

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM VIGILÂNCIA SANITÁRIA
INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

Marcelo Raul Romero Tappin

PROPOSTA DE PROTOCOLO PARA A CERTIFICAÇÃO DE
MATERIAL DE REFERÊNCIA PARA DERIVADOS DE
PLANTAS MEDICINAIS

Rio de Janeiro

2012

Marcelo Raul Romero Tappin

PROPOSTA DE PROTOCOLO PARA A CERTIFICAÇÃO DE
MATERIAL DE REFERÊNCIA PARA DERIVADOS DE
PLANTAS MEDICINAIS

Tese apresentada ao curso de Pós-graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz como requisito para a obtenção do título de Doutor em Vigilância Sanitária.

Orientador: Leonardo Lucchetti

Co-orientador: Antonio Carlos Siani

Rio de Janeiro

2012

Catálogo na fonte

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Biblioteca

Tappin, Marcelo Raul Romero

Proposta de protocolo para a certificação de material de referência para derivados de plantas medicinais. / Marcelo Raul Romero Tappin. - Rio de Janeiro: INCQS, 2012.

237f. : il., tab.

Tese de Doutorado (Pós-graduação em Vigilância Sanitária) – Curso de Pós-graduação em Vigilância Sanitária. Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz.

1. Controle da Qualidade. 2. Certificação de material de referência. 3. Plantas medicinais.

Marcelo Raul Romero Tappin

PROPOSTA DE PROTOCOLO PARA A CERTIFICAÇÃO DE
MATERIAL DE REFERÊNCIA PARA DERIVADOS DE
PLANTAS MEDICINAIS

Tese apresentada ao curso de Pós-graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz como requisito para a obtenção do título de Doutor em Vigilância Sanitária

Aprovado em 07 / 05 / 2012

BANCA EXAMINADORA

Silvana do Couto Jacob (Doutora)
Instituto Nacional de Controle da Qualidade em Saúde

Maria das Dores Dutra Behrens (Doutora)
Instituto de Tecnologia em Fármacos

Bernardete Ferraz Spisso (Doutora)
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Dedico este trabalho aos meus pais e a
minha esposa que sempre me incentivaram.

AGRADECIMENTOS

A Marcos Jun Nakamura por todo o apoio dado em todas as etapas deste trabalho sem o qual este não seria possível.

A Fernanda Fernandes Braga pelo apoio.

A Altivo Pitaluga pelas análises realizadas.

A Rafael Cardoso Seicera pelas análises realizadas.

A Eliane Gonçalves de Carvalho pelas análises realizadas.

A Adélia Mara Belén Lima pelas análises realizadas.

Aos orientadores pelo apoio.

A minha esposa pela paciência e pela ajuda na revisão e formatação do trabalho.

RESUMO

Com a promulgação do decreto presidencial nº 5813 de 22 de junho de 2006 foi aprovada a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. Como desdobramento desta política é esperado um aumento do número de pedidos de registro de produtos tendo plantas medicinais como base. Neste contexto é papel da Vigilância Sanitária zelar pela qualidade destes produtos. Um dos pontos críticos neste controle é a indisponibilidade de substâncias de referência certificadas, em função da dificuldade de se certificar novas substâncias para as quais não há substância de referência prévia. Este trabalho elaborou uma proposta de protocolo para certificação de substâncias de origem vegetal para o controle da qualidade de plantas medicinais e fitoterápicos. O protocolo elaborado tem como base o ISO Guia 35, documento elaborado pela ISO que descreve os requisitos gerais e estatísticos para a certificação de materiais de referência. Também foram consultadas uma série de referências sobre o estado da arte das principais técnicas a serem aplicadas em certificação de substâncias. Por fim as principais dificuldades na certificação de substâncias de origem vegetal também foram discutidas. O protocolo proposto foi testado parcialmente com quatro substâncias: os ácidos oleanólico e betulínico; e com os tetranortriterpenoides isolados de *Carapa guianensis*, 7-desacetóxi-7-oxogedunina e 6 α -acetoxigedunina. Para estes últimos foi desenvolvido um processo de isolamento que se mostrou satisfatório inclusive com seu aumento de escala, o que subsidia no futuro um teste para a sua certificação.

Palavras-chave: Controle da Qualidade. Certificação de Material de Referência. Plantas medicinais.

ABSTRACT

The National Policy for Medicinal Plants and Herbal Medicines was approved in June 22, 2006. As a result, it is expected an increase in the registration of herbal medicines based on Brazilian native medicinal plants, in this context, regulating authorities must ensure the quality of these products. One of the key points of herbal medicines quality assurance is the low availability of certified reference substances, mainly because of the difficulties in certifying new substances for which there are no previous references. This work elaborated a protocol proposal for the certification of substances from plant origin for the quality assurance of herbal medicines. The proposal was based on ISO GUIDE 35, the ISO document that describes general and statistical requisites for the certification of reference material. References on the state of the art of the recommended techniques for the certification of substances were also consulted and main difficulties on the certification of substances isolated from medicinal plants were delineated. The proposal was partially tested with 5 substances: Oleanolic acid, ursolic acid, 7-deacetoxy-7-xogedunin and 6 α -acetoxygedunin. The last two tetranortriterpenoids from *Carapa guianensis* for which an isolation process was developed, including an improvement on the process scale that will allow the complete certification of these substances in the future.

Key-words: Quality Control. Reference Material Certification. Medicinal Plants.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - SQRs de plantas na Lista de Registro Simplificado da IN nº 5 (ANVISA, 2008) por instituição produtora	24
Quadro 1 - Usos medicinais da <i>Carapa guianensis</i> .	27
Figura 2 - Tetranortriterpenoides presentes no óleo de andiroba.	29
Figura 3 - Triterpenoides estudados.	31
Figura 4 - Esquema de estudo de homogeneidade.	42
Figura 5 - Esquema de avaliação de homogeneidade intrafrasco.	43
Figura 6 - Esquema de um estudo de estabilidade isócrono.	45
Figura 7 - Fluxograma do processo de certificação por múltiplos laboratórios.	54
Figura 8 - Estrutura do Paclitaxel.	60
Quadro 2 - Método de análise por CG-EM dos tetranortriterpenóides.	91
Quadro 3 - Método de análise por CG-EM dos ácidos triterpênicos.	91
Figura 9 - Espectro de RMN ¹³ C de 7-desacetoxi-7-oxogedunina.	92
Figura 10 - Espectro de RMN ¹ H de 7-desacetoxi-7-oxogedunina.	93
Figura 11 - Espectro de massas do 7-desacetoxi-7-oxogedunina.	93
Figura 12 - Resultado do CDE do 7-desacetoxi-7-oxogedunina.	94
Figura 13 - Espectro de RMN ¹³ C de 6 α -acetoxigedunina do Grupo Fpp1.	95
Figura 14 - Espectro de RMN ¹ H de 6 α -acetoxigedunina do Grupo Fpp1.	95
Figura 15 - Espectro de RMN ¹³ C de 6 α -acetoxigedunina do Grupo Gpp1.	96
Figura 16 - Espectro de RMN ¹ H de 6 α -acetoxigedunina Grupo Gpp1.	96
Figura 17 - Espectro de massas de 6 α -acetoxigedunina do Grupo Fpp1.	97
Figura 18 – Espectro de massas de 6 α -acetoxigedunina do Grupo Gpp1.	97
Figura 19: Espectro de massas do ursolato de metila sililado.	98
Figura 20 - Análise de CDE de ácido ursólico.	98
Figura 21 - Espectro de massas do oleanolato de metila sililado.	99
Figura 22 - Análise de CDE de ácido oleanólico.	99
Quadro 4 - Etapas do procedimento de isolamento de tetranortriterpenoides.	102
Quadro 5 - Método de análise por CG-DIC.	103
Quadro 6 - Planejamento fatorial da extração por Soxhlet.	104
Quadro 7 - Preparo das soluções de 7-desacetoxi-7-oxogedunina.	104
Figura 23 - Precipitados da extração de polpa de sementes de <i>Carapa guianensis</i>	106
Figura 24 - Aproximação dos cromatogramas dos precipitados.	106

Figura 25 - Resultado da otimização da extração.	107
Figura 26 - Gráfico de massa de precipitado x tempo.	108
Figura 27 - Cromatogramas de CG dos precipitados de cada extração.	109
Figura 28 - Cromatogramas dos precipitados de cada dia da extração 9.	110
Figura 29 - Cromatograma da amostra PP.	110
Quadro 8 - Sistemas de solvente utilizados nos testes de partição.	113
Quadro 9: Equipamento de agitação.	113
Quadro 10 - Proporções dos sistemas estudados.	114
Figura 30 - Diagrama de fase do sistema de solventes n-heptano/2-propanol/água.	114
Quadro 11 - Experimentos realizados na otimização da partição.	116
Quadro 12 - Proporções do sistema n-heptano/2-propanol/água na linha de ligação do diagrama.	117
Quadro 13 - Método otimizado de CG-DIC para a amostra PP.	118
Figura 31 - Cromatogramas das amostras resultantes das duas fases do sistema n-heptano/2-propanol/água.	119
Figura 32 - Gráfico de Pareto da composição do sistema	119
Figura 33 - Gráfico do modelo em função das variáveis.	120
Figura 34 - Gráfico de superfície de resposta da razão glicerídeos/tetranortriterpenoides na fase superior.	120
Figura 35 - Gráfico de Pareto para a razão glicerídeos/tetranortriterpenoides na fase superior.	121
Figura 36 - Gráfico do modelo em função das variáveis.	121
Figura 37 - Gráficos de superfície de resposta da razão glicerídeos/tetranortriterpenoides na fase superior.	121
Figura 38 - Cromatogramas das fases superior e inferior obtidas pelas condições otimizadas	122
Figura 39 - Cromatogramas das fases superior e inferior com aumento de escala	122
Figura 40 - Cromatogramas de CG das amostras produzidas nos experimentos de aumento de escala da partição	124
Figura 41 - Cromatogramas de CG dos experimentos de produção de PPsG.	125
Figura 42 - Cromatogramas das amostras resultantes dos experimentos de obtenção de PPsG.	126
Quadro 14 - Experimentos de otimização da extração em fase sólida.	130

Quadro 15 - Eluição do experimento otimizado.	130
Quadro 16 - Aumento da escala da extração em fase sólida.	131
Figura 43a: Cromatogramas das frações do experimento 1 de EFS.	132
Figura 43b: Cromatogramas das frações do experimento 1 de EFS.	133
Figura 43c: Cromatogramas das frações do experimento 1 de EFS.	134
Figura 44a: Cromatogramas das frações do experimento 2 de EFS.	135
Figura 44b: Cromatogramas das frações do experimento 2 de EFS.	136
Figura 44c: Cromatogramas das frações do experimento 2 de EFS.	137
Figura 45a: Cromatogramas das frações do experimento 3 de EFS.	138
Figura 45b: Cromatogramas das frações do experimento 3 de EFS.	139
Figura 46 - Cromatogramas das frações F1 e F2 obtidas na condição otimizada.	139
Figura 47 - Cromatograma da fração F3 obtida na condição otimizada.	139
Figura 48 - Cromatogramas de CG das frações do experimento A.	140
Figura 49 - Cromatogramas de CG das frações obtidas no experimento B.	141
Figura 50 - Cromatogramas de CG das frações do experimento C.	142
Figura 51 - Cromatogramas de CG das frações obtidas no experimento D.	143
Figura 52 - Cromatogramas de CG das frações obtidas do experimento E.	144
Figura 53 - Cromatogramas CG das frações obtidas no experimento F.	145
Figura 54 - Cromatograma em CLAE de SPF2	145
Quadro 17 - Testes de precipitação de SPF2.	149
Quadro 18: Método analítico de CLAE-AFD (arranjo de fotodiodos).	149
Figura 55 - Cromatogramas das amostras obtidas no Experimento 1.	150
Figura 56 - Cromatogramas das amostras obtidas no Experimento 2.	150
Figura 57 - Cromatogramas das frações obtidas no experimento 1 escalonado.	151
Figura 58 - Cromatogramas das frações obtidas no experimento 2 em escala aumentada.	152
Figura 59 - Cromatogramas das frações pp1 e pp2 da precipitação de SPF2u.	153
Figura 60 - Cromatograma de SPF2u.	153
Quadro 19 - Experimentos de coluna de fase reversa.	156
Quadro 20 - Aumento de escala da coluna de fase reversa.	157
Figura 61 - Cromatograma da amostra Ctn.	157
Figura 62 - Cromatogramas das frações obtidas pela coluna de fase reversa.	158
Figura 63 - Cromatogramas das frações obtidas pela coluna de fase reversa II.	159

Figura 64a - Cromatogramas das frações obtidas pela coluna de fase reversa III.	160
Figura 64b: Cromatogramas das frações obtidas pela coluna de fase reversa III.	161
Figura 65a - : Cromatogramas das frações obtidas pela coluna de fase reversa IV.	162
Figura 65b - Cromatogramas das frações obtidas pela coluna de fase reversa IV.	163
Figura 66a - Cromatogramas das frações obtidas pela coluna de fase reversa V.	164
Figura 66b - Cromatogramas das frações obtidas pela coluna de fase reversa V.	165
Figura 67a - Cromatogramas das frações obtidas pela coluna de fase reversa VI.	166
Figura 67b - Cromatogramas das frações obtidas pela coluna de fase reversa VI.	167
Figura 68 - Cromatogramas das frações obtidas pela coluna de fase reversa VII.	168
Figura 69a - Cromatogramas das frações obtidas pela coluna de fase reversa VIII.	169
Figura 69b - Cromatogramas das frações obtidas pela coluna de fase reversa VIII.	170
Figura 70a - Cromatogramas das frações obtidas pela coluna de fase reversa IX.	171
Figura 70b - Cromatogramas das frações obtidas pela coluna de fase reversa IX.	172
Figura 70c - Cromatogramas das frações obtidas pela coluna de fase reversa IX.	173
Figura 71a - Cromatogramas das frações obtidas pela coluna de fase reversa X.	174
Figura 71b - Cromatogramas das frações obtidas pela coluna de fase reversa X.	175
Figura 72a - Cromatogramas das frações obtidas pela coluna de fase reversa XI.	176

Figura 72b - Cromatogramas das frações obtidas pela coluna de fase reversa XI.	177
Figura 73 - Cromatogramas das frações da coluna B.	178
Figura 74a - Cromatogramas das frações da coluna C.	179
Figura 74b - Cromatogramas das frações da coluna C.	180
Figura 75a - Cromatogramas das frações da coluna D.	182
Figura 75b - Cromatogramas das frações da coluna D.	183
Quadro 21 - Classificação e união das frações.	187
Quadro 22 - União de amostras do grupo 3.	188
Figura 76 - Cromatogramas das frações resultantes da purificação da fração F1.	189
Figura 77 - Cromatogramas das frações resultantes da purificação da fração F3.	189
Figura 78 - Cromatogramas das frações resultantes da purificação do grupo 1A.	190
Figura 79 - Cromatogramas das frações resultantes da purificação do grupo 1B.	191
Figura 80 - Cromatogramas das frações resultantes da purificação do grupo 3A.	191
Figura 81 - Cromatogramas das frações resultantes da purificação do grupo 3B.	192
Figura 82 - Cromatogramas das frações resultantes da purificação do grupo 3C.	192
Figura 83 - Cromatogramas das frações resultantes da purificação do grupo 3D.	193
Figura 84 - Cromatogramas das frações resultantes da re-purificação do grupo 1Bpp1.	194
Figura 85 - Cromatogramas das frações resultantes da re-purificação do grupo 3App1.	194
Figura 86 - Cromatogramas das frações resultantes da re-purificação do grupo 3Bpp1.	194
Figura 87 - Cromatogramas das frações resultantes da re-purificação do grupo 3Cpp1.	195
Figura 88 - Cromatogramas das frações resultantes da repurificação do grupo 3Dpp1.	195

Figura 89 - Cromatogramas das frações resultantes da re-purificação do grupo 3App1sob	196
Figura 90 - Cromatogramas das frações resultantes da re-purificação do grupo 3F.	197
Figura 91 - Cromatogramas das frações resultantes da repurificação do grupo 3G.	197
Figura 92 - Cromatogramas do isolamento por CCC	201
Quadro 23 - Experimentos para otimização do método cromatográfico de CG.	202
Quadro 24 - Preparo da curva de calibração de 7-desacetóxi-7-oxogedunina.	203
Figura 93 - Cromatograma de PP obtido pelo método analítico do quadro 5.	204
Figura 94 - Gráfico de Pareto da otimização do método de CG.	205
Figura 95 - Gráfico do modelo em função das variáveis da otimização do método de CG.	205
Figura 96 - Cromatograma de PP no método otimizado.	207
Quadro 25: Planejamentos de mistura para a otimização da fase móvel de CLAE.	209
Quadro 26: Curva de calibração.	210
Figura 97 - Cromatograma de SPF2 na fase móvel 25:37,3:37,5 (acetonitrila/água/metanol).	210
Figura 98 - Gráficos de superfície de resposta dos três planejamentos realizados.	211
Figura 99 - Gráfico de Pareto do planejamento 3.	211
Figura 100 - Gráfico do modelo em função das variáveis do planejamento 3.	212
Figura 101- Cromatograma CLAE da amostra SPF2 utilizando a fase móvel otimizada.	212

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Análises e a massa utilizada na certificação de Ginsenosídeo Rg1	76
Tabela 2 - Massa mínima necessária para a medição de pureza no estudo de viabilidade.	77
Tabela 3 - Massa mínima necessária para a certificação por CDE e RMNHq.	78
Tabela 4 – Massa mínima da substância candidata para certificação completa.	78
Tabela 5 – Massa mínima da substância candidata para a certificação interna.	78
Tabela 6 – Massa mínima da substância candidata para a certificação interna em um frasco.	79
Tabela 7 – Purezas das diferentes amostras analisadas por CDE.	100
Tabela 8 - Massa e rendimento das extrações.	108
Tabela 9 - Volumes das fases nas três proporções estudadas.	123
Tabela 10 - Rendimento dos testes na nova proporção.	123
Tabela 11 - Rendimento dos experimentos da proporção 34,2:50,0:15,8.	125
Tabela 12 - Rendimento dos experimentos de obtenção de PPsG.	126
Tabela 13 - Massa e rendimento das frações.	139
Tabela 14 - Massa e rendimentos das frações do experimento A.	140
Tabela 15 - Massa e rendimentos das frações do experimento B.	141
Tabela 16 - Massa e rendimentos das frações do experimento C.	142
Tabela 17 - Massa e rendimentos das frações do experimento D.	143
Tabela 18 - Massa e rendimentos das frações do experimento E.	144
Tabela 19 - Massa e rendimentos das frações do experimento F.	145
Tabela 20 - Massa e rendimento do Experimento 1 escalonado.	151
Tabela 21 - Massa e rendimento do experimento 2 escalonado.	152
Tabela 22 - Massa e rendimento da precipitação de SPF2u em escala aumentada.	153
Tabela 23 - Massa e rendimento das frações da coluna B.	178
Tabela 24 - Massa e rendimento das frações da coluna C.	179
Tabela 25 - Massa e rendimento das frações da coluna D.	181
Tabela 26 - Razões entre áreas de tetranortriterpenoides em frações da coluna B, após purificação	189
Tabela 27: Massa dos grupos originados da união de frações.	190
Tabela 28 - Resultados das amostras pp1 resultantes da precipitação/purificação.	193

Tabela 29 - Resultados das amostras pp1 resultantes da reprecipitação/purificação.	195
Tabela 30 - Resultados da precipitação/purificação de 3App1sob.	196
Tabela 31: Massas dos grupos 3F e 3G.	196
Tabela 32 - Resultado da purificação dos grupos 3Fpp1 e 3Gpp1.	197
Tabela 33 - Rendimento do processo de isolamento.	200
Tabela 34 - Tetranortriterpenoides isolados por Cromatografia de Contra-Corrente.	201
Tabela 35 - Resultados previstos pelo modelo e os obtidos experimentalmente	206
Tabela 36 - Coeficientes de variação de cada concentração da curva.	207
Tabela 37 - Teor dos TNTP na amostra CGPP.	207
Tabela 38 - Conteúdos individuais de tetranortriterpenoides em SPF2.	213

LISTA DE SIGLAS

DAF	Detector de Arranjo de Fotodiodos
DAC	Detector de Aerosol Carregado
CCCRS	Collaborating Centre for Chemical Reference Substances
CDE	Calorimetria Diferencial Exploratória
CG	Cromatografia em Fase Gasosa
CITAC	Corporation on International Traceability In Analytical Chemistry
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CTn	Cristais similares a SPF2 obtidos em estudos não apresentados
DIC	Detector de Ionização em Chama
EDQM	European Directorate for the Quality of Medicines and Health
DELE	Detector de Espalhamento de Luz Evaporativo
FDA	Food and Drugs Agency
Inmetro	Instituto Nacional de Metrologia
IN	Instrução Normativa
ISO	International Standardisation Organization
MRC	Material de Referência Certificado
PNPMF	Politica Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos
PP	Precipitado obtida na extração da polpa das sementes
PPsG	Precipitado sem glicerídeos
PPTn	Precipitado de SPF2
RMNHq	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio Quantitativa.
SI	Sistema Internacional de Medidas
SPF2	Fração rica em tetranortriterpenoides da extração em fase sólida
SQR	Substância Química de Referência
TG	Termogravimetria
TNTP	Tetranortriterpenoides
USP	United States Pharmacopeia
WHO	World Health Organization

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	22
1.1 POLÍTICA NACIONAL DE PLANTAS MEDICINAIS E FITOTERÁPICOS	22
1.2 DESAFIOS PARA A VIGILÂNCIA SANITÁRIA	22
1.3 SUBSTÂNCIAS QUÍMICAS DE REFERÊNCIA	23
1.4 SUBSTÂNCIAS QUÍMICAS DE REFERÊNCIA CERTIFICADAS	25
1.5 A ESPÉCIE <i>Carapa guianensis</i>	26
1.6 OS TRITERPENÓIDES ÁCIDO URSÓLICO E ÁCIDO OLEANÓLICO	29
2. RELEVÂNCIA DA PROPOSTA	32
3. OBJETIVOS	33
3.1 OBJETIVOS GERAIS	33
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	33
4. ESTABELECIMENTO DE MATERIAIS DE REFERÊNCIA CERTIFICADOS	34
4.1 PREÂMBULO	34
4.2 DETERMINAÇÃO DE INCERTEZA	35
4.3 ISO GUIA 35	36
4.3.1 Materiais de referência	36
4.3.2 Projeto de certificação	36
4.3.3 Determinação de incerteza da certificação do material de referência	38
4.3.4 Estudo de homogeneidade	39
4.3.4.1 <i>Natureza do material de referência certificado</i>	40
4.3.4.2 <i>Conceito de homogeneidade</i>	40
4.3.4.3 <i>Seleção dos frascos para o teste de homogeneidade</i>	40
4.3.4.4 <i>Medição da homogeneidade</i>	41
4.3.4.5 <i>Avaliação da homogeneidade</i>	41
4.3.4.6 <i>Homogeneidade intrafrasco</i>	43
4.3.5 Estudo de estabilidade	44
4.3.5.1 <i>Desenho de estudo de estabilidade</i>	44
4.3.5.2 <i>Avaliação dos resultados</i>	46
4.3.5.2.a <i>Cálculo com ANOVA</i>	46
4.3.5.2.b <i>Determinação pela regressão da análise de tendência</i>	49
4.3.5.3 <i>Monitoramento da estabilidade</i>	50
4.3.6 Determinação da propriedade do MRC	51
4.3.6.1 <i>Estimativa e demonstração da rastreabilidade</i>	51
4.3.6.2 <i>Desenho do experimento</i>	52

4.3.6.2.a <i>Medição em apenas um laboratório</i>	52
4.3.6.2.b <i>Medição em uma rede de laboratórios</i>	53
4.3.7 Considerações sobre as propriedades a serem medidas	58
4.3.7.1 <i>Propriedades físicas de MRCs</i>	58
4.3.7.2 <i>Pureza dos MRCs</i>	58
4.3.8 Certificação de MRC	59
4.4 MATERIAIS DE REFERÊNCIA CERTIFICADOS PARA PLANTAS MEDICINAIS E FITOTERÁPICOS	59
4.4.1 Métodos analíticos e pureza da substância em certificação	61
4.4.1.1 <i>Calorimetria Diferencial Exploratória</i>	62
4.4.1.2 <i>Ressonância Magnética Nuclear Quantitativa de Próton</i>	64
4.4.1.3 <i>Método de balanço de massas</i>	68
4.4.1.4 <i>Estratégias para a certificação</i>	71
4.4.2 Massa necessária da substância para certificação	72
4.4.3 Exemplo com a certificação de Ginsenosídeo Rg1	75
4.4.4 Massa mínima para a certificação	76
4.5 PROPOSTA DE PROTOCOLO DE CERTIFICAÇÃO	79
4.5.1 Observações sobre o protocolo	90
4.6 CERTIFICAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS DERIVADAS DE PLANTAS MEDICINAIS	90
4.6.1 Experimental	90
4.6.1.1 <i>Ressonância Magnética Nuclear</i>	90
4.6.1.2 <i>Cromatografia em Fase Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas</i>	91
4.6.1.3 <i>Calorimetria Diferencial Exploratória</i>	91
4.6.1.4 <i>Amostras comerciais</i>	92
4.6.2 Resultados	92
4.6.2.1 <i>7-desacetoxi-7-oxogedunina</i>	92
4.6.2.2 <i>6α-acetoxigedunina</i>	95
4.6.2.3 <i>Ácido ursólico</i>	98
4.6.2.4 <i>Ácido oleanólico</i>	99
4.6.3 Discussão	100
5 ISOLAMENTO DE TETRANORTRITERPENÓIDES DE <i>Carapa guianensis</i>	102
5.1 PREÂMBULO	102
5.2 EXTRAÇÃO DAS SEMENTES DE <i>Carapa guianensis</i>	103
5.2.1 Metodologia	103

5.2.1.1 <i>Coleta das sementes</i>	103
5.2.2.2 <i>Extração preliminar das sementes</i>	103
5.2.1.3 <i>Otimização da extração</i>	103
5.2.1.4 <i>Extração das sementes</i>	104
5.2.1.5 <i>Reunião dos precipitados de todas as extrações</i>	105
5.2.2 Resultados	106
5.2.2.1 <i>Extração preliminar de sementes</i>	106
5.2.2.2 <i>Otimização do processo de extração</i>	107
5.2.2.3 <i>Extração de sementes</i>	108
5.2.2.4 <i>Reunião dos precipitados de todas as extrações</i>	110
5.2.3 Discussão	110
5.2.3.1 <i>Extração preliminar das sementes</i>	110
5.2.3.2 <i>Otimização do processo de extração</i>	111
5.2.3.3 <i>Extração de sementes</i>	111
5.2.3.4 <i>Reunião dos precipitados de todas as extrações</i>	112
5.2.4 Conclusão e desdobramentos da extração das sementes	112
5.3 PARTIÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO DE PP	112
5.3.1 Metodologia	112
5.3.1.1 <i>Testes em diferentes sistemas de solventes</i>	112
5.3.1.2 <i>Otimização do sistema n-heptano/2-propanol/água</i>	113
5.3.1.3 <i>Teste das condições otimizadas</i>	116
5.3.1.4 <i>Aumento de escala da partição otimizada</i>	117
5.3.1.5 <i>Aumento de escala utilizando linhas de ligação</i>	117
5.3.1.6 <i>Obtenção de PP livre de glicerídeos</i>	118
5.3.2 Resultados	118
5.3.2.1 <i>Testes de sistemas de solventes</i>	118
5.3.2.2 <i>Otimização do sistema n-heptano/2-propanol/água</i>	119
5.3.2.3 <i>Teste das condições otimizadas</i>	122
5.3.2.4 <i>Aumento de escala da condição otimizada</i>	122
5.3.2.5 <i>Aumento de escala utilizando linhas de ligação</i>	122
5.3.2.6 <i>Obtenção de PP sem glicerídeos</i>	126
5.3.3 Discussão	126
5.3.3.1 <i>Testes de sistemas de solventes</i>	126
5.3.3.2 <i>Otimização do sistema n-heptano/2-propanol/água</i>	127
5.3.3.3 <i>Teste das condições otimizadas</i>	128

5.3.3.4 <i>Aumento de escala da condição otimizada</i>	128
5.3.3.5 <i>Aumento de escala utilizando linhas de ligação</i>	128
5.3.3.6 <i>Obtenção de PP sem glicerídeos</i>	129
5.3.4 <i>Conclusão e desdobramentos da partição líquido-líquido</i>	129
5.4 EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA DE PPsG	130
5.4.1 Metodologia	130
5.4.1.1 <i>Teste e otimização de extração em fase sólida de PPsG</i>	130
5.4.1.2 <i>Teste da extração em fase sólida na condição otimizada</i>	130
5.4.1.3 <i>Aumento de escala da extração em fase sólida</i>	131
5.4.1.4 <i>Aplicação do processo de extração em fase sólida</i>	131
5.4.2 Resultados	131
5.4.2.1 <i>Teste e otimização de extração em fase sólida</i>	131
5.4.2.2 <i>Teste de extração em fase sólida na condição otimizada</i>	139
5.4.2.3 <i>Aumento da escala da extração em fase sólida</i>	140
5.4.2.4 <i>Aplicação do processo de extração em fase sólida</i>	144
5.4.3 Discussão	146
5.4.3.1 <i>Teste e otimização da extração em fase sólida</i>	146
5.4.3.2 <i>Teste de extração em fase sólida na condição otimizada</i>	147
5.4.3.3 <i>Aumento de escala da extração em fase sólida</i>	147
5.4.3.4 <i>Aplicação do processo de extração em fase sólida</i>	148
5.4.4 <i>Conclusão e desdobramentos da extração em fase sólida</i>	148
5.5 PRECIPITAÇÃO/PURIFICAÇÃO DE TETRANORTRITERPENOIDES EM SPF2	148
5.5.1 Metodologia	148
5.5.1.1 <i>Teste de precipitação/purificação</i>	148
5.5.1.2 <i>Aumento de escala do processo de precipitação de SPF2</i>	149
5.5.2 Resultados	149
5.5.2.1 <i>Testes de precipitação</i>	149
5.5.2.2 <i>Aumento de escala do processo de precipitação de SPF2</i>	151
5.5.3 Discussão	153
5.5.3.1 <i>Testes de precipitação</i>	153
5.5.3.2 <i>Aumento de escala do processo de precipitação/purificação de SPF2</i>	154
5.5.4 <i>Conclusão e desdobramentos da precipitação/purificação de SPF2</i>	154
5.6 COLUNA PARA O ISOLAMENTO DE TETRANORTRITERPENOIDES.	155
5.6.1 Metodologia	155

5.6.1.1 <i>Otimização da coluna</i>	155
5.6.1.2 <i>Aumento de escala da coluna para isolamento do tetranortriterpenoides</i>	157
5.6.2 Resultados	157
5.6.2.1 <i>Otimização da coluna</i>	157
5.6.2.2 <i>Aumento de escala da coluna para isolamento de tetranortriterpenoides</i>	178
5.6.3 Discussão	183
5.6.3.1 <i>Otimização da coluna de fase reversa</i>	183
5.6.3.2 <i>Aumento de escala da coluna para isolamento de tetranortriterpenoides</i>	186
5.6.4 Conclusão e desdobramentos da coluna de fase reversa	186
5.7 PRECIPITAÇÃO/PURIFICAÇÃO DAS FRAÇÕES DAS COLUNAS	186
5.7.1 Metodologia	186
5.7.1.1 <i>TESTE DE PRECIPITAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE FRAÇÕES DA COLUNA B</i>	186
5.7.1.2 <i>Precipitação de frações das colunas de fase reversa</i>	187
5.7.1.3 <i>Re-teste de precipitação/purificação da amostra 3App1sob</i>	188
5.7.1.4 <i>Re-precipitação / purificação do grupo 3</i>	188
5.7.2 Resultados	188
5.7.2.1 <i>Precipitação e purificação de frações da coluna B</i>	188
5.7.2.2 <i>Agrupamento das frações das colunas de fase reversa com perfis cromatográficos similares</i>	190
5.7.2.3 <i>Precipitações das frações de coluna de fase reversa</i>	190
5.7.2.4 <i>Re-teste de precipitação/purificação da amostra 3App1sob</i>	196
5.7.2.5 <i>Agrupamento das frações nos grupos F e G</i>	196
5.7.2.6 <i>Precipitação/purificação dos grupos F e G</i>	197
5.7.3 Discussão	197
5.7.3.1 <i>Precipitação/purificação de frações da coluna B</i>	197
5.7.3.2 <i>Agrupamento das frações das colunas de fase reversa com perfis cromatográficos semelhantes</i>	198
5.7.3.3 <i>Precipitação/purificação das frações agrupadas das colunas de fase reversa</i>	198
5.7.3.4 <i>Re-teste de precipitação/purificação da amostra 3App1sob</i>	199
5.7.3.5 <i>Agrupamento das frações dos grupos 3 nos grupos F e G</i>	199
5.7.3.6 <i>Precipitação/purificação dos grupos 3F e 3G</i>	199
5.7.4 Conclusão e desdobramentos da precipitação/purificação de frações das colunas de fase reversa	199

5.8 RENDIMENTO TOTAL DO PROCESSO E COMPARAÇÃO COM A LITERATURA	199
5.9 DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO ANALÍTICO DE CG PARA ANÁLISE DE PP	202
5.9.1 Metodologia	202
5.9.1.1 <i>Planejamento Experimental</i>	202
5.9.1.2 <i>Quantificação dos tetranortriterpenoides na amostra de PP</i>	203
5.9.2 Resultados	204
5.9.2.1 <i>Desenvolvimento de método analítico por CG para análise de PP</i>	204
5.9.3 Discussão	208
5.9.3.1 <i>Desenvolvimento de método analítico por CG para análise de PP</i>	208
5.9.4 CONCLUSÃO E DESDOBRAMENTOS DO Desenvolvimento de método analítico de CG para análise de PP	208
5.10 Desenvolvimento de método para análise de SPF2 por CLAE	209
5.10.1 Metodologia	209
5.10.1.1 <i>Planejamento Experimental</i>	209
5.10.1.2 <i>Quantificação dos tetranortriterpenoides na amostra de SPF2</i>	209
5.10.2 Resultados	210
5.10.2.1 <i>Planejamento experimental</i>	210
5.10.2.2 <i>Quantificação dos tetranortriterpenóides em SPF2</i>	212
5.10.3 Discussão	213
5.10.3.1 <i>Desenvolvimento de método analítico por CLAE para a análise de SPF2</i>	213
5.10.4 Conclusão e desdobramentos do desenvolvimento de método para análise de SPF2 por CLAE	214
6. CONCLUSÃO	215
BIBLIOGRAFIA	216
ANEXO A	222
ANEXO B	227

1. INTRODUÇÃO

1.1 POLÍTICA NACIONAL DE PLANTAS MEDICINAIS E FITOTERÁPICOS

O mercado brasileiro de fitoterápicos está avaliado em cerca de US\$ 540 milhões anuais, um montante ainda modesto levando-se em conta que o mercado nacional de medicamentos gira em torno de US\$ 22 bilhões anuais (Freitas, 2007). Além de uma oportunidade de crescimento econômico, isto representa uma oportunidade de desenvolvimento estratégico para o país, principalmente considerando-se a vantagem intrínseca de ter uma das maiores reservas de biodiversidade do mundo. Por outro lado, o desenvolvimento da indústria de fitoterápicos no país, principalmente centrado em plantas nativas, acarretaria, pelo menos em parte, na necessidade de cultivo de espécies para suprir a demanda, trazendo uma alternativa para o desenvolvimento da agricultura familiar com consequente desenvolvimento social (Laurenzani, Laurenzani e Batalha, 2004). Neste contexto, em 22 de Junho de 2006 foi publicado o Decreto nº 5813, que instituiu a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos – PNPMF (Brasil, 2006), resultado do trabalho do grupo interministerial para a formulação desta política. Entre os objetivos específicos da PNPMF destacam-se dois: o desenvolvimento tecnológico da indústria farmacêutica nacional, com base na produção de medicamentos fitoterápicos e o acesso a instrumentos terapêuticos eficazes e seguros por populações de baixa renda (Brasil, 2006).

1.2 DESAFIOS PARA A VIGILÂNCIA SANITÁRIA

No desenvolvimento de produtos derivados de plantas medicinais, principalmente medicamentos fitoterápicos, a Vigilância Sanitária tem um papel fundamental no cumprimento de suas atribuições dispostas na Lei nº 6360 de 1976. A própria PNPMF destaca que o desenvolvimento tecnológico deve ser promovido com a garantia da qualidade dos produtos desenvolvidos. Cabe à Vigilância Sanitária assegurar esta qualidade, aplicando os instrumentos legais de que dispõe, como a regulação de registro de medicamentos fitoterápicos (Brasil, 2010). O Decreto nº 5813 ainda estabeleceu a necessidade de regulação de produtos que sejam constituídos apenas pela planta fresca ou estabilizada (Brasil, 2006), já presente na legislação atual (Brasil, 2010). Por outro lado, a maioria dos medicamentos fitoterápicos registrados tem como base plantas exóticas ao país, como arnica (*Arnica montana*), ginseng (*Panax ginseng*) e ginkgo (*Ginkgo biloba*).

que são amplamente estudadas, tanto em relação à sua eficácia e segurança como no estabelecimento de padrões de qualidade. Com o aumento esperado de pedidos de registro de produtos com base em plantas nativas, a avaliação das informações de registro deve ser feita com cautela. A comprovação de eficácia e segurança dificilmente terá como base a *Lista de Registro Simplificado de Fitoterápicos* presente IN nº 5 (Brasil, 2008) ou a *Lista de Referências Bibliográficas para a Avaliação de Segurança e Eficácia de Fitoterápicos*, que constitui a IN nº 05 (Brasil, 2010), já que em ambas as listas predominam as plantas exóticas. Ao contrário, a comprovação será realizada por ensaios clínicos. O estabelecimento de padrões de qualidade para plantas nativas requer também uma análise cuidadosa. Se, por um lado, testes gerais para matérias-primas vegetais e de medicamentos fitoterápicos já são bem estabelecidos (WHO, 1998; Farmacopeia Brasileira, 2010), o estabelecimento de marcadores para o controle da qualidade e/ou princípios ativos é dificultado quando se trata de produtos com base em espécies vegetais para as quais não há referências disponíveis – a maioria destas nativas no território nacional.

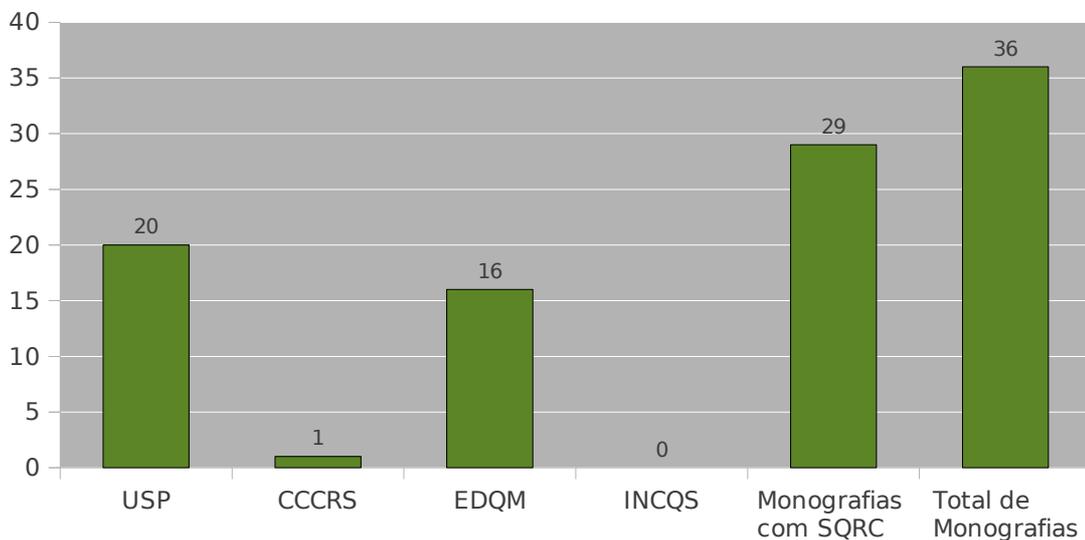
1.3 SUBSTÂNCIAS QUÍMICAS DE REFERÊNCIA

A indústria farmacêutica tem grande impacto na saúde pública, não apenas porque os medicamentos que produz promovem a saúde, mas também porque a modernização da indústria leva à produção de quantidades cada vez maiores de medicamentos por lote. Para o controle da qualidade de medicamentos, a indústria farmacêutica utiliza técnicas analíticas modernas como a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) ou a cromatografia com fase gasosa (CG), dentre outras, que dependem de padrões de referência, seja para o uso em rotina ou mesmo para o desenvolvimento e validação de métodos. Portanto, uma parte importante da qualidade repousa nos padrões de referência ou Substâncias Químicas de Referência (SQR), cujo propósito é alcançar a exatidão e a reprodutibilidade requeridas para o controle da qualidade de produtos farmacêuticos (WHO, 2007). A produção de SQR para fármacos sintéticos é bem desenvolvida, e é assistida e realizada por instituições como a OMS através do *Collaborating Centre for Chemical Reference Substances* (CCCRS), a *US Pharmacopeia* (USP), o *European Directorate for the Quality of Medicines and Health* (EDQM). No Brasil, oficialmente, esta função cabe ao Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz (INCQS/FIOCRUZ), em associação com a Farmacopeia

Brasileira.

Contrastando com essa realidade, a produção de SQR para produtos à base de plantas medicinais é incipiente, concentrando-se nas espécies vegetais mais utilizadas pela indústria farmacêutica e de suplementos alimentares. Para espécies que não se encontram neste grupo, caso da maioria das plantas nativas, as referências disponíveis não têm, em geral, a qualidade necessária para um SQR. A baixa disponibilidade de SQRs para plantas medicinais e produtos derivados já foi abordada por Reif, Sievers e Steffen (2004). Os autores sustentam a produção e utilização destas substâncias como a melhor forma de se assegurar a qualidade de produtos de plantas medicinais e derivados. Da mesma forma, a OMS indica a necessidade de se apontar marcadores de qualidade para plantas medicinais (WHO, 2007). Ilustrando a situação atual, a **Figura 1** mostra a disponibilidade de SQRs para as espécies vegetais presentes na lista de registro simplificado da IN nº 5 (ANVISA, 2008).

Figura 1- SQRs de plantas na Lista de Registro Simplificado da IN nº 5 (ANVISA, 2008) por instituição produtora.



O avanço da USP em relação à certificação de SQRs é facilmente explicável pelo mercado americano de suplementos nutricionais e também é movido por uma sinalização do FDA quanto a tornar mais rigorosos os requisitos para estes produtos (Tappin e Lucchetti, 2007). Vale destacar que das substâncias fornecidas para USP, três substâncias não foram certificadas objetivando produtos de plantas medicinais (cafeína, utilizada para *Paulinia cupana*, e os ácidos palmítico e oleico, considerados para quantificação de ácidos graxos em *Serenoa repens*). O mesmo motivo explica

porque o CCCRS tem SQR apenas *Paulinia cupana* (caféina). Dois dos SQRs fornecidos pelo EDQM também se enquadram nessa categoria: caféina e ácido palmítico. Além disso, alguns destes materiais de referência são extratos padronizados e não propriamente SQRs, seguindo uma linha sustentada por alguns autores que apregoam que, para plantas medicinais, principalmente para suplementos alimentares, não seriam necessárias referências mais elaboradas (Sander, Sharpless e Wise, 2006). A USP tem dois SQRs deste tipo, para *Panax ginseng* e para *Piper methys*; o EDQM outros dois, para *Senna alexandrina* e *Valeriana officinalis*.

Sobre a lista presente na IN nº 5 vale apontar que mesmo considerando estes extratos padronizados, ainda há sete plantas da lista sem nenhum tipo de SQR, o que dificulta seu controle da qualidade. Além disso, da perspectiva de exploração da biodiversidade brasileira no desenvolvimento de medicamentos fitoterápicos, chama a atenção o fato da lista presente na IN nº 5 ser formada, principalmente, por plantas de origem europeia e asiática. Isto é uma consequência da grande disponibilidade de informações sobre eficácia e segurança para estas espécies e ainda reforça a necessidade da realização de pesquisas científicas sobre espécies vegetais nativas, associadas a atividades de desenvolvimento tecnológico, como a produção de SQRs.

1.4. SUBSTÂNCIAS QUÍMICAS DE REFERÊNCIA CERTIFICADAS

Em um mundo cada vez mais globalizado, as análises químicas e físico-químicas desempenham um papel fundamental e diverso como, por exemplo, na análise de poluentes atmosféricos e de rios transnacionais; ou na análise da qualidade de produtos comercializados entre países. Este contexto indica a necessidade de materiais de referência estabelecidos e certificados que permitam a comparação de resultados obtidos em diferentes laboratórios (Walker, 1999). A princípio, no controle da qualidade farmacêutica, este papel é desempenhado pelos SQRs produzidos pela USP e pelo EDQM. Contudo, para assegurar a comparabilidade interlaboratorial é necessário utilizar materiais de referência certificados ou, mais especificamente neste caso, substâncias químicas de referência certificadas. Segundo o Vocabulário Internacional de Metrologia (Inmetro, 2009), a definição de material de referência certificado é:

- “Material de referência acompanhado de documentação emitida por um organismo com autoridade, a qual fornece um ou mais valores de propriedades especificadas com as incertezas e rastreabilidades associadas, utilizando procedimentos válidos”.

Dessa forma, as substâncias químicas de referência certificadas tem conhecidas, além da pureza, sua incerteza, e a declaração de sua rastreabilidade ao sistema internacional de medidas (SI) fornecida por uma cadeia de rastreabilidade. Os SQRs da USP e do EDQM fornecem apenas o valor da pureza, não se prestando, portanto, para a comparação interlaboratorial.

Os princípios gerais e estatísticos para a certificação de materiais de referência estão apresentados no ISO Guia 35 (ISO, 2006). Nele estão descritos, de forma resumida, como calcular a incerteza associada a materiais de referência certificados, assim como estratégias para a quantificação da propriedade do MRC, neste caso a pureza.

