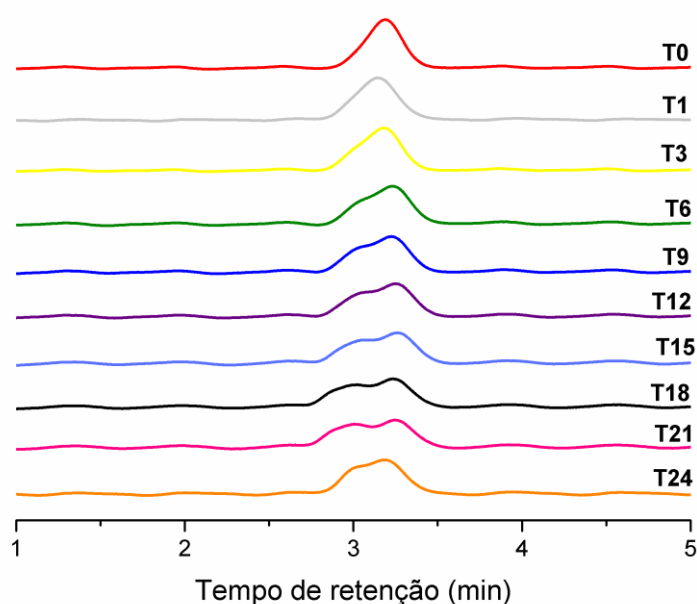


Fonte: adaptado de Nilsen e Braslau, 2005

Em relação a deformação do pico do analito de interesse nos resultados cromatográficos para ambas hidrólises, fica evidente que houve formação de um produto de degradação com polaridade semelhante ao da substância estudada. A caracterização desse produto está fora do escopo desse trabalho e exige uma combinação de técnicas e metodologias diversas, sendo, portanto, alvo para futuros estudos.

Os nitroxídeos são antioxidantes multifuncionais e por essa razão o TEMPOL quando em contato com o peróxido de hidrogênio apresentou relativa estabilidade, além disso o mesmo é preparado por oxidação de 2,2,6,6-tetrametilpiperidina com peróxido de hidrogênio (MA,2010). Podemos observar nos cromatogramas do período avaliado (Figura 70) que houve uma mudança na conformação do pico da substância de interesse, sugestivo de surgimento de novos picos, porém e também não ocorreu degradação com o valor mínimo preconizado pela ANVISA de 10%.

Figura 70- Sobreposição dos cromatogramas do TEMPOL para o intervalo de 24 horas de degradação oxidativa



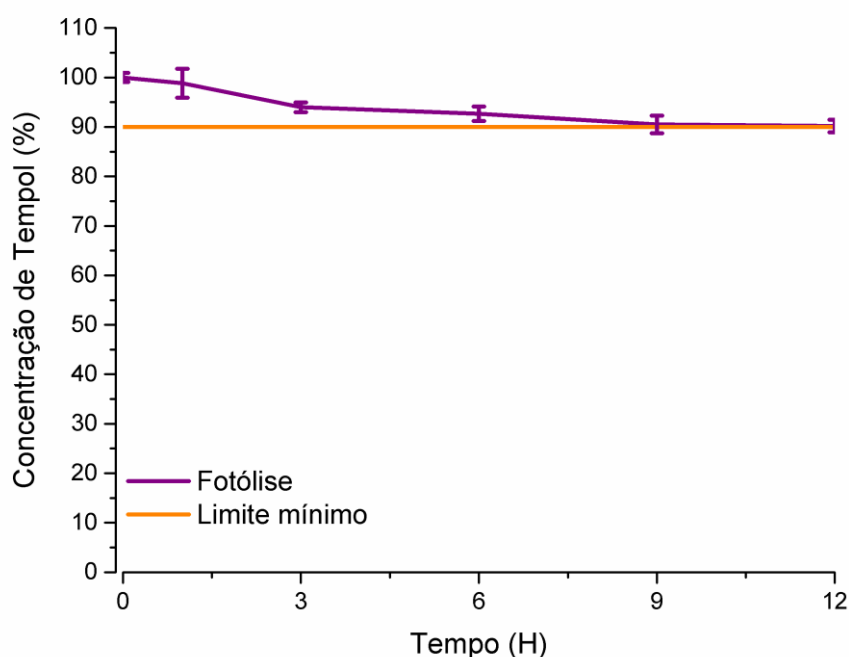
Fonte: autor, 2021

5.11.2 Degradação fotolítica para o TEMPOL

A degradação fotolítica (Figura 71) para o TEMPOL foi superior a 10% após 9 horas de exposição na câmara de fotoestabilidade. Isso corrobora com a informação de que agentes

antioxidantes geralmente apresentam sensibilidade a luz e como consequência apresentam problemas relacionados a sua bioatividade, distribuição e biodisponibilidade (PUCEK et al., 2020). Por essa razão existe a necessidade estudar a estabilidade do ativo em condições fotolíticas para garantir sua eficácia em possíveis formulações

Figura 71 – Percentagem remanescente de TEMPOL para a condição fotolítica

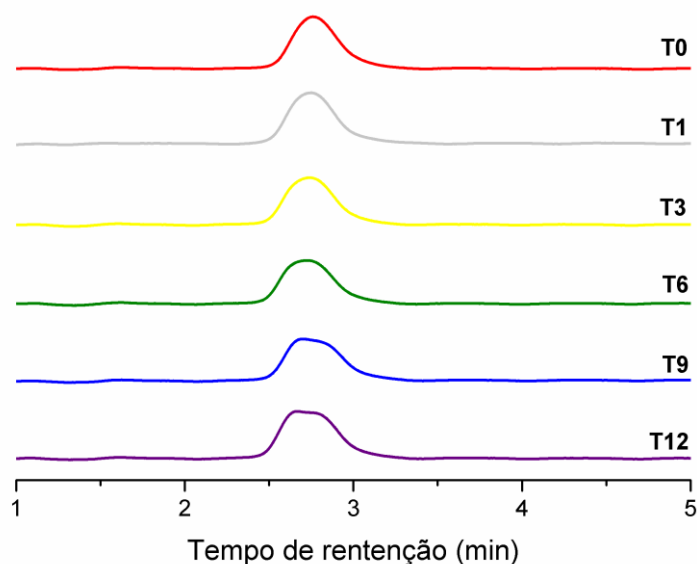


Fonte: autor, 2021

No caso específico de nitróxidos, estudos apontam dois padrões de reatividade quando são fotoquimicamente excitados. Um dos padrões trata-se da clivagem de uma das ligações C-N e o outro da abstração de hidrogênio por um nitróxido fotoexcitado. (JOHNSTON; TENCER; SCAIANO, 1986). Para o TEMPOL o mecanismo observado foi o segundo: abstração de hidrogênio.