Portanto, a garantia da qualidade de produtos farmacêuticos, na qual se incluem os derivados plantas medicinais, passa pela certificação de seus materiais de referência. A situação se torna mais crítica para espécies medicinais nativas, pois para estas não há materiais de referência disponíveis. Neste contexto, a implementação da PNPMF, ao induzir um aumento no uso de plantas com fins terapêuticos, torna evidente a necessidade de se produzir SQRs certificados para as espécies nativas. Neste processo de obtenção de SQR certificados, é crucial o estabelecimento de um protocolo de certificação que leve em consideração as particularidades dessas substâncias, tendo em vista, em última instância, a garantia da qualidade de produtos de base vegetal.

1.5 A ESPÉCIE *Carapa guianensis*

A espécie *Carapa guianensis* Aubl. (Meliaceae), conhecida popularmente como “andiroba”, é uma árvore de grande porte. Seu fruto, com a forma de cápsula globosa deiscente de 6-8 cm de diâmetro, apresenta em seu interior 6 a 8 sementes que fornecem cerca de 70% de um óleo espesso, de cor amarelo-escuro. Ocorre em toda a Amazônia, em matas de várzeas ou regiões alagadiças dos rios, às vezes formando pequenas aglomerações. Existe ainda nas Antilhas, Nicarágua, Peru, Suriname, Guianas, África tropical, Colômbia e Venezuela (VIEIRA *et al.*, 2004).

A *C. guianensis* é usada tradicionalmente no tratamento de moléstias diversas. Alguns trabalhos etnográficos, envolvendo uma série de entrevistas em comunidades de caboclos da ilha de Marajó sobre plantas utilizadas com objetivos medicinais, relatam inúmeros usos para a *C. guianensis* (HAMMER e JOHNS, 1993), conforme descritos no **Quadro 1**.

Quadro 1 - Usos medicinais da *Carapa guianensis*.

<i>Moléstia ou ação</i>	<i>Parte da planta utilizada</i>
Artrite	Óleo de “andiroba” aplicado diretamente sobre as juntas.
Inflamação da Garganta	Uma colherada de óleo de “andiroba” com fruta de “cabacinha”: gargarejar uma vez ao dia. Se não há “cabacinha”, tomar apenas o óleo ou óleo com mel.
Repelente de insetos	O óleo é aplicado diretamente sobre a pele.
Cicatrizante	O óleo é aplicado diretamente sobre a ferida ou um decocto do córtex é preparado, e o líquido aplicado sobre a ferida.
Diarreia	O decocto do córtex é bebido três vezes ao dia.
Diabetes	Um copo do decocto do córtex é bebido três vezes ao dia.
Infecção de ouvido	O óleo é colocado em água quente e misturado ao leite humano e pingado no ouvido.
Estimulante digestivo	O córtex é macerado e seco durante 15 dias; este material então é misturado com água e tomado antes das refeições.
Câncer uterino	O óleo é aplicado diretamente na região vaginal e nas paredes cervicais.

Coerentemente com os resultados relatados, as propriedades da *C. guianensis* no combate a insetos têm sido um dos principais objetos de estudo com a árvore. Pereira (1998) demonstrou o poder de repelência a mosquitos, exercido pelo bagaço resultante do processo de extração do óleo de “andiroba”, chegando a desenvolver uma vela repelente a partir deste material, para a qual se depositou uma patente (FIOCRUZ, 2000). O mesmo trabalho indicou que as substâncias presentes no bagaço, responsáveis por essa atividade são os tetranortriterpenóides (TNTPD). Por outro lado, a atividade repelente a *Aedes sp* do óleo de “andiroba” foi

comparada à do N,N-dietil-3-metilbenzamida (ou DEET), repelente sintético largamente utilizado e, ao contrário do bagaço, aquele apresentou uma atividade repelente discreta, muito inferior (MIOT *et al.*, 2004). Em outra abordagem, Mendonça e colaboradores (2005) demonstraram a atividade tóxica contra larvas de *Aedes* sp de várias plantas dentre as quais se incluía o óleo de andiroba (500 µg/l). Silva e colaboradores (2006) avaliaram diferentes doses de óleo de andiroba (de 15 a 700 ppm) contra larvas de duas linhagens de *Aedes aegypti* em diferentes estágios evolutivos. Os resultados mostraram uma relação entre a dose e a atividade tóxica do óleo, sendo esta dependente também da linhagem. A atividade tóxica do bagaço da *C. guianensis* contra larvas de *Aedes albopictus* também foi demonstrada por Silva e colaboradores com doses variando de 0.5 a 4% (SILVA *et al.*, 2004). Ambrozin e colaboradores (2006) isolaram alguns tetranortriterpenoides também demonstraram uma moderada atividade tóxica destes (100 µg/ml) contra formigas da espécie *Atta sexdens rubropilosa*.

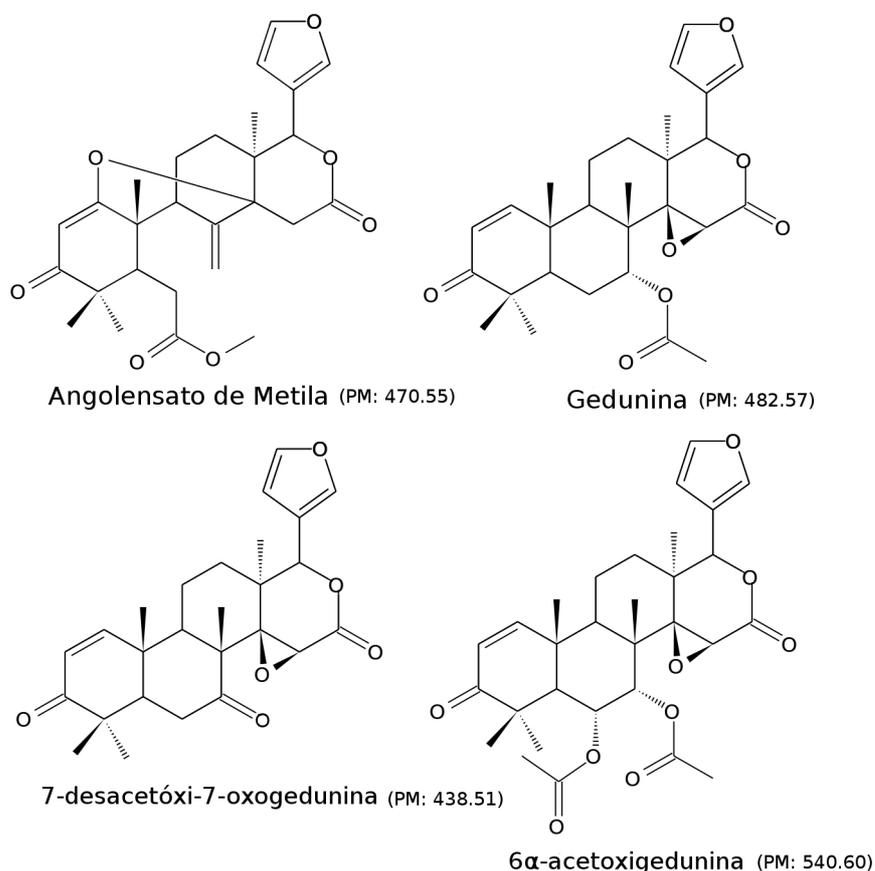
Um alvo terapêutico que tem sido explorado, também coerente com o saber popular, é o efeito anti-inflamatório da andiroba. A atividade anti-edematogênica, analgésica e anti-alérgica do óleo de andiroba foram comprovadas (100 a 400 mg/kg) e dos tetranortriterpenoides (12,5 a 100 mg/Kg) isolados desta espécie (Penido *et al.*, 2005). Estudos mais detalhados da atividade anti-inflamatória dos tetranortriterpenoides demonstraram sua ação terapêutica em modelos *in vivo* de artrite com doses de até 200 mg/Kg (Penido, 2006a), assim como a atividade anti-alérgica em modelos mais específicos em doses de até 200 mg/kg (Penido, 2006b).

Costa-Silva e colaboradores (2007) realizaram um estudo toxicológico em ratos Wistar prenhas. Os autores não evidenciaram sinais tóxicos clínicos ou efeitos teratogênicos do óleo de andiroba com doses até 15 vezes maiores que a utilizada por Penido (2005). Os mesmos autores realizaram um estudo de toxidez aguda e subaguda em ratos Wistar através da administração oral de doses elevadas de óleo e andiroba. Comparadas com as doses propostas por Penido e colaboradores (2005) as doses utilizadas por Costa-Silva e colaboradores foram 50 vezes maiores no estudo agudo e 15 vezes maiores no estudo subagudo. Os resultados não indicaram alterações significativas em nenhum dos parâmetros estudados. Todavia, foram observadas alterações em enzimas transaminases, indicando um possível efeito hepatotóxico (2008).

A variedade de resultados farmacológicos para extratos derivados de *C.*

guianensis indica a necessidade de uma padronização química destes materiais. Este estudo foi iniciado com a análise química do óleo de andiroba realizada por Tappin (2007), no qual foram desenvolvidos dois métodos de análise para tetranortriterpenóides, um por CLAE e outro por CG; sendo ambos foram pré-validados, utilizando como referência o tetranortriterpenoide 7-desacetóxi-7-oxogedunina (7-oxo), isolado e caracterizado no mesmo estudo. Além desta substância, foram quantificados o angolensato de metila, a gedunina e a 6 α -acetoxigedunina (**Figura 2**) sendo eles cerca de 0,7 % (m/m) da amostra. Estes tetranortriterpenoides são, neste contexto, candidatos à certificação.

Figura 2 - Tetranortriterpenoides presentes no óleo de andiroba.



1.6 OS TRITERPENOIDES ÁCIDO URSÓLICO E ÁCIDO OLEANÓLICO

Os ácidos ursólico e oleanólico são ácidos triterpênicos de grande ocorrência na natureza como ácidos livres ou na forma glicosilada como saponinas. Jäger e colaboradores (2009) compilaram extratos de 39 espécies, nas quais encontraram pelo menos um dos dois destes ácidos em 36 delas. Os dois ácidos mais comuns

foram o ácido oleanólico e o ácido ursólico; ambos encontrados em 24 das espécies estudadas. O ácido oleanólico é descrito em muitas espécies como, por exemplo, *Panax Ginseng*, *Calendula officinalis* e *Eugenia jambolana*. O ácido ursólico é encontrado em *Coffea arabica*, *Melissa officinalis* e *Malus domestica*.

Inúmeras atividades farmacológicas foram investigadas para os dois triterpenoides. Ríos (2010) publicou uma revisão em que descreve as propriedades anti-inflamatórias dos dois triterpenoides mencionados acima, entre outras. Em outras revisões, Saleen e colaboradores (2010) destacam as suas propriedades antimicrobianas e Topçu (2006), ao compilar os triterpenos bioativos de espécies do gênero *Salvia*, demonstrou que, além das atividades já mencionadas, o ácido oleanólico e ácido ursólico possuem atividades anti-hiperlipidêmica, hipoglicêmica e anticarcinogênica entre outras.

Além da ampla ocorrência e da variedade de atividades terapêuticas, o ácido oleanólico e o ácido ursólico estão presentes em quantidades notáveis na natureza. No estudo mencionado, Jäger e colaboradores (2009) quantificaram os extratos das espécies estudadas e frequentemente encontraram teores de mais de 1% dos dois ácidos. Este fato potencializa como comerciais as espécies selecionadas pelos autores, e também possibilita pesquisas importantes com estes triterpenoides, já que aponta como exequível o isolamento deles em quantidades significativas. Por exemplo, os autores chamam a atenção para as cascas de *Malus domestica*, a espécie comum de maçã, que apresenta quantidades significativas dos dois triterpenoides e tem a vantagem de já constituir uma cultura convencional de larga escala.

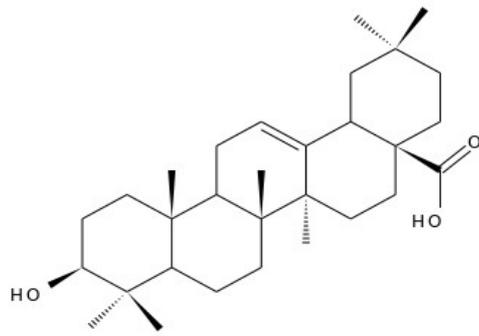
Sporn e colaboradores (2011) publicaram uma revisão em que apresentam os mecanismos para a síntese de derivados do ácido oleanólico, utilizando este como material de partida. Os autores ainda relataram a atividade antiinflamatória apresentada por muitos destes derivados.

Pela sua grande ocorrência, alguns autores indicaram estes ácidos triterpênicos como marcadores químicos para atestar a qualidade de algumas plantas medicinais e de produtos nutracêuticos e fitofarmacêuticos (Baricevic et al., 2011) (Chen, Xia e Tan, 2003).

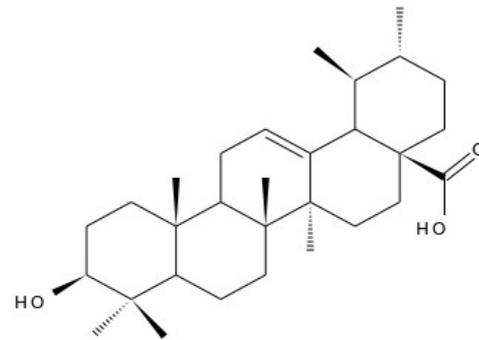
A importância terapêutica, a possibilidade de gerar inúmeros derivados, e a facilidade de acesso em fontes naturais, tornam o ácido oleanólico e o ácido ursólico candidatos importantes no desenvolvimento de novos medicamentos e, por

consequente, candidatos naturais à certificação. As estruturas do ácido oleanólico e do ácido ursólico estão apresentadas na **figura 3**.

Figura 3 - Triterpenoides estudados.



Ácido oleanólico (PM: 456.70)



Ácido ursólico (PM: 456.70)

2. RELEVÂNCIA DA PROPOSTA

Como política nacional, a aprovação da PNPMF deve causar um impacto tecnológico em médio e longo prazo nos programas governamentais de desenvolvimento de novos medicamentos. A oficialização do aproveitamento dos recursos da biodiversidade como matéria-prima para este desenvolvimento deve aportar recursos para a regulação do uso de plantas medicinais e para o desenvolvimento de produtos industriais à base de produtos naturais. É natural que, conseqüentemente, ocorra uma tendência de aumento no número de solicitações de registros para medicamentos fitoterápicos e derivados.

Este fato do segmento produtivo requer o cumprimento de uma série de exigências de caráter regulatório; o que significará também um esforço adicional dos órgãos regulatórios para atender à demanda da garantia da qualidade neste âmbito. Nos segmentos químico e farmacêutico, entre outros requisitos, será fundamental o desenvolvimento de metodologias analíticas e a obtenção e certificação de substâncias de referência. Portanto, as ações de vigilância deverão ser apoiadas por trabalhos que subsidiem esta assertiva. É neste nicho que se insere a presente proposta de elaborar um protocolo para a certificação de substâncias voltadas para o controle da qualidade de plantas medicinais.

Assim, o objeto do presente estudo é a elaboração fundamentada de um protocolo de certificação de substâncias para controle da qualidade de plantas medicinais e seus derivados. Esta proposição se complementa com a aplicação do protocolo desenvolvido na certificação de tetranortriterpenoides constituintes da espécie medicinal *Carapa guianensis*, assim como na certificação dos triterpenoides bioativos ácido ursólico e ácido oleanólico.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

- Elaborar uma proposta de protocolo para a certificação de substâncias químicas de referência certificadas para controle de qualidade de plantas medicinais.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar levantamento bibliográfico do estado da arte da certificação de material de referência.
- Estudar as particularidades de substâncias de origem vegetal para a aplicação do protocolo.
- Elaboração de proposta de protocolo para certificação de substâncias químicas de referência para plantas medicinais.
- Isolamento e caracterização de tetranortriterpenoides de *Carapa guianensis*.
- Aplicação da proposta de protocolo de certificação a tetranortriterpenoides isolados e os ácidos ursólico e ácido oleanólico.

• 4. ESTABELECIMENTO DE MATERIAIS DE REFERÊNCIA CERTIFICADOS

4.1 PREÂMBULO.

As medições químicas têm papel fundamental na ciência moderna e em áreas diversas como a própria química, e outras afins, como biologia, bioquímica, farmacologia, etc. Além disso, as medições químicas também se aplicam nos setores industriais e regulatórios tão distintos quanto o controle da qualidade de medicamentos e alimentos, análises de poluentes ambientais, análises forenses, etc.

Independente do campo científico ou da aplicação em foco, as medições químicas devem ser capazes de fornecer resultados com qualidade. Taverniers, Bockstaele e De Loose (2004) definiram a qualidade de uma medição química baseada em dois critérios: utilidade e confiabilidade. Por utilidade entende-se que a medição química permite uma tomada de decisão confiável. Daí, a confiabilidade da medição química dá suporte à utilidade. A confiabilidade dos resultados é obtida através de ações variadas como: implementação de sistemas da qualidade, treinamento de pessoal, qualificação de equipamentos, validação de metodologias, etc.

Contudo, o aspecto chave da confiabilidade das medições químicas é a comparabilidade de resultados em locais e tempos diferentes – o que fornece, em última análise, a utilidade a uma medição química. A comparabilidade de resultados é obtida através da rastreabilidade de resultados, utilizando-se referências apropriadas. Convencionalmente, a referência que dará suporte à rastreabilidade é, em última análise, o Sistema Internacional de Medidas (S.I.).

No entanto, na maioria das medições químicas cada substância apresenta um sinal com intensidade e características diferentes, o que impede a rastreabilidade direta ao S.I., requerendo então o uso de material de referência certificado (MRC) específico da substância de interesse. Exceções marcantes a esta afirmativa são a Calorimetria Diferencial Exploratória (CDE) (Van Dooren e Muller, 1984) e algumas aplicações de Ressonância Magnética Nuclear Quantitativa (RMNq) (Pauli, Jaki, Lankin, 2005), que são de grande importância na certificação de materiais de referência.

O estabelecimento de MRCs não é uma atividade simples, apesar de não ser necessariamente complexa. É trabalhosa e envolve uma série de estudos que garantem o uso para o qual foram estabelecidas. Os princípios gerais e estatísticos metrologicamente aceitos, para o estabelecimento de MRCs, são descritos no ISO

GUIA 35 e tem como base os métodos de determinação de incerteza de métodos analíticos (2006).

4.2 DETERMINAÇÃO DE INCERTEZA

Segundo o *Vocabulário Internacional de Termos Fundamentais e Gerais de Metrologia* (Inmetro, 2009), a incerteza de uma medição é definida como “*parâmetro, associado ao resultado de uma medição, que caracteriza a dispersão dos valores que podem ser fundamentalmente atribuídos a um mensurando*”. A incerteza da medição pode ser expressa em desvio padrão ou erro padrão (no caso de medidas com cálculo de média).

A determinação da incerteza de uma medição está descrita em vários guia internacionais, como o *Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement*, publicado pelo Eurachem/CITAC (ref) e o *Evaluation of Measurement Data – Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement*, uma publicação conjunta do BIPM, ISO e outras instituições.

Existem algumas abordagens distintas para determinação da incerteza dependendo das informações disponíveis. O processo básico de determinação ou cálculo de incerteza é realizado em diversas etapas. O primeiro passo é a especificação do material a ser analisado, como a especificação do analito, matriz da amostra, e a expressão matemática, ou modelo, pela qual o resultado é calculado a partir dos resultados brutos. Com este modelo matemático, identifica-se cada fonte de incerteza a partir de cada item do modelo. A incerteza combinada de todas as fontes é calculada pelas expressões:

$$u_{med} = \sqrt{u(x_1)^2 + u(x_2)^2 + u(x_3)^2 + \dots + u(x_n)^2} \quad (1)$$

$$u_{med} = \sqrt{\left(\frac{u(x_1)}{x_1}\right)^2 + \left(\frac{u(x_2)}{x_2}\right)^2 + \left(\frac{u(x_3)}{x_3}\right)^2 + \dots + \left(\frac{u(x_n)}{x_n}\right)^2} \quad (2)$$

Onde u_{med} é a incerteza combinada da medição; x_n são as fontes de incerteza; $u(x_n)$ é a incerteza de x_n .

A expressão (1) é utilizada quando o modelo inclui apenas somas ou

subtrações e a expressão (2) quando o modelo inclui apenas multiplicações ou divisões. Em caso de um modelo misto, este pode ser dividido em partes que possam ser calculadas por (1) ou (2). A limitação da aplicação destas expressões é que as fontes de incertezas devem ser independentes entre si.

Um exemplo de cálculo de incerteza retirado do *Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement* da Eurachem (2000) é apresentado no **anexo B**.

4.3 ISO GUIA 35

O ISO GUIA 35, como indica o nome, é publicado pela *International Organization for Standardization* (ISO). O documento estabelece os princípios gerais e estatísticos para a certificação de Materiais de Referência (MR), cujo conceito mais amplo, extrapola as Substâncias Químicas de Referência (SQR).

4.3.1 Materiais de referência.

Uma das primeiras definições que o documento coloca é a diferenciação entre material de referência e material de referência certificado (MRC). O material de referência é:

- “Material suficientemente homogêneo e estável com respeito a uma ou mais propriedades especificadas que foi estabelecido para servir ao uso ao qual se propõe no processo de medição.”
- “Material de referência caracterizado por um método metrologicamente válido, para uma ou mais propriedades especificadas, acompanhado de um certificado que fornece o valor da propriedade certificada, acompanhado de sua incerteza associada e de uma declaração da rastreabilidade metrológica.”

4.3.2 Projeto de certificação.

De acordo com as definições acima, o GUIA estabelece as seguintes etapas para um projeto de certificação de material de referência:

- Desenho do projeto.
- Avaliação de questões sobre transporte.
- Obtenção do material inicial.

- Estudo de viabilidade.
- Avaliação sobre o tempo de vida requerido e tempo de prateleira.
- Preparação da amostra.
- Estudo de homogeneidade.
- Estudo de estabilidade.
- Certificação.

O desenho do projeto é a etapa inicial quando todo o estudo será planejado. Nesta fase é elaborada uma definição que tem por objetivo resumir e esclarecer em uma frase aspectos variados do projeto como: identificação do material de referência, a matriz da amostra, os analitos, qual o objetivo ou a grande área da medição em que será usado o MRC, qual o nível da propriedade que será medida e qual a incerteza associada. O método em que será utilizado não é necessário, contudo pode ser incluído. O estabelecimento desta definição permite então passar a planejar os detalhes das próximas etapas da certificação.

Na avaliação sobre questões de transporte, verifica-se se há alguma restrição para a distribuição do material de referência em estudo, por se tratar de uma substância perigosa ou algum agente patológico. Podem existir proibições ou especificações e/ou procedimentos específicos para o transporte do material. Estas questões devem ser abordadas logo no começo do estudo, no sentido de aperfeiçoar o planejamento. Questões regulatórias também são abordadas neste momento, como a obtenção de permissões para coleta e transporte, por exemplo.

Uma vez planejado o projeto, deve-se tratar da obtenção do material em estudo. A principal questão a ser levada em conta é a quantidade de material necessário para a certificação. Esta quantidade deve considerar não só todas as etapas experimentais subsequentes, mas também uma parcela extra de material para distribuição e uso. Uma boa medida sugerida é o número de amostras que se espera distribuir durante o período de estabilidade previsto.

O estudo de viabilidade tem por objetivo avaliar a possibilidade de se produzir e caracterizar a quantidade de material necessária com a homogeneidade e estabilidade apropriadas. Em alguns casos, o estudo pode servir para avaliar a capacidade de medição dos laboratórios envolvidos antes do estudo principal.

A vida útil esperada ou requerida para o MRC também é definida neste momento. Informações sobre a estabilidade do material podem estar disponíveis na literatura, e com base nelas adotam-se medidas que permitam estender a vida útil do material de referência certificado. Por exemplo, a aferição da umidade do material, o uso de aditivos em solução para aumentar a estabilidade, etc.

A preparação da amostra é a etapa na qual serão realizadas as operações que visam obter um lote de material com a homogeneidade e estabilidade adequadas para a certificação. Dependendo do material de referência em estudo, esta etapa pode ser simples ou complexa. Em geral, substâncias puras podem apresentar a necessidade de homogeneização, contudo normalmente já apresentam a pureza necessária quando se atinge esta etapa. No entanto, alguns materiais de referência envolvem a inclusão de analitos em matrizes, muitas vezes mais de um analito. Com este tipo de material, os cuidados nos preparos devem incluir a forma de se misturar os componentes considerando-se, por exemplo, diferentes matrizes, a adição de analitos de interesse às matrizes e a homogeneização e subdivisão do material.

O estudo de homogeneidade, como indica o nome, tem por objetivo determinar a homogeneidade do material distribuído. Já o estudo de estabilidade determina o tempo de vida útil e a estabilidade para o transporte do material. Ambos os estudos serão discutidos adiante.

A certificação do material é a elaboração do certificado que acompanha o MR, provendo as informações sobre: propriedade de interesse, seu valor, a incerteza associada, e a declaração de rastreabilidade. Estas informações são as mínimas necessárias para a emissão do certificado, no entanto, um relatório detalhando todo o processo de certificação também é necessário, devendo ser disponibilizado aos usuários. É necessário incluir o nome de um representante do órgão certificador responsável pelas informações do certificado.

4.3.3 Determinação de incerteza da certificação do material de referência.

Como mencionado acima, o requisito essencial que garante tanto a utilidade como a confiabilidade do material de referência certificado é a determinação da incerteza associada ao MRC. A incerteza associada ao uso do MRC perpassa todas as etapas experimentais do projeto de certificação e é composta pela combinação da incerteza associada a cada uma delas. Assim, de acordo com o expresso em (1),

a incerteza de um MRC pode ser expressa da seguinte maneira:

$$u_{MRC} = \sqrt{u_{med}^2 + u_{hef}^2 + u_{eld}^2 + u_{ecd}^2} \quad (3)$$

Onde u_{MRC} é a incerteza combinada do MRC; u_{med} é a incerteza do método de medição da propriedade do MRC; u_{hef} é a incerteza da homogeneidade entre frascos, u_{eld} é a incerteza da estabilidade de longa duração; e u_{ecd} é a incerteza da estabilidade de curta duração.

O valor da propriedade medida do MRC pode ser expresso da seguinte maneira:

$$x_{MRC} = x_{med} + x_{hef} + x_{eld} + x_{ecd} \quad (4)$$

Onde x_{MRC} é o valor da propriedade medida do MRC; x_{med} é o valor da propriedade medida pelo método; x_{hef} é o erro sistemático derivado da homogeneidade entre frascos; x_{eld} é o erro sistemático derivado da estabilidade de longa duração; e x_{ecd} o erro sistemático derivado da estabilidade de curta duração. O preparo da amostra do MRC é realizado para que os erros associados à estabilidade e homogeneidade em (4) sejam desprezíveis, no entanto, sua incerteza associada a eles não é desprezível e deve ser levada em conta no cálculo em (3).

Como pode ser visto em (3) e (4), o valor da propriedade do MRC e de sua incerteza é derivado tanto da medição da propriedade quanto dos estudos de homogeneidade e estabilidade. Todas as suas incertezas são então combinadas para se calcular a incerteza da propriedade do MRC.

A determinação da incerteza da medição é realizada com base no exemplo descrito no **Anexo B**. Os cálculos das incertezas derivadas da homogeneidade e da estabilidade do MRC será descrito a seguir.

4.3.4 Estudo de homogeneidade

A maioria dos materiais de referência é preparada em lotes, como lotes de frascos por exemplo, sendo a etapa final da preparação de um MRC uma subdivisão nestes itens. Normalmente, um subgrupo destes itens é separado para realizar um estudo de homogeneidade. A seleção deste subgrupo é geralmente realizada aleatoriamente. No entanto, quando a homogeneidade é tida como certa, um método

sistemático pode também ser aplicado.

Como descrito anteriormente, a incerteza associada à homogeneidade entre frascos é um dos componentes da incerteza do MRC. Sua magnitude pode variar muito dependendo da natureza do MRC. No entanto, este estudo só é aplicável quando um único certificado é emitido para todo o lote.

O outro aspecto importante é a homogeneidade intrafrasco. No entanto, a incerteza desta pode ser minimizada fornecendo instruções de uso como, por exemplo, uma massa mínima ou homogeneização prévia.

4.3.4.1 Natureza do material de referência certificado

A natureza do MRC terá papel fundamental em sua homogeneidade. Substâncias puras e soluções apresentam em geral um alto grau de homogeneidade. Nestes casos, a falta de homogeneidade deriva normalmente da presença de impurezas que não são homogeneamente distribuídas. Na maioria das vezes, a incerteza calculada deste estudo deve ser bem pequena, podendo ser desprezível, o que não a exime da necessidade de ser calculada.

Por outro lado, quando o MRC é uma mistura de diversas naturezas, a heterogeneidade ocorre de forma acentuada. A incerteza derivada destes casos pode ainda ser pequena, principalmente se comparada à incerteza derivada da estabilidade ou da medição. Porém, em alguns casos, é inevitável que tenha a mesma ordem de grandeza da incerteza da medição.

4.3.4.2 Conceito de homogeneidade

Teoricamente, um material é considerado homogêneo quando não há diferença do valor da propriedade medida entre os frascos. Na prática, no entanto, considera-se um material como homogêneo se a diferença entre as partes é avaliada como desprezível, quando comparado, por exemplo, com a incerteza da caracterização.

4.3.4.3 Seleção dos frascos para o teste de homogeneidade

Devem ser selecionados ao menos 10 frascos para o estudo de homogeneidade. A seleção deve preferencialmente ser aleatória e caso sejam identificados estratos dentro do conjunto, deve-se realizar uma seleção aleatória

dentro de cada estrato. Apenas se a homogeneidade for tida como certa, será possível realizar a seleção por um método sistemático.

4.3.4.4 Medição da homogeneidade

O método utilizado para medir a propriedade em cada frasco deve apresentar uma repetitividade alta. As medições devem ser realizadas de forma a garantir que a visualização de tendência das amostras seja separada da tendência da análise. Para tanto, intercalam-se as análises para cada série de alíquotas, por exemplo, ímpares e pares, e inverte-se a ordem ao analisar uma nova série de alíquotas.

4.3.4.5 Avaliação da homogeneidade

A avaliação da homogeneidade pode ser dividida em duas etapas: a avaliação de tendência e a avaliação de homogeneidade em si. A avaliação de tendência é realizada calculando uma regressão linear com o número dos frascos como variável independente (x) e as medições das alíquotas de cada frasco como variável dependente (y). O cálculo utiliza o modelo abaixo:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X + \varepsilon \quad (5)$$

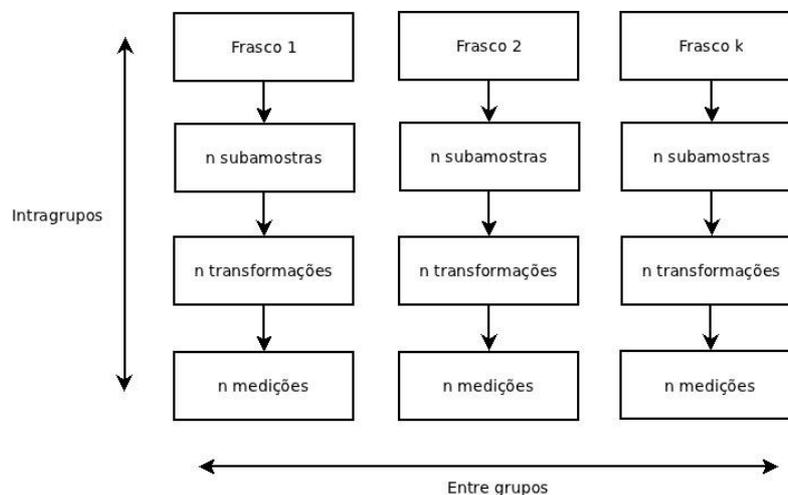
Onde β_0 é o coeficiente linear; β_1 é o coeficiente angular; e ε é o componente do erro aleatório. Para se avaliar a ocorrência de uma tendência, deve-se testar a significância de β_1 . A forma mais simples de cálculo é uma Análise de Variância (ANOVA) da regressão, normalmente realizada em cálculos de regressão linear. Caso a regressão seja significativa (ou seja, β_1 é significativo) há uma tendência no lote – o que indica que há falta de homogeneidade - e o MRC não pode ser certificado. Os cálculos para esta avaliação estão apresentados no **Anexo A**. Se a regressão não for significativa, determina-se a incerteza associada à homogeneidade entre os frascos.

O estudo da homogeneidade tem como base o modelo seguinte, onde i é o número do frasco e j é o número da alíquota.

$$x_{ij} = \mu + A_i + \varepsilon_{ij} \quad (6)$$

Onde x_{ij} é o resultado de uma medição; μ é o valor matemático esperado de x_{ij} que é o valor da grande média geral quando o número de amostras tende ao infinito. A_i é o erro referente à homogeneidade entre frascos e ε_{ij} é o erro aleatório. Se a medição não tem erro sistemático, então a μ é igual ao valor real. A determinação da incerteza associada à homogeneidade entre frascos é então realizada por uma ANOVA, onde as alíquotas de cada um dos frascos formam as variâncias intragrupo e todas as alíquotas formam a variância entre grupos. A **Figura 4** mostra um esquema retirado da ISO GUIA 35.

Figura 4 - Esquema de estudo de homogeneidade.



(ISO, 2006)

A análise de variância (ANOVA) é calculada como descrito no **Anexo A**. A incerteza entre frascos é calculada pela seguinte expressão:

$$u_{hef} = \sqrt{\frac{MS_{entre} - MS_{intra}}{n_0}} \quad (7)$$

MS_{entre} e MS_{intra} são calculados diretamente da análise da ANOVA. n_0 corresponde ao número de alíquotas por frasco quando não há falta de dados (todos os frascos têm o mesmo número de alíquotas analisadas). Quando há falta de dados, o n_0 corresponde a:

$$n_0 = \frac{1}{a-1} \left[\sum_{i=1}^a n_i - \frac{\sum_{i=1}^a n_i^2}{\sum_{i=1}^a n_i} \right] \quad (8)$$

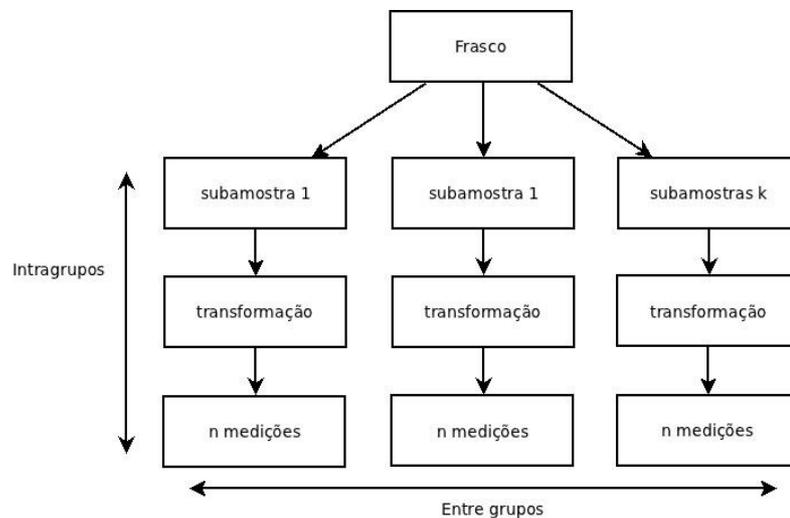
Onde a corresponde ao número de frascos e n_i o número e replicatas do frasco i .

4.3.4.6 Homogeneidade intrafrasco

A homogeneidade intrafrasco pode ser avaliada com um desenho similar ao descrito acima. A **Figura 5** mostra um esquema retirado da ISO GUIA 35 exemplificando.

Várias alíquotas do material de um frasco são preparadas e cada uma é analisada várias vezes. Os resultados são avaliados por ANOVA como descrito acima. O objetivo principal de um estudo intrafrasco é determinar experimentalmente a massa mínima a ser pesada, garantindo assim a homogeneidade. Para tanto, o experimento descrito acima é realizado com diferentes quantidades de massas. A massa mínima será aquela cuja incerteza intrafrasco se igualar a incerteza da repetitividade do método de medida. Este experimento deve ser realizado para a técnica na qual o MRC será utilizado em rotina (por exemplo, técnicas cromatográficas), visando garantir o resultado das análises.

Figura 5 - Esquema de avaliação de homogeneidade intrafrasco.



(ISO, 2009)

4.3.5 Estudo de estabilidade

Os estudos de estabilidade de um MRC visam dois objetivos: determinar a estabilidade (ou a ausência de instabilidade) e, em caso positivo, a incerteza associada. Como apresentado em (3), há dois tipos de estabilidade a serem avaliadas: as estabilidades de curta duração e de longa duração.

A estabilidade de curta duração está relacionada ao transporte do MRC até o usuário, considerando que não haverá condições ideais de armazenamento. A estabilidade de longa duração está relacionada a comportamento do MRC em condições ideais de armazenagem no local de uso. As duas estabilidades são determinadas por procedimentos experimentais similares, as diferenças são o prazo e condições de armazenagem. No caso do estudo de curta duração são utilizados períodos mais curtos em condições mais drásticas como temperaturas altas. No caso do estudo de longa duração são utilizados períodos mais longos com condições menos drásticas. Em ambos os estudos é recomendável a realização do estudo em mais de uma temperatura.

4.3.5.1 *Desenho de estudo de estabilidade*

Há dois desenhos básicos de estudo de estabilidade para MRC: o estudo clássico e o estudo isócrono. O estudo clássico envolve a preparação de amostras do MRC ao mesmo tempo, tratando-as como um lote, e utilizando medidas em intervalos de tempo predefinidos. Estas medições são, portanto, realizadas em condições de reprodutibilidade, apesar de serem analisadas no mesmo laboratório, o que acarreta uma maior incerteza devida à instabilidade do método analítico. Em um estudo isócrono, por outro lado, todas as análises são realizadas em um período curto de tempo, portanto em condições de repetitividade. Lamberty, Schimmel e Pauwels (1998) descreveram um estudo isócrono, onde as amostras dos diferentes intervalos de tempo seriam preparadas todas juntas e armazenadas sob baixíssima temperatura (-20 °C ou menos). Apenas uma amostra seria armazenada para cada temperatura, que seriam referentes ao período máximo do estudo (por exemplo dois anos). Com o passar do tempo outras amostras referentes a intervalos de tempo menores seriam retiradas da armazenagem à baixíssima temperatura e colocadas nas condições de estudo. Ao final do período máximo todas as amostras seriam analisadas. A **Figura 6**, retirada do trabalho de Lamberty, Schimmel e Pauwels (1998), mostra um esquema deste estudo. Como vantagens, os autores indicam

primeiramente o fato de poderem cumprir as condições de repetitividade, como já mencionado. Além disso, os autores mencionam a possibilidade de avaliar apenas algumas amostras, caso o MRC demonstrasse ser instável. Para tanto, a análise deve iniciar as amostras estocadas sob a maior temperatura e o menor tempo de estocagem. Se a amostra for instável, não é necessário analisar as outras amostras armazenadas sob esta temperatura e proseguindo-se para a temperatura imediatamente inferior, para qual se repete o procedimento. Por outro lado, caso as amostras demonstrem ser estáveis na temperatura mais alta, não será necessário proceder à análise das amostras armazenadas sob as demais temperaturas.

Figura 6 - Esquema de um estudo de estabilidade isócrono.

Tempo de estocagem (meses) \ T (°C)	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
T ₁ (e.g. +18)																									
T ₂ (e.g. +4)																									
T ₃ (e.g. -20)																									
T Baixa (e.g. -30)																									
Análise																									X


 Armazenamento a temperatura T
 Armazenamento a temperatura muito baixa

(Lamberty, Schimmel e Pauwels, 1998)

Obviamente, uma abordagem similar pode ser aplicada no estudo clássico, analisando-se a amostra referente à maior temperatura no primeiro intervalo de tempo. As maiores desvantagens do desenho isócrono são o fato de ter que esperar que o estudo se complete para determinar a estabilidade e a incerteza do MRC e também de requerer o armazenamento de grande quantidade do MRC em baixíssima temperatura durante todo o período do estudo (Lamberty, Schimmel e Pauwels, 1998).

4.3.5.2 Avaliação dos resultados

Assim como no estudo de homogeneidade, a primeira etapa da avaliação dos resultados é a verificação da presença de tendência. Esta avaliação é realizada conforme descrito acima, apenas com o tempo como variável independente (x) e a média de cada frasco como variável dependente (y). No caso de a regressão ser considerada significativa, há uma tendência e o MRC é considerado instável nas condições de estudo, não podendo ser certificado (pelo menos se armazenado nestas condições). No caso de a regressão ser considerada não significativa, há ausência de tendência e o MRC é considerado estável.

Com a ausência de tendência, os resultados são avaliados para determinar a incerteza da estabilidade. Há duas formas de se calcular esta incerteza: utilizando ANOVA ou utilizando a regressão da análise de tendência.

4.3.5.2.a Cálculo com ANOVA

Dependendo do desenho do estudo, o cálculo da incerteza da estabilidade pode ser expresso das seguintes formas:

Para desenhos isócronos a incerteza é expressa por:

$$u^2_{ESTAB} = S^2_{estab} + S^2_{hef} + S^2_r \quad (9)$$

Onde u_{ESTAB} é a incerteza da estabilidade (de curto ou longo prazo); S_{estab} é a incerteza associada à estabilidade do material; S_{hef} é a incerteza associada à homogeneidade entre frascos; e S_r é a incerteza associada à repetitividade do método.

Para desenhos clássicos a incerteza é expressa por:

$$u^2_{ESTAB} = S^2_{estab} + S^2_{repro} + S^2_{hef} + S^2_r \quad (10)$$

Onde S_{repro} é a incerteza da reprodutibilidade do desenho clássico, como descrito anteriormente. Está claro então que a incerteza associada a um desenho clássico sempre será maior que a associada a um desenho isócrono. No entanto, Van der Veene colaboradores (2001) concluíram que S_{repro} não pode ser separado S_{estab} , daí a expressão se torna:

$$u^2_{ESTAB} = S^2_{estab'} + S^2_{hef} + S^2_r \quad (11)$$

Onde S_{estab}' corresponde à incerteza da estabilidade do material combinada com a da reprodutibilidade. As expressões (9) e (11) são similares; assim o cálculo realizado para a determinação da incerteza será similar.

Com base nas expressões (9) e (11) é possível formular a seguinte expressão:

$$x_{ijk} = \mu + A_i + B_{ij} + \varepsilon_{ijk} \quad (12)$$

Onde x_{ijk} é valor da análise k , do frasco j no tempo i . O valor de μ corresponde ao valor matemático esperado de x_{ijk} , de forma similar à expressão (16). A_i corresponde ao erro relativo ao tempo; B_{ij} corresponde ao erro relativo ao frasco; e ε_{ijk} corresponde ao erro aleatório. A ANOVA em dois níveis “*nested*” (ou aninhada) é calculada com um grupo (tempo) e um subgrupo (frasco). Para se calcular as incertezas que compõem a incerteza da estabilidade utilizam-se as seguintes expressões:

$$S^2_r = MS_{intra} \quad (13)$$

$$S^2_{hef} = \frac{MS_{B \subset A} - MS_{intra}}{n_0} \quad (14)$$

$$S^2_{estab} = \frac{MS_{entre} - n_0' u^2_{hef} - MS_{intra}}{(nb)_0} \quad (15)$$

MS_{intra} , $MS_{B \subset A}$ e MS_{entre} são calculados conforme descrito no anexo A. Os valores de n_0 , n_0' e $(nb)_0$ são calculados pelas expressões abaixo, quando todos os frascos tiverem o mesmo número de resultados:

$$n_0 = n \quad (16)$$

$$n_o' = (na) - n \quad (17)$$

$$(nb)_o = nb \quad (18)$$

Onde n é o número de alíquotas por frasco, a é o número de tempos do estudo de estabilidade e b é número de frascos. No caso de haver falta de dados, estes parâmetros são calculados pelas expressões:

$$n_0 = \frac{\sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^{b_i} n_{ij} - \sum_{i=1}^a \left(\frac{\sum_{j=1}^{b_i} n_{ij}^2}{\sum_{j=1}^{b_i} n_{ij}} \right)}{\sum_{i=1}^a b_i - a} \quad (19)$$

$$n_0' = \frac{\sum_{i=1}^a \left(\frac{\sum_{j=1}^{b_i} n_{ij}^2}{\sum_{j=i}^{b_i} n_{ij}} \right) - \frac{\sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^{b_i} n_{ij}^2}{\sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^{b_i} n_{ij}}}{a - 1} \quad (20)$$

$$(nb)_o = \frac{\sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^{b_i} n_{ij} - \frac{\sum_{i=1}^a \left(\sum_{j=1}^{b_i} n_{ij} \right)^2}{\sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^{b_i} n_{ij}}}{a - 1} \quad (21)$$

Existe a possibilidade de se calcular a incerteza da homogeneidade a partir das expressões (9) e (11). Van der Veen e colaboradores (2001) afirmam que o cálculo é possível, principalmente em situação onde se espera uma alta estabilidade por parte do material. O método de ANOVA de dois níveis “*nested*” é capaz de calcular os três desvios padrões s_r , s_{hef} e s_{estab} . No entanto, na realização de um estudo isócrono, é necessário se levar em consideração o fato de só se analisarem

as amostras ao final do estudo – principalmente se houver uma tendência e falta de homogeneidade por parte do candidato a MRC.

4.3.5.2.b Determinação pela regressão da análise de tendência

O cálculo de u_{ESTAB} pela regressão tem como base a incerteza do coeficiente angular (u_b) da análise de tendência, e é mais utilizado para a estabilidade de longo prazo. A seguinte expressão é utilizada:

$$u_{estab} = Xu_{b1} \quad (22)$$

Onde x é o tempo de prateleira estimado e u_b é a incerteza de b_1 .

$$u_b = \frac{s}{\sqrt{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}} \quad (23)$$

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y})^2}{n-2}} \quad (24)$$

Onde X_i é o valor de cada tempo X ; \bar{X} é o tempo médio; y_i é o valor médio da propriedade medida, s é o desvio padrão da regressão.