Assim como nas outras condições de degradação, não houve aparecimento de nenhum produto de degradação, apenas redução da área do pico referente a substância estudada como pode ser visualizado na figura 72.

Figura 72- Sobreposição dos cromatogramas do TEMPOL para o intervalo de 24 horas de degradação fotolítica



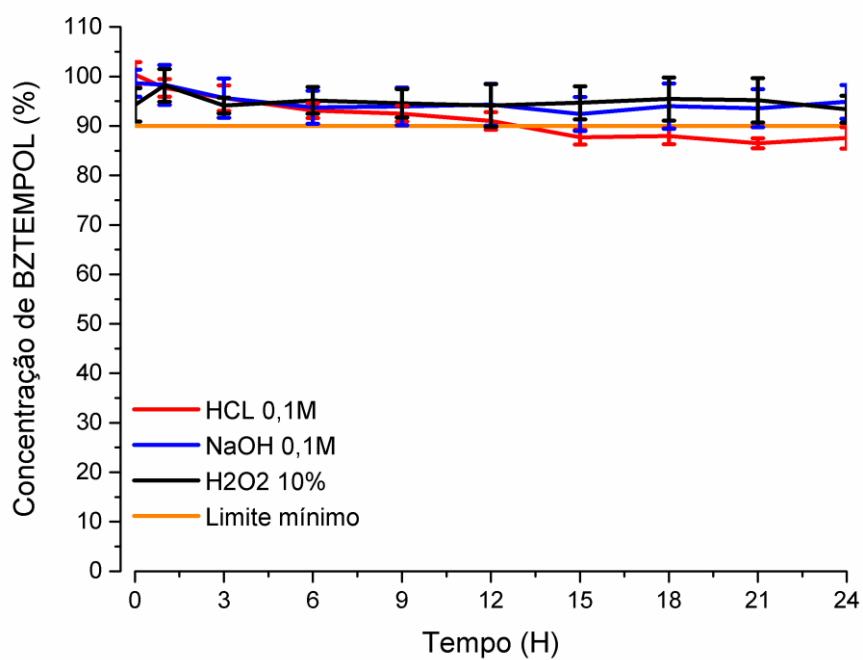
Fonte: autor, 2021

5.11.3 Degradação ácida, básica e oxidativa para o BZTEMPOL

O BZTEMPOL apresentou comportamento semelhante ao TEMPOL para todos os ensaios de degradação forçada. Essa similaridade já era esperada uma vez que essa substância apresenta os mesmos pontos disponíveis para sofrer o desproporcionamento discutido no tópico anterior.

Dessa forma, ao avaliarmos os resultados referentes a percentagem remanescente de BZTEMPOL (Figura 73) observamos que apenas a degradação ácida obteve um resultado dentro dos limites exigido pela ANVISA, apresentando uma redução de 12% na área do pico após 15 horas de teste.

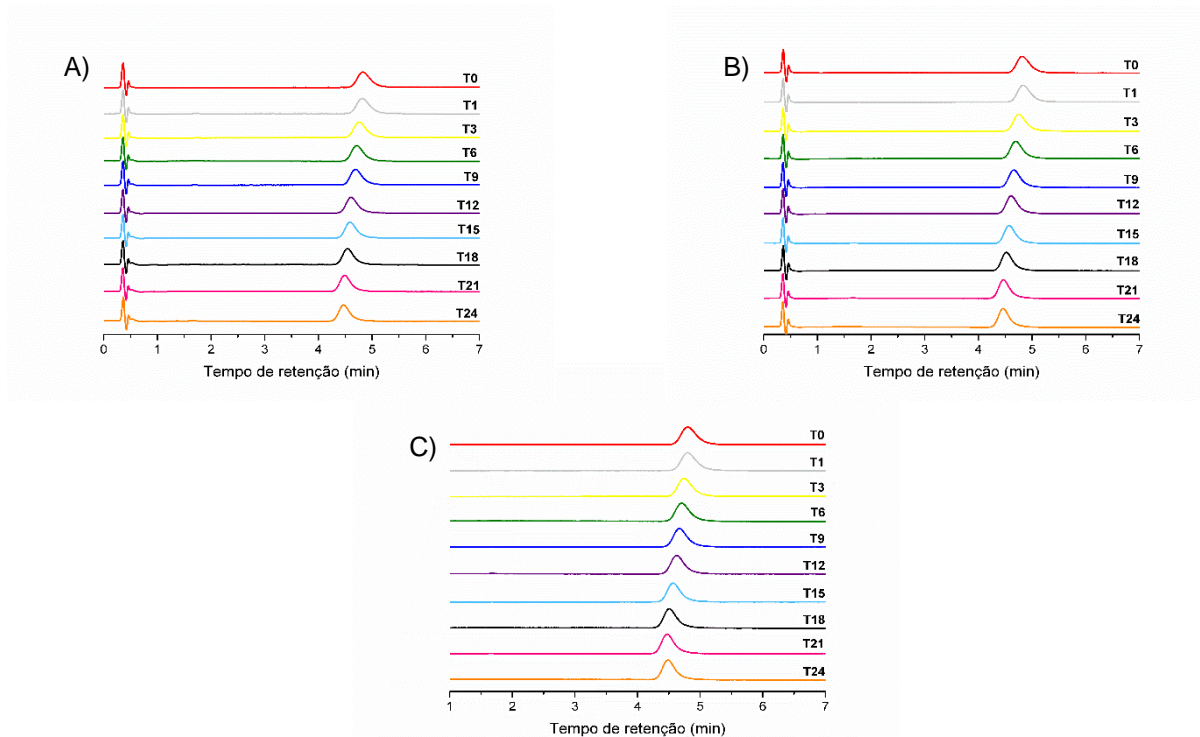
Figura 73 – Percentagem remanescente de BZTEMPOL para as condições ácida, básica e oxidativa.