A expressão (22) foi proposta por Lisinger e colaboradores (2001), como uma forma de estimar com segurança a estabilidade do MRC em tempo de prateleira proposto. Fica evidente pela expressão que, à medida que o tempo passa, a incerteza da estabilidade aumenta. Ao estimar-se o tempo de prateleira de, por exemplo, 36 meses, o valor máximo que u_{ESTAB} irá atingir será calculado. Aplicando-se o valor ao cálculo da incerteza do MRC obtém-se o valor de u_{MRC} que considera todo o período de prateleira. Esta forma de cálculo superestima o valor de u_{ESTAB} e, como consequência, superestima também u_{MRC} . No entanto, a utilização do valor calculado é segura, pois é provável que o valor de u_{ESTAB} real seja inferior. Esta afirmativa é confirmada com a realização de estudos de monitoramento como aqueles descritos

no item seguinte.

Esta forma de determinação da u_{ESTAB} claramente permite uma escolha quanto ao tempo de prateleira. Esta uma característica importante já que o estudo de estabilidade fornece informações sobre o passado, mas não sobre o futuro. Assim, calcular u_{ESTAB} por este método permite determinar o período pelo qual será seguro utilizar o MRC. No entanto, quanto maior o tempo de prateleira proposto, maior será u_{ESTAB} e, portanto, maior será a incerteza do MRC. Assim, o tempo proposto deve ser escolhido com cautela, baseando-se no tempo esperado de uso do MRC.

4.3.5.3 Monitoramento da estabilidade

O monitoramento do MRC deve ser realizado por todo o seu tempo de prateleira, principalmente porque o estudo de estabilidade fornece informações sobre o passado mas não sobre o futuro. O monitoramento é normalmente realizado pelo desenho clássico, cuja utilização não prejudica o resultado, já que este é utilizado apenas para confirmar a incerteza do MRC expressa no certificado. Como alternativa, Van de Veen e colaboradores (2001) propõem um desenho semicontínuo, no qual as amostras do MRC são colocadas em condições de armazenamento poucos meses antes do estudo principal de estabilidade finalizar. Estas são analisadas alguns meses depois, à maneira de um estudo isócrono. Por sua vez, novas amostras são colocadas em condições de estudo, antes do prazo das amostras anteriores findar, para um novo período de monitoramento. A vantagem principal é o uso de um modelo isócrono que permite realizar as análises em condições de repetitividade. Isso permite, segundo os autores, recalculer a incerteza da estabilidade para cada passo.

A avaliação do resultado do monitoramento do MRC é realizada pela expressão abaixo:

$$(x_{MRC} - x_{mon}) \leq k \sqrt{u_{MRC}^2 + u_{mon}^2} \quad (25)$$

Onde x_{MRC} é o valor da pureza do MRC, x_{mon} é o valor da pureza medida no monitoramento, u_{MRC} é a incerteza do material de referência e u_{mon} é a incerteza da medição do monitoramento. Se a condição de (25) é confirmada, o MRC é considerado estável. No caso do MRC se demonstrar instável há duas

possibilidades: a retirada do MRC ou a recertificação.

4.3.6. Determinação da propriedade do MRC

Há uma variedade de abordagens válidas para a determinação do valor de propriedade do MRC. Estas incluem um ou mais métodos envolvendo um ou mais laboratórios. A abordagem também depende do tipo de material a ser utilizado, seu uso, as qualificações dos laboratórios, a qualidade dos métodos e a habilidade de se determinar a incerteza de forma realista.

4.3.6.1 *Estimativa e demonstração da rastreabilidade*

Como já discutido anteriormente, a determinação da rastreabilidade do MRC segundo padrões apropriados é um passo fundamental para a sua certificação. Isto pode ser alcançado através de três modelos:

- Os valores de propriedade do MRC são rastreáveis ao SI.
- Os valores de propriedade do MRC são rastreáveis a um método ou procedimento padrão.
- Os valores de propriedade do MRC são rastreáveis a outros materiais de referência.

O modelo a ser utilizado depende muito do MRC; a rastreabilidade direta ao SI acontece normalmente com MRC para medidas físicas como massa ou distância. A rastreabilidade por métodos ou procedimentos padrões se aplica às amostras mais complexas, para os quais a medida é completamente dependente do método. Este pode ser o caso, mas não necessariamente, de MRC de matrizes ou brancos. Nestas situações, o estudo interlaboratorial pode ser essencial. Por fim, a rastreabilidade a outros MRC é um caso comum em análises químicas, por exemplo, onde o equipamento tem de ser calibrado para medição.

Um aspecto a se considerar é a transformação de amostras durante seu preparo. É muito difícil determinar a incerteza deste processo. Então, quando possível, as amostras são transformadas simultaneamente a MRs ou MRCs, apenas para garantir a adequação do método. A Incerteza, em muitos casos, só poderá ser determinada por um estudo interlaboratorial.

Outro aspecto a se considerar se refere à metodologia. Neste caso, é essencial que todos os equipamentos e vidrarias utilizados na análise estejam calibrados e validados, inclusive com estudo interlaboratorial quando for o caso. Também, todos os erros sistemáticos devem ser corrigidos.

4.3.6.2 *Desenho do experimento*

A escolha do desenho depende do método utilizado e da natureza do MRC. Existem quatro desenhos de medição que podem ser utilizados na certificação de MRCs:

- a) Medição por um único método em um único laboratório.
- b) Medição por dois ou mais métodos de referência em um único laboratório.
- c) Medição por uma rede de laboratórios utilizando um ou mais métodos com exatidão determinada.
- d) Medição por um método específico, o que fornece resultados relativos ao método, usando uma rede de laboratórios.
- e) Os quatro desenhos serão discutidos a seguir.

4.3.6.2.a *Medição em apenas um laboratório.*

A principal característica dos desenhos (a) e (b) é a utilização de métodos de análise primários. Estes podem ser definidos por:

- “...métodos que têm as maiores propriedades metrológicas, cuja operação pode ser descrita completamente e entendida, para qual uma declaração de incerteza pode ser escrita em termos de SI.”
- Um método primário direto mede o valor da propriedade desconhecida de uma amostra sem se referenciar a um padrão da mesma quantidade.
- Um método primário de razão mede o valor de uma razão em uma amostra desconhecida com relação a um padrão da mesma quantidade; sua operação deve ser completamente descrita por uma equação de medição.

Dessa maneira, o uso de um método primário é a forma mais adequada para a certificação uma substância de referência por não necessitar de uma referência já previamente certificada. No entanto, métodos primários não estão disponíveis para todas as amostras e muitas vezes, como no caso da calorimetria diferencial

exploratória, não estão disponíveis para todos os valores de pureza a serem medidos.

Alguns exemplos de métodos primários reconhecidos são: diluição isotópica com espectrometria de massas, coulometria, gravimetria, titrimetria e calorimetria.

O resultado desta medição será o valor obtido pela análise de uma ou mais alíquotas do candidato a MRC, calculando então sua média. A incerteza será a incerteza do método.

4.3.6.2.b *Medição em uma rede de laboratórios*

Os desenhos (c) e (d) apresentados acima lançam mão de uma rede de laboratórios para a medição da propriedade do MRC. O envolvimento de vários laboratórios é normalmente desejável para tornar aleatório o erro relacionado a certas etapas do processo de medição como, por exemplo, o preparo da amostra.

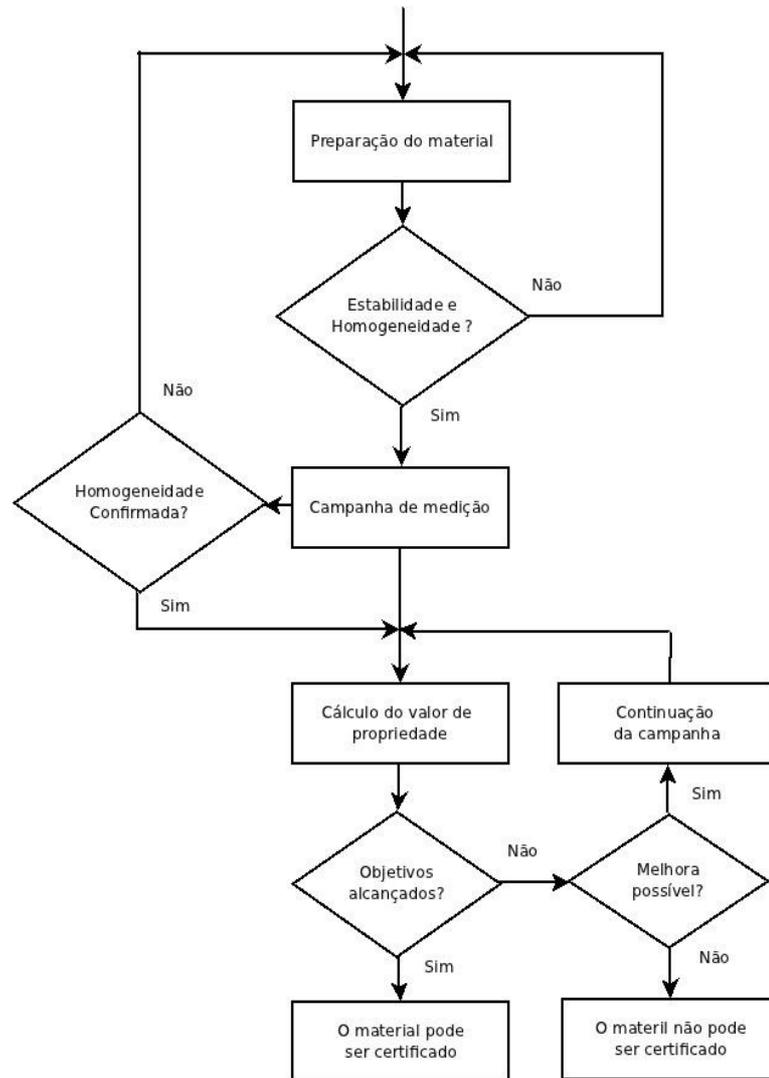
Em ambos os casos, assume-se que estes laboratórios têm a capacidade equivalente para a medição em questão e fornecem resultados com exatidões aceitáveis. Como consequência, as diferenças entre os resultados individuais se devem a uma distribuição estatística, desvio padrão, erro padrão, etc. Além disso, todos os resultados devem ser rastreáveis conforme descrito no item 3.4.2. A média das médias dos laboratórios será considerada a melhor estimativa do valor da propriedade do MRC. Caso a distribuição dos resultados se mostre irregular uma estatística mais robusta pode ser utilizada como a mediana.

A **Figura 7** apresenta um fluxograma retirado da ISO GUIA 35 que ilustra o processo de certificação utilizando múltiplos laboratórios. Esta indica a ordem das atividades a serem realizadas, os estudos de homogeneidade e estabilidade são realizados pelo laboratório principal ou coordenador. Após a comprovação de ambos estudos, a medição interlaboratorial é realizada, os resultados são avaliados e o material é certificado ou não.

O número de amostras a serem analisadas, ou seja, o número de laboratórios participantes, deve ser escolhido com cautela. O principal critério é a complexidade dos procedimentos a serem realizados para a medição. Quanto mais complexos forem os procedimentos, maior deve ser o erro associado e, portanto, maior o número de laboratórios necessários. Quando métodos bem estabelecidos estão disponíveis o número de laboratórios pode ser de apenas dois ou três. Quando os controles estatísticos e metrológicos não são ideais, mas ainda aceitáveis, então

entre seis a oito laboratórios podem ser utilizados. Finalmente, se houver uma chance significativa de haver resultados técnica ou estatisticamente inválidos, um número mínimo de 10 laboratórios é necessário, preferencialmente 15. Este número grande de laboratórios permite analisar os dados em busca de valores aberrantes.

Figura 7 - Fluxograma do processo de certificação por múltiplos laboratórios.



(ISO, 2006)

Outra questão a ser abordada é o número de métodos disponíveis. Quando não há um método reconhecido bem estabelecido para a medição, o organizador deve permitir aos participantes escolherem os métodos, contanto que estes sejam válidos, cumprindo assim os requisitos de validação e rastreabilidade.

Dentro de cada laboratório, a análise de apenas duas unidades com seis

replicatas cada uma, é o suficiente. No entanto, se uma confirmação da homogeneidade for calculada, é necessário que pelo menos três ou quatro unidades por laboratório devam ser analisadas.

Os resultados serão relatados em uma entre duas formas, pelos laboratórios. Os participantes apresentam sua medida de incerteza junto com a incerteza expandida e o fator de abrangência; ou os participantes apresentam os resultados individuais obtidos. Quando apresentarem a incerteza, eles devem, preferencialmente, apresentar o modelo completo da incerteza com todas as incertezas.

As estatísticas descritivas utilizadas na avaliação destes resultados são baseadas na condição de distribuição normal dos resultados. Um teste de normalidade ou uma avaliação visual do histograma dos resultados, de cada laboratório e do conjunto de todos os laboratórios, deve ser realizado para confirmar esta condição. Caso a normalidade não seja confirmada, outras distribuições podem ser utilizadas como a triangular e a retangular, comum em avaliação de incerteza do tipo B (**Anexo A**).

A avaliação do histograma permite também observar se os resultados se agrupam em um nível, formando uma distribuição unimodal, ou dois níveis, formando uma distribuição bimodal. A distribuição bimodal pode ser consequência de um desvio sistemático ou de um número insuficiente de resultados. Para contornar esta situação, pode-se realizar, por exemplo, uma transformação logarítmica ou exponencial. Contudo, é possível que se faça necessária a realização de uma nova certificação, utilizando um número maior de resultados.

Uma avaliação dos resultados aberrantes também deve ser realizada, descartando estes valores estatisticamente significativos. Sempre que possível, mais de um teste deve ser utilizado para a avaliação de valores aberrantes. É importante salientar que, para estes testes, a distribuição normal é assumida, assim a confirmação desta distribuição por parte dos resultados é fundamental. Além disso, como já mencionado, o descarte de aberrantes só é possível com um número grande de participantes.

Quando apenas os resultados individuais de cada laboratório (replicatas) são apresentados, já se mostrando normais e sem valores aberrantes, o valor da propriedade medida será a média das médias de cada laboratório. A incerteza será o erro padrão desta média.

Quando os resultados individuais de cada laboratório vierem acompanhados de uma declaração de incerteza, a determinação da incerteza do valor da propriedade será realizada com base nas incertezas individuais de cada laboratório. A declaração de incerteza de cada laboratório é acompanhada preferencialmente pelo modelo do qual foi calculado. Dessa forma, o valor da incerteza combinada é calculado segundo a expressão (1), adicionando apenas uma incerteza correspondente à dispersão dos dados dos laboratórios. Segundo Pauwels e colaboradores (1998), esta incerteza pode ser calculada pela seguinte expressão:

$$u(R) = \frac{s_{lab}}{\sqrt{l}} \quad (26)$$

Onde s_{lab} corresponde ao desvio padrão da média das médias dos laboratórios e l corresponde ao número de laboratórios. Esta expressão corresponde ao erro padrão da média das médias.

Outra possibilidade para o cálculo é novamente apresentada por Pauwels e colaboradores. Estes dividem a incerteza combinada da propriedade em quatro tipos:

1. Tipo I: incertezas específicas de um laboratório.
2. Tipo II: incertezas comuns a todos os laboratórios.
3. Tipo III: incertezas comuns a grupos de laboratórios.
4. Tipo IV: dispersão entre os valores de laboratórios participantes.

A incerteza da propriedade será calculada com base em (1) somando-se todas as incertezas acima. Para o cálculo de cada uma delas as incertezas de cada laboratório são desmembradas e classificadas em cada uma das primeiras três categorias. A incerteza do tipo 1 pode ser calculada pela seguinte expressão:

$$u_c(I) = \frac{\sqrt{\sum_{i=1}^l [u_i(j)]^2}}{l} \quad (27)$$

Onde j é a identificação do laboratório e i o número total de laboratórios. Pela expressão fica evidente que o impacto desta incerteza sobre o valor final será menor à medida que aumentar o número de laboratórios participantes. As incertezas de tipo

I correspondem, por exemplo, à incerteza oriunda das vidrarias utilizadas.

A incerteza do tipo II pode ser calculada pela seguinte expressão:

$$u_c(II) = \sqrt{\sum_{i=1}^n [u_i(II)]^2} \quad (28)$$

Sendo que n é o número total de laboratórios e i o número de identificação da incerteza de tipo II. As incertezas do tipo II correspondem, por exemplo, a referências comuns utilizadas em todos os laboratórios.

A incerteza do tipo III pode ser calculada pela seguinte expressão:

$$u_c(III) = \frac{\sqrt{\sum_{q=1}^g h_q [U_c(q)]^2}}{gl} \quad (29)$$

Onde:

$$u_c(q) = \sqrt{\sum_{i=1}^n [u_i(q)]^2} \quad (30)$$

Onde q é a identificação do grupo, g o número total de grupos, l o número total de laboratórios, h_q o número total de laboratórios no grupo q e i o número de identificação da incerteza do tipo III. Incerteza do tipo III corresponde, por exemplo, a incerteza associada ao uso do mesmo procedimento analítico em diferentes laboratórios.

A incerteza do tipo IV é calculada pela expressão (26). Assim a incerteza da propriedade medida será calculada pela expressão se segue.

$$u_{MRC} = \sqrt{[u_c(I)]^2 + [u_c(II)]^2 + [u_c(III)]^2 + [u(R)]^2} \quad (31)$$

A incerteza expandida será calculada por:

$$U = u_{MRC} k \quad (32)$$

Onde k é o fator de abrangência para o nível de confiança desejado.

Os estudos interlaboratoriais podem ainda levar ao cálculo do valor da propriedade e da incerteza associada, com a aplicação de um fator de correção. Esse fator pode ser, por exemplo, o número de amostras realizadas em cada laboratório ou a incerteza associada a cada laboratório. O fator de correção é único para cada laboratório e soma de todos os fatores deve ser igual a 1. O objetivo da aplicação de fatores de correção é equilibrar as discrepâncias entre os laboratórios participantes.

4.3.7 Considerações sobre as propriedades a serem medidas.

4.3.7.1 *Propriedades físicas de MRCs*

No caso de abordar propriedades físicas, o(s) laboratório(s) envolvido(s) deve(m) participar regularmente de comparações interlaboratoriais. A participação visa garantir a competência na determinação da propriedade em questão, ou seja, que o laboratório é capaz de medir a propriedade com exatidão e incerteza adequadas. Para a certificação do MRC não é obrigatória a realização de estudo interlaboratorial; no entanto, ele é altamente recomendado.

4.3.7.2 *Pureza dos MRCs*

As substâncias puras formam a base da rastreabilidade na medição química. Obviamente “puro” se refere a uma situação ideal, já que nenhuma substância é 100% pura. A não ser pela aplicação de métodos diretos, como a calorimetria, a pureza é, muitas vezes, determinada por diferença. Uma lista de possíveis impurezas deve ser preparada com base no processo de produção da substância. Então, cada impureza é medida na substância sob análise, e em seguida a pureza é calculada por diferença. O método de balanço de massas, segue este protocolo, e está descrito adiante.

A medição de impurezas é um processo difícil, já que as quantidades estão próximas dos limites de detecção ou quantificação. A expressão abaixo descreve a pureza em fração de quantidade de substância.

$$y = 1 - \sum_{i=1}^k x_i \quad (26)$$

Onde y é a fração do componente principal, k é o número de impurezas com frações de substância x_i . Assumindo-se que as impurezas são independentes, incerteza da fração do componente principal deriva de (1) e é expressa por:

$$u^2(y) = \sum_{i=1}^k u^2(x_i) \quad (27)$$

Substâncias puras podem ainda ser utilizadas na produção de MRCs formados por misturas sintéticas e no preparo de MRCs de matrizes ou brancos. Normalmente estes MRCs são preparados por gravimetria.

4.3.8 Certificação de MRC

O conceito de MRC já foi introduzido anteriormente. As informações do certificado do MRC devem compreender:

- A propriedade de interesse
- Seu valor
- Sua incerteza associada e expandida
- Uma declaração de sua rastreabilidade metrológica

O certificado deve conter ainda informações sobre os experimentos realizados para a certificação, bem como materiais de referência, equipamentos, calibrações, etc. Estas informações mais detalhadas podem não estar apresentadas no certificado, porém devem estar disponíveis de alguma maneira.

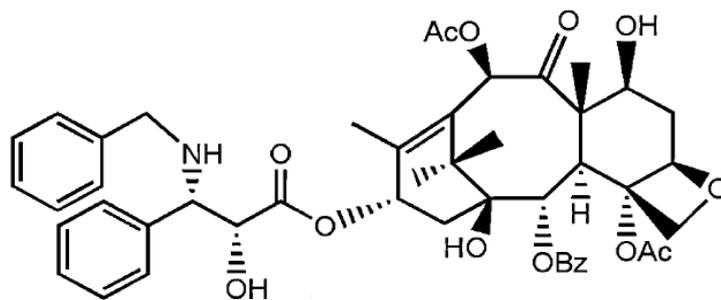
4.4 MATERIAIS DE REFERÊNCIA CERTIFICADOS PARA PLANTAS MEDICINAIS E MEDICAMENTOS FITOTERÁPICOS.

Como desdobramento a discussão sobre material de referência, esta seção inicia uma discussão da aplicação dos protocolos de certificação a substâncias oriundas de plantas medicinais, ressaltando suas dificuldades e opções.

Os materiais de referência certificados para plantas medicinais e medicamentos fitoterápicos são substâncias relevantes na caracterização da

espécie ou no estudo da atividade terapêutica daqueles. A aplicação dos princípios de certificação de materiais de referência deve levar em consideração as peculiaridades destas substâncias no contexto das plantas medicinais e medicamentos fitoterápicos. No geral, são substâncias do metabolismo secundário vegetal, de estrutura complexa e síntese difícil, o que em muitos casos ocorre em baixíssimas quantidades na natureza. Um exemplo interessante pela sua importância é o paclitaxel. Descoberto em extratos de *Taxus brevifolia*, conhecido popularmente como teixo do pacífico, o paclitaxel é extraído de diversas espécies do gênero *Taxus* e se tornou um importante agente antitumoral (Nikolic et al., 2011). No entanto, as quantidades presentes nos extratos de *Taxus* são mínimas, os rendimentos obtidos não ultrapassam 0,05% nas melhores espécies. Como consequência, são necessários cerca de 10000 kg de cascas de *T. Brevifolia*, ou 3000 árvores com cerca de 60 anos de idade, para produzir 1 kg de fármaco (Malik et al., 2011). Por outro lado, o paclitaxel é um diterpeno complexo (**Figura 8**), de síntese muito difícil, o que tem levado os pesquisadores a buscar sua produção em cultura de células vegetais (Malik et al., 2011) .

Figura 8 - Estrutura do Paclitaxel.



(Malik et al., 2010)

Além da complexidade da molécula e sua baixa ocorrência natural as dificuldades de se obtenção são agravadas pelas variações decorrentes de fatores geográficos e sazonais, que influenciam no teor de substâncias nas plantas. Esta variação nos teores de substâncias presentes em extratos de plantas medicinais pode ser exemplificada pelo estudo de Black e colaboradores (Black et al., 2011) sobre a variação de compostos fenólicos em *Rhododendron tomentosum spp subarticum*, demonstrando uma variação nos teores individuais de 15 moléculas fenólicas, mas não uma variação no total de fenólicos. Ncube, Finne e Van Staden

(2011) demonstraram a variação sazonal de flavonóides e taninos em uma seleção de plantas medicinais tradicionais da África do Sul. Soni e colaboradores (2010) determinaram a variação sazonal e geográfica dos esteróides Z- e E-guggulsterona em *Commiphora wightii*, coletados na região noroeste da Índia. Van Vureen e colaboradores (2007) estudaram a variação sazonal e geográfica da composição do óleo essencial de *Heteropyxis natalensis*. Os autores demonstraram a variação, tanto sazonal como geográfica, dos componentes principais do óleo essencial.

Por outro lado, a composição complexa dos extratos de plantas pode ser uma dificuldade adicional no isolamento de substâncias específicas. Além disso, substâncias que pertencem à mesma classe química de interesse podem constituir impurezas de ocorrência comum, pois ambas se comportam de forma similar em operações de extração e purificação.

Estas características têm como consequência a dificuldade de se obter a substância de interesse em massa e pureza necessárias. Discute-se a seguir como isto afeta a estratégia de certificação e formas de contornar estas limitações.

4.4.1 Métodos analíticos e pureza da substância em certificação.

A situação ideal para a certificação de qualquer substância é a de apresentar-se o mais pura possível. No entanto, como discutido no item anterior, uma pureza alta não necessariamente será atingida, pelo menos com a massa necessária para a certificação. A forma de lidar com esta situação está intimamente relacionada ao método analítico que será utilizado na certificação. Por outro lado, o método escolhido afeta também a escolha do desenho da certificação: a utilização de métodos primários permite a certificação em apenas um laboratório; já a utilização de métodos secundários obriga a aplicação de um protocolo interlaboratorial. Embora um pouco mais complexa, a aplicação deste último não é necessariamente desvantajosa, desde que, havendo referências disponíveis e sendo o método bem estabelecido, apenas um número pequeno de laboratórios é requerido. No entanto, no caso de plantas medicinais em estágios iniciais de estudo e desenvolvimento, o mais comum é não haver referência disponível, e a aplicação de métodos primários é recomendada. A seguir, apresenta-se uma discussão sobre as diferentes estratégias e métodos analíticos que podem ser aplicados nestes casos.

4.4.1.1 Calorimetria Diferencial Exploratória

A Calorimetria Diferencial Exploratória (CDE) tem uma aplicação vasta na indústria farmacêutica, abrangendo: determinação de ponto de fusão e ebulição, análise de polimorfismo, estudo de estabilidade, estudo de compatibilidade entre fármaco e excipiente e análise de pureza de substâncias. O CDE é considerado uma técnica primária de medida, sendo mencionada na ISO GUIA 35, e por isso bastante aplicada na determinação de pureza. Van Dooren e Müller (1984) publicaram uma revisão sobre a aplicação da técnica em determinação de pureza, na qual descrevem o estado da arte. Em outros estudos, Kestenz e colaboradores (2011) e Drozdowska e colaboradores (2007) apresentam a aplicação da técnica na determinação de pureza de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, no primeiro destes, aplicado à pureza do cloranfenicol. MathKar e colaboradores analisaram a pureza de 16 padrões de referência por CDE e HPLC e compararam seus resultados, concluindo que os resultados são similares quando a pureza for maior que 98% (2009). Similarmente, Ma e colaboradores (2009) avaliaram a pureza de teofilina pelos métodos de balanço de massa, CLAE e CDE, concluindo que as três técnicas fornecem resultados similares.

O CDE é definido como uma técnica na qual a diferença na absorção de energia entre uma amostra e um material de referência, normalmente o elemento Índio, é medida em função da temperatura, enquanto as duas estão sujeitas a uma rampa de temperatura (Van Dooren e Muller, 1984). Esta técnica é baseada na lei de Van't Hoff expressa abaixo.

$$\frac{d \ln K}{dT} = \frac{\Delta H_0}{RT^2} \quad (28)$$

Onde K é a constante de equilíbrio T a temperatura; ΔH_0 a variação de entalpia padrão específica da substância; e R a constante geral dos gases. A lei de Van't Hoff relaciona a variação da temperatura com a constante de equilíbrio, dada a entalpia padrão do sistema. A medição da pureza é realizada durante o processo de fusão da substância de interesse e está baseada na depressão do ponto desta pela presença da impureza. Para o cálculo de pureza a expressão (28) é rearranjada, após algumas operações e aproximações, na expressão (29).

$$T_m = T_0 - \frac{RT_0^2 x_2}{\Delta H_0} \cdot \frac{1}{F} \quad (29)$$

Onde T_m é a temperatura da amostra após o equilíbrio, T_0 é a temperatura de fusão da substância, x_2 é a concentração da impureza e F a fração da substância principal fundida. Esta é uma equação de primeiro grau coeficiente linear T_0 e

coeficiente angular $\frac{RT_0^2 x_2}{\Delta H_0}$ onde se plota $\frac{1}{F}$ versus T_m . A concentração x_2 é calculada a partir do coeficiente angular, quanto maior ele for maior será a concentração da impureza. É utilizada a seguinte expressão para o cálculo de x_2 :

$$x_2 = \frac{\Delta H_0 F (T_0 - T_M)}{RT_0^2} \quad (30)$$

A entalpia padrão é calculada a partir da variação da entalpia medida no sistema, a massa molecular da substância e a massa da amostra. Assim a expressão se torna:

$$x_2 = \frac{QMF (T_0 - T_M)}{mRT_0^2} \quad (31)$$

Onde Q é a entalpia medida, M a massa molecular da substância principal e m a massa da amostra analisada.

As principais vantagens desta técnica são: o fato de ser uma técnica primária, por não utilizar a mesma substância da amostra como referência; a utilização de massas relativamente pequenas para a análise; e serem relativamente rápidas. Contudo, o CDE apresenta uma série de limitações. A principal delas está relacionada a um grau relativamente alto para a pureza mínima. Gao, Ding e Hu (2011) analisaram amostras de isosorbida monohidratada dopadas com lidocaína e comprovaram que purezas menores que 98,5% apresentam um desvio da reta da expressão (29), apresentando, portanto, um erro sistemático significativo. Este fato

está diretamente relacionado com a variação dos parâmetros de suporte da expressão (29). Uma das aproximações utilizadas assume que a impureza está presente em quantidades muito inferiores àquela da substância principal; outra aproximação indica que a depressão da temperatura de fusão é pequena. Estas duas assumem, portanto, uma pureza alta da substância principal. Outro aspecto a se levar em consideração é que a impureza tem de formar uma mistura eutética com a substância principal, ou seja, a impureza deve se dissolver na substância principal líquida. Impurezas inorgânicas, por exemplo, não são detectadas – o que requer a aplicação de técnicas complementares, como a medição de cinzas inorgânicas, para a medição da presença destas substâncias (Van dooren e Muller, 1984) . O cálculo da incerteza de uma análise de pureza por CDE é apresentado Gao, Ding e Hu (2011) e também por Ma e colaboradores (2009), com pequenas variações. No entanto, ambos estão relacionados à expressão (31). O cálculo descrito por Gao está apresentado no **Anexo B**.

Assim, a Calorimetria Diferencial Exploratória é uma técnica importante na determinação da pureza de substâncias, por se tratar de uma técnica primária de simples aplicação. No entanto, ela tem uma limitação importante ao só permitir a medição de substâncias de alta pureza (acima de 98,5%).

4.4.1.2 *Ressonância Magnética Nuclear Quantitativa de Próton*

A Ressonância Magnética Nuclear (RMN) Quantitativa remonta ao início do RMN, no entanto, os primeiros trabalhos indicaram que a precisão associada a medição era na faixa de 10% de erro (Pauli, Jaki e Lankin, 2005) e portanto a técnica é desde então mais considerada pelas suas aplicações qualitativas. Contudo, o avanço tecnológico dos equipamentos permitiu uma melhora significativa na precisão, havendo hoje um interesse crescente na aplicação de RMN quantitativo (Pauli, Jaki e Lankin, 2005), principalmente como técnica primária de análise, apesar de ainda não ser reconhecido como tal. As áreas de aplicação do RMN quantitativo têm sido as mais diversas. Fulton e colaboradores (1992) avaliaram substâncias orgânicas diluídas em água por RMN quantitativo. Maniara e colaboradores (1998) estudaram a aplicação de RMN quantitativo de ^1H e ^{31}P na análise de agroquímicos. Meusinger (1999) apresentou um método para a determinação de substâncias oxigenadas em gasolina por RMN quantitativo de ^1H . Como exemplo de aplicação na análise de medicamentos, Goger e colaboradores

apresentaram a quantificação de azatioprina por RMN quantitativo de ^1H , e Zoppi, Linares e Longhi (2005) desenvolveram um método analítico para a análise de enalapril pela mesma técnica. Aplicada à análise de produtos naturais, o grupo de Pauli e colaboradores é um dos mais atuantes. Um de seus estudos (Pauli, Jaki, Lankin, 2005) propôs a aplicação do RMN para a validação de substâncias de referência para plantas medicinais. Neste, o autor apresenta a técnica como uma alternativa às técnicas cromatográficas na determinação da pureza, particularmente o RMN quantitativo de próton. Jaki e colaboradores avaliaram glucoiberina como substância de referência para *Iberis amara* utilizando o RMN quantitativo para determinar a pureza (2008). Pauli, Jaki e Lankin publicaram uma revisão sobre o potencial de aplicação do RMN quantitativo de hidrogênio (RMNHq) na análise de produtos naturais, onde pontuam as características do experimento, seu potencial e suas diferentes áreas de aplicação dentro da análise de produtos naturais (Pauli, Jaki, Lankin, 2005). Pauli, Jaki e Lankin (2007) também apresentaram um protocolo experimental para a aplicação de RMNHq em certificação de substâncias de referência de origem natural, exemplificando com a quantificação taxol em diferentes isolados. Jaki e colaboradores apresentaram outro trabalho onde apresentam o conceito de relação pureza/atividade, sendo a pureza determinada por RMNHq, exemplificando com ácido ursólico. Outros autores também trabalharam a aplicação desta técnica para plantas medicinais como Burton Quillian e Walter (2005) que avaliaram o RMNHq com padronização externa na preparação de soluções de calibração para a quantificação de toxinas de algas.

A ressonância magnética nuclear quantitativa se baseia na intensidade de sinais (áreas) gerados pelos núcleos sensíveis (^1H , ^{13}C , ^{31}P , etc.). Asseguradas as devidas condições de sequência de pulsos e pós-processamento, as intensidades dos sinais serão proporcionais à concentração molar da substância na amostra. De acordo com Pauli e colaboradores (2005), a forma mais simples de se determinar a concentração de uma substância na amostra é a integração de partes do espectro que correspondam à substância principal e às impurezas presentes. Após um ajuste para refletir o número de núcleos por molécula a que o sinal se refere, por exemplo, mais de um ^1H com o mesmo deslocamento, as integrações são somadas e a porcentagem de cada substância é calculada. Por este método, o cálculo da pureza é estritamente molar, pois a intensidade de cada sinal é proporcional ao número de núcleos que o geraram, o que, por sua vez, é proporcional ao número de moléculas

(mol). No entanto, este cálculo não é proporcional à massa molecular da substância. Em amostras com alta pureza da substância principal, a diferença entre a massa molecular desta e as massas moleculares das impurezas não tem um impacto significativo. No entanto, em amostras com purezas inferiores torna-se necessário conhecer a composição da amostra para determinar a fração de cada substância. O ponto onde isto se torna necessário depende da composição da amostra. No caso de produtos naturais, os processos de extração e isolamento utilizados normalmente extraem substâncias da mesma classe, portanto com massas moleculares similares, o que diminui de forma significativa o erro quando não se conhece toda a natureza da amostra (Pauli, Jaki, Lankin, 2005).

Uma forma mais exata de se determinar a pureza é com a utilização de referências internas ou externas. Em ambos os casos a amostra é preparada de forma precisa, com pesagem em balanças calibradas e dissolução em vidraria adequada. Com a referência interna é adicionada uma quantidade precisa de uma substância conhecida, cujos sinais não interferem com os da substância principal da amostra. A quantificação é realizada de forma similar à descrita acima, os sinais da referência são computados e relacionados a concentração da referência. Então a concentração da substância principal é calculada proporcionalmente à concentração da referência interna. A validade desta abordagem foi comprovada por Burton, Quillian e Walter (2005), ao preparar curvas de calibração com cafeína, teofilina, sacarose e arginina, e demonstrar que as curvas de calibração, obtidas com substâncias diferentes, são similares quando obtidas nas mesmas condições (sonda, sequência de pulsos, etc.). Esta última abordagem permite a quantificação de substâncias em concentrações mais baixas na mistura. Ela é muito similar à técnica cromatográfica de quantificação, contudo possui a vantagem de não necessitar de uma referência da própria substância a ser quantificada (Burton, Quillian e Walter, 2005).

Na aquisição de dados, os espectrômetros de RMN atuais empregam técnicas pulsadas. Os pulsos são formados por três parâmetros básicos: (i) o tempo de relaxação denominado de $d1$, (ii) a largura do pulso denominada de pw , e (iii) o tempo de aquisição, denominado aq .

$d1$ está relacionado ao tempo de restabelecimento da magnetização ou do estado de equilíbrio, situação em que todos os núcleos de hidrogênio estarão alinhados ao campo magnético do aparelho. O estabelecimento deste tempo é

fundamental pois todos os núcleos devem estar em equilíbrio antes que o próximo pulso seja aplicado. $d1$ está relacionado ao tempo de T_1 , este o tempo que o núcleo mais lento demora a voltar para o equilíbrio. Para um pulso de 90° $d1$ pode ser ajustado para $5T_1$ com boa margem de segurança. pw está diretamente relacionado ao ângulo do pulso. Como o sinal detectado está relacionado ao vetor transversal ao campo, normalmente é utilizado um valor de pw para o ângulo de 90° , resultando na maior intensidade possível. No entanto quanto maior o ângulo maior o tempo T_1 e portanto maior $d1$. Assim para otimizar o tempo de análise o ângulo pode ser otimizado, por exemplo, com o ângulo de Ernst que relaciona o cosseno do ângulo otimizado com $d1$ e T_1 , resultando sempre em um ângulo menor. aq irá determinar o número de pontos para formar o espectro, quanto maior o número de pontos maior será a resolução. aq é normalmente selecionado tendo como base a largura espectral, os valor para um espectro de hidrogênio 1D é de $aq^{-1} = 0,25 \text{ Hz}$ ou melhor.

A sobreposição de sinais é outro problema que deve ser abordado quando se elegem sinais para a quantificação de uma substância em uma amostra. As fontes de sobreposição são três: a presença de sinais laterais de rotação (associados ou à rotação do tubo na sonda do equipamento), as diferenças nos tempos de relaxação entre a amostra e a referência, e a presença de sinais satélites de ^{13}C . Os sinais laterais de rotação podem ser resolvidos simplesmente não rodando o tubo na fonte. Isto atualmente é possível, pois os equipamentos geram campos magnéticos homogêneos. As diferenças nos tempos de relaxação são resolvidas pela otimização do tempo de relaxação, conforme ajustes dos parâmetros mencionados acima. A presença de sinais satélites de ^{13}C é resolvida pela aplicação de um desacoplamento heteronuclear na frequência do ^{13}C paralelamente a aquisição do espectro, o que força o desaparecimento desses sinais (Pauli, Jaki, Lankin, 2005).

Esta medição também pode ser melhorada com tratamento pós-aquisição, quando duas técnicas são normalmente utilizadas: o *zero-filling* e a aplicação de funções de peso. Por fim, a correção de fase, ou *Phasing*, é realizada para assegurar as que integrações dos sinais tenham uma distorção mínima. Neste aspecto, vários estudos sugerem que, para melhores resultados para RMNHq, a correção manual ainda é a melhor opção (Pauli, Jaki e Lankin, 2005).

Uma vez asseguradas as devidas condições experimentais, o RMNHq pode ser aplicado como método primário para a quantificação de substâncias em amostras de origem vegetal para sua certificação em MRCs. Os únicos pontos não

abordados até agora foram a determinação da incerteza da técnica e a rastreabilidade. A determinação de incerteza foi abordada por Al-Deen e colaboradores (2004), ao apresentar a quantificação do glifosato e determinar a incerteza da medida discriminando todas as fontes de incerteza. O cálculo apresentado pelos autores encontra-se no **Anexo B**. Já Saito e colaboradores (2009) propõem a rastreabilidade dos MRCs certificados por RMNHq pelo cálculo da incerteza apresentado por Al-Deen e pelo uso de MRCs com referência interna na medida da pureza da amostra.

A principal desvantagem do RMN quantitativo é sua incapacidade de detectar núcleos paramagnéticos e por isso as impurezas inorgânicas não são detectadas.

Como ferramenta para a determinação de pureza de substâncias visando à certificação como MRC, portanto, o RMNHq é importante e versátil na medição, desde que se assegurem as condições de análise. Esta técnica pode ser utilizada tanto para a medição de pureza de substâncias quanto para a quantificação de várias substâncias em extratos. Cabe, no entanto, ressaltar que ela não é reconhecida ainda no ISO GUIA 35 como técnica primária.

4.4.1.3 *Método de balanço de massas*

O método de balanço de massas para a determinação da pureza de substâncias é a combinação da várias técnicas, como descrito no item 3.3.7.2 e expresso na ISO GUIA 35, para determinar a pureza por diferença. Todas as impurezas da amostra são computadas, e sua totalidade é subtraída de 100% para determinar o valor da substância principal. Esta abordagem implica no uso de diversas técnicas analíticas distintas, que são adequadas para cada tipo de impureza, compondo provavelmente a estratégia mais comum de certificação de substâncias puras. Nogueira e colaboradores (2011) certificaram um lote de captopril para uso como substância de referência na análise deste fármaco. Gao, Ding e Hu (Gao et al., 2011) compararam esta técnica à CDE e concluíram que seus resultados são equivalentes. Kim e colaboradores (2010) certificaram uma amostra de ginsenosídeo Rg₁ utilizando o balanço de massas.

As impurezas que podem ser analisadas são: impurezas orgânicas, impurezas inorgânicas e impurezas voláteis, que representam os três tipos de impurezas básicas que se analisam num processo de determinação da pureza de uma substância. Não por acaso as análises básicas são aplicadas às matérias

primas farmacêuticas (Farmacopeia Brasileira 5ª ed.).

As impurezas orgânicas em geral são quantificadas por métodos cromatográficos. Quando há material de referência disponível, a(s) impureza(s) é (são) expressa(s) pela fração de massa na amostra calculada a partir da referência (utilizando curvas de calibração). Quando não há referência disponível, as impurezas são calculadas pela porcentagem da(s) área(s) da(s) impureza(s) no cromatograma. No caso de produtos naturais, a segunda abordagem é a mais provável, no entanto, esta claramente esta possui limitações, já que, dependendo da técnica analítica e da forma de detecção o fator de resposta de cada impureza varia ou mesmo não é detectada. No caso de CLAE, o detector mais comumente utilizado é o de arranjo de fotodiodos. Este depende da presença de grupos cromóforos nas substâncias em análise, cujas ligações determinam os comprimentos de onda da absorção. Isso impossibilita uma visão global da amostra. Outro detector muito utilizado em CLAE é o detector de fragmentação de massas. Todavia, esta técnica também tende a gerar diferentes fatores de resposta, então atribuídos à interface entre o cromatógrafo e o espectrômetro, já que não há uma interface universal que se aplique a todas as substâncias (Hutchinson et al., 2010). O detector de índice de refração já foi muito utilizado, no entanto ele é instável e pouco sensível (Hutchinson et al. 2011). Outra classe é a de detectores com base no processo de nebulização. Nestes a fase móvel é nebulizada e seca, formando partículas que são detectadas. Existem dois tipos básicos, o DELE (Detector de Espalhamento de Luz Evaporativo) cuja detecção se faz por via ótica e o DAC (Detector de Aerosol Carregado) no qual as partículas formadas por nebulização são carregadas eletricamente e mede-se a diferença de potencial causada por esta carga no detector. Esta classe é considerada como a mais próxima de um detector universal, no entanto alguns autores já demonstraram a instabilidade das respostas, principalmente com substâncias semi-voláteis, e uma variação sistemática de sinal durante o uso do modo gradiente (Hutchinson et al. 2011). A aplicação de cromatografia com fase gasosa é ainda mais restrita, pois só as substâncias voláteis são analisadas. Além disso, os detectores utilizados também apresentam restrições. O DIC (Detector de ionização em chama) apresenta fatores de resposta diferentes para diferentes substâncias (Tappin, 2004). O espectrômetro de massas não apresenta os problemas de interface do CLAE, mas também está condicionado a diferentes fatores de resposta (Yu et al., 2011). Como consequência destas limitações, assim

como nas técnicas anteriores, quanto menor a pureza da substância a ser certificada, maior será o erro sistemático da medição das impurezas. Daí que a aplicação de técnicas cromatográficas para este fim está limitada às substâncias de pureza elevada.

A análise de impureza inorgânica é realizada com o ensaio de teor de cinzas totais. Porções do material em certificação são pesadas em cadinhos calcinados e tarados, as porções são incineradas e a massa de cinzas computada. Apesar de ser um teste simples, ele é muito utilizado na certificação de substâncias, pois a medida tem fundamento gravimétrico (ISO, 2006).

As impurezas voláteis podem ser classificadas em dois tipos básicos: resíduos de solventes voláteis e água. Para a determinação destes tipos de impurezas existem algumas técnicas disponíveis. A mais básica mede a perda por dessecação. Nesta técnica, porções da amostra são pesadas e secas em estufa até a constância do peso; as amostras são pesadas novamente e o valor da fração volátil é expresso pela diferença da massa. Outras técnicas mais específicas também podem ser utilizadas. Para determinação de água, utiliza-se o método de Karl-Fischer, que tem como base a oxidação de iodo (I_2) e redução de sulfeto a SO_2 em álcool (geralmente metanol) e na presença de uma base (geralmente imidazol). Para cada mol de I_2 oxidado, um mol de água é consumido. O ponto final de titulação é detectado por um par de eletrodos de platina imersos na solução. Antes do ponto final há abundância de íon I^- (iodeto), gerando uma diferença de potencial detectável pelos eletrodos. No ponto final há uma queda brusca da voltagem com o acúmulo de I_2 pelo consumo de toda água. Há duas técnicas básicas para a aplicação do Karl-Fischer: a Coulometria e a Titulometria. As duas têm os mesmos princípios; a diferença é que na primeira o I_2 é gerado por um eletrodo de platina, e na segunda, o I_2 é adicionado na solução titulante. Independente da técnica, o método de Karl-Fischer tem as vantagens de ser preciso e exato, ser seletivo para a água e utilizar massas de amostra pequenas. De forma complementar ao Karl-Fischer, a cromatografia com fase gasosa pode ser utilizada para a quantificação de resíduos de solventes orgânicos voláteis. A quantificação, utilizando colunas específicas como a HP-Plot Q, é realizada da forma usual, com curvas de calibração dos solventes. Esta técnica permite ainda identificar quais os solventes foram detectados na amostra.

A termogravimetria (TG) é uma técnica que pode substituir as técnicas

tradicionais de determinação impurezas totais e voláteis. Esta técnica já foi utilizada para tal fim em amostras distintas, como farinha (Acquistucci et al., 1991), semente de oleaginosas comerciais e temperos (Tomassetti, Campanella e Aureli, 1989). A Farmacopéia Brasileira 5ª edição (2010), indica a TG para, entre outros, a análise de umidade e/ou solventes e a determinação de cinzas. Giron, em sua revisão (2002), indica o uso da TG em análise de perda por secagem. A termogravimetria está baseada na medição da variação da massa da amostra em função da variação da temperatura. A massa perdida durante o processo é medida com altíssima precisão e a partir dela é possível se calcular a perda de componentes voláteis e o teor de cinzas. A grande vantagem da termogravimetria é a possibilidade de se utilizarem massas menores, na faixa de 20 – 50 mg (Acquistucci et al., 1991).

Na aplicação do método de balanço de massas para candidatos a MRC de produtos naturais a principal limitação se refere à determinação de impurezas orgânicas. Dependendo da pureza da amostra, a quantidade de impurezas pode ser significativa. Isso obriga ao uso de técnicas cromatográficas com detectores que tenham resposta similar para diferentes substâncias, como o CAD. Além disso, a presença de substâncias não solúveis no solvente no qual foi dissolvida a amostra para a análise cromatográfica pode ser avaliada. Kim e colaboradores (2010) sugeriram a realização de uma análise gravimétrica. Após dissolver uma porção de amostra no solvente (neste caso metanol), a solução é filtrada em filtro tarado. Após a secagem, o filtro é pesado novamente e o resíduo é calculado. Nesta abordagem há claramente uma sobreposição entre as impurezas inorgânicas e as orgânicas não solúveis, todavia o teste é válido para detectar algum desvio grosseiro na fração orgânica e adicionar uma nova fonte de incerteza.

O balanço de massas é utilizado fundamentalmente porque as técnicas que ele utiliza são todas primárias (gravimetria, titulometria, coulometria), sendo a única exceção a determinação de impurezas orgânicas por técnicas cromatográficas. Por outro lado, o impacto destas é significativamente pequeno quando a pureza da amostra é alta, ou quando são utilizados detectores “universais”.

4.4.1.4 *Estratégias para a certificação*

Todas as três técnicas descritas anteriormente têm a vantagem de serem primárias, o que permite que sejam realizadas em apenas um laboratório. Isto simplifica o esforço operacional como também permite a utilização de uma massa

menor. Por outro lado há algumas limitações na escolha da técnica.

As técnicas de CDE e o RMNHq medem diretamente a pureza da amostra, no entanto ambas as técnicas são incapazes de determinar impurezas inorgânicas. Isto faz com que seja necessária a aplicação do teste de cinzas totais – qualquer que seja a técnica de medição escolhida. Para mitigar esta limitação, a associação destas técnicas com a termogravimetria é uma solução válida, já que alia também a vantagem principal da baixa massa utilizada.

A pureza da amostra é fundamental na escolha da técnica a ser utilizada. A CDE não pode ser aplicado em amostras com pureza inferior a 98,5%. Por outro lado, a aplicação do balanço de massas em amostras com purezas menores não é segura, implicando em um erro sistemático significativo. O RMNHq, com a utilização de uma referência interna é a única técnica capaz de medir purezas inferiores. Entretanto, esta quantificação pode ser difícil, pois nesta técnica os sinais de todos os componentes aparecem em um único espectro, e em amostras muito complexas o isolamento de sinais de desejável e a escolha da referência adequada podem não ser possíveis. Além disso, é interessante que a medida da pureza seja realizada, pelo menos no estudo de viabilidade, por pelo menos duas técnicas. A certificação de amostras muito impuras impossibilita a comparação. Frente a isso, um limite de segurança proposto para a certificação seria de pelos menos 95% de pureza, sendo desejável pelo menos 98,5% de pureza. O primeiro valor permite que se comparem pelo menos duas técnicas (o CDE e o RMNHq), já o segundo, as três disponíveis (CDE, RMNHq e Balanço de massas). Os limites aqui sugeridos, no entanto, se aplicam a primeira certificação de uma substância. Limites menores podem ser aplicados a novas amostras, utilizando as primeiras como referência, com a aplicação de técnicas cromatográficas em estudo interlaboratorial.

A aplicação de métodos cromatográficos na certificação não está descartada. De posse de um MRC, mesmo que não seja a mesma substância, mas sim alguma outra da mesma classe química, é possível certificar uma amostra através de um estudo interlaboratorial.

4.4.2 Massa necessária da substância para certificação

A massa disponível é talvez a questão mais importante no processo de certificação, pois restringe a sua abrangência. A certificação tem essencialmente o propósito de distribuição do MRC produzido para o uso em diferentes laboratórios.

Este propósito traz subentendido, portanto, a produção de vários frascos de MRC, cujas massas de material devem ser suficientes para uma quantidade mínima de análises. Claramente, esta quantidade mínima está ligada à massa mínima necessária para se realizar uma análise que, por sua vez, está relacionada ao método analítico e à homogeneidade intrafrasco do MRC.

O processo de certificação utiliza uma massa considerável da substância, em três principais etapas: os estudos de homogeneidade, estabilidade e a própria medição da pureza, sendo que para todos os estudos os frascos devem conter a mesma massa que os frascos que serão distribuídos.

O estudo de homogeneidade requer pelo menos 10 frascos. O estudo de estabilidade é dividido em dois, de curta duração e de longa duração. Nos dois casos a quantidade de frascos utilizada varia de acordo com as condições de estudo, o tempo total do estudo e o número de pontos a serem analisados dentro deste intervalo. Ainda o MRC pode não ser estável nas condições de armazenagem utilizadas, assim um novo estudo será necessário em condições mais brandas utilizando mais massa. A medição da pureza também utiliza uma quantidade significativa de massa dependendo da técnica analítica utilizada. Com a utilização de uma técnica primária, a massa necessária pode ser diminuída, necessitando apenas de algumas replicatas. No entanto se este não for o caso, faz-se necessário um estudo interlaboratorial onde, na melhor das hipóteses, podem participar apenas 2 a 3 laboratórios; a depender da complexidade, o número de laboratórios pode atingir 15. Com as replicatas que cada um deve realizar o número total de frascos pode atingir facilmente 45 ou 60.

Fica claro que o consumo de massa do candidato a MRC está ligada a determinação dos componentes da incerteza do MRC apresentadas na expressão (3). A redução da massa a ser utilizada na certificação passa então pela retirada ou simplificação do cálculo destes componentes.

$$u_{MRC} = \sqrt{u_{med}^2 + u_{hef}^2 + u_{eld}^2 + u_{ecd}^2} \quad (3)$$

Como já foi mencionado, a primeira abordagem óbvia seria o uso de um método analítico primário para a determinação da pureza, pois reduz a massa utilizada ao realizar a medição da pureza em apenas um laboratório.

Van de Veen e colaboradores (Van der Veen et al. 2001) propuseram a possibilidade de se calcular u_{hef} em conjunto com u_{eld} . Isto torna desnecessário um estudo independente apenas para o cálculo da homogeneidade. Outra opção foi apresentada por Kim e colaboradores (2010) que consideraram u_{hef} como inserida em u_{med} pelo fato de se realizar a medida da pureza com um método primário, e utilizando vários frascos.

A realização de uma certificação “interna” é uma opção interessante. Seria uma espécie de certificação piloto em que não seriam produzidos frascos para envio a outros laboratórios, mas apenas alguns frascos, ou até mesmo apenas um único, para uso no laboratório ou instituição. A redução de massa obtida por esta abordagem deriva inicialmente da não realização do estudo de estabilidade de curta duração e, portanto, u_{ecd} é retirado do cálculo da expressão (3). Novamente o componente u_{hef} pode ser calculado em um único experimento em conjunto com u_{eld} dividindo-se a amostra em poucos frascos ou utilizando a abordagem de Kim e colaboradores (2010), calculando-se junto u_{med} no caso de métodos primários. Indo além, a certificação em apenas um frasco eliminaria de fato a contribuição de u_{hef} para o cálculo da incerteza do MRC, sendo necessário apenas o estudo de estabilidade e a determinação da pureza. Esta última possibilidade, no entanto, obriga ao uso de um desenho clássico no estudo de estabilidade, já que o desenho isócrono utiliza obrigatoriamente 1 frasco por período de tempo. Algumas ressalvas sobre o MRC “interno” devem ser destacadas: Primeiro, uma certificação realizada desta maneira implica necessariamente no uso de um método analítico primário já que, no caso contrário, um estudo interlaboratorial é necessário e o caráter “interno” deixa de fazer sentido; como ele não pode ser distribuído, já que nem u_{eld} nem u_{hef} foram calculados, o MRC “interno” não se presta a comparações interlaboratoriais, salvo talvez quando dentro da mesma instituição. Adicionalmente, caso seja certificado em apenas um frasco, não serão obtidas informações sobre a homogeneidade entre frascos, e isto é particularmente importante, pois o processo de certificação de uma substância como MRC “interno” pode ser encarada como um estudo de viabilidade para uma certificação posterior da mesma substância. Apesar dessas ressalvas, a certificação “interna” é uma alternativa interessante para contornar a falta de massa, pois permite a certificação de material de referência a partir de massas menores de substância. MRCs “internos” podem ter aplicações importantes, como ao dar suporte a diferentes estudos envolvendo a substância

certificada: estudos de quantificação da substância ou sua classe em plantas que a contem, mas não necessariamente da qual foi originariamente isolada; estudos de variação sazonal e geográfica; estudos de desenvolvimento e aumento de escala do processo de obtenção da própria substância do MRC, onde tem importância fundamental no controle e acompanhamento de processos e produtos.

4.4.3 Exemplo com a certificação de Ginsenosídeo Rg1

Kim e colaboradores (2010) apresentaram um trabalho onde certificam Ginsenosídeo Rg1 para extratos de *Panax ginseng*. A citação deste trabalho é pertinente, pois permite avaliar na prática as considerações apresentadas acima, como massa e método analítico utilizado. A abordagem escolhida pelos autores vai de encontro com a proposta de material de referência certificado “interno”. Neste estudo, eles apresentam a seguinte expressão para o cálculo da incerteza:

$$u_{MRC} = \sqrt{u_{med}^2 + u_{hef}^2 + u_{eld}^2} \quad (34)$$

Esta expressão claramente indica a certificação de um MRC “interno” pois não houve o cálculo de u_{ecd} . Além disso, o valor de u_{hef} foi considerado incluso em u_{med} . Portanto, a expressão para o cálculo da incerteza de MRC foi:

$$u_{MRC} = \sqrt{u_{med}^2 + u_{eld}^2} \quad (35)$$

O método analítico escolhido para a medição da pureza foi o de balanço de massas. As impurezas orgânicas foram analisadas por CLAE com detector de CAD. As impurezas inorgânicas foram medidas por teor total de cinzas. A água residual foi medida por Karl-Fischer e resíduo de solventes voláteis por CG. A **tabela 1** apresenta o número de análises e a massa utilizada para cada uma.

Tabela 1 - Análises e a massa utilizada na certificação de Ginsenosídeo Rg1

Análise	Número de análises	Massa utilizada por análise	Total
Impurezas orgânicas	6	39,53 mg*	237,18 mg
Impurezas inorgânicas	3	100 mg	300 mg
Água	8	100 mg	800 mg
Solventes voláteis	3	400 mg/g*	1200 mg
			2537,18 mg

Valor estimado para 10 ml de solução.

A massa total para a medição da pureza por este método foi aproximadamente 2,5 g. O estudo de estabilidade aplicou praticamente os mesmos métodos a cada 6 meses em duplicata, somando a utilização de mais 1279 mg em cada ponto, o que perfaz o total de 2558 mg para o estudo de estabilidade. Como foram isolados 14 g, ainda sobrou uma massa significativa para uso. No entanto alguns pontos chamam a atenção. A ISO GUIA 35 indica que o estudo de homogeneidade deve ser realizado com no mínimo 10 frascos, portanto, pelo menos 10 análises de cada técnica do método de balanço de massas deveriam ter sido realizadas. Dessa maneira, a massa para a certificação atingiria 6395,30 mg. Contando com a massa utilizada no estudo de estabilidade, o total atinge cerca de 8900 mg. Provavelmente esta foi a razão de não efetuarem tantas replicatas.

4.4.4 Massa mínima para a certificação

O trabalho de Kim e colaboradores (2010) mostra como a técnica de balanço de massas necessita de uma quantidade alta de amostra para certificação. Esta é essencialmente a vantagem do CDE e do RMNHq. Vários autores demonstraram que uma análise de CDE pode ser realizada com segurança, com uma massa de amostra entre 1 a 5 mg (Van Dooren e Muller, 1984), dependendo da entalpia padrão da substância. O RMNHq pode medir a pureza com massa de amostra entre 3 a 10 mg (Paul, Jaki e Lankin, 2005) dependendo da pureza e da substância. Cabe lembrar que apesar das duas técnicas medirem diretamente a pureza da substância principal da amostra, nenhuma das duas é sensível às impurezas inorgânicas, o que pode aumentar a massa em 800 mg [segundo o protocolo de Kim e colaboradores (Kim et al., 2010) apenas para a medição da pureza]. No entanto é razoável destacar algumas opções. Primeiro, a aplicação de termogravimetria no lugar da determinação de cinzas clássica reduz a massa necessária para esta análise

significativamente. E segundo pode-se preparar o MRC para que as impurezas inorgânicas sejam desprezíveis de forma que não seja necessário analisá-las durante toda a certificação. Isto pode ser realizado com o resultado de pelos menos quatro análises, ainda no estudo de viabilidade.

A massa que será utilizada na certificação pode ser dividida em três. A massa necessária para a identificação da amostra, a massa para o estudo de viabilidade e a massa necessária para a certificação em si.

A identificação pode ser realizada por técnicas cromatográficas acopladas à espectrometria de massas e/ou ressonância magnética nuclear. Para tal estudo, podem ser separados 15 mg da amostra.

O estudo de viabilidade tem por objetivo determinar a massa mínima para a análise pela técnica escolhida, otimizar os parâmetros da técnica para análise da substância, estimar a pureza da amostra de forma a confirmar se ela já é passível de certificação e, com os dois resultados, calcular qual a massa mínima necessária para análise. Consequentemente, isso evidencia a massa mínima de amostra em um frasco.

Pelo discutido acima, as técnicas do CDE e RMNHq associadas à termogravimetria são mais indicadas para quantidades menores de amostras e portanto é para elas que se fará o cálculo de massa mínima necessária.

Independente da técnica escolhida para a determinação da pureza, uma massa próxima a 35 mg é utilizada para determinar a massa mínima para a análise e otimizar as condições de análise.

Utilizando os valores de massa máximos indicados acima e no item 3.4.2.3, é possível calcular a massa mínima necessária para um estudo de viabilidade. O resultado está apresentado na **Tabela 2**.

Tabela 2 - Massa mínima necessária para a medição de pureza no estudo de viabilidade.

Técnica	Número de análises para a medição da pureza (p), impurezas inorgânicas (in)	Massa - pureza	Massa – análise Imp. Inorg.	Massa total
CDE	6 (p) ; 4 (in)	5 mg	50 mg	230 mg
RMNHq		10 mg		260 mg

A massa necessária para a certificação completa dependerá, como já mencionado, dos resultados do estudo de viabilidade. A massa mínima por frasco deve ser de cerca de 5 vezes a massa mínima por análise, com o objetivo de

garantir a realização de novas análises caso necessário. Além disso, é necessário produzir mais dois frascos para realizar a verificação da homogeneidade intrafrasco com a mesma massa dos demais. Novamente extrapolando para as maiores massas e considerando-se as impurezas inorgânicas desprezíveis, as massas mínimas necessárias para a certificação completa estão apresentadas na **Tabela 3**.

Tabela 3 - Massa mínima necessária para a certificação por CDE e RMNHq.

Técnica	Número de frascos para a medição da pureza e homogeneidade (ph), estabilidade (e)	Massa por análise	Massa total
CDE	10 (ph) ; 12 (e)**	5 mg	330 mg
RMNHq		10 mg	660 mg

*Inclui três análises para cada frasco **inclui estabilidade de curto e longo prazo com três pontos em duplicata cada.

Levando-se isso em consideração, pode-se propor que a massa mínima necessária para a certificação completa apresentada na **Tabela 4**.

Tabela 4 – Massa mínima da substância candidata para certificação completa.

Etapa	Nome da etapa	Massa (CDE)	Massa (RMNHq)
1	Identificação	15 mg	15 mg
2	Massa mínima para análise e otimização.	35 mg	35 mg
3	Estudo de viabilidade	230 mg	260 mg
4	Certificação	600 mg	1200 mg
Total		880 mg	1510 mg

Com este cálculo prevem-se três análises por frasco portanto ainda sobra a mesma massa para utilização e distribuição.

A certificação “interna” pode reduzir ainda mais estes valores com a não realização do estudo de estabilidade de curto prazo. A **Tabela 5** mostra os valores.

Tabela 5 – Massa mínima da substância candidata para a certificação interna.

Etapa	Nome da etapa	Massa (CDE)	Massa (RMNHq)
1	Identificação	15 mg	15 mg
2	Massa mínima para análise e otimização.	35 mg	35 mg
3	Estudo de viabilidade	230 mg	260 mg
4	Certificação*	450 mg	900 mg
Total		730 mg	1210 mg

*Não é realizado o estudo de estabilidade de curta duração.

Optando por realizar a certificação em apenas um frasco, a massa para análise reduz significativamente. A **Tabela 6** mostra os valores.

Tabela 6 – Massa mínima da substância candidata para a certificação interna em um frasco.

Etapa	Nome da etapa	Massa (CDE)	Massa (RMNHq)
1	Identificação	15 mg	15 mg
2	Massa mínima para análise e otimização	35 mg	35 mg
3	Estudo de viabilidade*	230 mg	260 mg
4	Certificação	65 mg	130 mg
Total		345 mg	440 mg

Neste caso utiliza-se os resultados do estudo de viabilidade para a certificação, bastando adicionar algumas análises para completar a pureza (quatro) e realizar o estudo de estabilidade (nove).

Contudo, é necessário se considerar que a massa para certificação completa já contempla uma massa adicional em cada frasco, não utilizada diretamente na análise. Já a massa calculada para a análise em apenas um frasco contempla apenas a massa utilizada.

4.5 PROPOSTA DE PROTOCOLO DE CERTIFICAÇÃO

O protocolo proposto para a certificação de substância de plantas medicinais está apresentado abaixo. Este protocolo abrange a certificação completa e as certificações internas.

1. Introdução

- a) O protocolo de certificação de material de referência tem por objetivo certificar uma amostra de substância para utilização desta como material de referência em análises laboratoriais e interlaboratoriais. As etapas deste protocolo são: Análise qualitativa da amostra, Estudo de viabilidade, Certificação e Monitoramento.

2. Análise qualitativa da amostra

- a) Objetivo: Analisar a amostra por técnicas analíticas adequadas visando confirmar a identidade da amostra. Consideram-se técnicas adequadas a espectrometria de massas e a ressonância magnética nuclear. É recomendável que as duas técnicas sejam realizadas. Os resultados devem ser documentados e arquivados junto ao relatório de certificação.
- b) Os protocolos destas análises serão os usuais desenvolvidos para a amostra por estas técnicas.

3. Estudo de viabilidade

- a) Objetivo: determinar a viabilidade de certificação do material por quatro etapas distintas: otimização da técnica de análise de pureza, determinação da massa mínima, medição de pureza e medição de impurezas inorgânicas. Na primeira etapa é escolhida a técnica analítica que será utilizada, Calorimetria Diferencial Exploratória (CDE), a Ressonância Magnética Nuclear de Próton quantitativa (RMNHq) e balanço de massas. A escolha dependerá da disponibilidade da técnica, a pureza da substância e da massa da amostra.
- b) Otimização da técnica
 - A análise da amostra pela técnica escolhida será realizada segundo protocolos de cada técnica.
 - Com método otimizado serão realizadas as próximas etapas.
- c) Determinação da massa mínima.
 - Pesam massas regulares a partir de 1 mg até a massa máxima da técnica escolhida de acordo com a **Tabela 1**.

Tabela 1: Massas pesadas da substância para a análise da homogeneidade intrafrasco

Técnica	Massas (mg)
CDE	1, 2, 3, 4, 5.
RMNHq	1, 2, 4, 6, 8, 10.
Balanço de massas*	1, 2, 3, 4, 5.

*Análise de impurezas orgânicas.

- Analisar as amostras pela técnica escolhida
- Analisar os resultados buscando determinar a massa mínima em que há uma boa relação entre o sinal da amostra e o ruído.
- Documentar os resultados e anexá-los ao relatório final de certificação.

d) Pureza

- Pesar seis alíquotas da amostra com a massa mínima escolhida.
- Realizar as análises destas alíquotas pelo método analítico escolhido.
- Calcular média, desvio padrão e erro padrão.
- Calcular a incerteza da medição segundo a técnica escolhida.
- A pureza da medição será apresentada segundo a seguinte expressão:

$$Pur(\%) \pm u_{med} \cdot k$$

Onde $Pur(\%)$ é a pureza da amostra, u_{med} é a incerteza da medição e k é o fator de abrangência, $k=2$ com uma confiança de 95%.

- Obs. O CDE pode determinar pureza com exatidão adequada a partir de 98,5% de pureza. Purezas inferiores a 98,5% mas superiores a 95% devem ser analisadas por RMNHq ou balanço de massas.
- Documentar os resultados e anexá-los ao relatório final de certificação.

d) Impurezas inorgânicas

- Realizar quatro análises de termogravimetria com a amostra visando determinar o teor de impurezas inorgânicas.
- Calcular a média, desvio padrão e erro padrão da análise.
- Calcular a incerteza da medição.
- As impurezas inorgânicas serão apresentadas segundo a seguinte expressão:

$$I_{impur} \pm u_{impur} \cdot k$$

Onde $I_{impur}(\%)$ é o valor das impurezas Inorgânicas, u_{impur} é o valor da incerteza das impurezas inorgânicas e k o fator de abrangência, $k=2$ com uma confiança de 95%.

- Documentar os resultados e anexá-los ao relatório final de certificação.
- No caso de CDE ou RMNHq, se o valor do teor das impurezas inorgânicas for desprezível a certificação é realizada apenas com o método principal (CDE ou RMNHq). Caso o teor das impurezas inorgânicas não seja desprezível a certificação pode ser realizada com a medição das impurezas inorgânicas em todas as análises de pureza.

4. Certificação completa

a) Objetivo: Certificar a substância determinando o valor de sua pureza assim como sua incerteza associada. A certificação pode ser classificada em dois tipos: Certificação completa e certificação “interna”. As etapas da certificação completa são: Distribuição da amostra em frascos, medição da homogeneidade intrafrasco, medição da pureza, medição da homogeneidade entre frascos, estudo de estabilidade de curta e longa duração, e cálculo da incerteza da pureza.

b) Distribuição da amostra em frascos

- Homogeneizar a amostra por métodos adequados, como pulverização em gral e pistilo, visando a maior homogeneidade possível.
- Distribuir a amostra por pelo menos 24 frascos, cada frasco contendo cerca de cinco vezes a massa mínima necessária determinada experimentalmente no estudo de viabilidade.
- Rotular os frascos com o nome da substância e um número de identificação.
- Selecionar aleatoriamente 10 frascos para a análise de pureza, 12 para os estudos de estabilidade e dois para homogeneidade intrafrasco.

c) Homogeneidade intrafrasco

- A homogeneidade intrafrasco será medida pelo método no qual se pretende utilizar o material de referência. Se mais de um método for pretendido, o procedimento descrito aqui deve ser realizado para cada um deles.

- Um frasco selecionado aleatoriamente para a medição da homogeneidade intrafrasco.
- Pelo menos três alíquotas de cerca de 1,00 mg serão pesadas com exatidão.
- Como uma destas alíquotas será preparada e analisada segundo metodologia da técnica em uso. Os resultados serão expressos em sinal bruto.
- Quando possível, dependendo da técnica, a amostra preparada será analisada pelo menos quatro vezes.
- Os resultados serão avaliados por ANOVA (anexo A) considerando cada alíquota pesada um grupo.
- O resultado da ANOVA é uma indicação da homogeneidade intrafrasco como segue:

$$p_{anova} \leq 0,05 \rightarrow \text{falta de homogeneidade}$$

$$p_{anova} > 0,05 \rightarrow \text{não há falta de homogeneidade}$$

- A incerteza da homogeneidade intrafrasco será calculada a pela seguinte expressão:

$$u_{hif} = \sqrt{\frac{MS_{entre} - MS_{intra}}{n_0}}$$

Onde u_{hif} é a incerteza da homogeneidade intrafrasco, MS_{entre} é o quadrado médio entre alíquotas, MS_{intra} é o quadrado médio intraalíquota e n_0 é o número de análises por alíquota.

- O resultado da incerteza será analisado da seguinte forma:

$$u_{hif} < Rep \rightarrow \text{Massa mínima para a análise de 1,00 mg}$$

$$u_{hif} > Rep \rightarrow \text{Massa mínima para a análise maior de 1,00 mg}$$

Onde Rep é a repetitividade do método.

- Caso a massa mínima seja maior de 1,00 mg então o procedimento deverá ser repetido com uma massa maior até se determinar a massa mínima.
- Caso a técnica de certificação não permita várias análises da mesma amostra utiliza-se a técnica descrita no estudo de viabilidade para a

determinação de massa mínima.

- Documentar os resultados e anexá-los ao relatório final de certificação.

d) Medição de pureza - Certificação completa

- Pesar pelo menos três alíquotas com massa determinada no item 3.b) de cada frasco selecionado para análise de pureza no 4.b).
- Analisar as amostras pesadas pelo método desenvolvido para a técnica escolhida.
- Calcular a média dos resultados de cada frasco.
- Com a média de cada frasco calcular a média dos resultados de todos os frascos assim com seu desvio padrão e erro padrão.
- Calcular a incerteza da medição pelo modelo da técnica escolhida.
- A incerteza da pureza será a maior incerteza entre o erro padrão da medição entre frascos e a incerteza da medição da técnica escolhida.
- Documentar os resultados e anexá-los ao relatório final de certificação.

e) Medição da homogeneidade

- Analisar a presença de uma tendência calculando uma regressão linear com os resultados individuais de todos os frascos da análise de pureza. Para esta análise $x = \text{número do frasco}$ e $y = \text{resultados individuais}$.
- Avaliar o resultado da ANOVA da regressão da seguinte maneira:

$$p \leq 0,05 \rightarrow \text{presença de tendência}$$

$$p > 0,05 \text{ ausência de tendência}$$

- Em caso de presença de tendência, a amostra é considerada não homogênea e portanto não pode ser certificada.
- Analisar os resultados individuais de cada frasco por uma ANOVA (Anexo A).
- O resultado da ANOVA é uma indicação da homogeneidade entre frascos:

$$p_{anova} \leq 0,05 \rightarrow \text{falta de homogeneidade}$$

$$p_{anova} > 0,05 \rightarrow \text{não há falta de homogeneidade}$$

- Caso ocorra falta de homogeneidade a amostra não poderá ser certificada.

- Calcular a incerteza da homogeneidade pela seguinte expressão:

$$u_{hef} = \sqrt{\frac{MS_{entre} - MS_{intra}}{n_0}}$$

- Onde u_{hef} é a incerteza da homogeneidade intrafrasco, MS_{entre} é o quadrado médio entre os frascos, MS_{intra} é o quadrado médio intrafrasco e n_0 é o número de alíquotas por frasco.
 - O valor da incerteza entre frascos não será utilizado no cálculo da incerteza da pureza da amostra se u_{med} for o erro padrão da medição entre os frascos.
 - Documentar os resultados e anexá-los ao relatório final de certificação.
- f) Estudo de estabilidade de curta duração
- Dos 12 frascos já selecionados para estudos de estabilidade selecionar aleatoriamente seis frascos.
 - Agrupar os frascos em três pares e registrar.
 - Armazenar todos os frascos fechados a temperatura de 30 °C, se não houver histórico de degradação térmica e a 20 °C se houver histórico de degradação térmica.
 - Retirar cada par e analisar conforme a **Tabela 2**

Tabela 2: Tempos do estudo de estabilidade de curta duração.

Par de frascos	Tempo
1º Par	7 dias
2º Par	14 dias
3º Par	30 dias

- Pesquisar pelos menos três alíquotas de cada frasco com a massa mínima determinada no item 4.c).
- Analisar as amostras pelos métodos desenvolvidos para a técnica escolhida.
- O cálculo da incerteza pode ser realizado de duas maneiras, utilizando uma ANOVA de dois níveis “*nested*” ou a partir da regressão linear.
- Cálculo da incerteza da estabilidade por ANOVA de dois níveis “*nested*”.

- o Calcular a média de cada frasco.
- o Analisar a presença de uma tendência calculando uma regressão linear com os resultados médios de todos os frascos da análise de pureza. Para esta análise $x = \text{tempo armazenagem}$ e $y = \text{resultados individuais}$.
- o Avaliar o resultado da ANOVA da regressão da seguinte maneira:

$$p \leq 0,05 \rightarrow \text{presença de tendência}$$

$$p > 0,05 \rightarrow \text{ausência de tendência}$$

- o Em caso de presença de tendência, a amostra é considerada não estável e, portanto, não pode ser certificada.
- o Com os resultados individuais de cada frasco realizar uma ANOVA de dois níveis “nested” (anexo A).
- o Calcular a incerteza da estabilidade pela seguinte expressão.

$$u_{ecd}^2 = S_{estab}^2 + S_{hef}^2 + S_r^2$$

- o Onde S_r é a repetitividade intrafrasco, S_{hef} é o desvio padrão da homogeneidade entre frascos e S_{estab} é o desvio padrão da estabilidade.

$$S_r^2 = MS_{intra}$$

$$S_{hef}^2 = \frac{MS_{B \subset A} - MS_{intra}}{n_0}$$

$$S_{estab}^2 = \frac{MS_{entre} - n_0' u_{hef}^2 - MS_{intra}}{(nb)_0}$$

Onde o S_{hef} é a homogeneidade entre frascos $MS_{B \subset A}$ é o quadrado médio do subgrupo B (frascos) no grupo A (tempo), MS_{intra} é a média dos quadrados do subgrupo B, MS_{entre} é média dos quadrados do grupo A. Os valores de n_0 , n_0' e $(nb)_0$ serão calculados pelas seguintes expressões.

$$n_0 = n$$

$$n_0' = (na) - n$$

$$(nb)_0 = nb$$

- Cálculo da incerteza da estabilidade a partir da regressão.
 - o Utilizando os resultados da análise de tendência calcular o desvio

padrão do coeficiente angular da regressão pela seguinte expressão:

$$u_{estab} = Xu_{bl}$$

Onde u_{estab} é a incerteza da estabilidade, x é o período de tempo em dias e u_{bl} é o desvio padrão da regressão calculado por:

$$u_b = \frac{s}{\sqrt{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}}$$

Onde X_i é o valor de cada tempo e \bar{X} é o tempo médio. s é calculado pela seguinte expressão.

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y})^2}{n-2}}$$

Onde y_i é o valor da média de cada frasco e \hat{y} é o valor da pureza calculado pela regressão para aquele tempo.

- Comparar os valores da incerteza da estabilidade calculada pelos dois métodos e utilizar o maior.
 - Documentar os resultados e anexá-los ao relatório final de certificação.
- g) Estudo de estabilidade de longa duração
- Agrupar os seis frascos restantes selecionados para estudo de estabilidade em pares.
 - Armazenar todos os frascos fechados a uma temperatura de 8 °C se não houver histórico de degradação térmica e a -20 °C se houver histórico de degradação térmica.
 - Retirar cada par e analisar conforme a **Tabela 3**.

Tabela 3: Tempos do estudo de estabilidade de longa duração

Par de frascos	Tempo
1º Par.	90 dias
2º Par.	180 dias
3º Par.	360 dias

- Calcular a incerteza de longa duração da mesma maneira que o cálculo da incerteza da estabilidade de curta duração.

- Documentar os resultados e anexá-los ao relatório final de certificação.
- h) Cálculo da incerteza e expressão da pureza do material de referência certificado.
- Calcular a incerteza da pureza da amostra segundo a expressão:

$$u_{MRC} = \sqrt{u_{med}^2 + u_{hef}^2 + u_{eld}^2 + u_{ecd}^2}$$

Onde u_{MRC} é a incerteza do material de referência certificado, u_{med} é a incerteza da medição da pureza, u_{eld} é a incerteza da estabilidade de longo prazo e u_{ecd} é a incerteza da estabilidade de curto prazo.

- A expressão da pureza do material de referência certificado será feita de seguinte maneira:

$$Pur_{MRC} \pm u_{MRC} \cdot k$$

Onde k é o fator de abrangência, $k=2$ para 95% de confiança.

5. Certificação interna em vários frascos

- a) A certificação interna em vários frascos é realizada da mesma maneira que a certificação completa, apenas não é realizado o estudo de estabilidade de curta duração.

6. Certificação interna em apenas um frasco.

- a) A certificação interna em apenas um frasco é realizada da mesma forma que a certificação completa com algumas modificações:
- Como não há vários frascos não será realizado o estudo de homogeneidade.
 - Como será uma certificação interna não será realizado o estudo de estabilidade de curta duração.
 - Serão realizadas mais 4 medições da amostra pela técnica escolhida, adicionando estas às análises realizadas no estudo de viabilidade. Com estas será calculada a pureza. A incerteza da medição será calculada pela incerteza da técnica escolhida.
 - O estudo de estabilidade de longa duração será realizado com os mesmos tempos discriminados acima, apenas serão pesadas e analisadas pelo menos três alíquotas para cada tempo.
 - A incerteza do MRC será calculada pela seguinte expressão.

$$u_{MRC} = \sqrt{u_{med}^2 + u_{eld}^2}$$

- A pureza será expressa como indicado no item 4.h).
- Documentar os resultados e anexá-los ao relatório final de certificação.

7. Monitoramento

- a) Independente da forma de certificação todos MRC devem ser monitorados após a certificação.
- b) O monitoramento é realizado pela medida periódica da pureza do MRC armazenado a temperatura de estabilidade. O resultado é comparado com a pureza certificada e sua incerteza.
- c) O procedimento é o que segue:
 - A cada 180 dias pesar três alíquotas de um frasco na massa mínima determinada.
 - Analisar pelo método desenvolvido para a técnica escolhida.
 - Calcular a média, desvio padrão e erro padrão.
 - Calcular a incerteza da medição pela técnica escolhida.
 - Avaliar a estabilidade pela seguinte expressão

$$|x_{MRC} - x_{mon}| \leq k \sqrt{u_{MRC}^2 + u_{mon}^2}$$

Onde x_{MRC} é a pureza do MRC, x_{mon} é a pureza medida no monitoramento, u_{MRC} é a incerteza do MRC e u_{mon} é a incerteza da medida do monitoramento. Se a condição é cumprida o MRC é considerado estável.

4.5.1 Observações sobre o protocolo

Este protocolo se aplica a substâncias novas ou relativamente novas para as quais não há uma substância de referência reconhecida.

O protocolo minimiza o uso de massa de diversas maneiras: (i) Ao utilizar um método primário realiza-se a medição da pureza em um único laboratório e não há mais a necessidade de um estudo de homogeneidade em separado. (ii) Para uma certificação interna não há necessidade de estudo de estabilidade de curta duração. (iii) Sendo uma certificação interna em um único frasco a análise de pureza será uma extensão da análise de pureza do estudo de viabilidade. (iv) Os estudos de estabilidade apresentam um número reduzido de pontos e condições no estudo.

Sobre este último vale mencionar que o estudo com mais de uma temperatura é possível e até desejável. Por outro lado, não há garantia de que a amostra será estável com as temperaturas escolhidas, portanto pode ser necessário o uso de mais massa para um novo estudo em outra temperatura.

4.6 CERTIFICAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS DERIVADAS DE PLANTAS MEDICINAIS

Com base no protocolo acima foi iniciado um estudo de viabilidade com algumas substâncias de origem natural. As etapas realizadas foram a análise qualitativa e o início do estudo de viabilidade. Cinco amostras foram avaliadas, duas de origem comercial e três isoladas no laboratório.

As substâncias são: Ácido ursólico (comercial), ácido oleanólico (comercial), 7-desacetoxi-7-oxogedunina (isolada; 1Bpp1pp1) e 6 α -acetoxigedunina (duas amostras isoladas; Grupo Fpp1 e Grupo Gpp1).

A qualificação das amostras isoladas foi realizada por Ressonância Magnética Nuclear de Próton e Carbono e Cromatografia em fase Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas. A qualificação das amostras comerciais foi realizada apenas por Cromatografia em Fase Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas.

As amostras comerciais e a amostra 1Bpp1pp1 foram analisadas por Calorimetria Diferencial Exploratória para uma determinação preliminar da pureza.

4.6.1 Experimental

4.6.1.1 Ressonância Magnética Nuclear

A Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e ^{13}C foi realizada em um equipamento da marca Bruker de 400 MHz. As amostras foram dissolvidas em

CD_2Cl_2 e o TMS foi utilizado como referência.

4.6.1.2 *Cromatografia em Fase Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas*

Para a análise dos tetranortriterpenóides cerca de 1 mg de amostra foi dissolvida em cerca de 1 ml de CH_2Cl_2 . Cerca de 1 μ l desta solução foi injetado e analisado. Para a análise dos ácidos triterpênicos as amostras foram derivatizadas com trimetilsilimidazol (TMSI). Cerca de 1 mg de cada amostra foram pesados e dissolvidos em 1 ml de $CHCl_3$. O solvente foi evaporado e sobre a amostra foi adicionado 1ml da solução derivatizante (2 ml de TMSI em 10 ml de acetonitrila). A solução foi aquecida a 60 °C por 30 min. Esta solução foi injetada no CG-EM. o método cromatográfico está descrito no **Quadro 2**.

O equipamento utilizado foi um cromatógrafo da marca Agilent modelo 6890 acoplado a um espectrômetro de massas da mesma marca modelo 5973. O método utilizado foi o descrito no **Quadro 3**.

Quadro 2 - Método de análise por CG-EM dos tetranortriterpenóides.

Temperatura do injetor: 300 °C; split de 20:1.
 Programação do forno: Temperatura inicial 150 °C, taxa de aquecimento 5,75 °C/min até 325 °C, isoterma final de 10 min.
 Coluna DB-5MS de 30 m, diâmetro interno de 250 μ m e espessura de filme de 0,25 μ m.
 Fluxo de 1,6 ml/min de hélio.
 Temperatura do auxiliar de transferência de 280 °C.
 Temperatura da fonte de íons de 230 °C.
 Temperatura do analisador de 150 °C.
 Faixa de análise de massas: de 40 a 600.

Quadro 3 - Método de análise por CG-EM dos ácido triterpênicos.

Temperatura do injetor: 290 °C; split de 20:1.
 Programação do forno: Temperatura inicial 115 °C, isoterma de 1 min, taxa de aquecimento 20 °C/min até 200 °C, taxa de aquecimento de 10 °C/min até 290 °C, isoterma de 2 min, taxa de aquecimento de 15 °C/min até 300 °C isoterma de 2 min. , taxa de aquecimento de 2 °C/min até 320 °C, isoterma de 6 min.
 Coluna DB-5MS de 30 m, diâmetro interno de 250 μ m e espessura de filme de 0,25 μ m.
 Fluxo de 1,1 ml/min de hélio.
 Temperatura do auxiliar de transferência de 280 °C.
 Temperatura da fonte de íons de 230 °C.
 Temperatura do analisador de 150 °C.
 Faixa de análise de massas: de 40 a 650.

4.6.1.3 *Calorimetria Diferencial Exploratória*

Foram pesadas três alíquotas de cada amostra com massa entre 1,5 e 2,2 mg. As três alíquotas de cada amostra foram analisadas variando a taxa de aquecimento: 0,4; 0,5 e 0,6 °C. As análises foram realizadas em calorímetro marca

Mettler-Toledo modelo 822^e.

4.6.1.4. Amostras comerciais

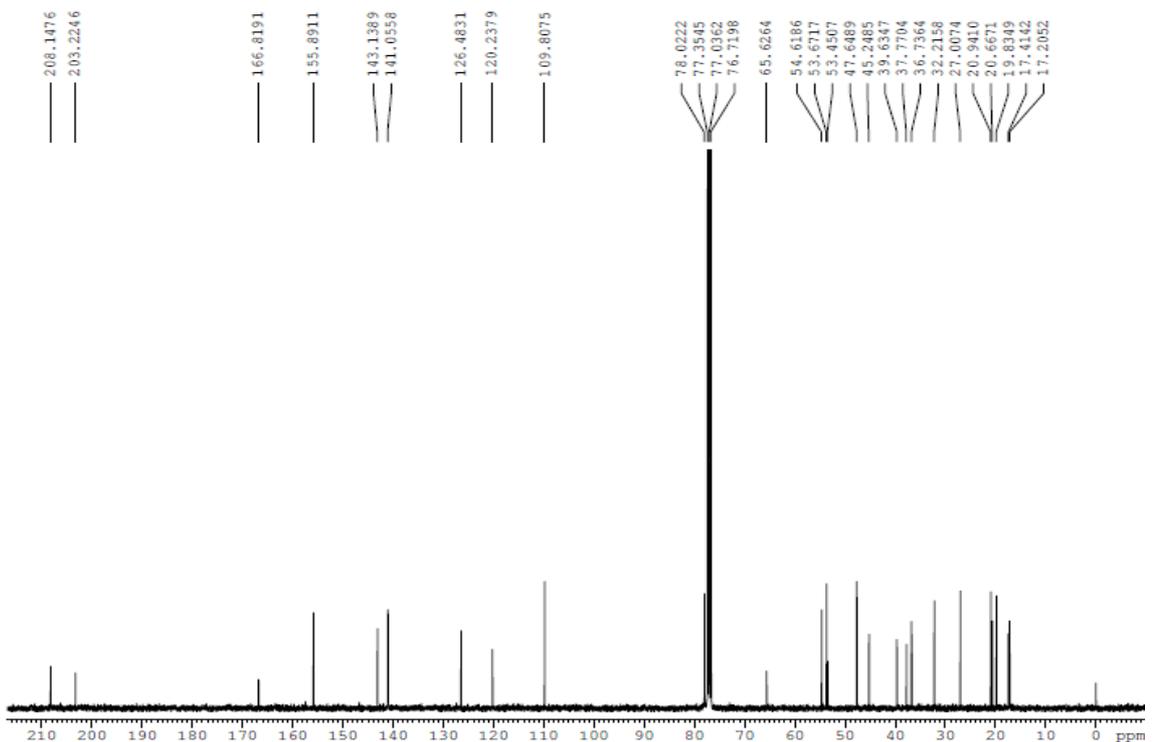
Ácido oleanólico da marca Aldrich pureza mínima de 97%. Ácido ursólico da marca Aldrich pureza mínima de 90%.

4.6.2 Resultados

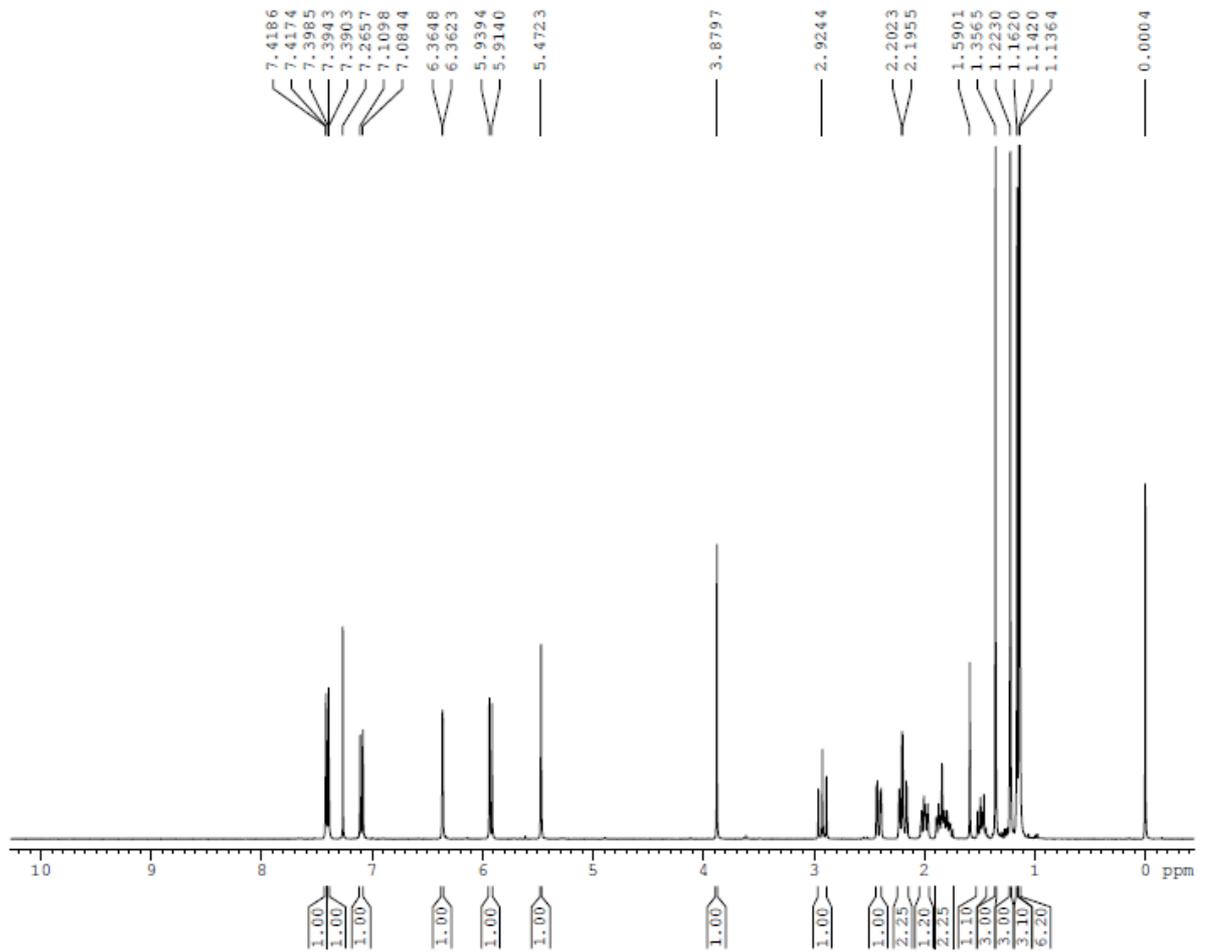
Os espectros de RMN de próton e carbono, o espectro de massas obtido por impacto de elétrons (obtido pela técnica hifenizada CG-EM), e o resultado do CDE de cada amostra estão apresentados a seguir.