Fonte: autor, 2021

Os cromatogramas obtidos para cada condição de degradação e nos diferentes tempos de coleta podem ser visualizados na figura 74.

Figura 74 – Sobreposição dos cromatogramas do BZTEMPOL para o intervalo de 24 horas de degradação ácida (A), básica (B) e oxidativa (C).



Fonte: autor, 2021

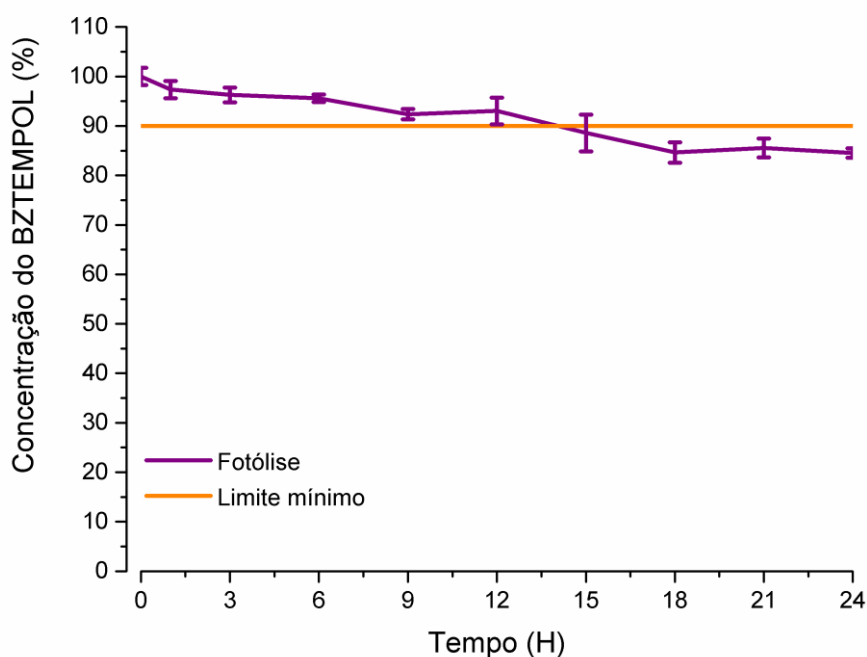
Para o estudo de degradação forçada em meio ácido o BZTEMPOL foi exposto a uma solução de HCl 0,1 M por 24 horas. Após 16 horas foi possível observar redução da área sob o pico do ativo, porém não houve surgimento de produtos de degradação durante todo o intervalo do teste.

Da mesma forma, para o teste na condição básica e oxidativa, o BZTEMPOL foi exposto por 24 horas a uma solução de NaOH 0,1 M e uma solução de peróxido de hidrogênio a 10%, respectivamente. No entanto, para ambas as situações, não houve degradação significativa ou surgimento de novos picos, além disso não ocorreu alteração significativas no pico do BZTEMPOL e por essa razão, para essas condições, o fármaco foi considerado estável. É necessário aplicar condições mais severas ou prolongar o tempo de exposição para confirmar sua estabilidade.

5.11.4 Degradação fotolítica para o BZTEMPOL

A degradação fotolítica (Figura 75) para o BZTEMPOL foi superior a 10% após 15 horas de exposição na câmara de fotoestabilidade.

Figura 75 – Percentagem remanescente de BZTEMPOL para a condição fotolítica

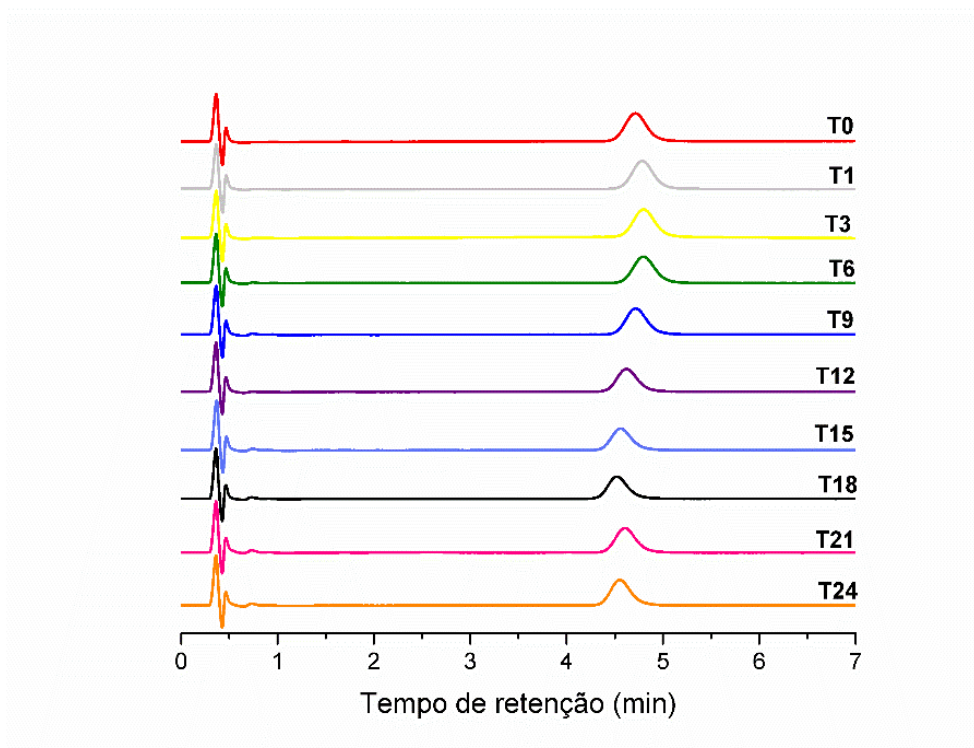


Fonte: autor, 2021

Como o BZTEMPOL é um alquilnitroxídeo derivado do TEMPO (2,2,6,6-tetrametilpiperidina-1-oxil) apresenta a mesma característica citada no tópico anterior, de abstrair átomos de hidrogênio quando fotoexcitados e como consequência houve redução da área do pico cromatográfico.