4.6.2.1. 7-desacetoxi-7-oxogedunina

Figura 9 - Espectro de RMN¹³C de 7-desacetoxi-7-oxogedunina

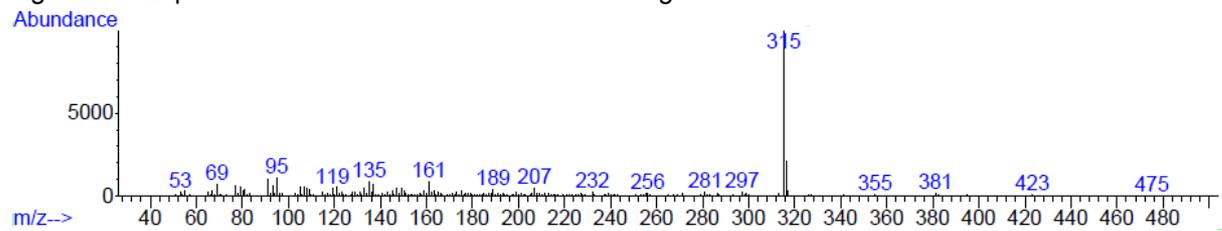


(Tappin, 2012)

Figura 10 - Espectro de RMN¹H de 7-desacetoxi-7-oxogedunina

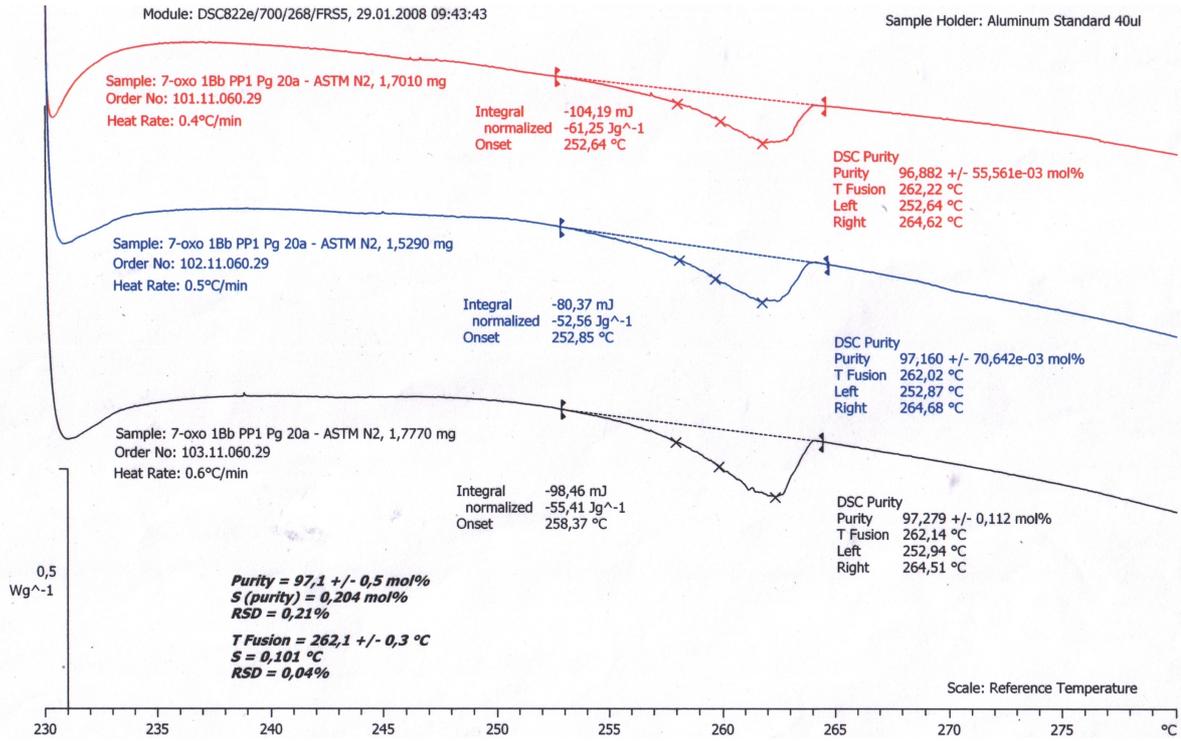
(Tappin, 2012)

Figura 11 - Espectro de massas do 7-desacetoxi-7-oxogedunina.

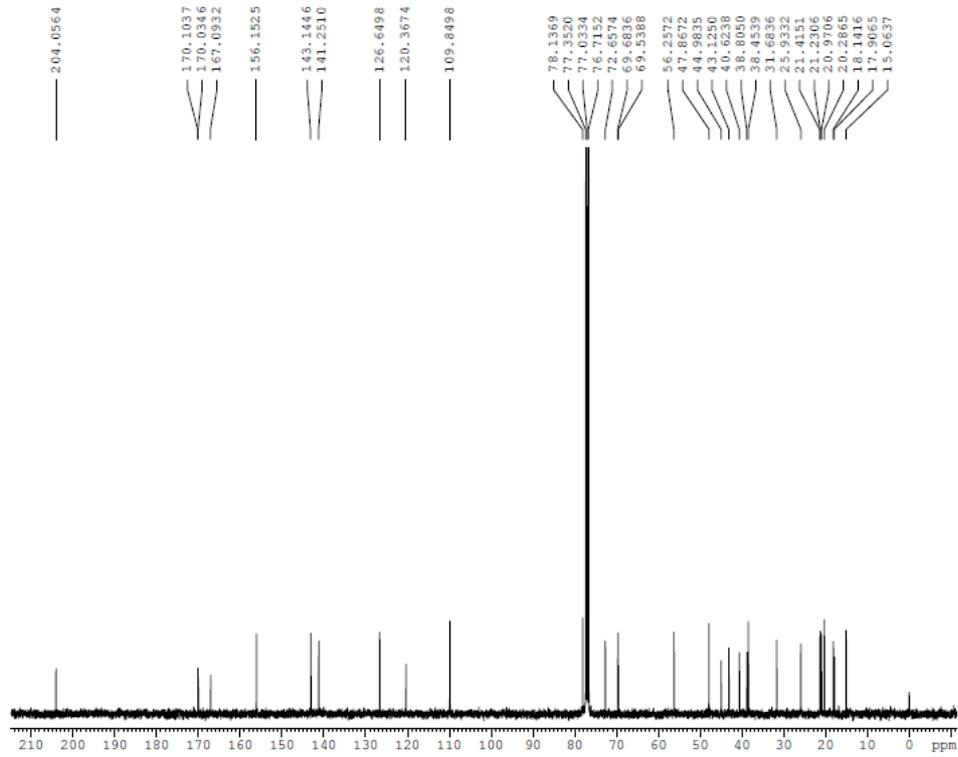


(Tappin, 2012)

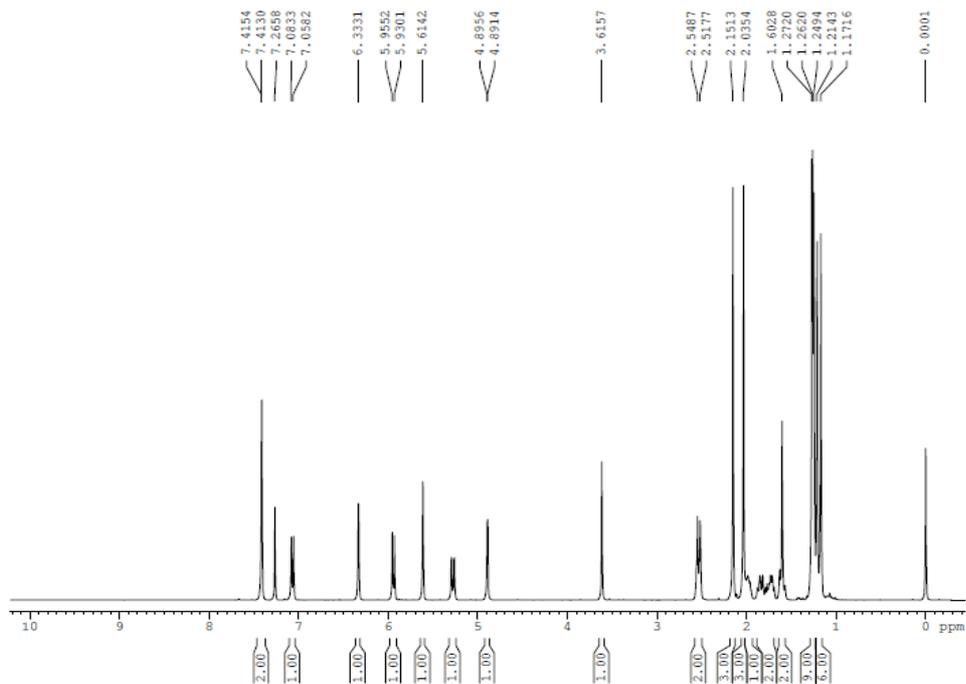
Figura 12 - Resultado do CDE do 7-desacetoxi-7-oxogedunina



(Tappin, 2012)

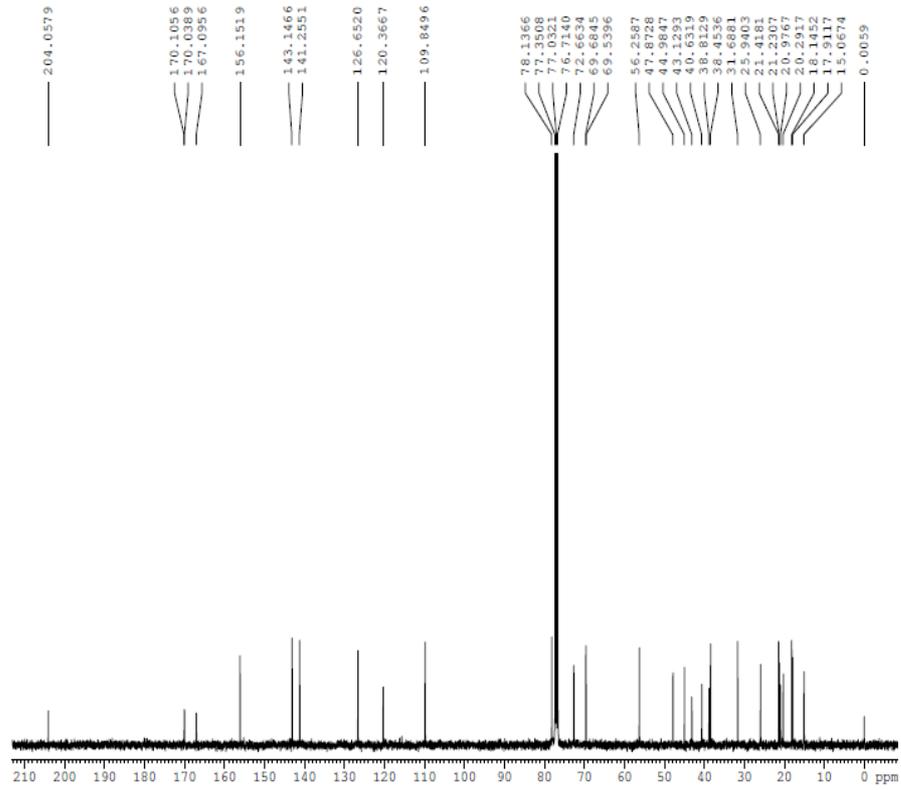
4.6.2.2. 6 α -acetoxigeduninaFigura 13 - Espectro de RMN¹³C de 6 α -acetoxigedunina do Grupo Fpp1.

(Tappin, 2012)

Figura 14 - Espectro de RMN¹H de 6 α -acetoxigedunina do Grupo Fpp1

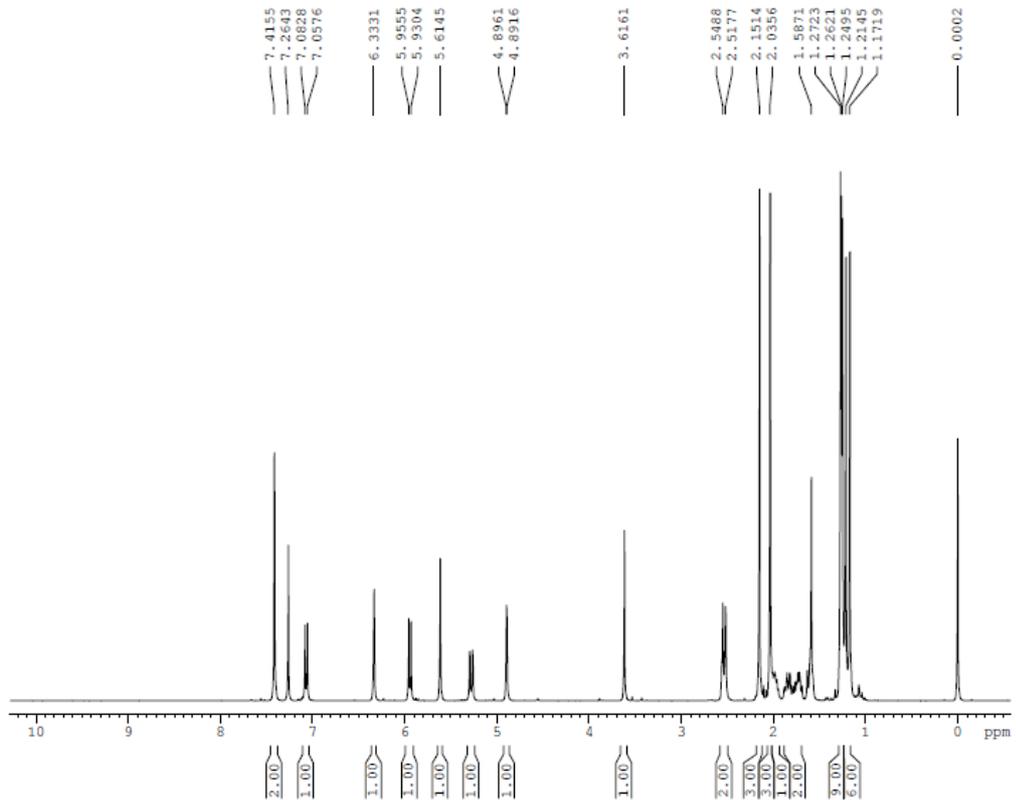
(Tappin, 2012)

Figura 15 - Espectro de RMN¹³C de 6α-acetoxigedunina do Grupo Gpp1

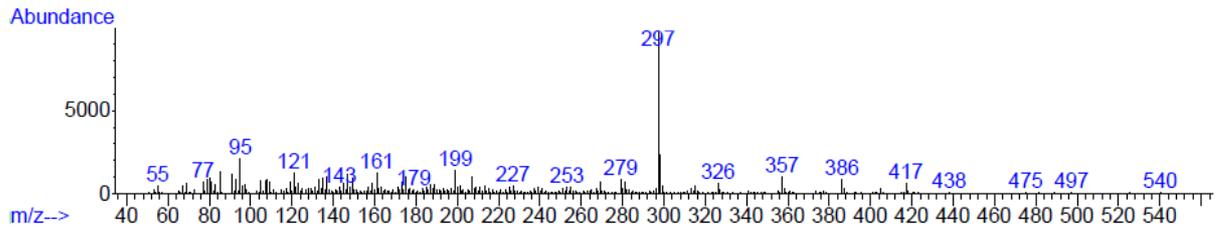


(Tappin, 2012)

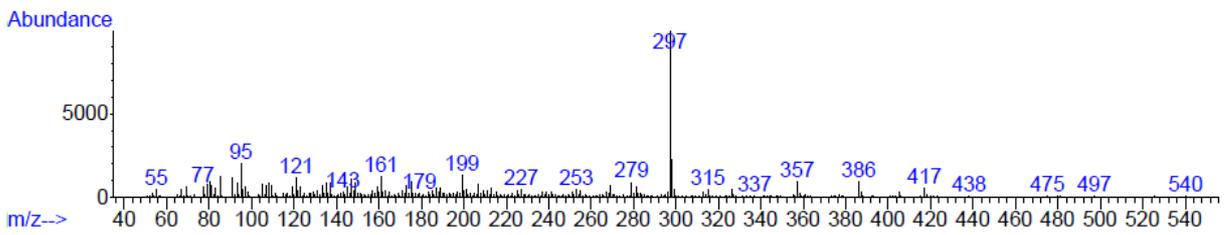
Figura 16 - Espectro de RMN¹H de 6α-acetoxigedunina Grupo Gpp1



(Tappin, 2012)

Figura 17 - Espectro de massas de 6 α -acetoxigedunina do Grupo Fpp1

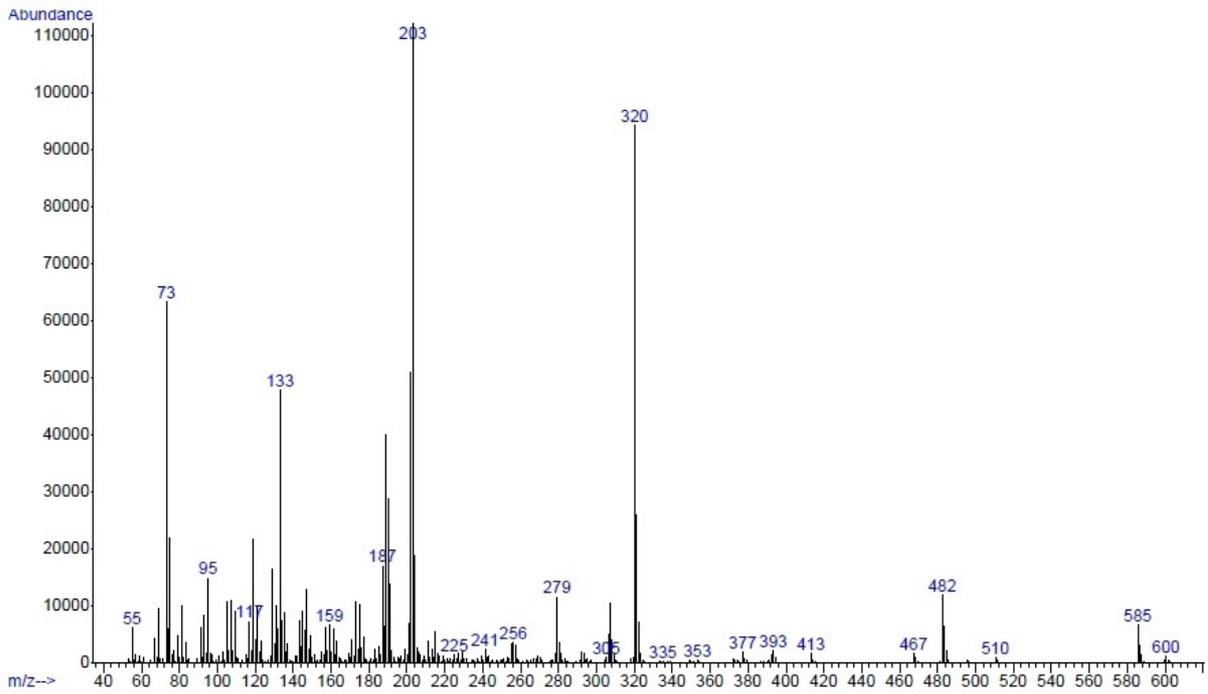
(Tappin, 2012)

Figura 18 – Espectro de massas de 6 α -acetoxigedunina do Grupo Gpp1

(Tappin, 2012)

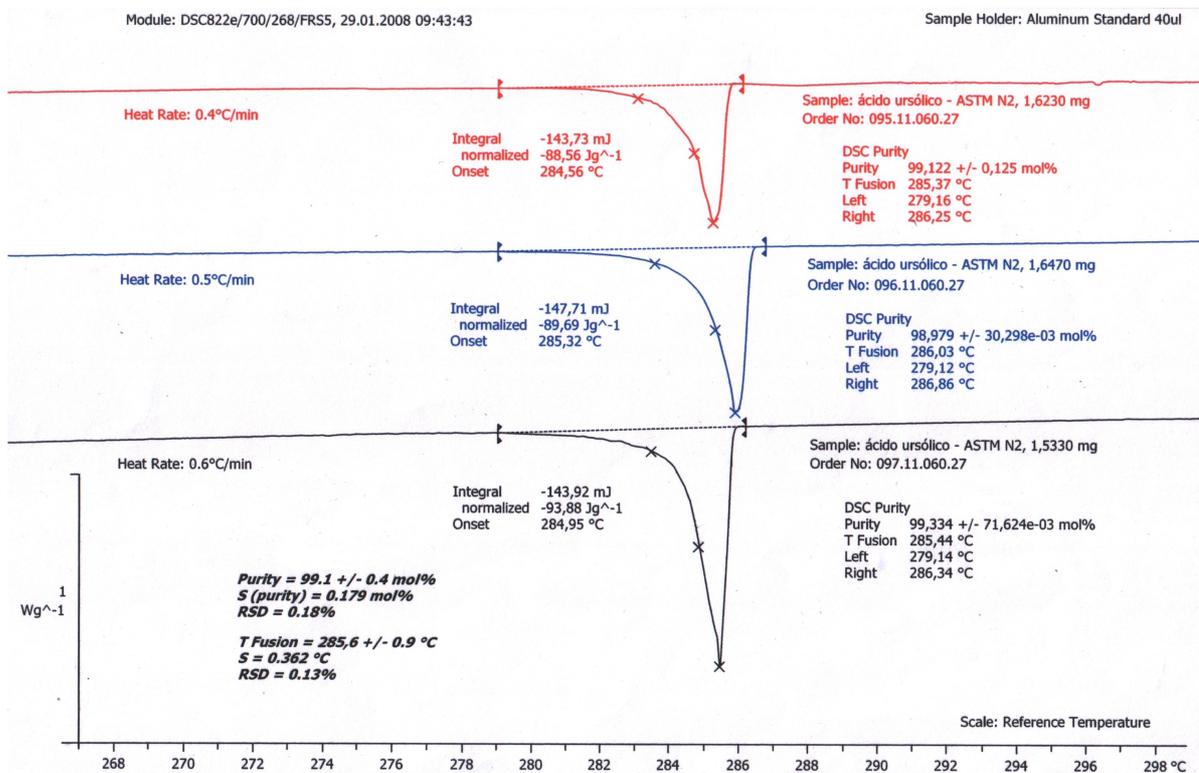
4.6.2.3 Ácido ursólico

Figura 19: Espectro de massas do ursolato de metila siliado



(Tappin, 2012)

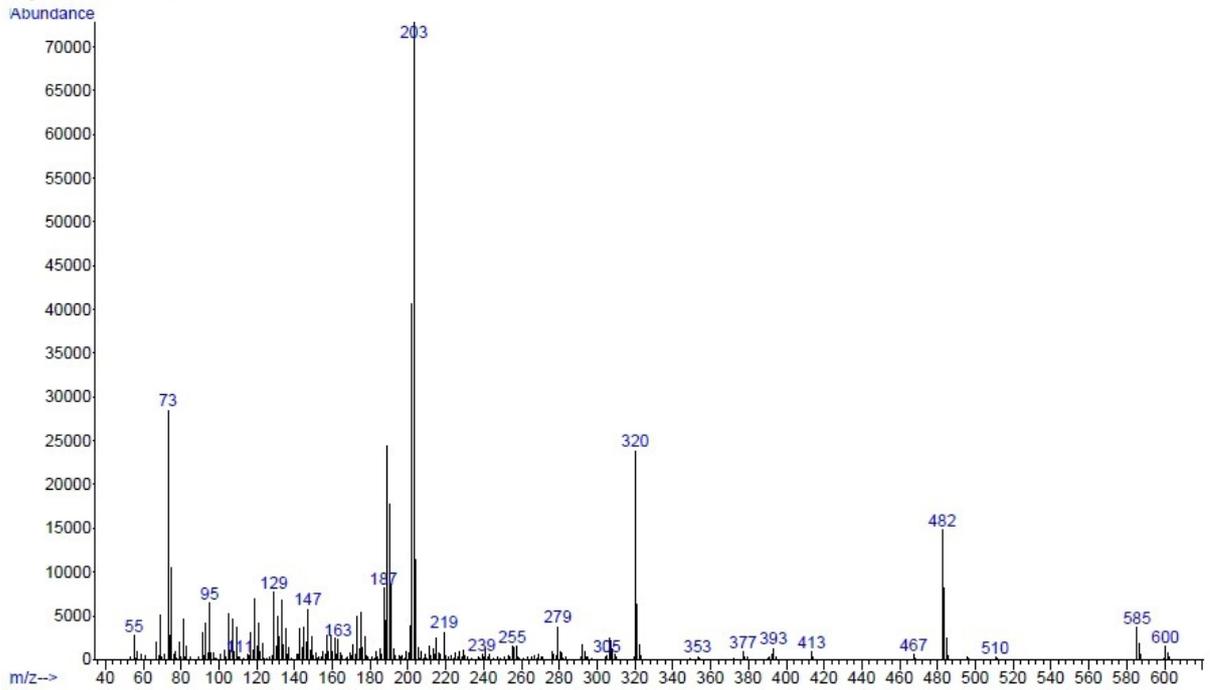
Figura 20 - Análise de CDE de ácido ursólico



(Tappin, 2012)

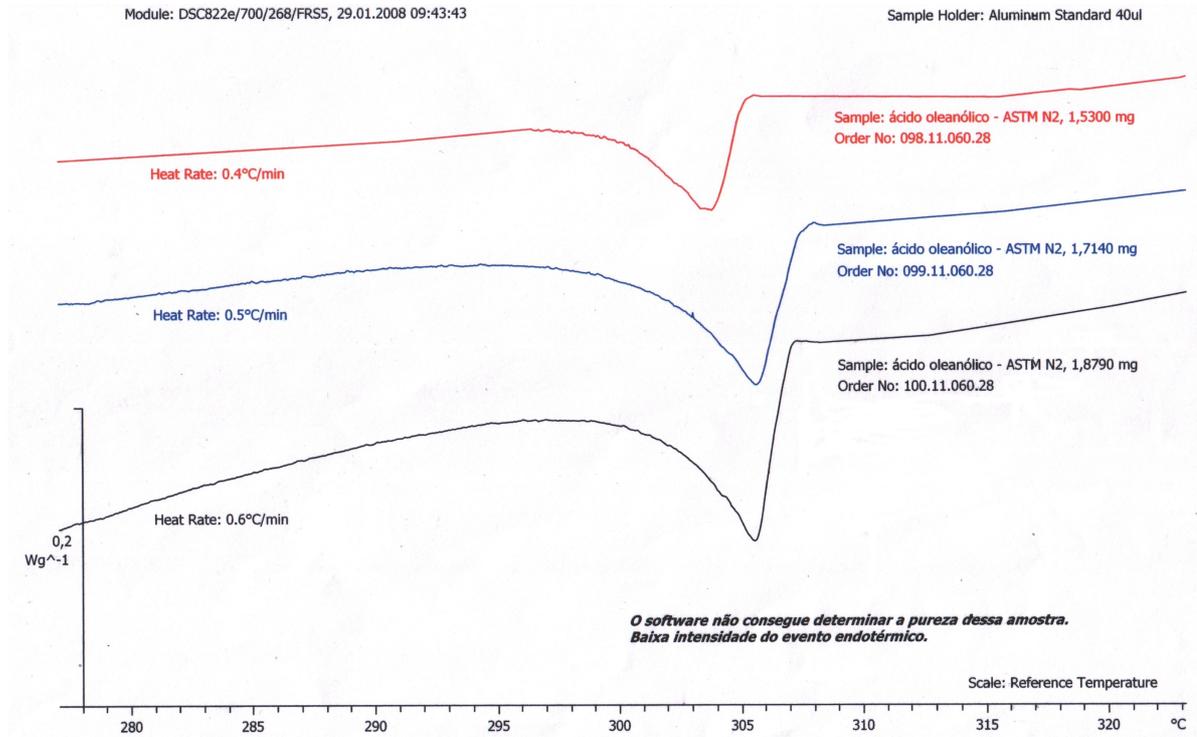
4.6.2.4. Ácido oleanólico

Figura 21 - Espectro de massas do oleanolato de metila sililado



(Tappin, 2012)

Figura 22 - Análise de CDE de ácido oleanólico



(Tappin, 2012)

4.6.3 Discussão

Os resultados de RMN-¹H e RMN-¹³C e CG-EM correspondem aos resultados encontrados na literatura para as referidas substâncias (Razborsek et al., 2008) (Pereira, 1998).

A análise de pureza por CDE apresentou resultados variados, que estão mostrados na **Tabela 7**.

Tabela 7 – Purezas das diferentes amostras analisadas por CDE.

Amostra	Pureza
7-desacetóxi-7-oxogedunina	97,1%mol +/- 0,5 %mol
Ácido oleanólico	-
Ácido ursólico	99,1 %mol +/- 0,4 %mol

O melhor resultado foi apresentado pelo ácido ursólico, que se revelou suficiente para a certificação, aproximando-se bastante do esperado em uma análise de certificação por CDE. O resultado obtido por esta técnica mostra uma linha de base clara, com um sinal intenso em forma triangular e pouca depressão da temperatura de fusão. Tendo como base estes resultados é possível se calcular, para o ácido ursólico, que a massa necessária para a certificação completa será próxima a 452 mg, considerando uma massa de cada análise para CDE de cerca de 1,6 mg. Através da mesma estimativa, ainda é possível calcular que, para uma certificação em um único frasco, a massa necessária está por volta de 281 mg.

É interessante notar que a pureza especificada pelo fabricante do ácido ursólico é de >90%. Apesar de a pureza medida ser bem superior ao valor mínimo declarado, o fabricante não se compromete com a constância deste valor, podendo outro lote ser de pureza inferior, já que o fabricante só delimita o valor mínimo de pureza. O caso desta amostra ilustra bem a situação das substâncias de referência para plantas medicinais e medicamentos fitoterápicos. Para estes, muitas vezes a pureza é determinada por métodos não adequados, principalmente métodos cromatográficos, e/ou não há nenhuma declaração de sua incerteza ou rastreabilidade ao S.I., o que, na prática, os inviabiliza como material de referência.

O 7-desacetóxi-7-oxogedunina não apresenta a pureza mínima para a medida da pureza por CDE. O pico do sinal é curvo e a depressão da temperatura de fusão é alta. Por outro lado o resultado da análise de RMN de próton mostrou um espectro bem limpo com uma razão sinal/ruído alta. Apesar deste ser um espectro qualitativo,

este resultado sugere que a medida da pureza desta substância por RMNHq é possível e, portanto, a certificação por esta técnica é viável.

O ácido oleanólico apresenta uma linha da base razoável e um sinal triangular. No entanto, o sinal é muito pouco intenso; o que pode indicar a exigência de se utilizar uma massa maior na análise. A análise será repetida com uma massa maior.

As duas amostras isoladas de 6 α -acetoxigedunina não tiveram tempo hábil de serem analisadas por CDE. No entanto a inspeção dos cromatogramas destas amostras, apresentados no próximo capítulo (figuras 90 e 91; tabela 32), comparando com os resultados da amostra 7-desacetóxi-7-oxogedunina (figura 84; tabela 29) indica que as primeiras são mais impuras. No entanto a análise dos resultados do espectro de RMN de próton mostra uma razão sinal/ruído alta o que indica ser possível a medida da pureza destas amostras por RMNHq.

Com relação ao protocolo de certificação estes resultados ilustram bem o tipo de situação que se espera nesta etapa. A análise por CDE foi escolhida por ser mais simples em termos práticos e necessitar de menos amostra. No entanto, levando-se em conta apenas as purezas, somente o ácido ursólico poderia ser certificado por esta técnica. Por outro lado os resultados de RMN qualitativos são um bom indicativo da viabilidade do uso do RMNHq para a certificação dos tetranortriterpenoides. O objetivo dos estudos de otimização e viabilidade é justamente este, de coletar informações preliminares sobre a natureza e pureza da amostra e permitir delinear estratégias para a certificação.

5. ISOLAMENTO DE TETRANORTRITERPENOIDES DE *Carapa guianensis*

5.1 PREÂMBULO

Já foi apresentada a importância terapêutica dos extratos derivados de *C. guianensis* e dos tetranortriterpenoides presentes nesta espécie. O isolamento destes últimos visando sua certificação é um passo importante no controle da qualidade de óleo de andiroba, vela de andiroba e outros produtos que venham a ser desenvolvidos com base na espécie *C. guianensis*.

O isolamento também ilustra, na prática, a dificuldade de se obter as substâncias para a certificação com a pureza e massa mínimas necessárias, como já discutido no capítulo 4.

O processo de isolamento em si é dividido em seis etapas separadas discriminadas no **Quadro 4**. Da primeira a quarta etapa o objetivo foi a obtenção de uma fração mais pura de tetranortriterpenoides. As últimas duas etapas tem por objetivo a separação entre si dos dois principais tetranortriterpenoides: 7-desacetoxi-7-oxogedunina e 6 α -acetoxigedunina. Todas as etapas foram desenvolvidas de forma que seu aumento de escala fosse realizado da forma mais simples possível.

Para acompanhamento das etapas de isolamento dois métodos analíticos foram desenvolvidos, um por cromatografia em fase gasosa e outro por cromatografia líquida de alta eficiência.

Quadro 4 - Etapas do procedimento de isolamento de tetranortriterpenoides.

Etapas	Objetivo
Extração das sementes Extração das sementes por Soxhlet.	Obter precipitado com tetranortriterpenoides (PP).
Partição líquido-líquido Partição do PP em sistema de solventes. (n-heptano : 2-propanol : água)	Retirar resíduo de glicérido de PP (PPsG).
Extração em fase sólida Extração em fase sólida utilizando sílica com fase sólida.	Obter uma fração concentrada de tetranortriterpenoides a partir de PPsG (SPF2).
Precipitação Tratamento do PPsG com CH ₃ OH para obtenção de uma fração rica em tetranortriterpenoides tetranortriterpenoides.	Obter uma fração rica nos tetranortriterpenoides 7-desacetoxi-7-oxogedunina, 6 α -acetoxigedunina e Gedunina a partir de SPF2. (PPTn)
Coluna Coluna de fase reversa em C-18 utilizando acetonitrila, metanol e água como FM.	Isolar 7-desacetoxi-7-oxogedunina(7-oxo) e 6 α -acetoxigedunina (6 α) partir de PPTn
Precipitação / Purificação Tratamento das frações com MeOH.	Enriquecer as frações de isolados de 7-oxo e 6 α .

5.2 EXTRAÇÃO DAS SEMENTES DE *Carapa guianensis*

5.2.1 Metodologia

5.2.1.1 Coleta das sementes.

As sementes de *C. guianensis* Aubl. foram coletadas no Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, pela equipe da Plataforma Agroecológica de Fitomedicamentos de Farmanguinhos, Fiocruz. Foram coletados frutos já caídos das árvores, selecionando-se aqueles que estavam em melhores condições. Os frutos foram abertos no local de coleta para a retirada das sementes, que foram enviadas para o laboratório. Estas foram descascadas ainda frescas, e a polpas foi trituradas.

5.2.1.2 Extração preliminar das sementes

Porções trituradas de polpa fresca foram extraídas por aparelho de Soxhlet, utilizando n-hexano como solvente de extração. As amostras foram extraídas durante 8 horas e, em seguida, deixadas em repouso à temperatura ambiente por 12 horas, período após o qual forma-se um precipitado no fundo do balão, que foi separado e analisado por cromatografia em fase gasosa. O método de análise destas amostras está resumido no **Quadro 5**.

Quadro 5 - Método de análise por CG-DIC

Coluna	Modelo DB-5ht; comprimento de 30 m; diâmetro interno de 250 µm; espessura de filme de 0,25 µm. Marca Agilent Technologies.
Programação do forno	Temperatura inicial de 150 °C; isoterma de 2 min; taxa de aquecimento de 10 °C/min; temperatura final de 400 °C; isoterma final de 5 minutos.
Fluxo	2 ml/min de hélio.
Modo de injeção	Split de 1:10 a 300 °C
Deteção	Ionização em chama
Equipamento	Agilent modelo 6890

5.2.1.3 Otimização da extração

O procedimento de extração das polpas das sementes pelo aparelho de Soxhlet foi otimizado por um planejamento fatorial fracionário $2^{(4-1)}$. As variáveis analisadas foram: volume de solvente (ml), número de refluxos, massas de algodão utilizado como suporte para a amostra e a massa da amostra. Os efeitos avaliados foram: a massa de precipitado, o rendimento em massa do precipitado, e o teor de

cada tetranortriterpenoides. O **Quadro 6** resume os experimentos realizados.

Quadro 6 - Planejamento fatorial da extração por Soxhlet.

Experimento	Volume do Solvente (ml)	Refluxos	Massa algodão (g)	Massa amostra (g)
2	300	20	500	25
7	150	40	1000	10
4	300	40	500	10
6	300	20	1000	10
5	150	20	1000	25
1	150	20	500	10
8	300	40	1000	25
3	150	40	500	25

Para a quantificação dos tetranortriterpenoides foi elaborada uma curva de calibração de 7-desacetoxi-7-oxogedunina previamente isolada e purificada de bagaço das sementes de andiroba (trabalho anterior), dentro do intervalo de 5 a 200 µg/ml. Para tanto, foi preparada uma solução-mãe de cerca de 500 µg/ml pesando-se cerca de 5 mg em um balão de 10 ml. Cada solução foi preparada segundo o **Quadro 7** e cada concentração foi injetada no método descrito no **Quadro 5** com quatro repetições.

Quadro 7 - Preparo das soluções de 7-desacetoxi-7-oxogedunina.

Concentração (µg/ml)	Diluição
200	2 ml da solução mãe em um balão de 5 ml
150	3 ml da solução mãe em um balão de 10 ml
100	1 ml da solução mãe em um balão de 5 ml
50	1 ml da solução mãe em um balão de 10 ml
5	1 ml da solução de 50 µg/ml em um balão de 10 ml

5.2.1.4 Extração das sementes

Foram realizadas ao todo 9 extrações das sementes por Soxhlet, utilizando-se as condições determinadas na otimização. Utilizou-se um balão de 2000 ml, com a câmara de extração montada contendo aproximadamente 12 g de algodão no fundo, sobre o qual foram adicionados cerca de 600 g de polpa triturada. Com o balão já acoplado, adicionou-se o hexano e o sistema foi levado à temperatura de refluxo. Este volume foi medido e mais hexano foi adicionado ao balão, até completar 75 % do seu volume total. Foram realizados 20 refluxos para o primeiro e segundo dia da extração 1; nos demais, foram 15 refluxos. Para tentar determinar o esgotamento da

amostra, a primeira extração foi repetida por 7 dias e a massa de precipitado medida e as demais extrações ocorreram no período de apenas 3 dias. A cada dia, o solvente foi retirado do balão, medido e repassado para outro balão, onde o volume foi completado para 1500 ml. Os precipitados foram analisados por CG-DIC.

5.2.1.5 *Reunião dos precipitados de todas as extrações*

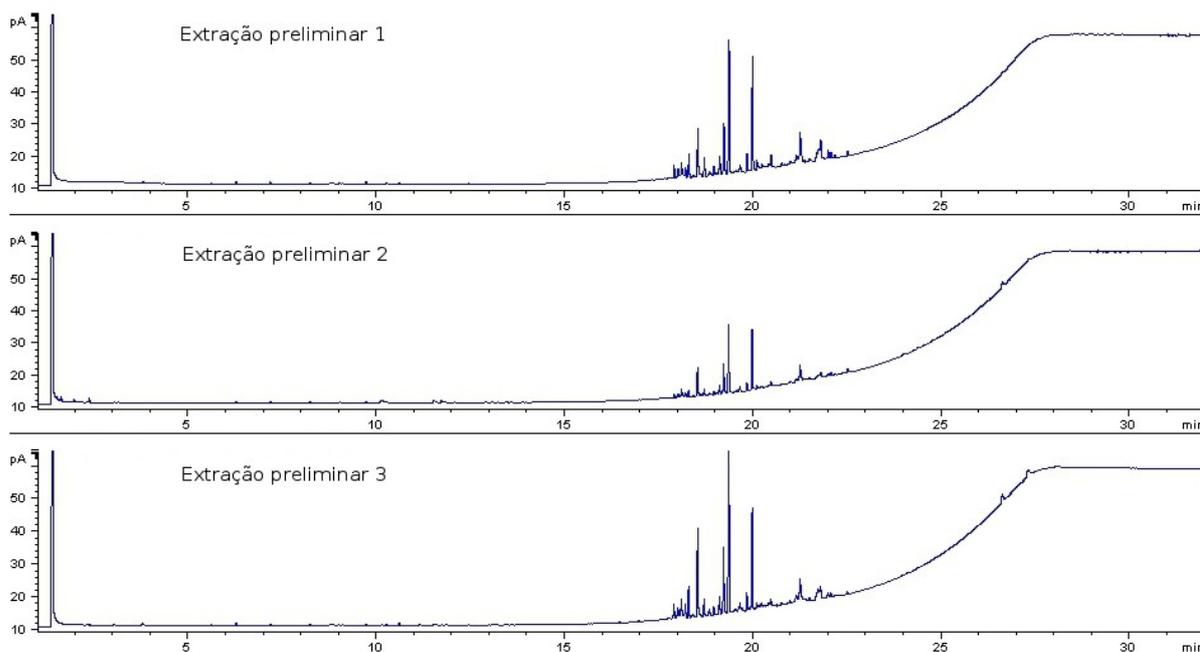
Os extratos das diversas extrações realizadas foram reunidos para obtenção de material para a etapa de purificação. Cada extrato foi dissolvido em CH_2Cl_2 e transferido para um balão tarado. Após a remoção do solvente em um evaporador rotatório, o material foi raspado, transferido para um frasco apropriado e então liofilizado para a remoção completa de resíduos de solventes. Uma vez seco, o extrato foi triturado em um almofariz e transferido para seu frasco final, sob o rótulo de PP.

5.2.2 Resultados

5.2.2.1 Extração preliminar de sementes

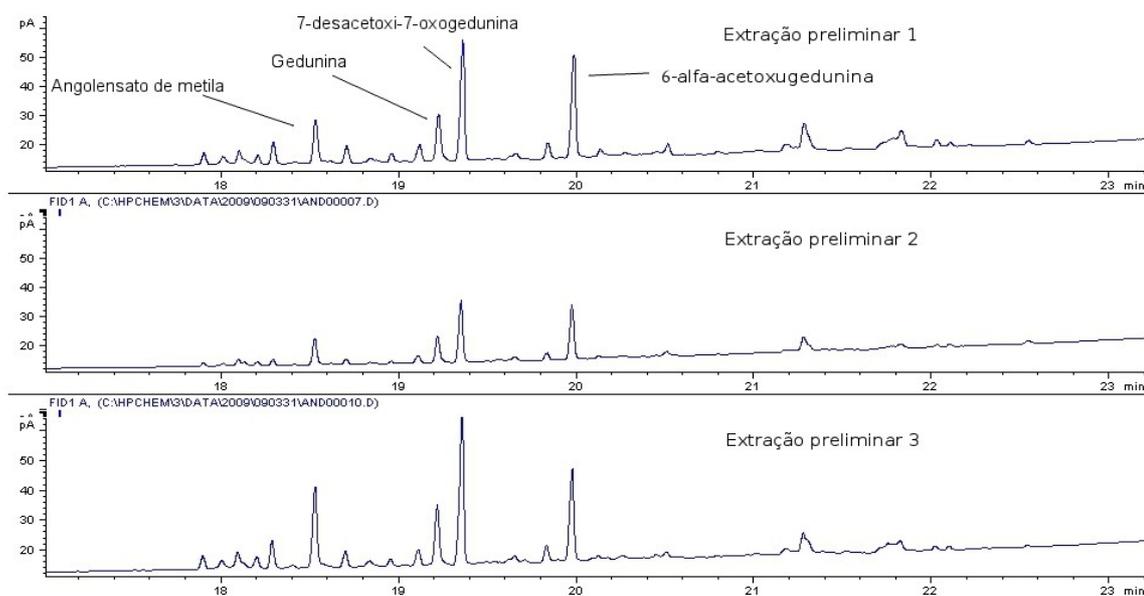
Foram realizadas ao todo três extrações, os resultados estão apresentados nas **Figuras 23 e 24**.

Figura 23 - Precipitados da extração de polpa de sementes de *Carapa guianensis*



(Tappin, 2012)

Figura 24 - Aproximação dos cromatogramas dos precipitados

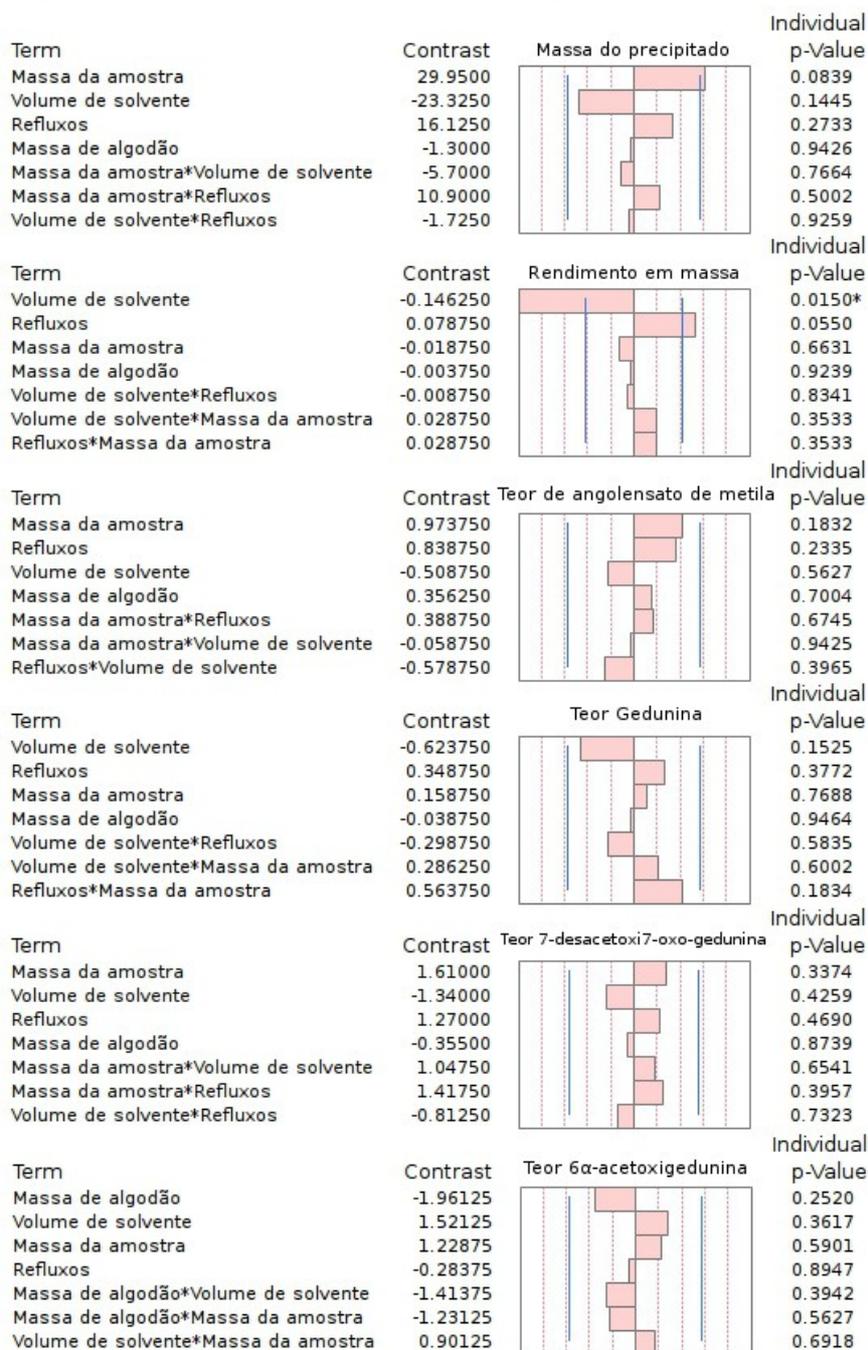


(Tappin, 2012)

5.2.2.2 Otimização do processo de extração

Os resultados da extração estão apresentados na **Figura 25**.

Figura 25 - Resultado da otimização da extração.



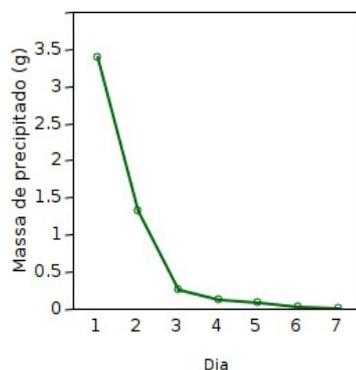
(Tappin, 2012)

Não houve variáveis significativas para o teor dos tetranortriterpenoides individuais. Quanto à massa de precipitado, apenas a massa da amostra se mostrou marginalmente significativa. Já o rendimento em massa apresentou o volume de solvente significativo e o número de refluxos marginalmente significativos.

5.2.2.3 Extração de sementes

A **Figura 26** mostra o decaimento da massa de precipitado conforme o tempo de extração (dias).

Figura 26 - Gráfico de massa de precipitado x tempo.



(Tappin, 2012)

A **Tabela 8** mostra os rendimentos das extrações individuais.

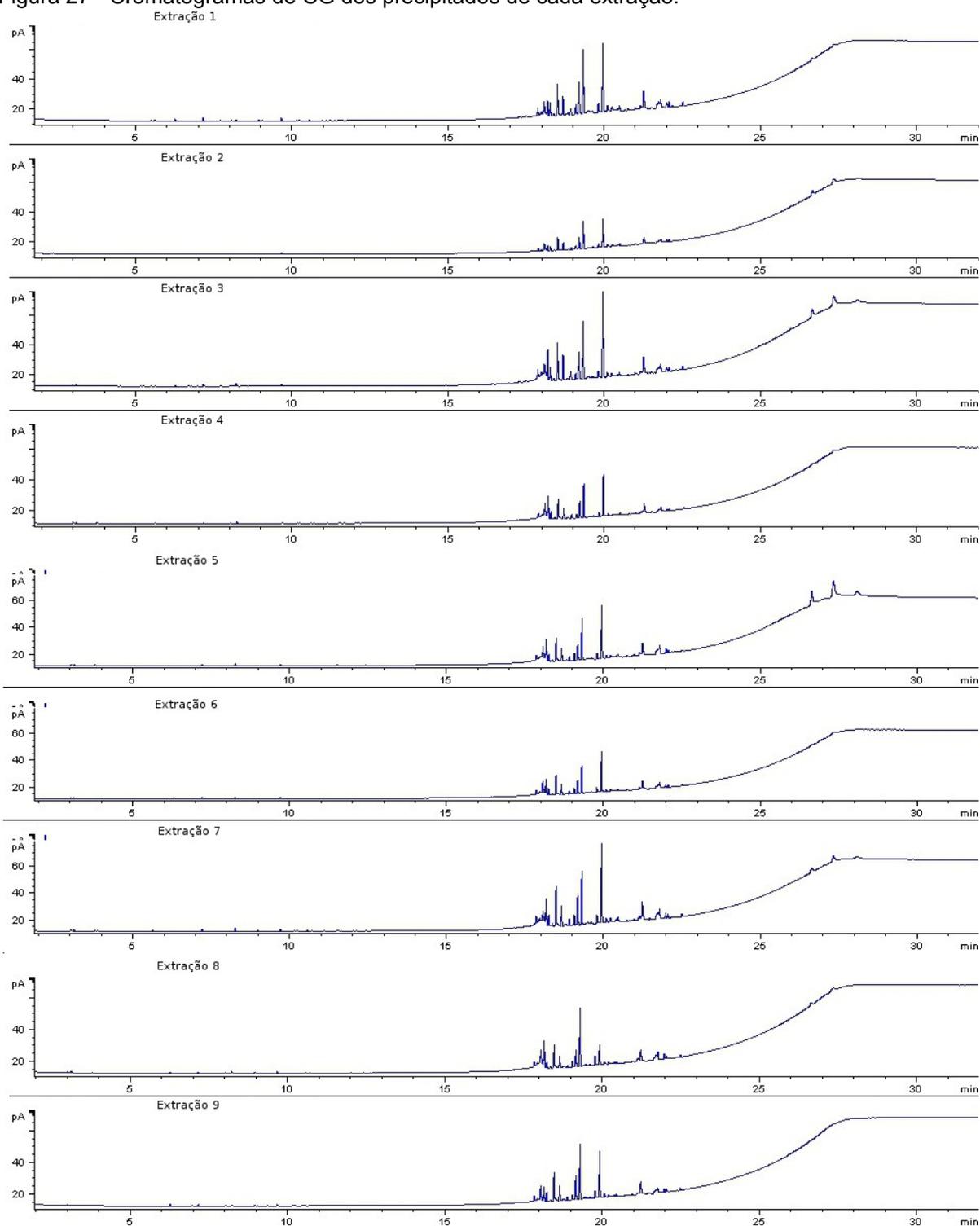
Tabela 8 - Massa e rendimento das extrações

Extração	Massa de precipitado obtida (g)	Rendimento (%)
1	5,31	0,89
2	4,11	0,69
3	6,32	1,05
4	4,02	0,67
5	-**	-
6	5,67	0,95
7	6,30	1,05
8	5,17	0,86
9	3,13	0,52

** Valor extraviado.

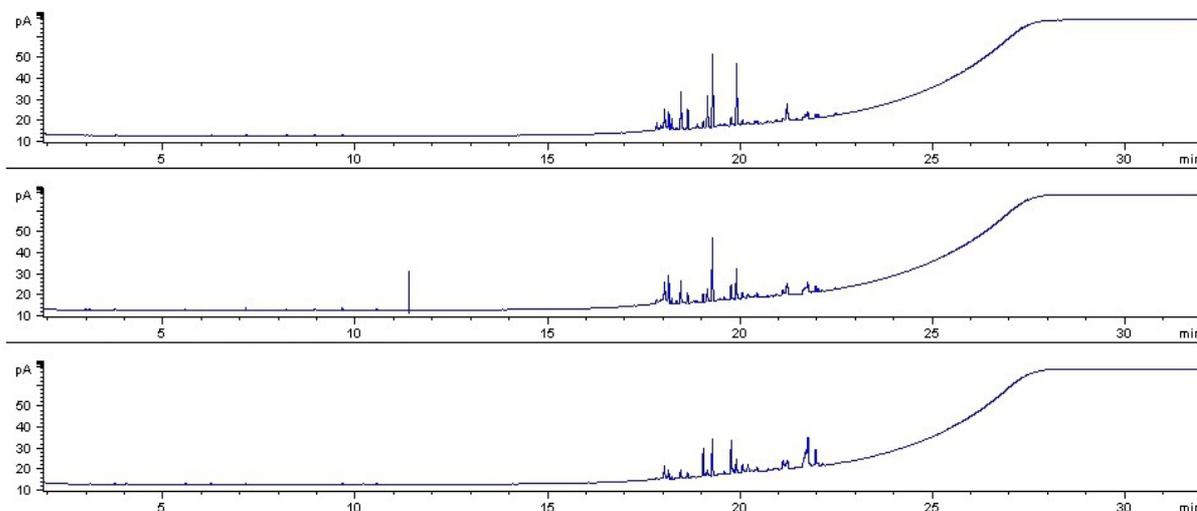
A **Figura 27** mostra os cromatogramas dos precipitados de cada extração. A **Figura 28** apresenta os cromatogramas dos precipitados de cada dia da extração 9.

Figura 27 - Cromatogramas de CG dos precipitados de cada extração.



(Tappin, 2012)

Figura 28 - Cromatogramas dos precipitados de cada dia da extração 9.

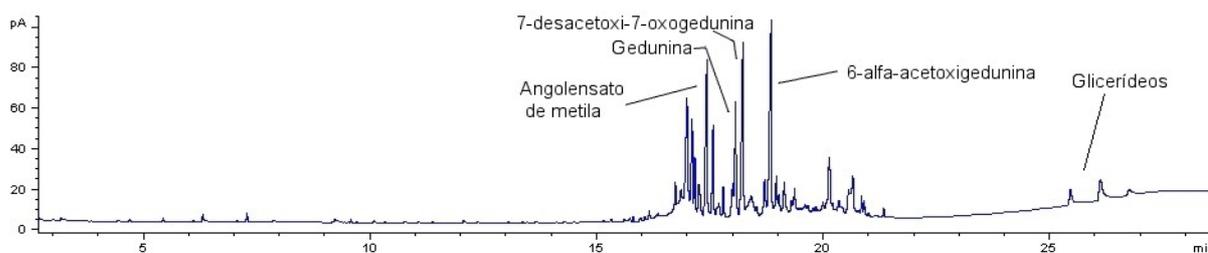


(Tappin, 2012)

5.2.2.4 Reunião dos precipitados de todas as extrações

A massa final de extrato reunido foi de 45,49 g. O cromatograma desta amostra, denominada PP, está apresentado na **Figura 29**, com indicação dos tetranortriterpenoides.

Figura 29 - Cromatograma da amostra PP.



(Tappin, 2012)

5.2.3 Discussão

5.2.3.1 Extração preliminar das sementes

As extrações foram realizadas segundo o método apresentado por Pereira (1998), no qual um precipitado foi obtido após extração de bagaço (resíduo de sementes maceradas, após extração do óleo) de andiroba por Soxhlet, utilizando n-hexano como solvente. Este precipitado apresentou uma quantidade importante de tetranortriterpenóides. Foram realizados experimentos iniciais para avaliar a capacidade desta extração em fornecer um precipitado similar a partir da polpa de

sementes de *C. guianensis*. Assim, como no experimento de Pereira, ocorreu a formação de um precipitado após o resfriamento do sistema. As **Figuras 23 e 24** mostram os cromatogramas (CG) resultantes destas extrações com a presença de tetranortriterpenoides.

5.2.3.2 Otimização do processo de extração

Um planejamento fatorial foi realizado para determinar os parâmetros importantes nesta extração. Os resultados, apresentados na **Figura 25**, indicaram que somente a *massa de polpa de sementes* e o *volume de solvente utilizado* foram significativos. A significância da *massa de polpa de sementes* extraída já é uma influência obviamente esperada, considerando que quanto maior a massa utilizada, maior a massa de precipitado final. Por outro lado, o volume utilizado na extração é significativo, pois, após a extração, com o resfriamento do sistema, ocorre a precipitação. Então, quanto menor for o volume de n-hexano, maior será a formação de precipitado. Disso decorre que seria recomendável utilizar o menor volume de solvente possível; no entanto, esse volume deve levar em consideração a quantidade necessária para preencher o compartimento onde está a amostra, além de um volume residual para proteger a amostra que já se encontra no balão de eventual degradação por exposição ao ar e/ou calor.

5.2.3.3 Extração de sementes

As extrações com aumento de escala foram realizadas com base no planejamento feito para a extração. Foi medida a maior massa possível de se acomodar, usando-se o maior sistema de extração por Soxhlet disponível. Os demais parâmetros da extração foram calculados a partir dele, utilizando-se a condição do planejamento que combinava a maior massa de extrato com o menor volume de solvente.

Na extração 1 verificou-se que, após três dias de extração, não ocorreu aumento significativo na massa do precipitado, conforme indicado no gráfico da **Figura 26**. A **Tabela 8** mostra que o rendimento das extrações variou de 0,5 a 1,0%, uma variação que pode ser considerada alta. Apesar disso, a **Figura 27** demonstra a consistência nos perfis das diferentes extrações. A **Figura 28** mostra, com os resultados da extração 9, que houve uma variação pequena do perfil cromatográfico, nos três dias de extração. Estes resultados demonstram o estabelecimento

satisfatório para o processo de extração ao fornecer, em média, 0,84% de rendimento de sólido precipitado.

5.2.3.4 Reunião dos precipitados de todas as extrações

A **Figura 29** mostra o perfil cromatográfico final do extrato reunido com a indicação dos tetranortriterpenoides presentes e dos glicerídeos. Foram obtidos 45,5 g para as próximas etapas.

5.2.4 Conclusão e desdobramentos da extração das sementes

Um protocolo de extração de tetranortriterpenoides a partir de polpa de sementes foi desenvolvido. Dois desdobramentos deste estudo de extração devem ser enfatizados: (i) a investigação mais aprofundada do processo para determinar a origem da variação do rendimento; e (ii) a possibilidade de substituição de n-hexano por n-heptano no processo de extração. De acordo com o ICH (ISO, 2006), o n-heptano é classificado como um solvente menos tóxico quando comparado com o n-hexano. A utilização de n-heptano, neste caso, aproxima-se dos preceitos da ‘química verde’.

5.3 PARTIÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO DE PP

5.3.1 Metodologia

5.3.1.1 Testes em diferentes sistemas de solventes

Uma série de sistemas de partição tradicionalmente utilizados em cromatografia em contracorrente foi avaliada para determinar sua capacidade de separar ou purificar os tetranortriterpenoides em PP. Os sistemas foram descritos por Foucault (1995) e incluem diagramas de fase para cada sistema de solventes, delimitando as proporções onde eles apresentam duas fases. Os sistemas foram escolhidos utilizando-se dois critérios: (i) que a proporção de solventes 1:1:1 estivesse na região bifásica; e (ii) que os solventes pertencessem à Classe 3 na classificação para solventes residuais do guia “*Impurities: guidelines for residual solvents*” do ICH (2009). Foram encontrados 8 sistemas que se enquadravam nestes critérios, os quais estão apresentados no **Quadro 8**. Cada sistema é constituído de três solventes – um de natureza apolar, outro de natureza polar e um terceiro, com polaridade intermediária, denominado ‘solvente ponte’.

Quadro 8 - Sistemas de solvente utilizados nos testes de partição

Sistema	Solvente apolar	Solvente ponte	Solvente polar
1	acetato de etila	2-butanol	água
2	n-heptano	2-propanol	água
3	acetato de etila	Acetona	água
4	éter etílico	Acetona	água
5	n-heptano	Acetona	água
6	n-heptano	1-butanol	água
7	acetato de etila	1-butanol	água
8	n-heptano	metil-etil-cetona	agua

Para todos os sistemas, a partição foi realizada da seguinte forma: Aproximadamente 12 mg de PP e 6 ml do solvente ponte foram adicionados em um frasco Erlenmeyer de 50 ml e a mistura foi homogeneizada por agitação. Em seguida, ainda sob agitação, o mesmo volume do solvente apolar foi adicionado, seguido então de 6 ml do solvente polar. O Erlenmeyer foi preso ao agitador, conforme descrito no **Quadro 9**, e então agitado por 30 minutos a 80 rpm. Ao final deste período, as fases foram separadas, colocadas em frascos tarados e deixadas evaporar à temperatura ambiente. As frações foram analisadas por CG-DIC.

Quadro 9: Equipamento de agitação

Equipamento
Agitador marca Ika, modelo KC 130 basic, Staufen, Alemanha.

5.3.1.2 Otimização do sistema n-heptano/2-propanol/água

O emprego do sistema n-heptano/2-propanol/água foi otimizado de duas formas. Primeiro em relação à proporção de cada solvente e, depois, em relação aos parâmetros da partição. Nos dois casos foi utilizado o planejamento experimental estatístico. A otimização da proporção de cada solvente foi realizada com base no diagrama de fase estabelecido por Foucault (1995) para este sistema. A **Figura 30** apresenta a região onde a mistura de solventes é bifásica e linhas de ligação que representam diferentes proporções deste sistema que resultam em partições equivalentes.

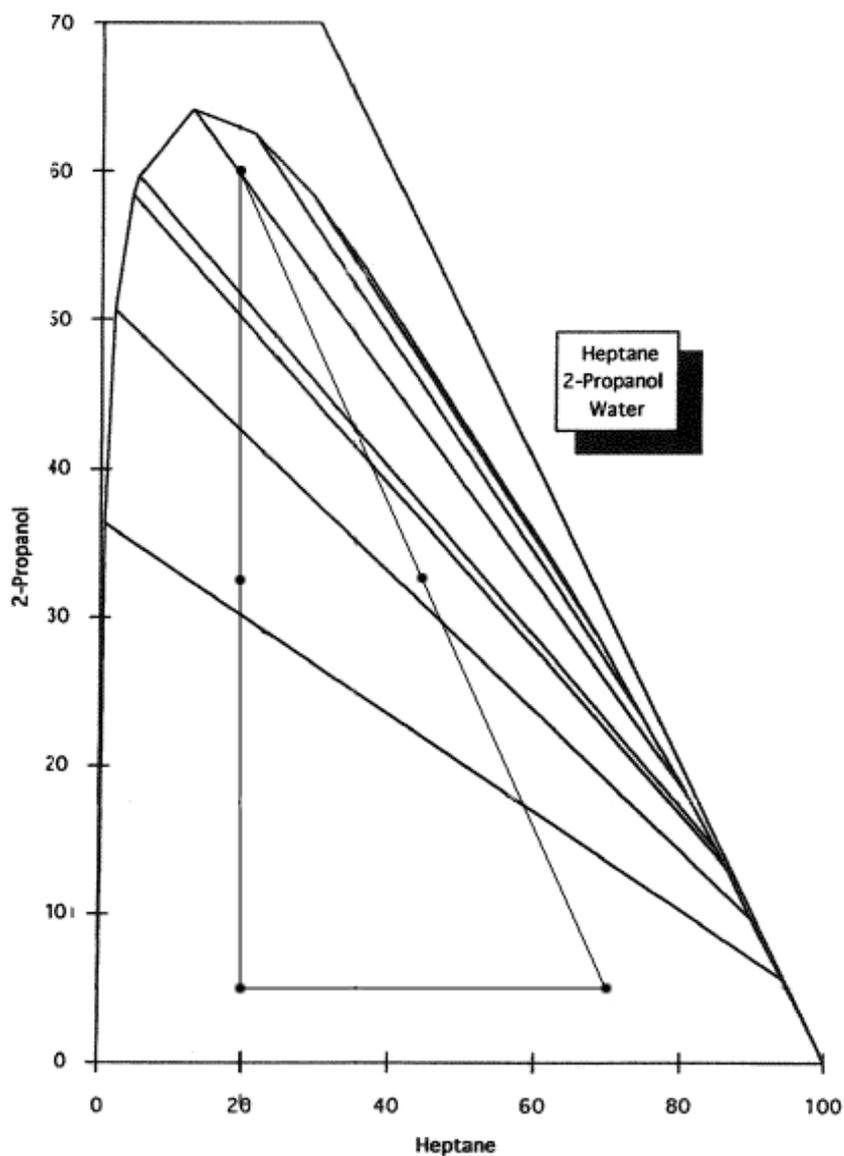
Para verificar melhor a partição dos glicerídeos e tetranortriterpenoides contidos em PP, foi realizado um planejamento experimental de mistura cobrindo a região bifásica segundo o diagrama. As proporções utilizadas estão mostradas no

Quadro 10.

Quadro 10 - Proporções dos sistemas estudados.

Sistema	n-heptano (%)	2-propanol (%)	água (%)
1	75	5	20
2	20	60	20
3	20	5	75
4	47,5	32,5	20
5	47,5	5	47,5
6	20	32,5	47,5

Figura 30 - Diagrama de fase do sistema de solventes n-heptano/2-propanol/água.



(Foucault, 1994)

A **Figura 30** também apresenta o diagrama com os pontos analisados. O planejamento foi estabelecido utilizando o software JMP versão 8.0.2 (SAS Institute, Cary, USA). Cada experimento do desenho foi realizado da seguinte forma: cerca de 10 mg de CGPP foram pesados em um frasco Erlenmeyer de 50 ml. Os solventes foram adicionados na seguinte ordem: solvente ponte, o solvente apolar e por fim o solvente polar, com o frasco sendo agitado após cada adição. Todos os 6 sistemas foram agitados concomitantemente a 80 rpm por 30 minutos. Após o repouso do sistema e separação das fases, estas foram transferidas para frascos separados tarados e secas à temperatura ambiente. Na etapa final, quando restava apenas água como resíduo, as amostras foram liofilizadas. Cada amostra foi pesada, dissolvida em CH₂Cl₂ e transferida para um balão volumétrico, sendo analisadas por CG-DIC. As áreas dos tetranortriterpenoides e dos glicerídeos foram medidas nos cromatogramas da fase superior e inferior. As áreas dos glicerídeos foram somadas assim como as áreas dos tetranortriterpenoides, então foi calculada a seguinte razão para o cromatograma da fase superior e utilizada como resposta no planejamento.

$$\text{Resposta fase superior} = \frac{\text{Soma das áreas do glicerídeos}}{\text{Soma das áreas dos tetranortriterpenoides}}$$

A razão inversa foi calculada para a fase inferior e também foi utilizada como resposta do planejamento.

De posse da composição ótima do sistema de solventes, foi realizado um planejamento experimental de composto central para otimizar os demais parâmetros de partição. As variáveis estudadas foram: (a) tempo de partição, (b) velocidade de rotação, e (c) a razão entre a massa de PP e o volume total do sistema de solventes. O **Quadro 11** resume os diferentes experimentos que foram realizados.

Quadro 11 - Experimentos realizados na otimização da partição.

Experimento	Tempo	Velocidade	Razão massa/volume
1	80	160	0,9
2	80	160	2,7
3	80	320	0,9
4	80	320	2,7
5	200	160	0,9
6	200	160	2,7
7	200	320	0,9
8	200	320	2,7
9	39	240	1,8
10	240	240	1,8
11	140	80	1,8
12	140	400	1,8
13	140	240	0,29
14	140	240	3,31
15	140	240	1,8
16	140	240	1,8
17	140	240	1,8
18	140	240	1,8

Cada experimento foi realizado da seguinte maneira: cerca de 10 mg de PP foram pesados em um frasco Erlenmeyer de 50 ml. Foram adicionados 18 ml de 2-propanol, 6 ml de n-heptano e 6 ml de água. Entre cada adição, o frasco foi agitado. Os experimentos foram agrupados segundo a velocidade de rotação. Após a retirada do agitador, as fases foram transferidas para frascos tarados e secos à temperatura ambiente. Após a evaporação dos solventes orgânicos as amostras foram submetidas ao liofilizador. Cada amostra foi pesada, dissolvida em CH_2Cl_2 e transferida para um balão volumétrico e, em seguida, foram analisadas por CG-DIC. As áreas dos glicerídeos foram medidas. A resposta do planejamento foi a soma total dos glicerídeos na fase superior.

5.3.1.3 Teste das condições otimizadas

A quantidade de 67,5 mg de CGPP foi pesada e transferida para um frasco Erlenmeyer de 50 ml. Foram então adicionados 18 ml de 2-propanol, 6 ml de n-heptano e 6 ml de água, agitando-se o frasco entre cada adição. Este foi então acoplado ao agitador e submetido a 320 rpm por 200 min. Após este período, as

fases foram separadas utilizando-se um funil de separação, transferidas para frascos tarados e evaporadas à temperatura ambiente. Em seguida, as amostras foram liofilizadas e alíquotas foram retiradas e analisadas por CG-DIC.

5.3.1.4 Aumento de escala da partição otimizada

Uma amostra com 675 mg de CGPP foi pesada e colocada em um frasco Erlenmeyer de 500 ml, onde se adicionaram 180 ml de propanol, 60 ml de n-heptano e 60 ml de água, nesta ordem. Entre cada adição o frasco foi agitado sendo, ao final, acoplado a um agitador e submetido a 320 rpm por 200 min. Após este período, o sistema foi transferido para um funil de separação e as duas fases separadas. O solvente foi evaporado em cada uma delas; ambas foram transferidas para frascos de liofilizador já tarados, para determinação da recuperação de massas, e subsequente análise por CG-DIC.

5.3.1.5 Aumento de escala utilizando linhas de ligação

Utilizando as linhas de ligação presentes no diagrama de Foucault, foram testadas outras proporções entre os solventes, visando avaliar a possibilidade de se aumentar a massa extraída de PP. Foram testadas três diferentes proporções, que estão apresentadas no **Quadro 12**.

Quadro 12 - Proporções do sistema n-heptano/2-propanol/água na linha de ligação do diagrama.

n-heptano (%)	2-propanol (%)	água (%)
34,2	50	15,8
49,3	40	10,7
63,7	30	6,3

As proporções foram preparadas para o volume final de 10 ml e o volume de cada fase foi medido. Três valores de razão massa/volume foram testados com partição, utilizando a proporção de n-heptano/2-propanol/água 34,2:50,0:15,8 : 2,25; 4,5; 9. A massa de cada razão foi de 67,1 mg, 134,8 mg e 269,8 mg, respectivamente. Cada uma destas foi pesada em frascos Erlenmeyer de 50 ml e a proporção de solventes preparada para um volume de 30 ml. O frasco foi acoplado a um agitador e submetido a 320 rpm por 200 min. As fases foram separadas e os resíduos secos, pesados e analisados por CG-DIC. Para esta análise foi utilizado um método de CG-DIC otimizado. O **Quadro 13** descreve este método.

Quadro 13 - Método otimizado de CG-DIC para a amostra PP.

Coluna	Modelo DB-5ht; comprimento de 30 m; diâmetro interno de 250 µm; espessura de filme de 0,25 µm. Marca Agilent Technologies.
Programação do forno	Temperatura inicial de 150 °C; isoterma de 2 min; taxa de aquecimento de 5,75 °C/min; temperatura final de 400 °C; isoterma final de 5 minutos.
Fluxo	1,6 ml/min de hélio.
Modo de injeção	Split de 1:20 a 300 °C
Detecção	Ionização em chama

Dois testes utilizando a razão massa/volume de 9 foram realizados, utilizando o mesmo método descrito acima. O primeiro teste utilizou um frasco Erlenmeyer de 1000 ml contendo uma massa de 4,5 g de PP e o volume do sistema de solventes de 250 ml. O segundo teste utilizou um frasco de 2000 ml com cerca de 9,0 g de massa PP e volume do sistema de solventes de 1000 ml. A velocidade de rotação e o tempo de partição foram mantidos.

5.3.1.6 Obtenção de PP livre de glicerídeos

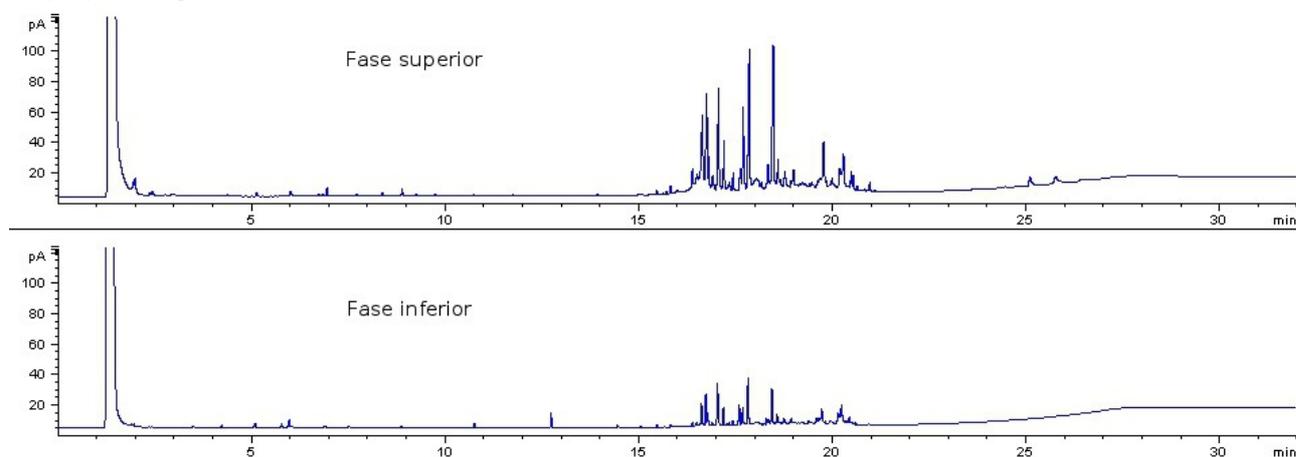
Para a obtenção de uma amostra de PP ausente de glicerídeos foram repetidos os dois experimentos do item anterior, cada um uma vez. As fases inferiores destes experimentos foram reunidas e denominada PPsG.

5.3.2 Resultados

5.3.2.1 Testes de sistemas de solventes

Entre os sistemas ternários de solventes para a partição líquido-líquido de PP, apenas o sistema n-heptano/2-propanol/água apresentou resultados promissores quanto à separação dos glicerídeos. Os demais sistemas não resultaram em partições relevantes. A **Figura 31** apresenta os cromatogramas das duas fases deste sistema.

Figura 31 - Cromatogramas das amostras resultantes das duas fases do sistema n-heptano/2-propanol/água.



(Tappin, 2012)

5.3.2.2 Otimização do sistema n-heptano/2-propanol/água

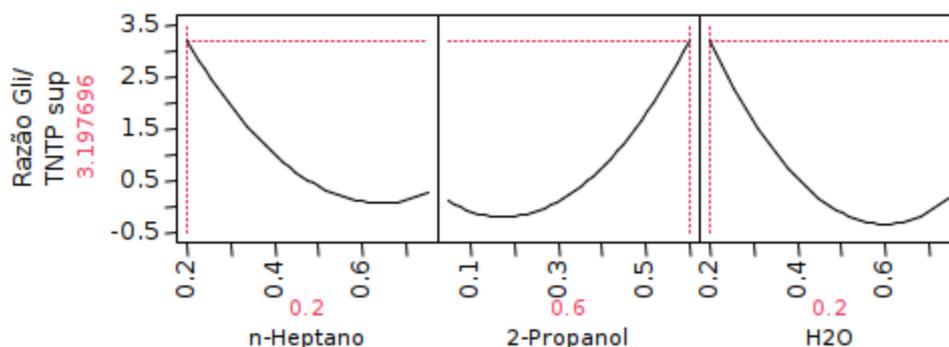
Os resultados referentes à otimização da proporção de n-heptano/2-propanol/água estão apresentados. A **Figura 32** mostra o gráfico de Pareto dos efeitos da composição do sistema, a **Figura 33** mostra o gráfico do modelo em função das variáveis, indicando as condições ótimas, e a **Figura 34** apresenta o gráfico de contorno indicando como varia a razão glicerídeos / tetranortriterpenoides na fase superior. A razão tetranortriterpenoides / glicerídeos na fase inferior não foi mostrada, pois não ocorreram glicerídeos na fase inferior.

Figura 32 - Gráfico de Pareto da composição do sistema

Term	Estimate	Relative Std Error	Pseudo t-Ratio	Pseudo p-Value
n-Heptano*H2O	72380.649	4.898979	2.13	0.1671
2-Propanol*H2O	43386.042	4.898979	1.28	0.3301
(H2O-0.2)/0.55	4913.6133	1	0.71	0.5524
n-Heptano*2-Propanol	21265.643	4.898979	0.63	0.5956
(2-Propanol-0.05)/0.55	238.98962	1	0.03	0.9757
(n-Heptano-0.2)/0.55	93.185275	1	0.01	0.9905

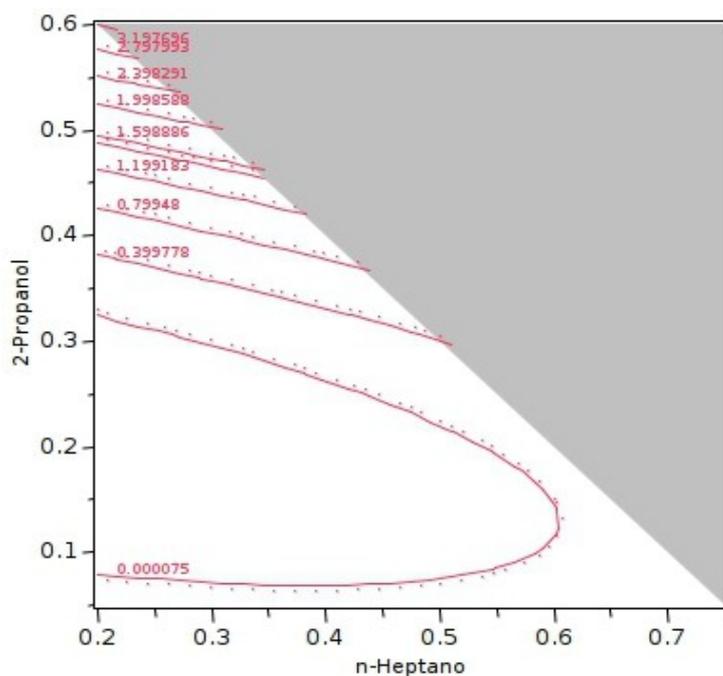
(Tappin, 2012)

Figura 33 - Gráfico do modelo em função das variáveis.



(Tappin, 2012)

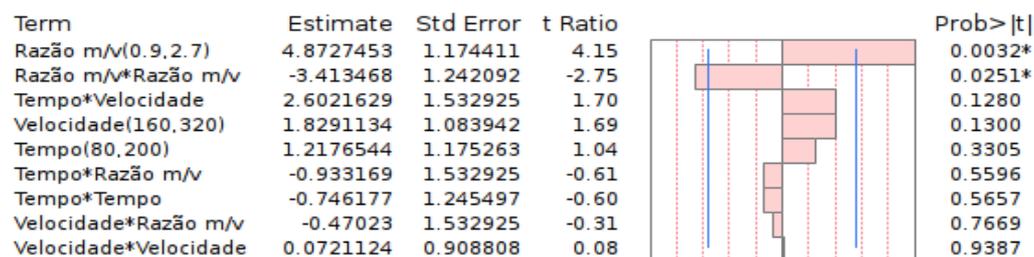
Figura 34 - Gráfico de superfície de resposta da razão glicerídeos/tetranortriterpenoides na fase superior



(Tappin, 2012)

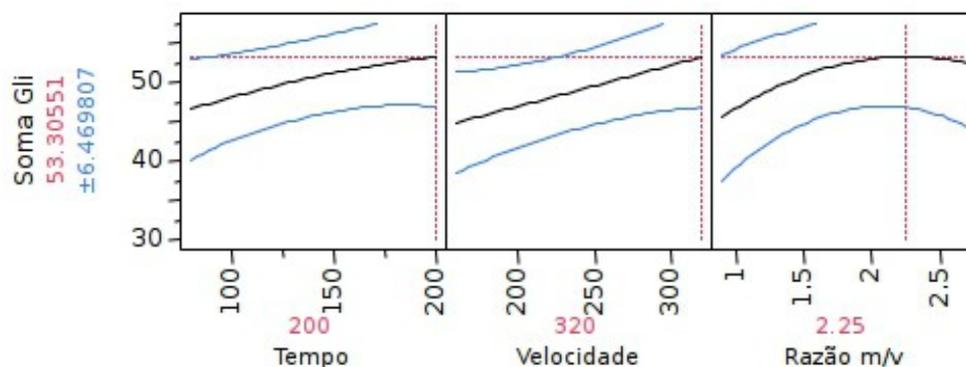
A **Figura 35** mostra o gráfico de Pareto da razão glicerídeos / tetranortriterpenoides na fase superior. A **Figura 36** mostra o gráfico do modelo em função das variáveis indicando as condições ótimas e a **Figura 37** mostra os gráficos de superfície de resposta.

Figura 35 - Gráfico de Pareto para a razão glicerídeos/tetranortriterpenoides na fase superior.



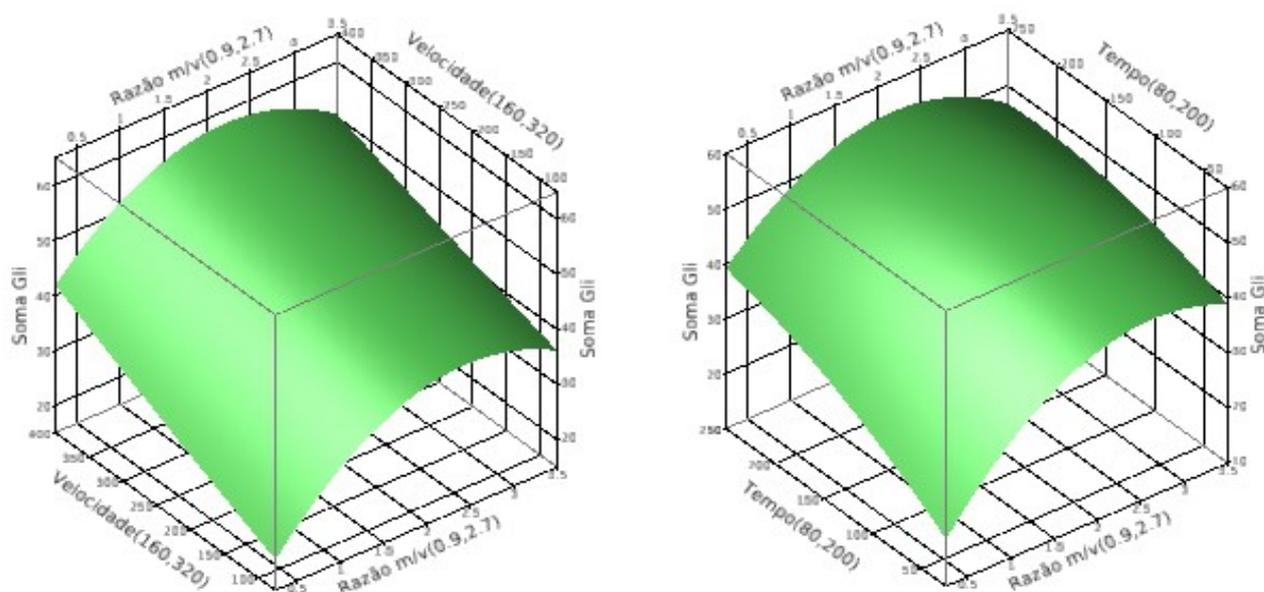
(Tappin, 2012)

Figura 36 - Gráfico do modelo em função das variáveis.



(Tappin, 2012)

Figura 37 - Gráficos de superfície de resposta da razão glicerídeos/tetranortriterpenoides na fase superior.

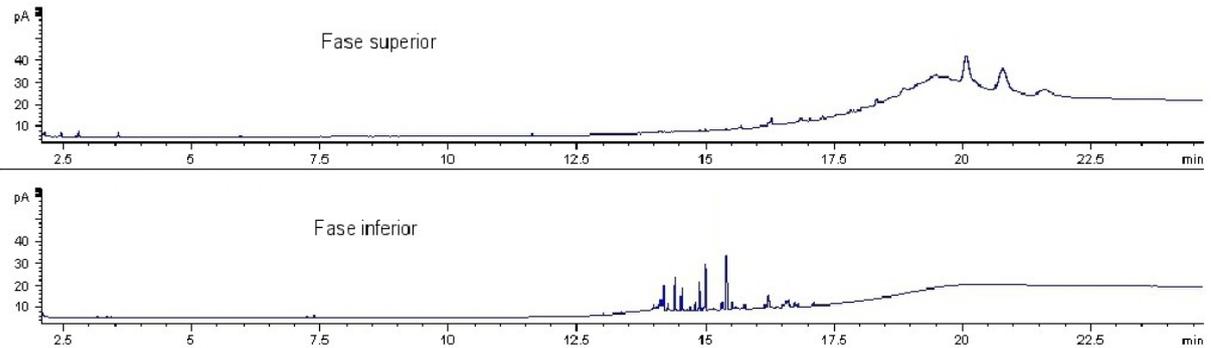


(Tappin, 2012)

5.3.2.3 Teste das condições otimizadas

A **Figura 38** mostra os cromatogramas das fases superior e inferior da partição líquido-líquido com o sistema de solventes n-heptano/2-propanol/água. O rendimento da fase inferior foi de 89,7% e da fase superior de 4,5%.

Figura 38 - Cromatogramas das fases superior e inferior obtidas pelas condições otimizadas

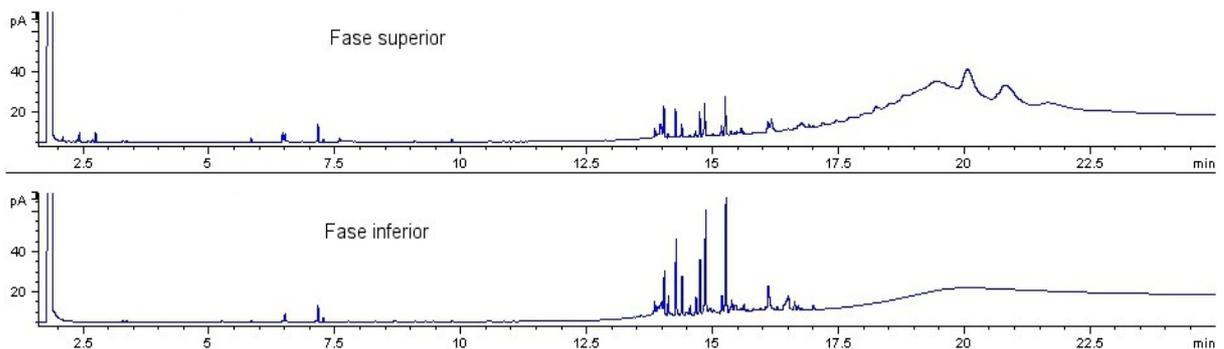


(Tappin, 2012)

5.3.2.4 Aumento de escala da condição otimizada

A **Figura 39** mostra os cromatogramas das fases superior e inferior da partição líquido-líquido com o sistema de solventes n-heptano/2-propanol/água com escala aumentada. O rendimento da fase inferior foi de 89,5% e da fase superior de 6,9%.

Figura 39 - Cromatogramas das fases superior e inferior com aumento de escala



(Tappin, 2012)

5.3.2.5 Aumento de escala utilizando linhas de ligação

O resultado da medição dos volumes das fases está apresentado na **Tabela 9**.

Tabela 9 - Volumes das fases nas três proporções estudadas.