Quanto aos resultados obtidos nos cromatogramas fica evidente que apesar da redução da área do pico do BZTEMPOL, não houve aparecimento de nenhum produto de degradação ou modificação (Figura 76).

Figura 76- Sobreposição dos cromatogramas do BZTEMPOL para o intervalo de 24 horas de degradação oxidativa



Fonte: autor, 2021

6. CONCLUSÕES

- Foi possível caracterizar os nitróxidos, TEMPOL, BZTEMPOL e TSTEMPOL, através das técnicas utilizadas.
 - Parâmetros físico-químicos para os nitróxidos TEMPOL, BZTEMPOL e TSTEMPOL foram determinados *in silico*;
 - O grau de pureza do TEMPOL, BZTEMPOL e TSTEMPOL foi determinado por UHPLC-DAD e UHPLC-MS-MS e todos apresentaram valores de pureza satisfatórios;
 - O perfil de fragmentação para os nitróxidos através das análises UHPLC-MS-MS foram determinados e confirmaram suas identidades.
 - A caracterização por DRX, revelou que o TEMPOL possui maior grau cristalinidade do que o BZTEMPOL e TSTEMPOL.
 - As análises por FTIR confirmaram a identidade dos grupos funcionais dos compostos ao apresentaram as respectivas bandas vibracionais características.
 - As análises por EPR comprovaram a natureza radicalar das substâncias estudadas, além de evidenciar que o TEMPOL, possui maior capacidade antioxidante.
 - Os dados térmicos determinados neste estudo possibilitaram caracterizar e determinar a estabilidade térmica do TEMPOL, BZTEMPOL e TSTEMPOL, e as transições de fases que permitem caracterizar os nitróxidos.

- Um método de quantificação por cromatografia foi desenvolvido para análise de cada um dos nitróxidos a partir da utilização de DOE e planejamento Box Behken, com confirmação da resposta das condições de desejabilidade encontradas.
 - Análises exploratórias iniciais e a caracterização molecular e físico química dos nitróxidos nortearam o desenvolvimento do método;
 - O planejamento fatorial experimental multivariado foi utilizado para determinar a desejabilidade e uma condição ótima para a análise desses compostos por UHPLC foi encontrada;

- O estudo de degradação forçada para os nitróxidos TEMPOL e BZTEMPOL mostrou que estas substâncias são susceptíveis a degradação ácida (HCL 0,1 M) e a fotodegradação para o intervalo de 24 horas. Já para a degradação alcalina (NaOH 0,1 M) e oxidativa (H₂O₂ à 10%) é necessário aumentar o tempo de exposição ou a condição de estresse em futuros projetos, com objetivo de avaliar a extensão da degradação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, R.; CASTRO ESTEVES, T.; TRELLES, M.A. Factores intrínsecos y extrínsecos implicados en el envejecimiento cutáneo. **Cirurgía Plástica Ibero-Latinoamericana.**, Madrid. v. 39, n. 1, p. 89-102, mar. 2013.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Guia de Estabilidade de Produtos cosméticos**, Brasília, v. 1, maio.2004, disponível em <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/centraisdeconteudo/publicacoes/cosmeticos/manuais-e-guias/guia-de-estabilidade-de-cosmeticos.pdf/view>. Acesso em 12 dezembro 2020.

ALEKSIEVA, K.I.; DIMOV, K.G.; YORDANOV, N.D.. Identification of gamma-irradiated fruit juices by EPR spectroscopy. **Radiation Physics And Chemistry**, [s.l.], v. 103, p. 27-30, out. 2014

AMORES, Celia Castano; HERNANDEZ, Pablo José Benavides. Activos antioxidantes en la formulación de productos cosméticos antienvjecimiento. **Ars Pharm**, Granada, v. 59, n. 2, p. 77-84, jun. 2018.

ALZOUBI, Karem H.; RABABA'H, Abeer M.; YACOUB, Omar N. Al. Tempol prevents post-traumatic stress disorder induced memory impairment. **Physiology & Behavior**, [s.l.], v. 184, p. 189-195, fev. 2018.

ANACLETO, Sara da Silva *et al.* Evaluation of physicochemical properties as supporting information on quality control of raw materials and veterinary pharmaceutical formulations. **Journal Of Pharmaceutical Analysis**, [s.l.], v. 8, n. 3, p. 168-175, jun. 2018.

Azevedo de Brito, Wanessa *et al.* “Development and Validation of HPLC-DAD and UHPLC-DAD Methods for the Simultaneous Determination of Guanylhydrazone Derivatives Employing a Factorial Design. **Molecules**, [s.l.], v. 22,9 1394, Aug. 2017.

BARABADI, Hamed *et al.* Optimization of myco-synthesized silver nanoparticles by response surface methodology employing Box-Behnken design. **Inorganic And Nano-Metal Chemistry**, [s.l.], v. 49, n. 2, p. 33-43, fev. 2019.

BEG, Sarwar *et al.* Development and validation of rp-hplc method for quantitation of amoxicillin trihydrate in bulk and pharmaceutical formulations using box-behnken

experimental design. **Journal Of Liquid Chromatography & Related Technologies**, [S.L.], v. 35, n. 3, p. 393-406, fev. 2012.

BEIGREZAEI, S.; NASRI, H. Tempol as an antioxidant ; an updated review on current knowledge. **Annals of Research in Antioxidants**, v. 2, n. 1, p. e1, 2017.

BERTOLDI, F.C. *et al.* Validação de um método analítico rápido por CLAE-UV para determinação de cumarina em guaco (*Mikania glomerata* Sprengel) confirmado com espectrometria de massas. **Revista brasileira de plantas medicinais**, Botucatu, v. 18, n.1, supl.1, p.316-325, 2016.

BEZERRA, Gilberto Silva Nunes *et al.* Compatibility study between ferulic acid and excipients used in cosmetic formulations by TG/DTG, DSC and FTIR. **Journal Of Thermal Analysis And Calorimetry**, [s.l.], v. 127, n. 2, p. 1683-1691, 2 jul. 2016.

BIGHETTI, Aparecida Erica; SAMPAIO, Patrícia Gisela; DE GUSMÃO, Cintia Prado. Estudo da atividade antioxidante de uma formulação cosmética. **Revista Uningá**, [s.l.], v. 55, n. 3, p. 1-13, set. 2018.