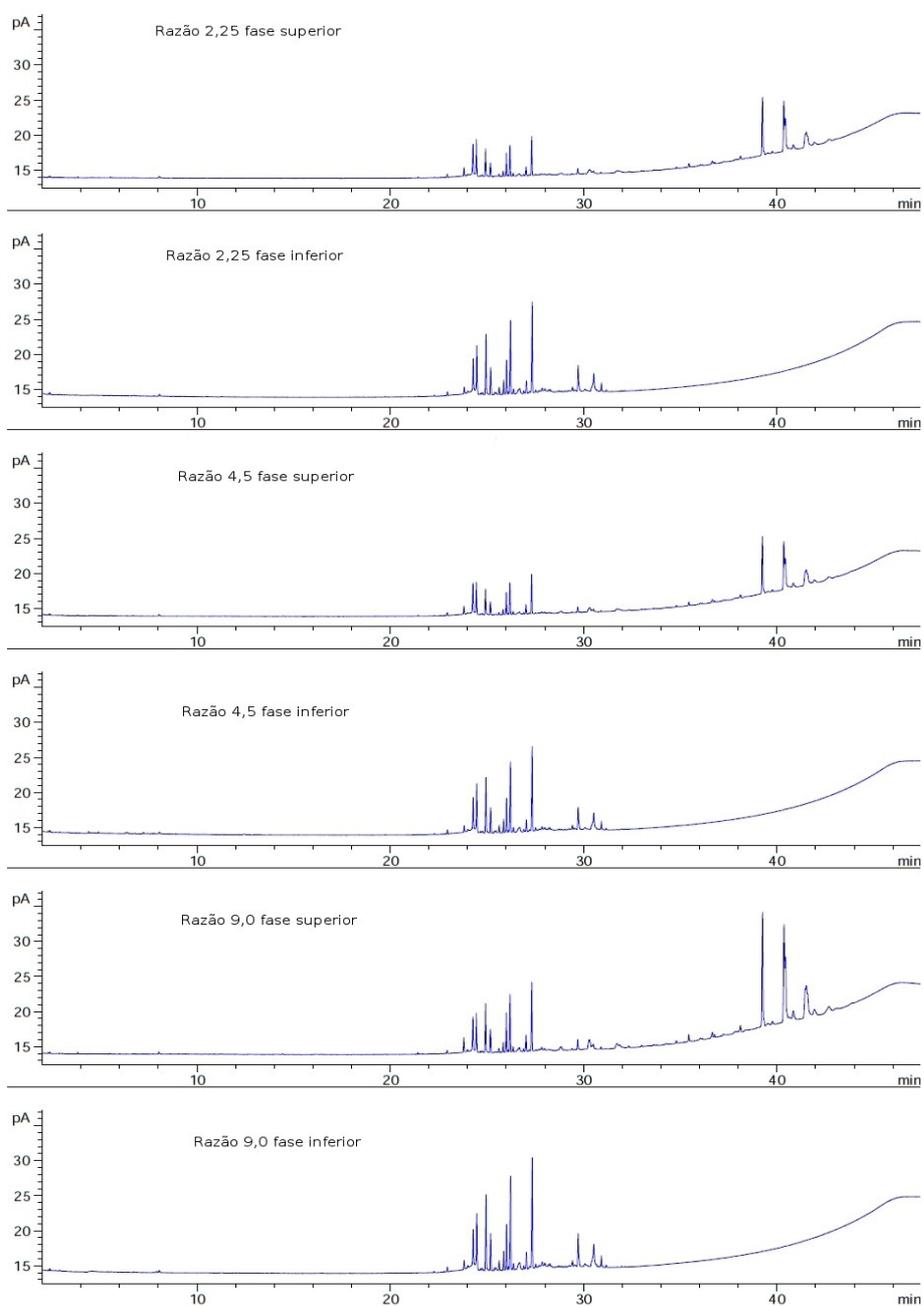
Sistema de solventes	Volume da fase superior	Volume da fase inferior
34,2 : 50,0 : 15,8	3,5 ml	6,5 ml
49,3 : 40,0 : 10,7	5,6 ml	4,4 ml
63,7 : 30,0 : 6,3	7,6 ml	2,4 ml
20,0 : 60,0 : 20,0	1,4 ml	8,6 ml

O resultado do teste das três razões massa/volume com a proporção de 34,2 : 50,0 : 15,8 está apresentado na **Figura 40** com os cromatogramas das fases superior e inferior das três razões testadas. O rendimento de cada uma das partições está apresentado na **Tabela 10**.

Tabela 10 - Rendimento dos testes na nova proporção.

Razão massa/volume	Rendimento fase superior	Rendimento fase inferior
2,25 mg/ml	10,3%	83,7%
4,5 mg/ml	11,3%	83,4%
9,0 g	8,6%	84,8%

Figura 40: Cromatogramas de CG das amostras produzidas nos experimentos de aumento de escala da partição.



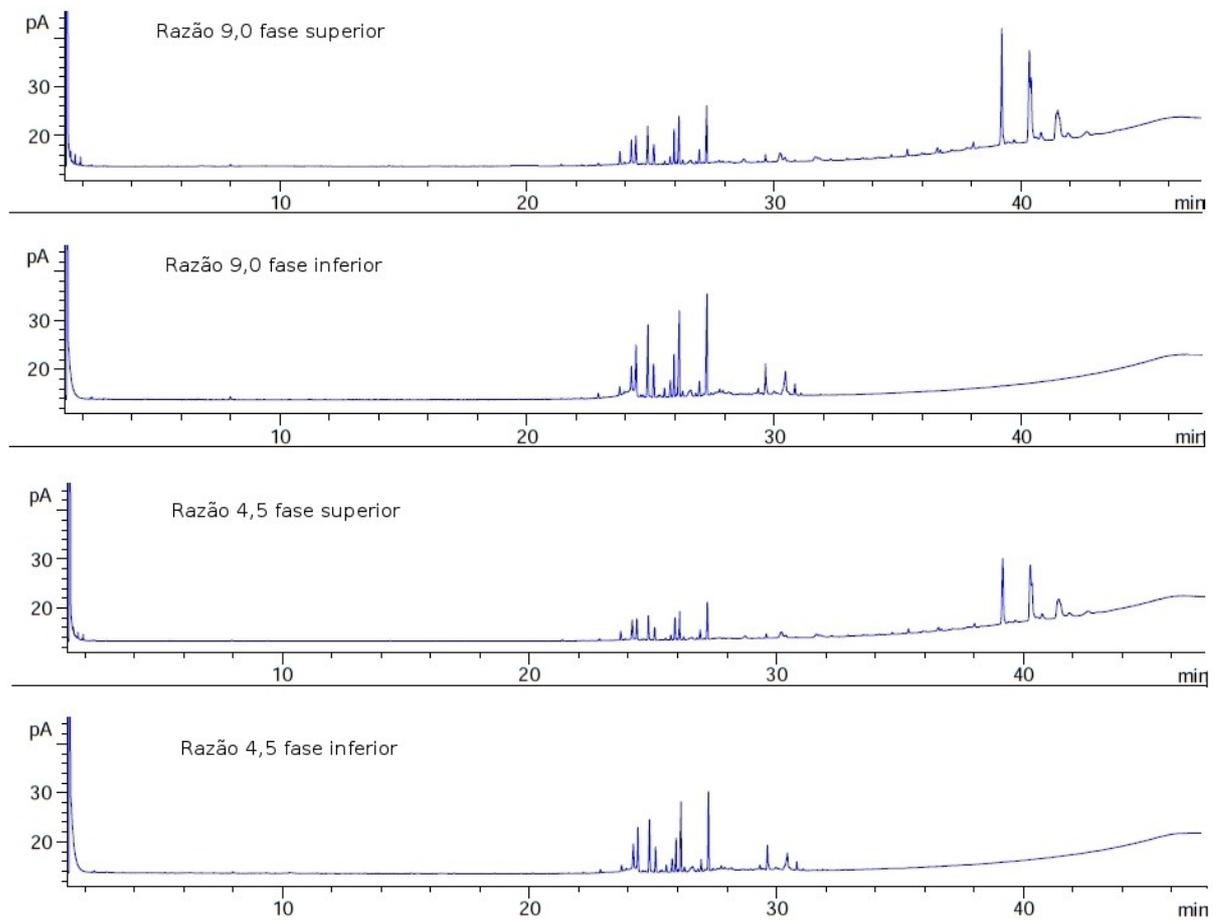
(Tappin, 2012)

A **Tabela 11** apresenta os rendimentos das fases em cada um dos experimentos. A **Figura 41** apresenta os cromatogramas dos dois experimentos.

Tabela 11 - Rendimento dos experimentos da proporção 34,2:50,0:15,8.

Massa de PP	Rendimento da fase superior	Rendimento da fase inferior
4,5 g	11,5%	80,4%
9,0g	11,3%	81,1%

Figura 41 - Cromatogramas de CG dos experimentos de produção de PPsG.



(Tappin, 2012)

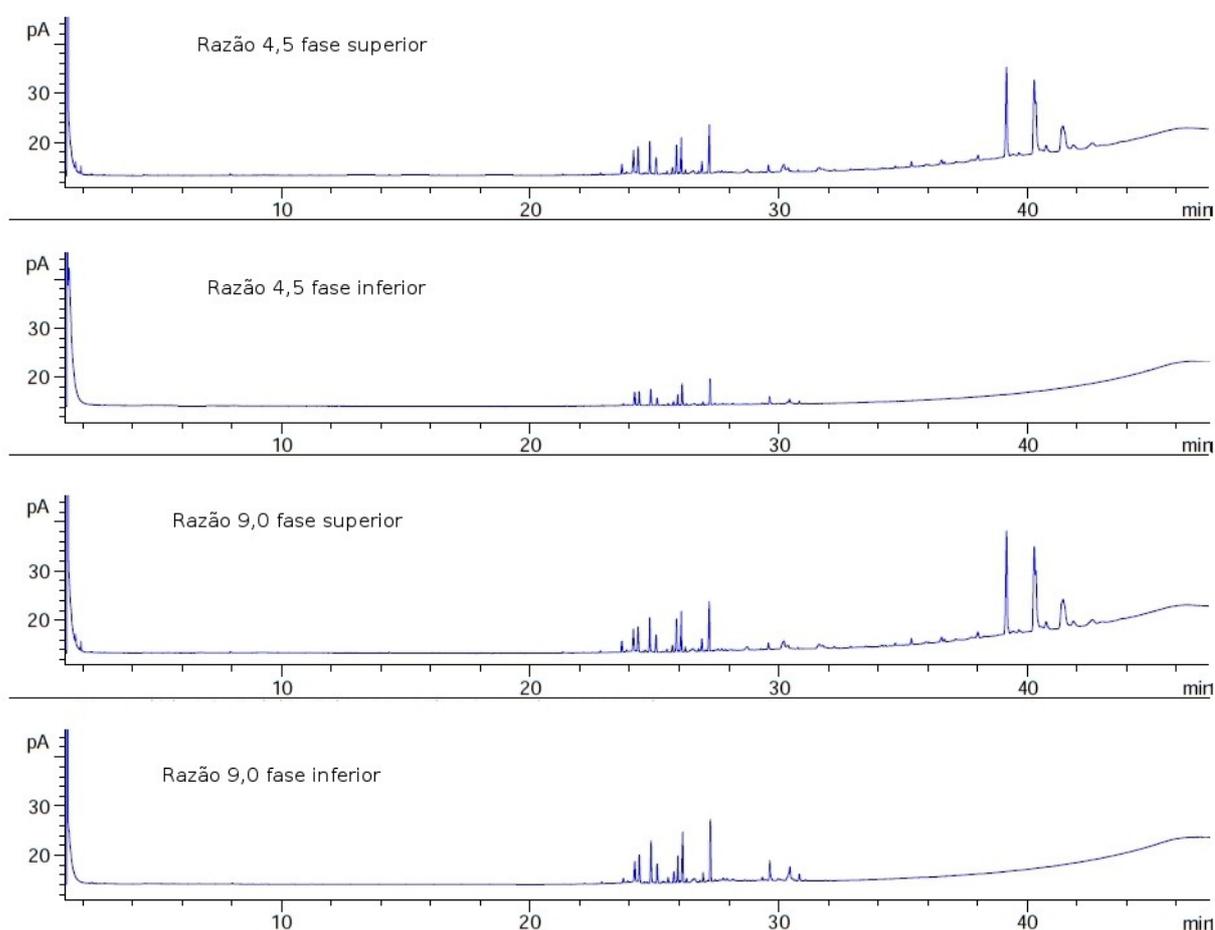
5.3.2.6 Obtenção de PP sem glicerídeos

Os resultados dos dois experimentos estão apresentados. A **Tabela 12** apresenta os rendimentos de cada experimento e a **Figura 42** apresenta os respectivos cromatogramas das amostras resultantes.

Tabela 12 - Rendimento dos experimentos de obtenção de PPsG.

Massa de PP	Rendimento da fase superior	Rendimento da fase inferior
4,5 g	11,3%	82,6%
9,0 g	11,5%	80,9%

Figura 42 - Cromatogramas das amostras resultantes dos experimentos de obtenção de PPsG.



(Tappin, 2012)

5.3.3 Discussão

5.3.3.1 Testes de sistemas de solventes

A análise da amostra correspondente às extrações reunidas, denominada PP, indicou a presença de tetranortriterpenoides juntamente com várias outras

substâncias, nestas incluídos os glicerídeos.

A aplicação do processo de partição líquido-líquido na separação dos tetranortriterpenoides foi inicialmente considerada, por se tratar de um método simples e de fácil escalonamento. Além disso, Foucault (1994), na publicação “*Centrifugal Partition Chromatography*”, construiu diagramas para diversos sistemas de solventes utilizados em cromatografia em contracorrente indicando as proporções nas quais o sistema é bifásico. Isto tornou possível a investigação de uma série de sistemas de solventes ternários para a separação dos tetranortriterpenoides. E, novamente dentro dos preceitos da química verde, a escolha dos sistemas de solventes levou em consideração a classificação do ICH para os resíduos de solventes.

Dos sistemas empregados, apenas n-heptano/2-propanol/água apresentou um resultado discreto, mas relevante, aplicado não à purificação de tetranortriterpenoides, mas sim na separação de glicerídeos da amostra. O resultado deste teste de partição é apresentado na **Figura 31**. O sistema foi então otimizado por planejamento de mistura, para se investigar qual a melhor composição para a retirada de glicerídeos.

5.3.3.2 Otimização do sistema n-heptano/2-propanol/água

O planejamento foi desenhado dentro da área bifásica do sistema, evitando-se a excessiva aproximação dos limites. O gráfico de Pareto da **Figura 32** mostra que o n-heptano e a água, os dois solventes extremos, são os de maior importância na partição – apesar de não serem significativos. De qualquer maneira, o modelo indicou que a melhor separação ocorre com a maior quantidade de n-heptano e as menores quantidades de 2-propanol e água (**Figuras 33 e 34**). Foi observado que quanto maior a fração de n-heptano, maior o volume da fase superior, o que contribui para deslocar a constante de equilíbrio dos glicerídeos para a fase superior.

Uma vez estabelecida a composição do sistema de solventes, as demais condições de partição foram otimizadas em um planejamento de composto central. Os limites dos parâmetros estudados foram determinados de diferentes maneiras. A razão massa/volume foi determinada de acordo com a solubilidade da amostra no sistema de solventes. As velocidades de agitação do sistema foram baseadas nas limitações do equipamento utilizado. Os limites de tempo foram determinados de forma a avaliar períodos curtos e longos de experimentos ainda passíveis de serem

realizados em um único dia. O gráfico de Pareto apresentado na **Figura 35** mostra que apenas a razão massa/volume é significativa na separação dos glicerídeos. No entanto, o gráfico do modelo apresentado na **Figura 36** revela que as condições ótimas para a retirada de glicerídeos, dentro do intervalo estudado, tendem ao maior tempo e à maior velocidade.

5.3.3.3 *Teste das condições otimizadas*

As condições otimizadas foram testadas e o resultado, bastante satisfatório, está apresentado na **Figura 38**, mostrando uma concentração alta de glicerídeos na fase superior e nenhum glicerídeo detectável na fase inferior.

5.3.3.4 *Aumento de escala da condição otimizada*

A escala deste processo foi aumentada de duas maneiras. Primeiro o processo foi simplesmente aumentado em 10 vezes, ou seja, todos os volumes e massa foram aumentados em 10 vezes, mantendo-se a velocidade e o tempo de partição. Os resultados, apresentados na **Figura 39**, mostram que, ao contrário do resultado anterior, ainda restaram tetranortriterpenoides na fase superior apesar de os glicerídeos já estarem concentrados na mesma fase. Provavelmente, ao aumentar a massa, seja necessário também aumentar o tempo de partição. No entanto, ao se verificar o valor dos rendimentos de cada fase, cerca de 90% da massa utilizada no processo foi recuperada na fase inferior; daí o resultado foi considerado satisfatório.

5.3.3.5 *Aumento de escala utilizando linhas de ligação*

O segundo modo de aumentar a escala incluiu o emprego das linhas de ligação. Foucault (1994), ao estabelecer seus diagramas, indicou linhas que cruzam a região bifásica, denominando-as de linhas de ligação. As proporções de solventes que se encontram nestas linhas têm as mesmas propriedades de partição, permitindo a utilização deste recurso para indicar a proporção mais adequada de solventes como, por exemplo, a redução de quantidade de um solvente mais caro ou tóxico. Neste caso, sabendo que o aumento da fase superior permite a transferência maior de glicerídeos para esta fase, três proporções de solventes tiveram o volume de suas fases medidas. O resultado (**Tabela 9**) mostra claramente que, conforme se aumenta a quantidade de n-heptano, maior será o volume da fase superior.

Entre as três proporções avaliadas, a mistura acetonitrila/2-propanol/água na proporção 34,2:50,0:15,8 foi a escolhida, pois o volume de fase superior já duplica com esta proporção. Nas outras duas proporções testadas (49,3:40:10,7; 63,7:30:6,3), o aumento da fase superior e a diminuição consequente da fase inferior foram muito acentuados – fato que poderia acarretar mudanças mais drásticas nas constantes de equilíbrio entre as fases, além de problemas inerentes de dissolução. A proporção selecionada foi então testada em três razões diferentes de massa/volume; a máxima estabelecida no planejamento experimental (2,25) e seus múltiplos (4,5 e 9). Os resultados (**Figura 40** e **Tabela 10**) foram similares ao do experimento anterior, apenas ocorrendo uma pequena queda no rendimento da fase inferior, para o patamar de 84%. Nos experimentos de razão massa/volume 4,5 e 9, a amostra não dissolveu totalmente, contudo isso não se traduziu em diferenças na partição.

Os experimentos com as razões de massa/volume 4,5 e 9 tiveram suas escalas aumentadas do mesmo modo como descrito acima. Os resultados foram similares (**Figura 41**), com uma pequena queda no rendimento da fase inferior, que ficou em cerca de 80% (**Tabela 11**) – o que ainda é considerado satisfatório.

5.3.3.6 *Obtenção de PP sem glicerídeos*

Para a produção de PP sem glicerídeos (amostra denominada PPsG), os experimentos do item anterior foram repetidos uma vez e os resultados, apresentados na **Figura 42** e na **Tabela 12**, foram condizentes com os resultados anteriores.

5.3.4 *Conclusão e desdobramentos da partição líquido-líquido*

O objetivo inicial de separar o grupo de tetranortriterpenoides por partição líquido-líquido não foi atingido com os sistemas estudados; contudo, um protocolo de remoção de glicerídeos do extrato inicial de PP foi desenvolvido. Como complemento deste estudo, cabe apontar a investigação do tempo necessário de partição para que a transferência dos tetranortriterpenoides para a fase inferior seja praticamente total.

5.4 EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA DE PPsG

5.4.1 Metodologia

5.4.1.1 Teste e otimização de extração em fase sólida de PPsG

A extração em fase sólida para purificação de uma amostra rica em tetranortriterpenoides foi testada e otimizada em três experimentos. A fase sólida utilizada foi 1000 mg de gel de sílica (Kieselgel 60, tamanho de partícula de 0,063-0,200 μm , Merck, Darmstad, Alemanha) acondicionada entre dois discos de algodão em uma seringa de 5 ml. A fase foi previamente condicionada com CH_2Cl_2 puro e então cerca de 100 mg de de PPsG foram dissolvidos em 1 ml de CH_2Cl_2 e aplicados sobre o disco superior de algodão. A amostra foi eluída com os seguintes sistemas de solventes: CH_2Cl_2 , $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{CN}$ 95:5 e CH_3CN , nesta ordem. Os diferentes volumes de cada sistema e as frações coletadas estão discriminados no **Quadro 14**. As frações foram secas, pesadas e analisadas por CG-DIC.

Quadro 14 - Experimentos de otimização da extração em fase sólida.

Experimento	1	2	3
Volume de CH_2Cl_2	10 ml (F1-F10: 1 ml)	20 ml (F1: 10 ml; F2-F11: 1 ml)	12 ml (F1: 10 ml; F2-F3: 2 ml)
Volume de $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{CN}$	10 ml (F11-F20: 1 ml)	10 ml (F12-F16: 2 ml)	10 ml (F4-F8: 2ml)
Volume de CH_3CN	10 ml (F21: 10ml)	10 ml (F17: 10ml)	10 ml (F9: 10ml)

5.4.1.2 Teste da extração em fase sólida na condição otimizada

A fase sólida foi preparada como no item anterior. A amostra composta de 100 mg de PPsG em 1 ml de CH_2Cl_2 foi aplicada sobre a fase sólida, e a eluição e fracionamento realizados segundo o **Quadro 15**. As amostras foram secas, pesadas e analisadas por CG-DIC.

Quadro 15 - Eluição do experimento otimizado.

Fração	Composição
1	10 ml de CH_2Cl_2
2	4 ml de CH_2Cl_2 e 4 ml de $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeCN}$ 95:5
3	10 ml de MeCN

5.4.1.3 Aumento de escala da extração em fase sólida

Quatro experimentos para aumentar a escala da extração em fase sólida foram realizados, à maneira do que foi descrito no item anterior, aumentando-se a escala do processo com a utilização de uma coluna maior. O cálculo de aumento de escala foi tem como base a área transversal e altura da fase estacionária da coluna de otimização. A área transversal da nova coluna foi medida e a altura foi calculada proporcionalmente então o volume foi preenchido com gel de sílica e pesado por diferença. A massa de amostra foi calculada proporcionalmente à massa da fase estacionária e os volumes das frações foram calculados proporcionalmente ao volume da fase estacionária. As amostras foram secas, pesadas e analisadas por CG-DIC. O **Quadro 16** apresenta as características de cada coluna.

Quadro 16 - Aumento da escala da extração em fase sólida.

Experimento	A	B	C	D
Massa da amostra	628 mg	635,5	2,816 g	5,259 g
Massa da fase	6,320 g	6,3238 g	28,017	52,128
Volume de CH ₂ Cl ₂	100,5 ml	100,5 ml	421 ml	814 ml
Volume de CH ₂ Cl ₂ /MeCN 95:5	28,7 ml	28,7 ml	121 ml	234 ml
Volume MeCN	71,8 ml	71,8 ml	300 ml	580 ml
Diâmetro da coluna	1,8 cm	1,8 cm	2,57 cm	3,03 ml

5.4.1.4 Aplicação do processo de extração em fase sólida

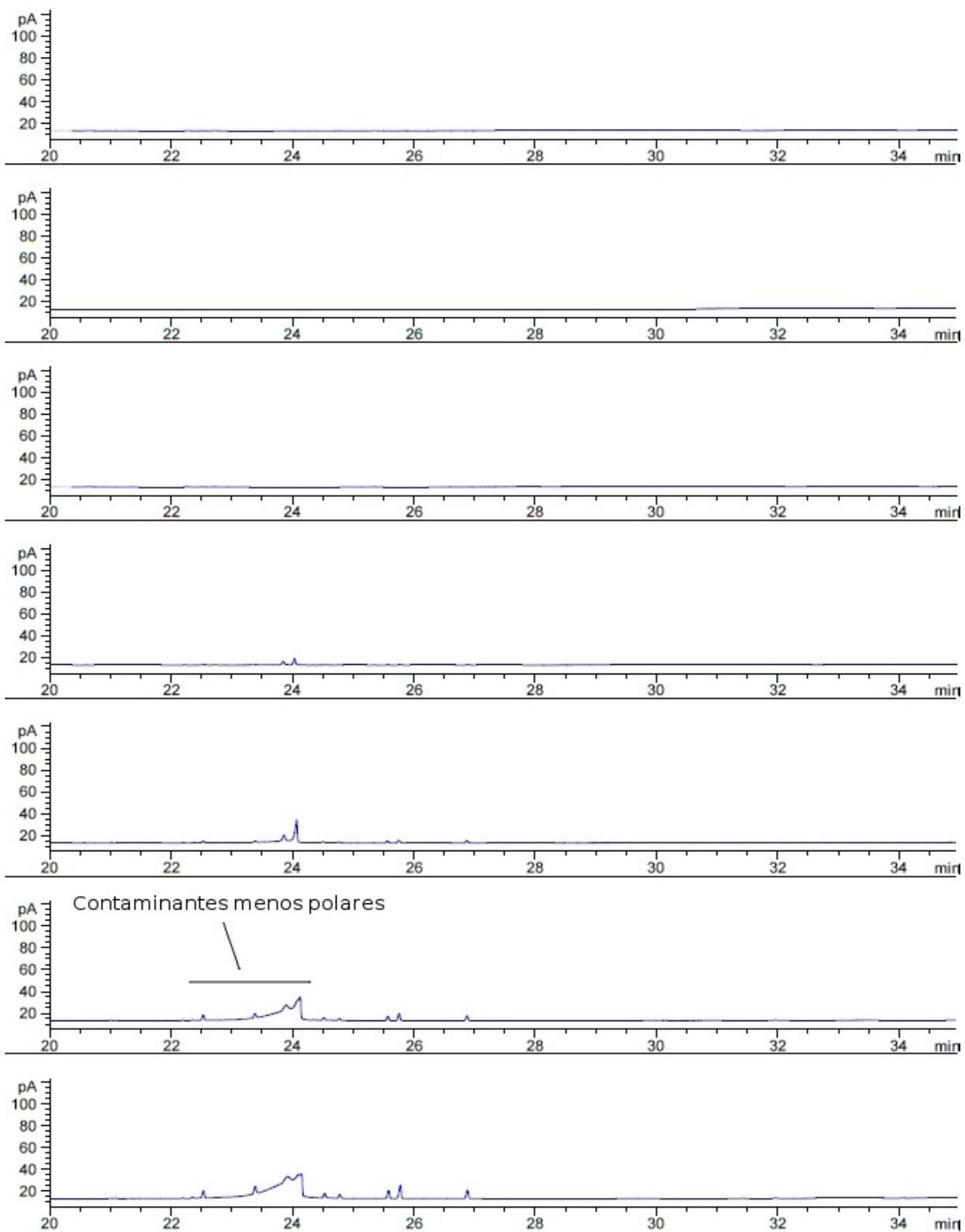
Dois experimentos foram realizados, aplicando-se os métodos descritos no item anterior com as condições da coluna D, denominados respectivamente E e F.

5.4.2 Resultados

5.4.2.1 Teste e otimização de extração em fase sólida

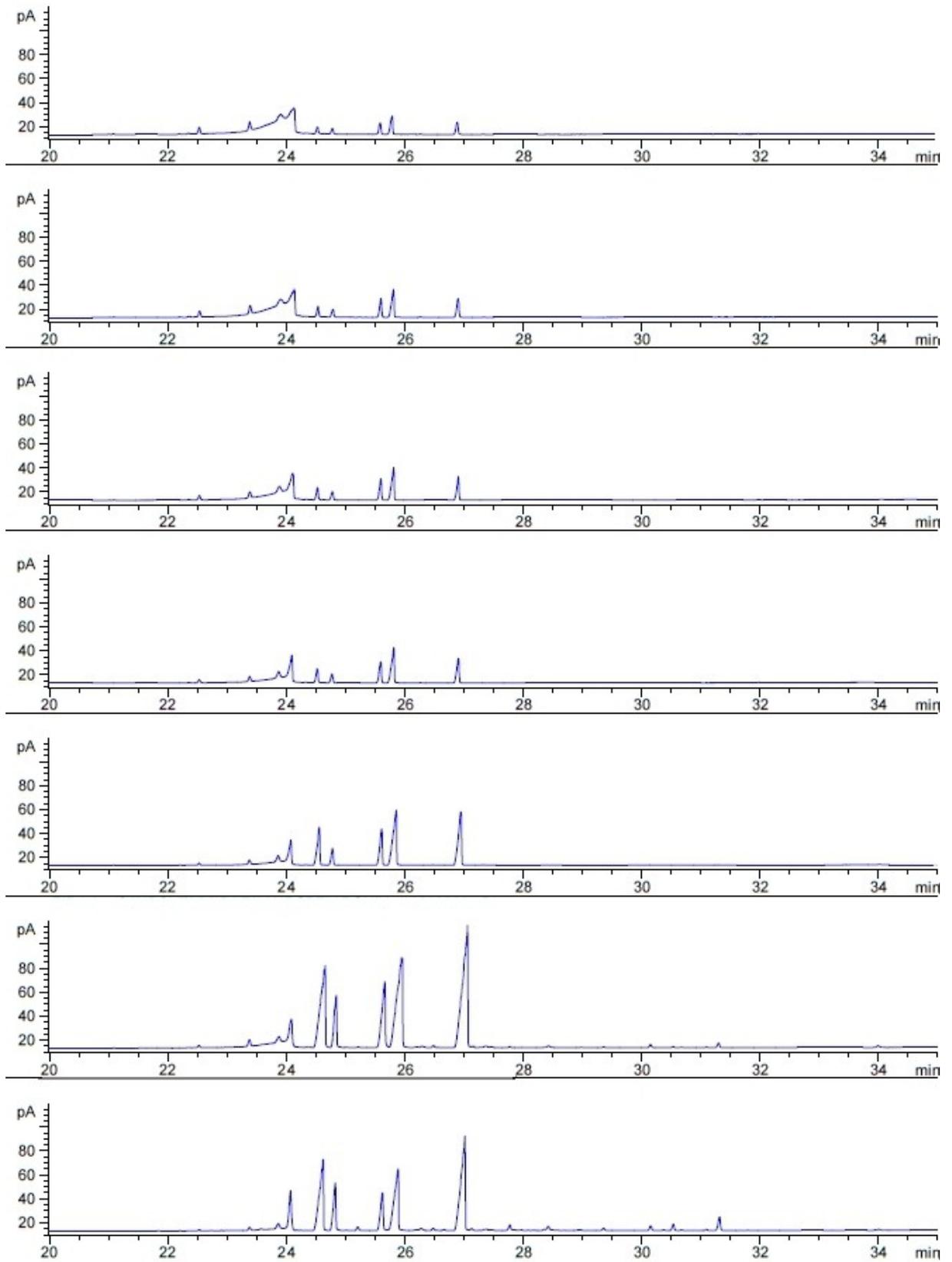
As **Figuras 43a-c** apresentam os resultados do experimento 1, as **Figuras 44a-c** apresentam os resultados do experimento 2 e as **Figuras 45a** e **45b** apresentam os resultados de experimento 3.

Figura 43a: Cromatogramas das frações do experimento 1 de EFS.



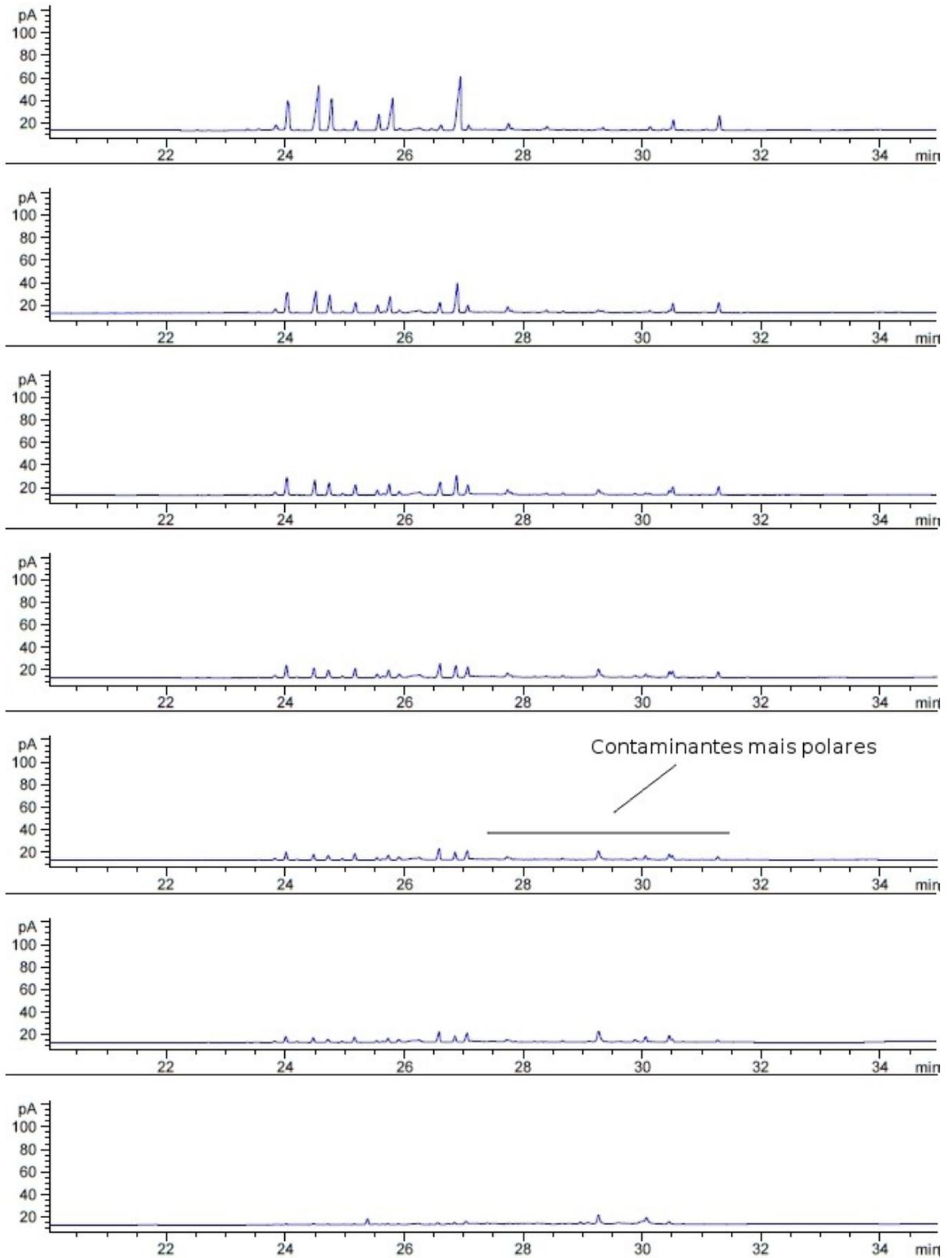
(Tappin, 2012)

Figura 43b: Cromatogramas das frações do experimento 1 de EFS.



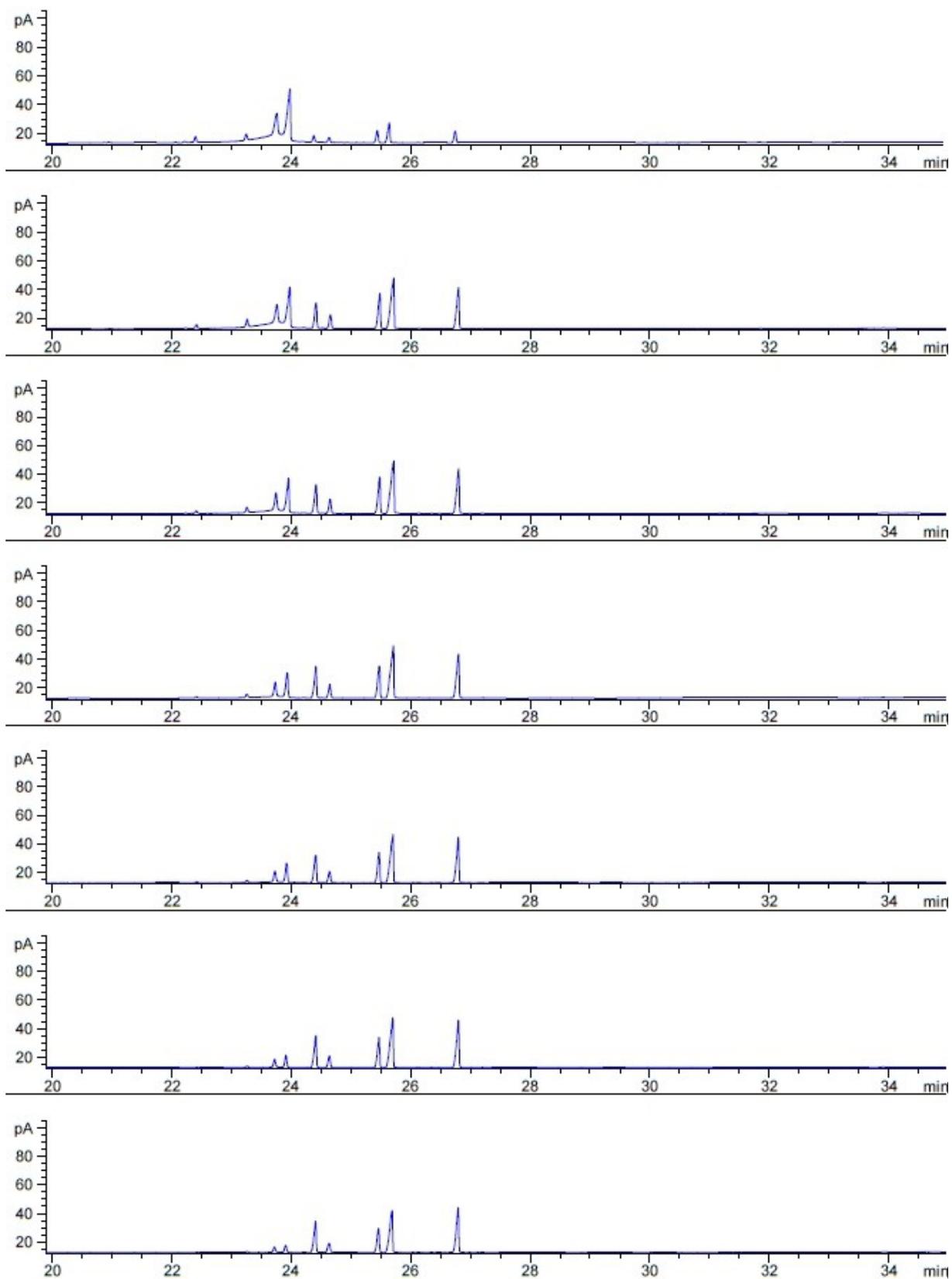
(Tappin, 2012)

Figura 43c: Cromatogramas das frações do experimento 1 de EFS.



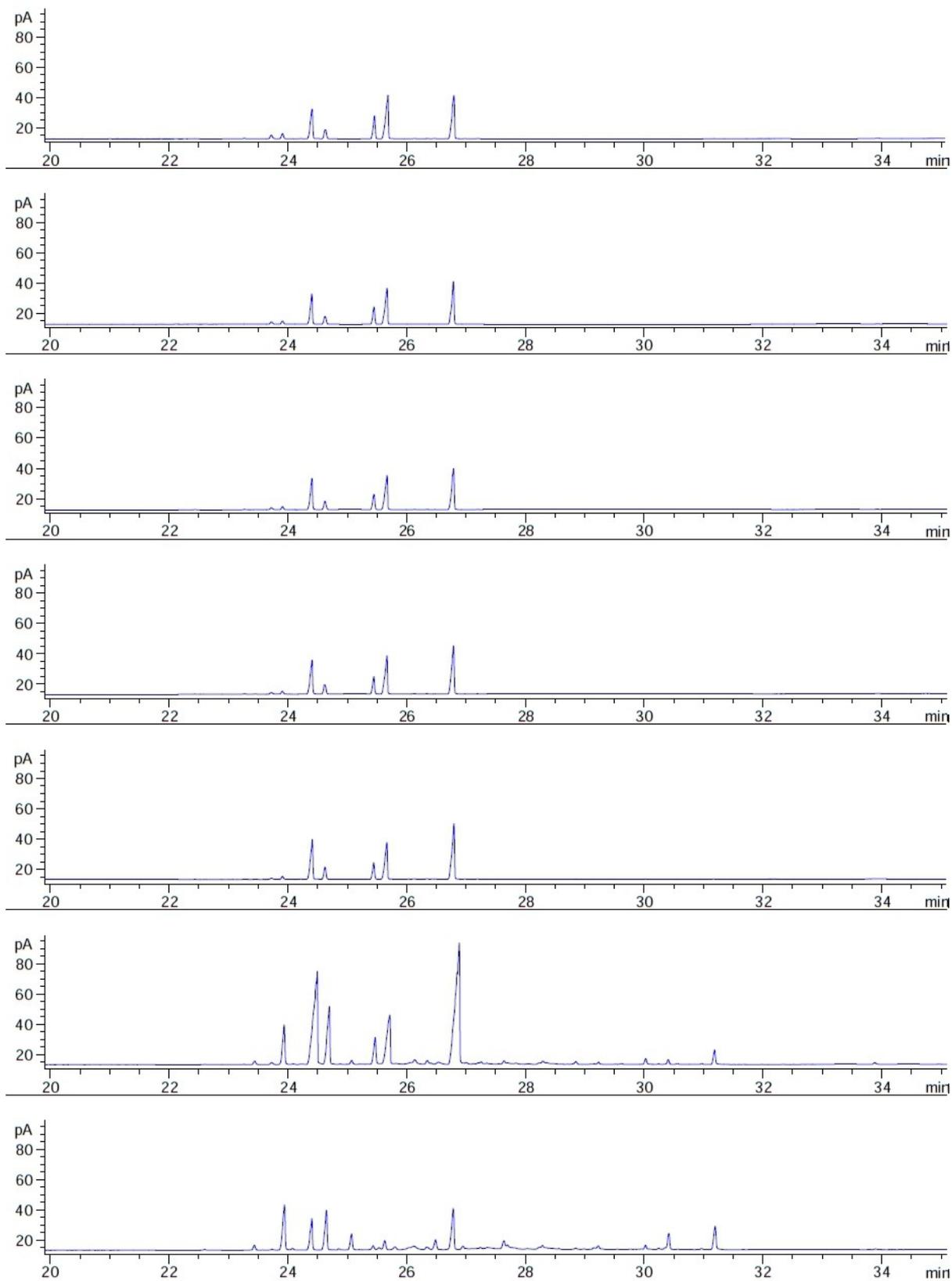
(Tappin, 2012)

Figura 44a: Cromatogramas das frações do experimento 2 de EFS.



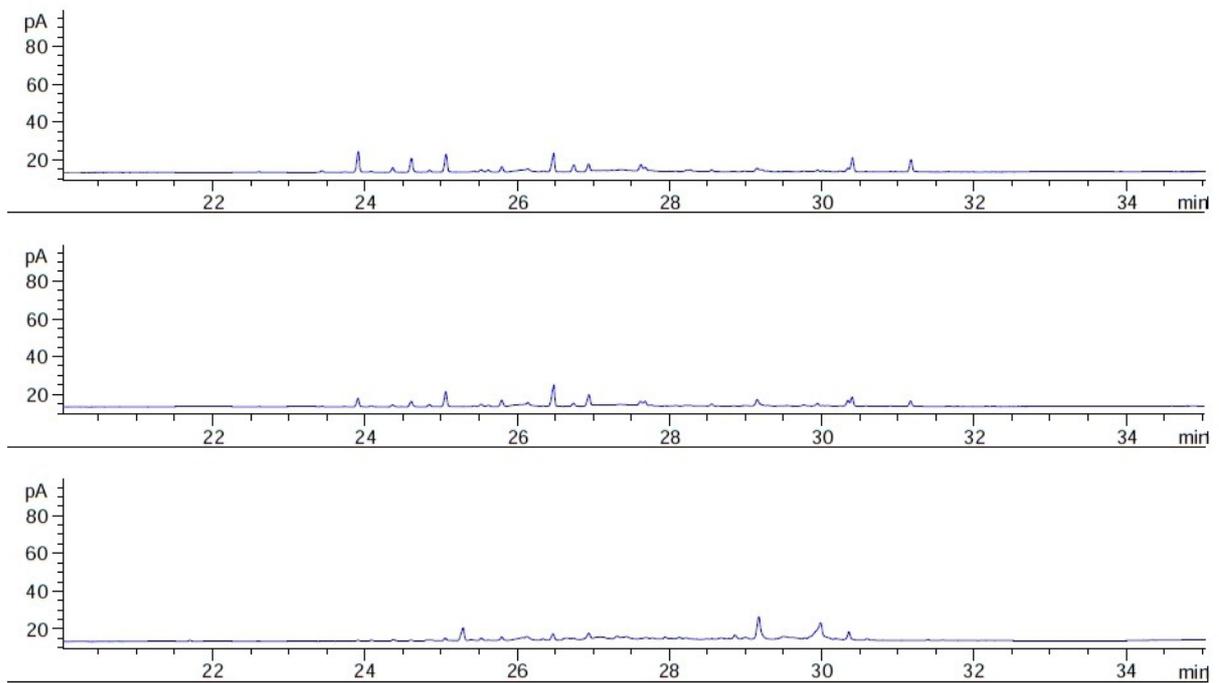
(Tappin, 2012)

Figura 44b: Cromatogramas das frações do experimento 2 de EFS.



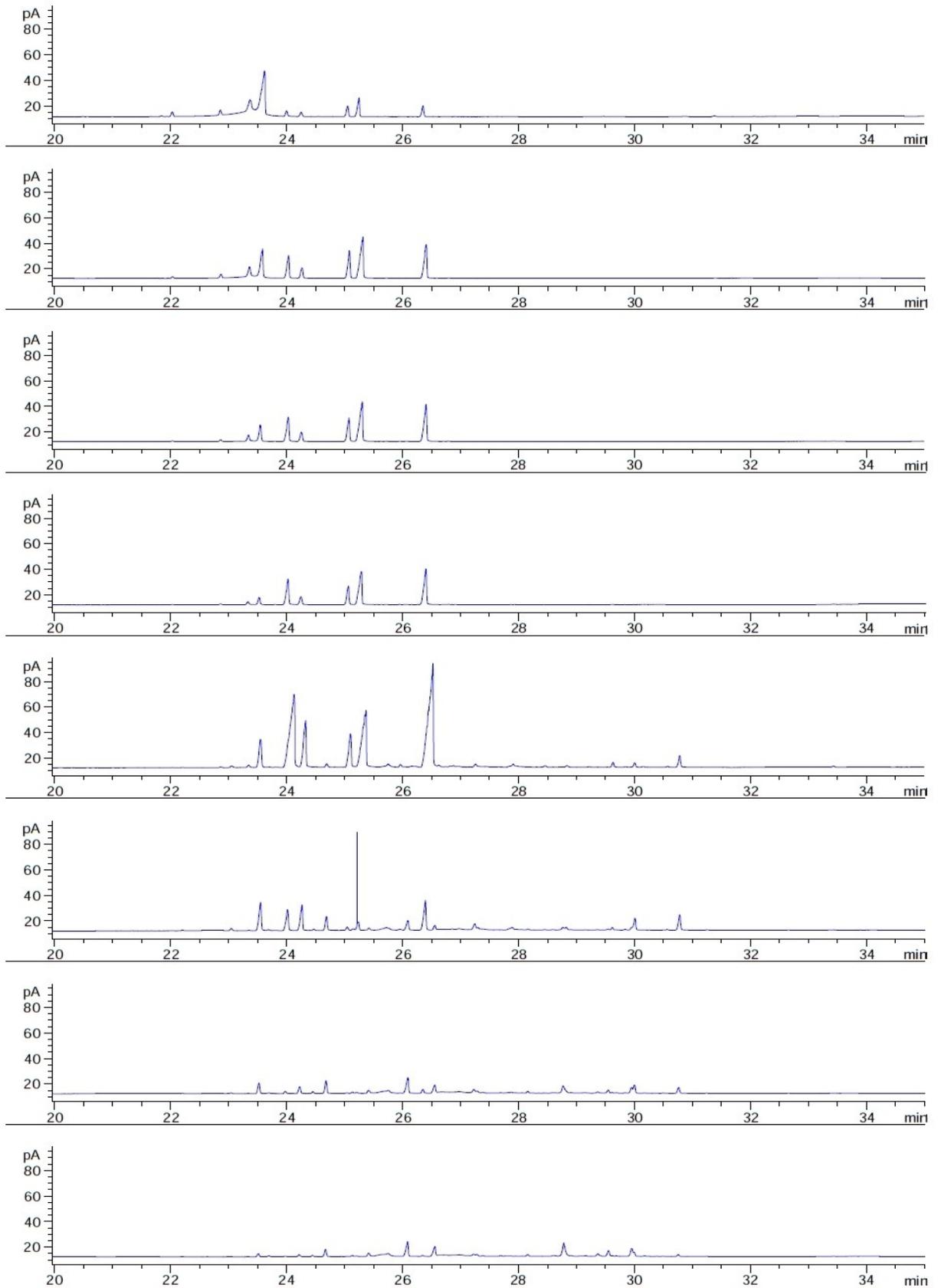
(Tappin, 2012)

Figura 44c: Cromatogramas das frações do experimento 2 de EFS.