BLESSY, M *et al.* Development of forced degradation and stability indicating studies of drugs—A review. **Journal Of Pharmaceutical Analysis**, [s.l.], v. 4, n. 3, p. 159-165, jun. 2014.

BOX, G. E. P.; BEHNKEN, D. W. Some New Three Level Desing for Study of quantitative variables Box Behnkee.pdf. **Technometrics**, [s.l.], v. 2, n. 4, p. 455–475, 1960.

BRASIL. **Guia para obtenção do perfil de degradação e identificação e qualificação de produtos de degradação em medicamentos - Guia Nº 4/2015 - versão 1**. Brasília: Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA, 2015.

BRUCE, P.; MINKKINEN, P.; RIEKKOLA, M. -L.. Practical method validation: validation sufficient for an analysis method. **Mikrochimica Acta**, [s.l.], v. 128, n. 1-2, p. 93-106, mar. 1998.

BULDUK, İbrahim. HPLC-UV method for quantification of favipiravir in pharmaceutical formulations. **Acta Chromatographica**, [s.l.], v. 33, n. 3, p. 209-215, 28 abr. 2021.

BUNACIU, A. A.; UDRIȘTIOIU, E. GABRIELA; ABOUL-ENEIN, H. Y. X-Ray Diffraction: Instrumentation and Applications. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, [s.l.], v. 45, n. 4, p. 289–299, 2015.

BURKE, Karen E. Mechanisms of aging and development—A new understanding of environmental damage to the skin and prevention with topical antioxidants. **Mechanisms Of Ageing And Development**, [s.l.], v. 172, p. 123-130, jun. 2018.

CAMMACK, Richard. EPR Spectroscopy: general principles. **Encyclopedia Of Biophysics**, [s.l.], p. 695-706, 2013. Springer Berlin Heidelberg.

CAMPOS, M. S. T. *et al.* Kinetics studies of the degradation of sirolimus in solid state and in liquid medium. **Journal Of Thermal Analysis And Calorimetry**, [s.l.], v. 130, n. 3, p.1653-1661, 28 jul. 2017.

CARABAJAL, Maira *et al.* Applications of liquid-phase microextraction procedures to complex samples assisted by response surface methodology for optimization. **Microchemical Journal**, [s.l.], v. 152, p. 104436, jan. 2020.

CEFALI, Letícia Caramori *et al.* Development and evaluation of na emulsion containing glycopene for combating acceleration of skin aging. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences.**, São Paulo, v. 51, n. 3, p. 579-590, Sept. 2015.

CHEN, Yanyan *et al.* Applications of Micro-Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) in the Geological Sciences—A Review. **International Journal Of Molecular Sciences**, [s.l.], v. 16, n. 12, p. 30223-30250, dez. 2015.

COLLINS, C.H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de cromatografia**. 1^a ed. Campinas: ed. Unicamp, 2006.

CUINICA, Lázaro Gonçalves; MACÊDO, Rui Oliveira. Thermoanalytical characterization of plant drug and extract of *Urtica dioica* L. and kinetic parameters analysis. **Journal Of Thermal Analysis And Calorimetry**, [s.l.], v. 133, n. 1, p. 591-602, 1 fev. 2018.

CZYRSKI, Andrzej; SZNURA, Justyna. The application of Box-Behnken-Design in the optimization of HPLC separation of fluoroquinolones. **Scientific Reports**, [s.l.], v. 9, n. 1, p. 7-12, dez. 2019.

DADHICH, Bharat; GOYA, Rakesh; AGARWAL, Dilip. A Review On: Development and Validation of HPLC in Pharmaceutical Dosage Form. **Asian Journal Of Pharmaceutical Research And Development**, Jaipu, v. 4, n. 8, p. 110-121, 20 jun. 2020

DAMIANI, Elisabetta; CASTAGNA, Riccardo; GRECI, Lucedio. The effects of derivatives of the nitroxide tempol on UVA-mediated in vitro lipid and protein oxidation. **Free Radical Biology And Medicine**, [s.l.], v. 33, n. 1, p. 128-136, jul. 2002.

DANKAR, Iman *et al.* Characterization of food additive-potato starch complexes by FTIR and X-ray diffraction. **Food Chemistry**, [s.l.], v. 260, p. 7-12, set. 2018.

DERRINGER, George; SUICH, Ronald. Simultaneous Optimization of Several Response Variables. **Journal Of Quality Technology**, [s.l.], v. 12, n. 4, p. 214-219, out. 1980.

DEIDDA, Riccardo *et al.* Vibrational spectroscopy in analysis of pharmaceuticals: critical review of innovative portable and handheld nir and raman spectrophotometers. **Trac Trends In Analytical Chemistry**, [s.l.], v. 114, p. 251-259, maio 2019.

DONOSO, Ruben *et al.* Thermal and Mechanical Characterization of EMA-TEGDMA Mixtures for Cosmetic Applications. **Polymers**, [s.l.], v. 10, n. 3, p. 256-271, mar. 2018.

DUTTA, Aastha. Fourier Transform Infrared Spectroscopy. **Spectroscopic Methods For Nanomaterials Characterization**, [s.l.], p. 73-93, 2017.

FERREIRA, S.L.C. *et al.* Box-Behnken design: an alternative for the optimization of analytical methods. **Analytica Chimica Acta**, [s.l.], v. 597, n. 2, p. 179-186, ago. 2007.

FUCHS, Jürgen; GROTH, Norbert; HERRLING, Thomas. Cutaneous Tolerance to Nitroxide Free Radicals in Human Skin. **Free Radical Biology And Medicine**, [s.l.], v. 24, n. 4, p. 643-648, mar. 1998.

GAUDEL-SIRI, Anouk *et al.* Collision-induced dissociation of stable nitroxides: a combined tandem mass spectrometry and computational study of tempo• and sg1•. **European Journal Of Mass Spectrometry**, [s.l.], v. 25, n. 2, p. 229-238, abr. 2019.

GASPAR, Lorena Rigo; CAMPOS, Patricia Maria Berardo Gonçalves M. A HPLC method to evaluate the influence of photostabilizers on cosmetic formulations containing UV-filters and vitamins A and E. **Talanta**, [s.l.], v. 82, n. 4, p. 1490-1494, set. 2010.

GERMANO, Gessiane F. *et al.* A new approach for the thermal characterization of monocrotaline, a pyrrolizidine alkaloid. **Journal Of Thermal Analysis And Calorimetry**, [s.l.], 8 abr. 2021.

GOMES, Silvana V.F. *et al.* Accelerated solvent extraction of phenolic compounds exploiting a Box-Behnken design and quantification of five flavonoids by HPLC-DAD in Passiflora species. **Microchemical Journal**, [s.l.], v. 132, p. 28-35, maio 2017.

GOUVEIA, Filipa *et al.* Development, validation and application of a new HPLC-DAD method for simultaneous quantification of apixaban, dabigatran, edoxaban and rivaroxaban in human plasma. **Journal Of Pharmaceutical And Biomedical Analysis**, [s.l.], v. 181, p. 113109, mar. 2020.

GREENWALD, Maya Ben Yehuda *et al.* Can nitroxides evoke the Keap1–Nrf2–ARE pathway in skin? **Free Radical Biology And Medicine**, [S.L.], v. 77, p. 258-269, dez. 2014

HASSIB, Sonia T. *et al.* Quantitative analysis of anti-inflammatory drugs using FTIR-ATR spectrometry. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, [s.l.], v. 186, p. 59-65, nov. 2017.

HU, L *et al.* Effect of Tempol on the prevention of irradiation-induced mucositis in miniature pigs. **Oral Diseases**, [s.l.], v. 23, n. 6, p. 801-808, abr. 2017.

HUSEYNOV, Elchin M. *et al.* EPR spectroscopy of neutron irradiated nanocrystalline boron nitride (h-BN) particles. **Ceramics International**, [s.l.], v. 47, n. 5, p. 7218-7223, mar. 2021.

International Confederation of Thermal Analysis and Calorimetry, **ICTAC**. 2014.

JARAMILLO-COLORADO, Beatriz Eugenia; MARTÍNEZ-CÁCERES, Eduardo Luis; DUARTE-RESTREPO, Edison. Volatile chemical composition and bioactivities from Colombian *Kyllinga pumila* Michx (Cyperaceae) essential oil. *Acta Scientiarum*. **Biological Sciences**, [s.l.], v. 38, n. 3, p. 273-282, dez. 2016.

JOHNSTON, Linda J.; TENCER, Michal; SCAIANO, J. C.. Evidence for hydrogen transfer in the photochemistry of 2,2,6,6-tetramethylpiperidine N-oxyl. **The Journal Of Organic Chemistry**, [s.l.], v. 51, n. 14, p. 2806-2808, jul. 1986.

JURÁSEK, Bronislav *et al.* X-Ray powder diffraction – A non-destructive and versatile approach for the identification of new psychoactive substances. **Talanta**, [s.l.], v. 195, p. 414-418, abr. 2019.

KAMMEYER, A.; LUITEN, R.M. Oxidation events and skin aging. **Ageing Research Reviews**, [s.l.], v. 21, p. 16-29, maio 2015.

KARUNAKARAN, Chandran; BALAMURUGAN, Murugesan. Electron Paramagnetic Resonance Spectroscopy. **Spin Resonance Spectroscopy**, [s.l.], p. 169-228, 2018.

LEITE, Renata da Silva *et al.* Evaluation of compatibility between dried extracts of Myracrodruon urundeuva Allemão and pharmaceutical excipients by TG and DTA. **Journal Of Thermal Analysis And Calorimetry**, [s.l.], v. 133, n. 1, p. 633-639, 21 nov. 2017.

LEWANDOWSKI, Marcin; GWOZDZINSKI, Krzysztof. Nitroxides as Antioxidants and Anticancer Drugs. **International Journal Of Molecular Sciences**, [s.l.], v. 18, n. 11, p. 2490-2516, nov. 2017.

LI, Mo; CHEN, Qian; MA, Teng; YU, Xiaochun. Targeting reactive nitrogen species suppresses hereditary pancreatic cancer. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [s.l.], v. 114, n. 27, p. 7106-7111, jun. 2017.

LIMA, Ígor Prado de Barros *et al.* Compatibility study between hydroquinone and the excipients used in semi-solid pharmaceutical forms by thermal and non-thermal techniques. **Journal Of Thermal Analysis And Calorimetry**, [s.l.], v. 120, n. 1, p. 719-732, ago. 2014.

LOBYSHEVA, Irina I. *et al.* Heme-nitrosylated hemoglobin and oxidative stress in women consuming combined contraceptives. Clinical application of the EPR spectroscopy. **Free Radical Biology And Medicine**, [s.l.], v. 108, p. 524-532, jul. 2017.

LORES, Marta *et al.* Positive lists of cosmetic ingredients: analytical methodology for regulatory and safety controls a review. **Analytica Chimica Acta**, [s.l.], v. 915, p. 1-26, abr. 2016.

MA, Yun. **Nitroxides in Mechanistic Studies: Ageing of Gold Nanoparticles and Nitroxide Transformation in Acids**. 2010. 209 f. Tese (Doutorado) - Curso de Química, University Of York, Iorque, 2010.

MACHADO, Karina Elisa; SIGALES, Geonara Leite; SOLOVY, Ivanisse. Ação do acetilhexapeptídeo-3 no processo de rejuvenescimento facial. **Infarma- Ciências Farmacêuticas**, [s.l.], v. 30, n. 3, p. 185-193, out. 2018.

MESA-ARANGO, Ana Cecilia; FLOREZ-MUNOZ, Sindy Viviana; SANCLEMENTE, Gloria. Mechanisms of skin aging. **Iatreia**, Medellín, v. 30, n. 2, p. 160-170, Apr. 2017.

MIGNOLET, Alix *et al.* FTIR spectral signature of anticancer drugs. Can drug mode of action be identified?. **Biochimica Et Biophysica Acta (Bba) - Proteins And Proteomics**, [s.l.], v. 1864, n. 1, p. 85-101, jan. 2016.

MITRA, Doyel *et al.* Abstract 2258: TEMPOL diet provides chemoprotection against UV-induced skin cancer in mice with epidermal Smad4 deletion. **Cancer Research**, [s.l.], v. 74, n. 19, p.2258, set. 2014.

MOHAMED, Mona A.; ATTIA, Ali K.. Thermal behavior and decomposition kinetics of cinnarizine under isothermal and non-isothermal conditions. **Journal Of Thermal Analysis And Calorimetry**, [s.l.], v. 127, n. 2, p. 1751-1756, 24 maio 2016.

MOHAMED, Mona A.; ATTY, Shima A.; BANKS, Craig E.. Thermal decomposition kinetics of the antiparkinson drug “entacapone” under isothermal and non-isothermal conditions. **Journal Of Thermal Analysis And Calorimetry**, [s.l.], v. 130, n. 3, p. 2359-2367, 12 set. 2017.

MOLDOVEANU, Serban C.; DAVID, Victor. **Parameters that Characterize HPLC Analysis**. In: _____. **Essentials in modern hplc separations**. [s.l.]: Elsevier, 2013. v, p 53-83.

MOU, Qianqian *et al.* Response Surface Optimized Infrared-Assisted Extraction and UHPLC Determination of Flavonoid Types from Flos Sophorae. **Molecules**, [s.l.], v. 22, n. 6, p. 1000, 15 jun. 2017.

NIKOLIN, Branko *et al.* High performance liquid chromatography in pharmaceutical analyses. **Bosnian Journal Of Basic Medical Sciences**, [s.l.], v. 4, n. 2, p. 5-9, 20 maio 2004.

NILSEN, Aaron; BRASLAU, Rebecca. Nitroxide decomposition: implications toward nitroxide design for applications in living free-radical polymerization. **Journal Of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry**, [s.l.], v. 44, n. 2, p. 697-717, 2005.

NUNES, Douglas Vq. *et al.* TEMPOL, a superoxide dismutase-mimetic drug, prevents chronic ischemic renal injury in two-kidney, one-clip hypertensive rats. **Clinical And Experimental Hypertension**, [s.l.], v. 40, n. 8, p.721-729, jan. 2018.

OLIVEIRA, Marcelo Antonio de; YOSHIDA, Maria Irene; GOMES, Elionai Cassiana de Lima. Análise térmica aplicada a fármacos e formulações farmacêuticas na indústria farmacêutica. **Química Nova**, [s.l.], v. 34, n. 7, p. 1224-1230, 2011.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE. Saúde nas Américas+, Edição de 2017. **Resumo do panorama regional e perfil do Brasil**. Washington, D.C.: OPAS; 2017.

OZAWA, Takeo. A New Method of Analyzing Thermogravimetric Data. **Bulletin Of The Chemical Society Of Japan**, [s.l.], v. 38, n. 11, p. 1881-1886, nov. 1965.

PATKI, Gaurav. *et al.* Tempol treatment reduces anxiety-like behaviors induced by multiple anxiogenic drugs in rats. **PLoS ONE**, [s.l.], v. 10, n. 3, 2015.

PENALVER, Rosa *et al.* An overview of microplastics characterization by thermal analysis. **Chemosphere**, [s.l.], v:242, p.125-170, mar. 2020.

PENNINGTON, Justin *et al.* Development of an LC–MS method for ultra trace-level determination of 2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxl (TEMPO), a potential genotoxic impurity within active pharmaceutical ingredients. **Journal Of Pharmaceutical And Biomedical Analysis**, [s.l.], v. 114, p. 488-492, out. 2015.

PETERSSON, Patrik *et al.* Why ultra high performance liquid chromatography produces more tailing peaks than high performance liquid chromatography, why it does not matter and how it can be addressed. **Journal Of Chromatography A**, [s.l.], v. 1218, n. 39, p. 6914-6921, set. 2011.

PORTO, Dayanne Lopes *et al.* Development and validation of a stability indicating HPLC-DAD method for the determination of the peptide stigmurin. **Microchemical Journal**, [s.l.], v. 157, p. 104921, set. 2020.

PRESCOTT, Christopher; BOTTLE, Steven E.. Biological Relevance of Free Radicals and Nitroxides. **Cell Biochemistry And Biophysics**, [S.L.], v. 75, n. 2, p. 227-240, 6 out. 2016.

PUCEK, Agata *et al.* Recent Advances in the Structural Design of Photosensitive Agent Formulations Using “Soft” Colloidal Nanocarriers. **Pharmaceutics**, [s.l.], v. 12, n. 6, p. 587, 24 jun. 2020. MDPI AG.

QUEIROZ, R. F. *et al.* Nitroxides attenuate carrageenan-induced inflammation in rat paws by reducing neutrophil infiltration and the resulting myeloperoxidase-mediated damage. **Free Radical Biology and Medicine**, [s.l.], v. 53, n. 10, p. 1942–1953, 2012.

RAMOS-E-SILVA, Marcia *et al.* Anti-aging cosmetics: Facts and controversies. **Clinics In Dermatology**, [s.l.], v. 31, n. 6, p. 750-758, nov. 2013.

RIOS, Maria Aleksandra de Sousa *et al.* Phosphorus cardanol: chemical characterization and thermal stability. **Scientia Plena**, [s.l.], v. 12, n. 3, p.1-11, mar. 2016.

ROMANET, Rémy *et al.* Exploring the chemical space of white wine antioxidant capacity: a combined dpph, epr and ft-icr-ms study. **Food Chemistry**, [s.l.], v. 355, p. 129566, set. 2021.

SAMUNI, A. M. *et al.* Nitroxides as antioxidants: Tempol protects against EO9 cytotoxicity. **Molecular and Cellular Biochemistry**, [s.l.], v. 234–235, n.1, p. 327–333, may. 2002.

SANAP, Gokul S.; ZAREKAR, Nilesh S.; PAWAR, Sarita S.. REVIEW ON METHOD DEVELOPMENT AND VALIDATION. **International Journal Of Pharmaceutics & Drug Analysis, Kopargao**, v. 5, n. 5, p. 177-184, may. 2017.

SANDOVAL, Maria Helena Lesqueves; CAIXETA, Clarice Martins; RIBEIRO, Nathalia Meireles. In vivo and in vitro evaluation of the cutaneous anti-aging efficacy of a product containing vitamin C, fragmented hyaluronic acid, and mannose. **Surgical And Cosmetic Dermatology**, Rio de Janeiro, v. 1, n. 7, p.37-44, jan. 2015.

SCHETTINO, L *et al.* A Rapid and Sensitive Method for the Determination of Cannabidiol in Cosmetic Products by Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry. **Cosmetics**, [s.l.], v. 8, n. 2, p. 1-9, april. 2021.

SHINTO, Saki *et al.* Antioxidant nitroxides protect hepatic cells from oxidative stress-induced cell death. **Journal Of Clinical Biochemistry And Nutrition**, [s.l.], v. 62, n. 2, p. 132-138, mar. 2018.

SIES, Helmut; BERNDT, Carsten; JONES, Dean P.. Oxidative Stress. **Annual Review Of Biochemistry**, [s.l.], v. 86, n. 1, p. 715-748, jun. 2017.

SILVA, Edilamar Pereira da *et al.* Compatibility study between atorvastatin and excipients using DSC and FTIR. **Journal Of Thermal Analysis And Calorimetry**, [s.l.], v. 123, n. 2, p. 933-939, out. 2015.

SILVA, Elton Clementino da; PAOLA, Maria Valéria Robles Velasco de; MATOS, Jivaldo do Rosário. Análise térmica aplicada à cosmetologia. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêutica**, São Paulo, v. 43, n. 3, p. 347-356, sept. 2007.

SILVA JÚNIOR, Walter Ferreira da *et al.* Thermal behavior and thermal degradation kinetic parameters of triterpene a, b amyrrin. **Journal Of Thermal Analysis And Calorimetry**, [s.l.], v. 127, n. 2, p. 1757-1766, jan. 2017.

SMITH, Craig D. *et al.* Electrospray ionization mass spectrometry of stable nitroxide free radicals and two isoindoline nitroxide dimers. **Journal Of Mass Spectrometry**, [s.l.], v. 35, n. 5, p. 607-611, maio 2000.

SOLON, Lílian Grace da Silva *et al.* Development and validation of an UHPLC method for the determination of betamethasone valerate in cream, gel, ointment and lotion. **Steroids**. [s.l.], v. 106, p. 70-77, fev. 2016

SOULE, B. *et al.* The chemistry and biology of nitroxide compounds. **Free Radical Biology & Medicine**, [s.l.], v. 42, n. 11, p. 1632-1650, jun. 2007.

SUN, Xiao-liang. *et al.* Design, synthesis, and biological evaluation of novel TEMPOL derivatives as effective antitumor agents. **Research On Chemical Intermediates**, Xi'an, p. 7659-7673, may.2016.

TALSI, Evgenii. Applications of EPR and NMR Spectroscopy in Homogeneous Catalysis. Broken Sound Parkway Nw: **Crc Press**, 2017. 245 p.

TAMILMANI, P; PANDEY, M.C. Thermal analysis of meat and meat products. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, [s.l.], v.123, pag. 1899-1917, may.2015.

THAKRAL, Naveen K.; ZANON, Roger L.; KELLY, Ron C.; THAKRAL, Seema. Applications of Powder X-Ray Diffraction in Small Molecule Pharmaceuticals: achievements and aspirations. **Journal Of Pharmaceutical Sciences**, [s.l.], v. 107, n. 12, p. 2969-2982, dez. 2018.

THALER, Sebastian *et al.* Neuroprotective effects of tempol acyl esters against retinal ganglion cell death in a rat partial optic nerve crush model. **Acta Ophthalmologica**, [s.l.], v. 89, n. 7, p. 555-560, 3 jun. 2011.

TRZYBIŃSKI, D. *et al.* Single-crystal X-ray diffraction analysis of designer drugs: Hydrochlorides of metaphedrone and pentedrone. **Forensic Science International**, [s.l.], v. 232, n. 1-3, p.28-32, 2013.

VENDITTI, Elisabetta *et al.* Nitroxides are more efficient inhibitors of oxidative damage to calf skin collagen than antioxidant vitamins. **Biochimica Et Biophysica Acta (Bba) - General Subjects**, [s.l.], v. 1780, n. 1, p. 58-68, jan. 2008.

VENDITTI, Elisabetta *et al.* Nitroxides and a nitroxide-based UV filter have the potential to photoprotect UVA-irradiated human skin fibroblasts against oxidative damage. **Journal Of Dermatological Science**, [s.l.], v. 63, n. 1, p. 55-61, jul. 2011.

VIJAYABASKAR, S.; MAHALINGAM, V.; KALAIIVANI. Analytical method development and validation for the analysis of verapamil hydrochloride and its related substances by using ultra performance liquid chromatography. **Journal Of Pharmaceutical And Biomedical Analysis**, [s.l.], v. 137, p. 189-195, abr. 2017.

WC, D. *et al.* Efficacy of the superoxide dismutase mimetic TEMPOL in animal hypertension models: a meta-analysis. **Journal Of Hypertension**, [s.l.], v.33. n.1, p. 14-23, jan. 2015.

WU, W. *et al.* Identification, characterization and HPLC quantification of formulation-related impurities of honokiol, an antitumor natural drug candidate in clinical trials. **Journal of**

Pharmaceutical and Biomedical Analysis, [*s.l.*], v. 153, p. 186–192, may. 2018.

YASHIN, Ya.I.; YASHIN, A.Ya.. Liquid Chromatography. **Chemical Analysis Of Food: Techniques and Applications**, [*s.l.*], p. 285-310, 2012.

ZHAO, Ying-Yong *et al.* Ultra-performance liquid chromatography–mass spectrometry as a sensitive and powerful technology in lipidomic applications. **Chemico-Biological Interactions**, [*s.l.*], v. 220, p. 181-192, set. 2014

ZOUBOULIS, Christos C.; MAKRANTONAKI, Eugenia; NIKOLAKIS, Georgios. When the skin is in the center of interest: an aging issue. **Clinics In Dermatology**, [*s.l.*], v. 37, n. 4, p. 296-305, jul. 2019.

YIP, Yiu-Chung; WONG, Siu-Kay; CHOI, Sik-Man. Assessment of the chemical and enantiomeric purity of organic reference materials. **Trac Trends In Analytical Chemistry**, [*S.L.*], v. 30, n. 4, p. 628-640, abr. 2011