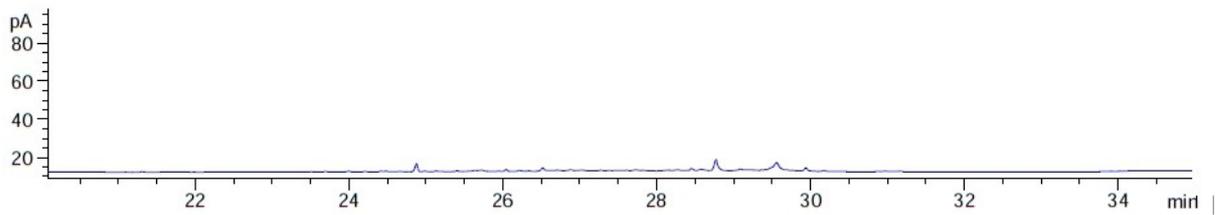
(Tappin, 2012)

Figura 45a: Cromatogramas das frações do experimento 3 de EFS.



(Tappin, 2012)

Figura 45b: Cromatogramas das frações do experimento 3 de EFS.



(Tappin, 2012)

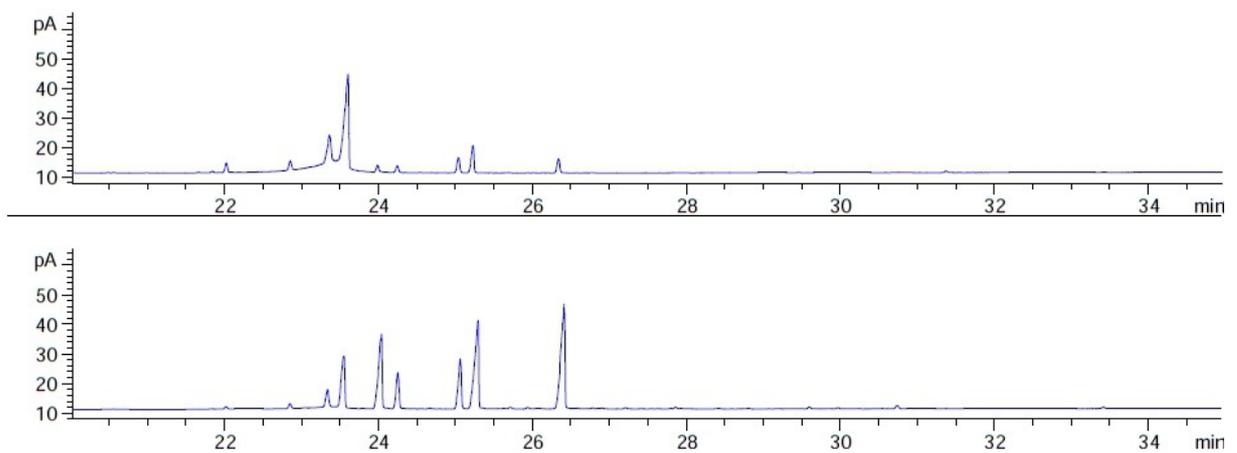
5.4.2.2 Teste de extração em fase sólida na condição otimizada

A **Tabela 13** apresenta as massas das frações obtidas na extração. A **Figura 46** apresenta os cromatogramas das frações F1 e F2 e a **Figura 47** apresenta os cromatogramas da fração F3.

Tabela 13 - Massa e rendimento das frações.

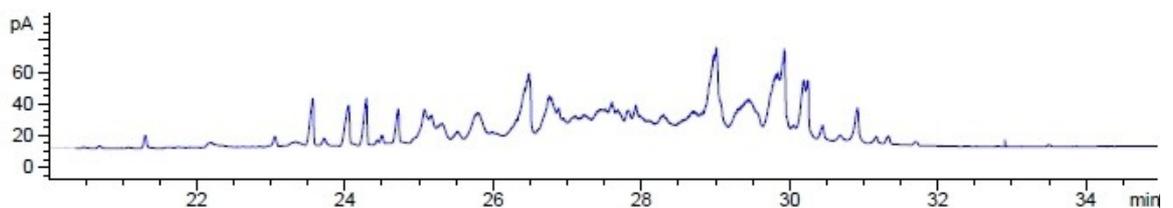
Fração	Massa (mg)
1	28,5
2	19,1
3	59,4

Figura 46 - Cromatogramas das frações F1 e F2 obtidas na condição otimizada.



(Tappin, 2012)

Figura 47 - Cromatograma da fração F3 obtida na condição otimizada.



(Tappin, 2012)

5.4.2.3 Aumento da escala da extração em fase sólida

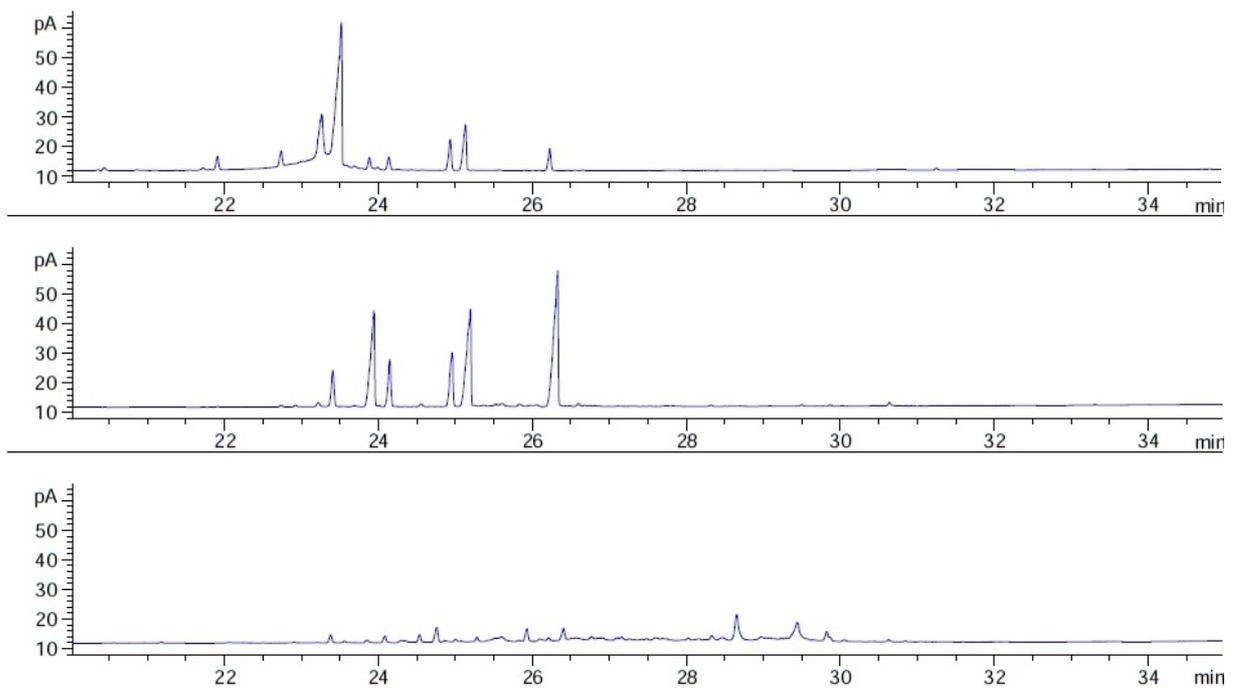
A **Tabela 14** apresenta a massa e o rendimento de cada fração obtida no experimento A. A **Figura 48** apresenta os cromatogramas correspondentes a estas frações.

Tabela 14 - Massa e rendimentos das frações do experimento A.

Fração	Massa (mg)	Rendimento (%)
1	130,2	20,7
2	123,7	19,7
3	342,7	54,6

(Tappin, 2012)

Figura 48 - Cromatogramas de CG das frações do experimento A.



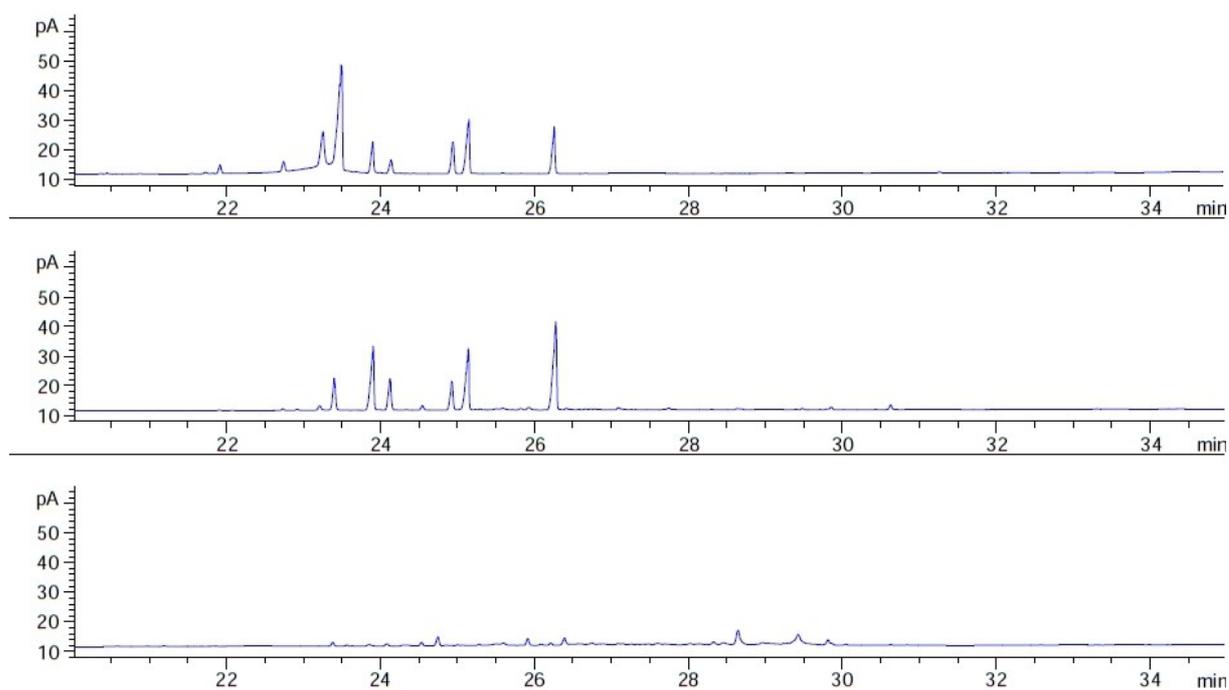
(Tappin, 2012)

A **Tabela 15** apresenta as massas e os rendimentos de cada fração no experimento B, e a **Figura 49** apresenta os cromatogramas correspondentes A cada fração.

Tabela 15 - Massa e rendimentos das frações do experimento B.

Fração	Massa (mg)	Rendimento (%)
1	159,9	25,2
2	127,7	20,1
3	360,0	56,6

Figura 49 - Cromatogramas de CG das frações obtidas no experimento B.



(Tappin, 2012)

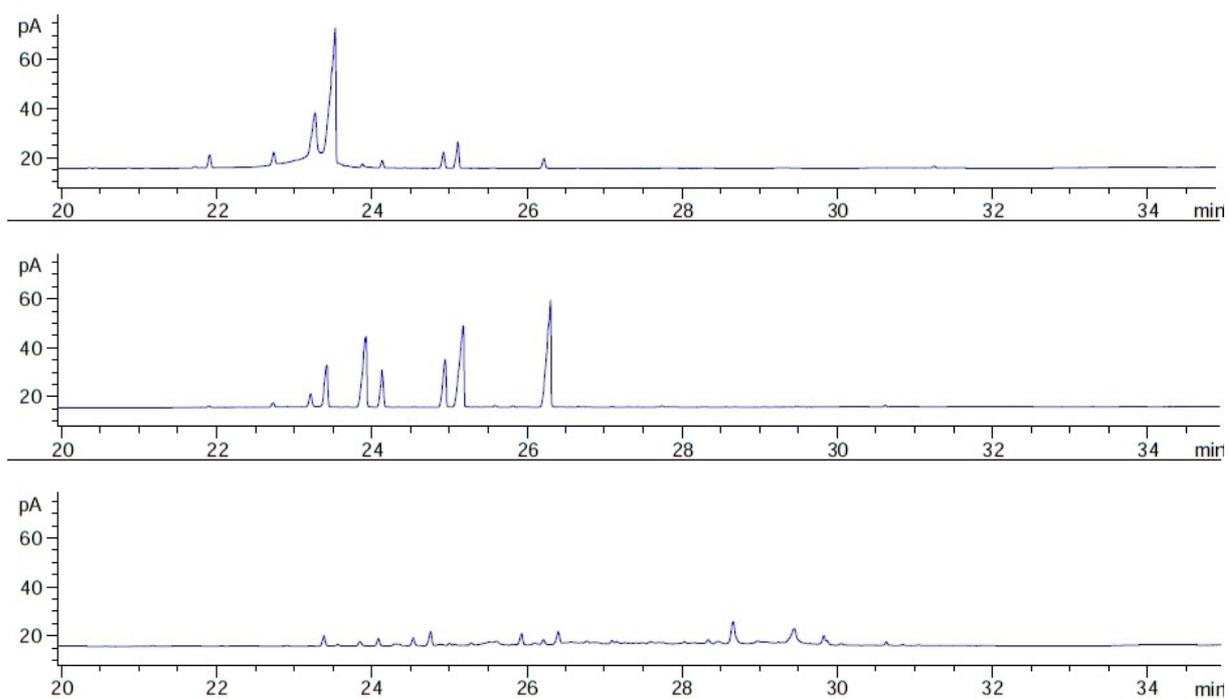
A **Tabela 16** apresenta as massas e os rendimentos de cada fração no experimento C. A **Figura 50** estão apresentados os cromatogramas correspondentes a cada fração.

Tabela 16 - Massa e rendimentos das frações do experimento C.

Fração	Massa (mg)	Rendimento (%)
1	*	-
2	650,5	23,1
3	1572,4	55,8

*A tara foi perdida.

Figura 50 - Cromatogramas de CG das frações do experimento C.



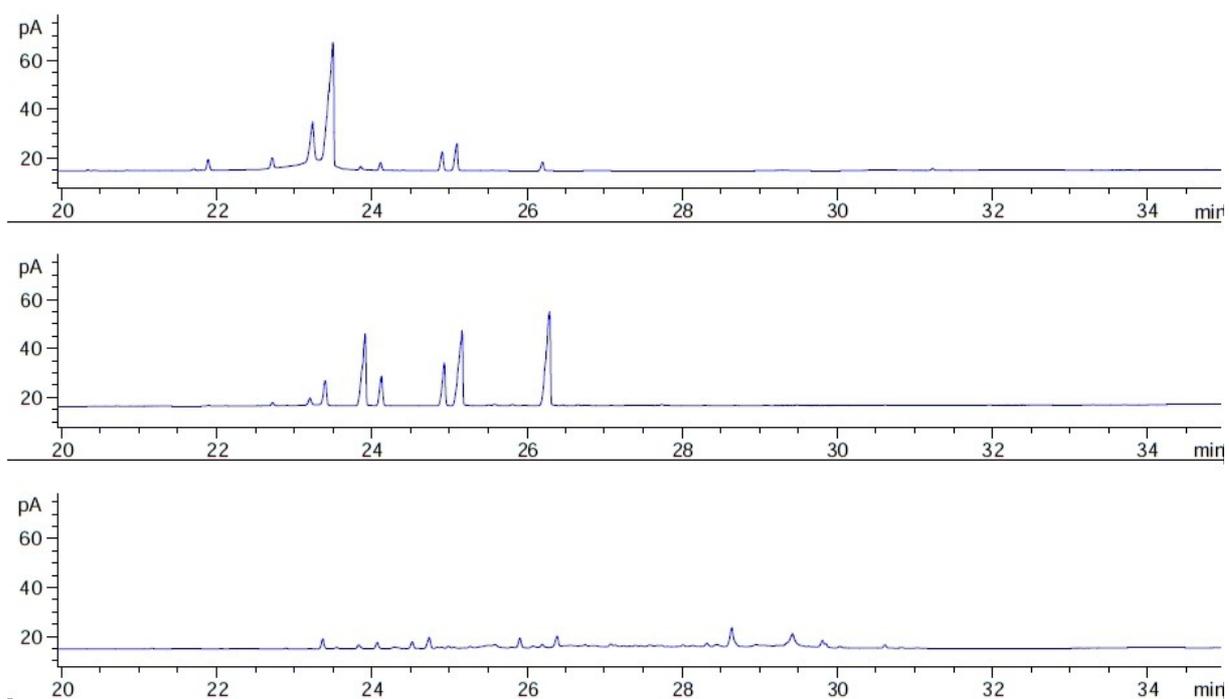
(Tappin, 2012)

A **Tabela 17** apresenta as massas e os rendimentos de cada fração no experimento D. A **Figura 51** apresenta os cromatogramas correspondentes a cada fração.

Tabela 17 - Massa e rendimentos das frações do experimento D.

Fração	Massa (g)	Rendimento (%)
1	1,001	19,0
2	1,1091	21,1
3	3,0034	57,1

Figura 51 - Cromatogramas de CG das frações obtidas no experimento D.



(Tappin, 2012)

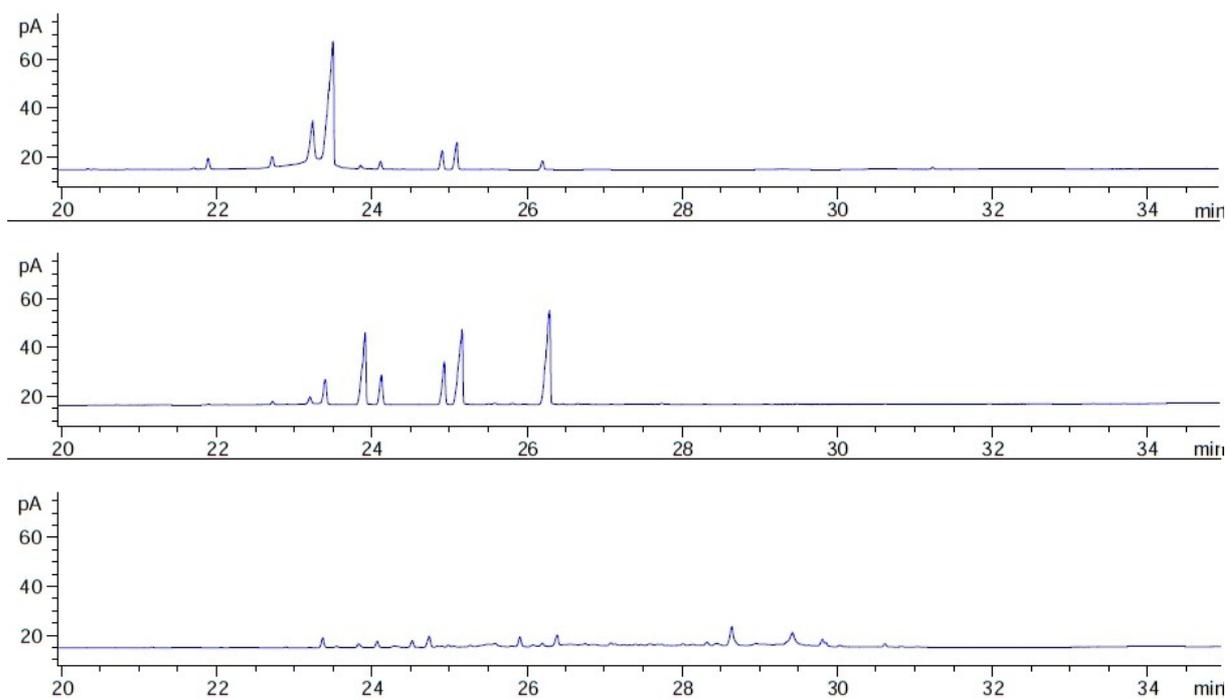
5.4.2.4 Aplicação do processo de extração em fase sólida

A **Tabela 18** apresenta as massas e os rendimentos de cada fração no experimento E. A **Figura 52** apresenta os cromatogramas correspondentes a cada fração.

Tabela 18 - Massa e rendimentos das frações do experimento E.

Fração	Massa (g)	Rendimento (%)
1	0,9472	18,1
2	1,1599	22,2
3	2,9234	55,8

Figura 52 - Cromatogramas de CG das frações obtidas do experimento E.



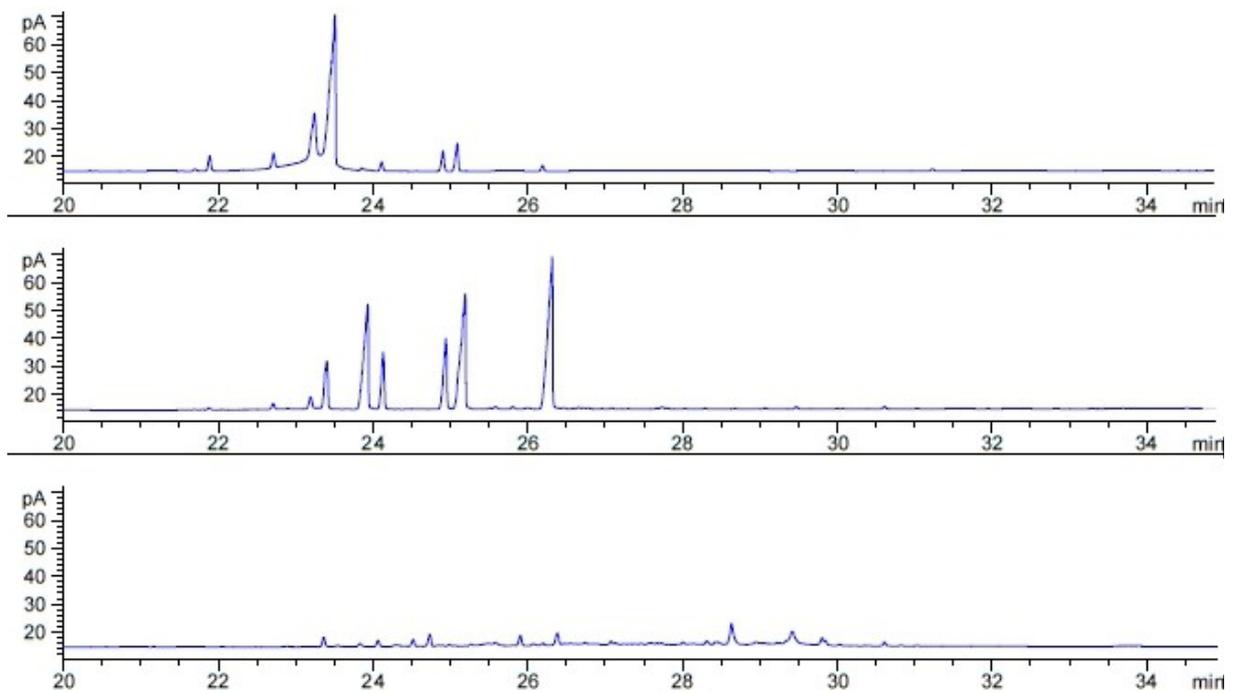
(Tappin, 2012)

A **Tabela 19** apresenta as massas e os rendimentos de cada fração no experimento F. A **Figura 53** apresenta os cromatogramas correspondentes a cada fração. A **Figura 54** apresenta um cromatograma de CLAE da amostra SPF2.

Tabela 19 - Massa e rendimentos das frações do experimento F.

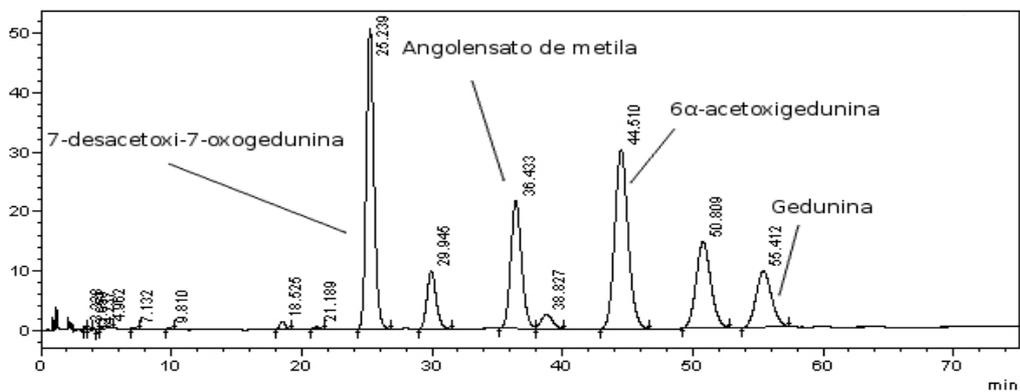
Fração	Massa (g)	Rendimento (%)
1	0,9701	18,6
2	1,1292	21,6
3	2,8431	54,4

Figura 53 - Cromatogramas CG das frações obtidas no experimento F.



(Tappin, 2012)

Figura 54 - Cromatograma em CLAE de SPF2.



(Tappin, 2012)

5.4.3 Discussão

5.4.3.1 *Teste e otimização da extração em fase sólida*

A extração em fase sólida é uma técnica já previamente utilizada para a concentração de tetranortriterpenoides de uma amostra de óleo de andiroba, ao visar sua quantificação nesta matriz (Tappin, 2007). A técnica desenvolvida foi, portanto, baseada nesse trabalho. Ela envolve o uso de uma fase estacionária de gel de sílica e por ela são passados em sequência diferentes sistemas de solventes: (i) CHCl_3 , no qual é aplicada amostra dissolvida e ocorre a eluição subsequente de contaminantes menos polares. (ii) $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{CN}$ 95:5, no qual são eluídos os tetranortriterpenoides. (iii) CH_3CN no qual são eluídos contaminantes mais polares. Os contaminantes menos polares estão indicados na **Figura 43a**. Os contaminantes mais polares estão indicados na **Figura 43c**.

Três experimentos de otimização foram realizados, visando determinar dois parâmetros: (i) o volume de CHCl_3 necessário para eluição de contaminantes menos polares sem (ou com um mínimo de) eluição de tetranortriterpenoides; e (ii) o volume necessário para eluir os tetranortriterpenoides com o mínimo de contaminantes mais polares. As massas de fase móvel e a amostra foram escolhidas de forma arbitrária.

Os resultados do primeiro experimento - apresentados nas **Figuras 43a, 43b e 43c** - mostram que há uma retenção importante da amostra na fase estacionária ao se eluir com CHCl_3 , com os primeiros sinais só aparecendo após a passagem de 4 ml de solvente. Nos 6 ml seguintes há uma eluição crescente de contaminantes e uma eluição discreta dos tetranortriterpenoides. A partir da aplicação do $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{CN}$ 95:5 há um grande aumento na eluição de tetranortriterpenoides, que se concentram nos 4 ml seguintes. Embora a eluição dos tetranortriterpenoides continue após este volume, há também uma eluição importante de contaminantes. Estes resultados demonstram que o protocolo de extração em fase sólida previamente desenvolvido para o óleo de andiroba, é aplicável em PPsG.

Apesar de já demonstrar sua capacidade de concentrar tetranortriterpenoides, o experimento 1 não foi capaz de indicar o volume de CHCl_3 necessário uma vez que, ao se trocar para $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{CN}$ 95:5, ainda havia eluição de contaminantes menos polares. Assim, no experimento 2, aumentou-se o volume de CHCl_3 , os resultados, apresentados nas **Figuras 44a, 44b e 44c**, mostram que nos primeiros 10 ml de CHCl_3 há predominância de contaminantes menos polares, acompanhados de uma pequena quantidade de tetranortriterpenoides. Nas amostras de 11 e 14 ml,

há certa equivalência entre os contaminantes menos polares e os tetranortriterpenoides. Finalmente, para os volumes de 15 a 20 ml, há uma clara predominância de tetranortriterpenoides sem a presença outros contaminantes. Este resultado permite determinar o volume de CHCl_3 em 14 ml, divididos em duas frações: 10 ml iniciais, onde há predominância dos contaminantes menos polares, e 4 ml, onde há equivalência entre contaminantes menos polares e tetranortriterpenoides. O experimento também confirma que, após a aplicação de $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{CN}$ 95:5, há um aumento expressivo na eluição de tetranortriterpenoides, que cessa rapidamente.

Após estabelecer o volume de CHCl_3 , restou determinar o volume necessário da mistura $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{CN}$ 95:5 para eluir os tetranortriterpenoides. O experimento 3 (**Figuras 45a e 45b**) demonstra que, após a aplicação dos 14 ml de CHCl_3 com apenas 4 ml de $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{CN}$, a maior parte dos tetranortriterpenoides é eluída; depois disso, a presença de contaminantes mais polares ganha relevância. Portanto, o volume necessário da mistura $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{CN}$ 95:5 é igual a 4 ml. Após essa quantidade, foram então aplicados 10 ml de CH_3CN para a eluição dos contaminantes restantes.

5.4.3.2 *Teste de extração em fase sólida na condição otimizada*

Este teste permitiu desenhar um protocolo de extração em fase sólida para a amostra PPsG. Três frações foram coletadas: a primeira, rica em contaminantes menos polares, com 10 ml de CHCl_3 ; a segunda, rica em tetranortriterpenoides, composta por 4 ml de CHCl_3 e 4 ml de $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{CN}$ 95:5; e a terceira, rica em contaminantes mais polares, composta por 10 ml de CH_3CN . O resultado pode ser visualizado nas **Figuras 46 e 47**, onde as frações têm o perfil previsto, com concentração alta de tetranortriterpenoides na segunda fração. Ainda há resíduos destes nas demais frações, principalmente na primeira; entretanto, o rendimento de 19,1% para a segunda fração (**Tabela 13**) indica um valor de 82% do total de tetranortriterpenoides da amostra, com base no teor de 23,3% de tetranortriterpenoides quantificados em PP por CG (resultados abaixo).

5.4.3.3 *Aumento de escala da extração em fase sólida*

O cálculo do aumento de escala tem como base um método indicado por Mazzei e d'Avila (2003). Foram realizados quatro experimentos, com os dois

primeiros (A e B) nas mesmas condições, com o objetivo de verificar a reprodução do protocolo (**Quadro 16**). O terceiro (C) e o quarto (D) experimentos foram realizados em escalas maiores sucessivas. Os perfis cromatográficos, apresentados entre as **Figuras 48 a 51**, mostram consistência entre os perfis cromatográficos em todas as escalas. Os rendimentos das frações também foram consistentes em todas as escalas (**Tabelas 14 a 17**).

5.4.3.4 *Aplicação do processo de extração em fase sólida*

Foram realizadas mais duas extrações em fase sólida nas condições da coluna D para a obtenção de amostra. Os resultados foram os esperados e estão apresentados nas **Figuras 52 e 53** e nas **Tabelas 18 e 19**. Estes resultados demonstram que o procedimento desenvolvido é muito reprodutivo.

5.4.4 Conclusão e desdobramentos da extração em fase sólida

Assim, um protocolo de extração em fase sólida para a obtenção de uma fração concentrada de tetranortriterpenoides foi desenvolvido. Todas as frações ricas em tetranortriterpenoides foram reunidas e denominadas de SPF2. Um cromatograma em CLAE de SPF2 é apresentado na **Figura 54**.

Como desdobramentos desta etapa pode-se considerar a tentativa de substituição dos solventes utilizados por solventes menos tóxicos, principalmente o CHCl_3 . Além disso, pode-se estudar protocolos para recuperar os tetranortriterpenoides da fração 1.

5.5 PRECIPITAÇÃO/PURIFICAÇÃO DE TETRANORTRITERPENOIDES EM SPF2

5.5.1 Metodologia

5.5.1.1 *Teste de precipitação/purificação*

A amostra SPF2 foi tratada com metanol com o objetivo de precipitar uma fração rica em tetranortriterpenoides, principalmente 7-desacetoxi-7-oxogedunina e 6 α -acetoxigedunina. O processo básico consiste em adicionar metanol sobre uma massa de SPF2, agitar, esperar decantar o precipitado e retirar o sobrenadante. Este ciclo é então repetido cinco vezes com um volume de 60% do metanol originalmente utilizado. As frações resultantes são o precipitado (pp1) e o sobrenadante (sob). Após algum tempo de repouso, o sobrenadante gera um segundo precipitado (pp2). O processo foi otimizado em dois testes, avaliando-se a massa de SPF2 e os

volumes de metanol adicionados. Estas variáveis estão discriminadas no **Quadro 17**.

Quadro 17 - Testes de precipitação de SPF2.

Experimento	1	2
Massa de SPF2	10 mg	10 mg
Volume inicial de metanol	200 µl	100 µl
Volume subsequente de metanol	120 µl	60 µl

O sobrenadante e o precipitado foram secos, pesados e analisados por CLAE–DAF, utilizando-se o método apresentado no **Quadro 18**.

Quadro 18: Método analítico de CLAE-DAF (arranjo de fotodiodos).

Coluna RP-18 de 25 cm de comprimento, 46 mm de diâmetro e 5 µm de tamanho de partícula.
Fluxo de 1 ml/min.
Fase móvel: Acetonitrila / Água / Metanol 20:41:39.
Detecção a 210 nm.
Equipamento: CLAE modelo prominence Shimadzu.

5.5.1.2 Aumento de escala do processo de precipitação de SPF2

Os dois experimentos do ítem anterior tiveram sua escala aumentada. As massas utilizadas foram de cerca de 500 mg e os volumes utilizados foram calculados proporcionalmente.

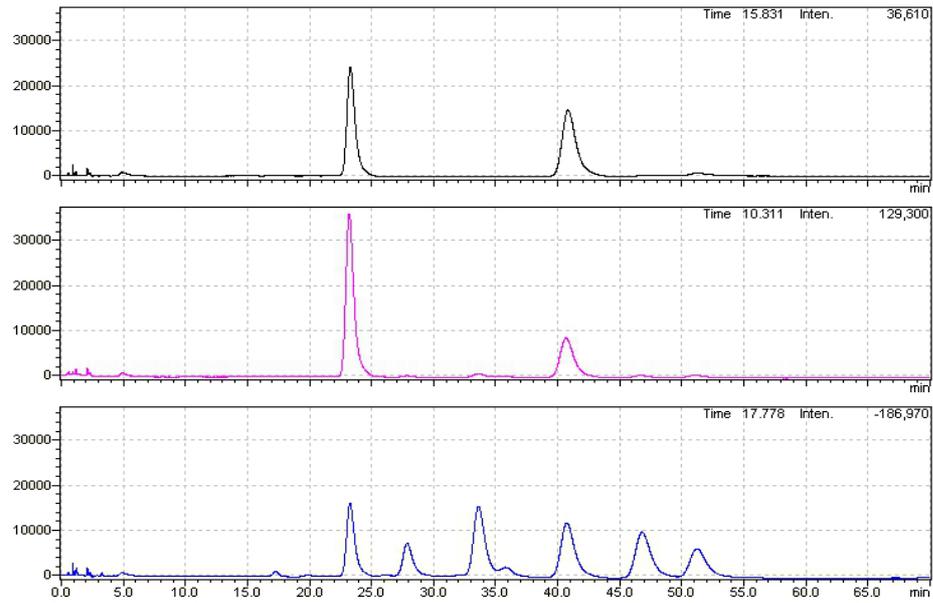
Além destas duas amostras, uma terceira proveniente da união de várias frações resultantes de outros experimentos, com perfil similar a SPF2, denominada SPF2u, foi precipitada/purificada pelo protocolo do experimento 2. O precipitado produzido por estes protocolos é denominado PPTn.

5.5.2 Resultados

5.5.2.1 Testes de precipitação

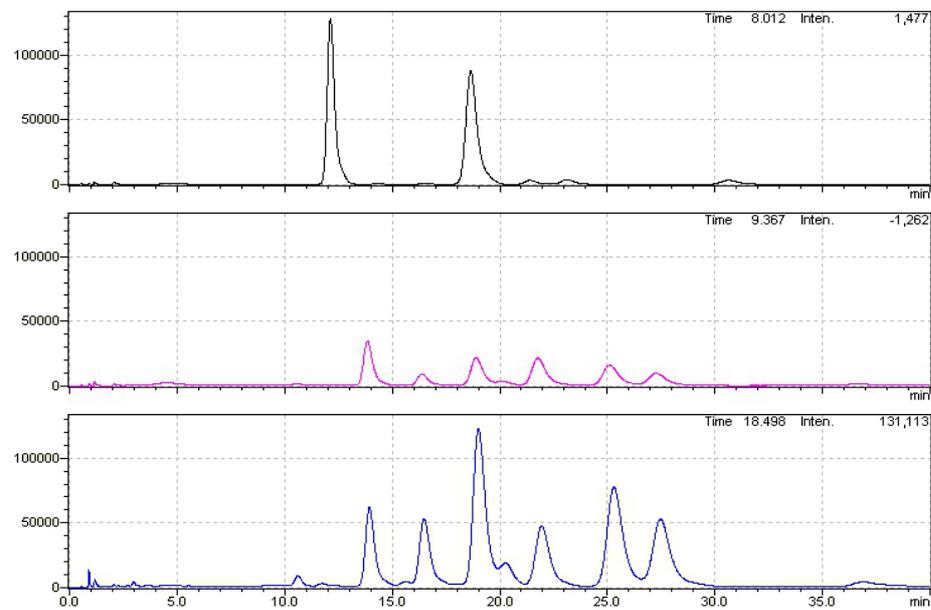
Os resultados dos testes de precipitação estão apresentados. As **Figuras 55** e **56** mostram, respectivamente, os resultados dos experimentos 1 e 2.

Figura 55 - Cromatogramas das amostras obtidas no Experimento 1.



(Tappin, 2012)

Figura 56 - Cromatogramas das amostras obtidas no Experimento 2.



(Tappin, 2012)

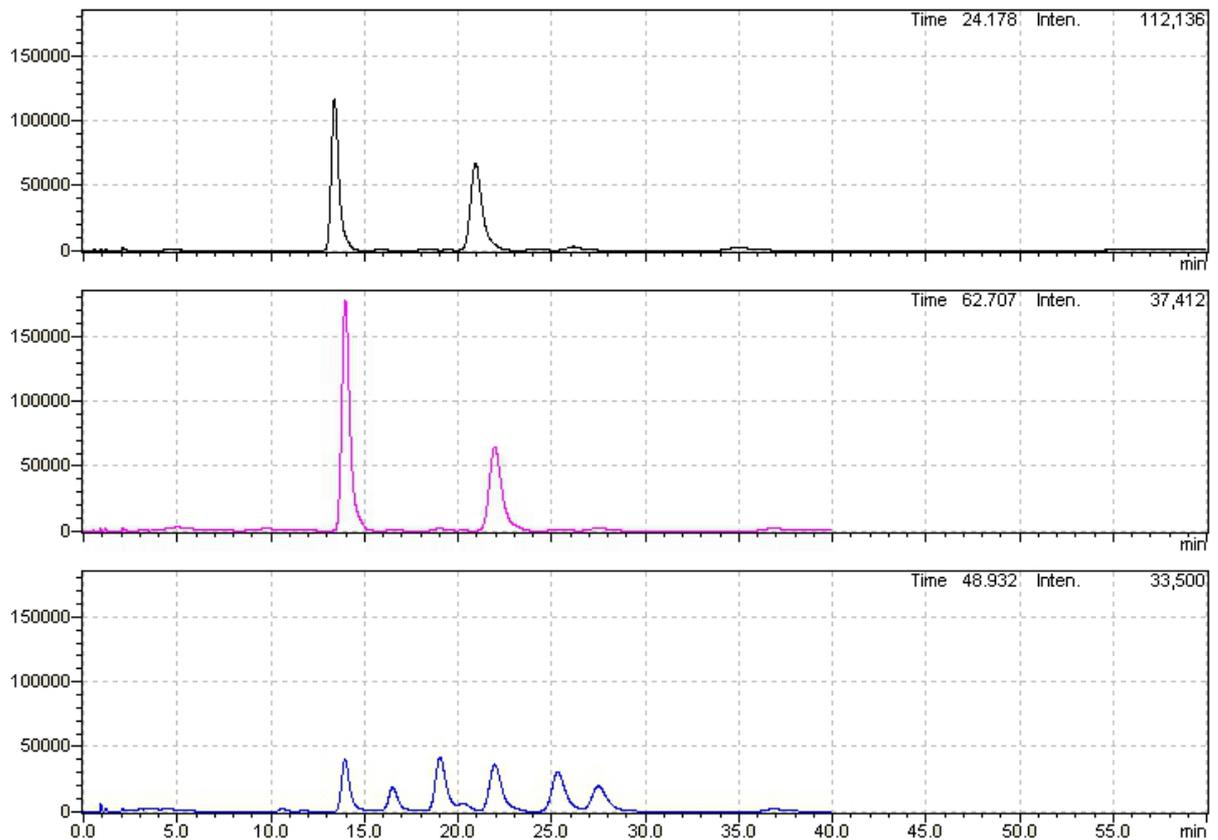
5.5.2.2 Aumento de escala do processo de precipitação de SPF2

A **Tabela 20** apresenta as massas e os rendimentos resultantes da escala aumentada do experimento 1 de precipitação de SPF2. A **Figura 57** apresenta os cromatogramas destas amostras.

Tabela 20 - Massa e rendimento do Experimento 1 escalonado.

Fração	Massa (mg)	Rendimento (%)
pp1	138,5	27,7
pp2	57,9	11,6
sob	319,4	63,9

Figura 57 - Cromatogramas das frações obtidas no experimento 1 escalonado.



(Tappin, 2012)

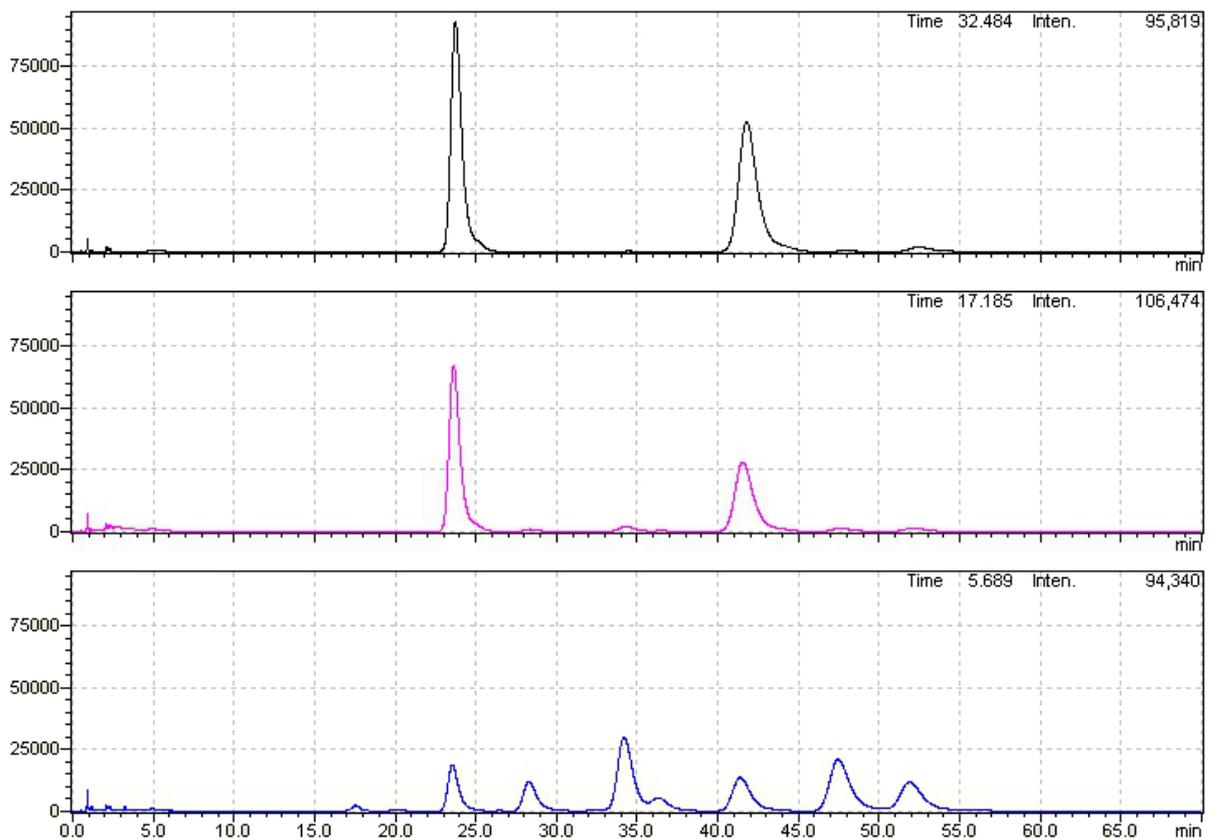
A **Tabela 21** apresenta as massas e os rendimentos resultantes da precipitação em escala aumentada do experimento 2. A **Figura 58** apresenta os cromatogramas destas amostras.

Tabela 21 - Massa e rendimento do experimento 2 escalonado.

Fração	Massa (mg)	Rendimento (%)
pp1	143,3	35,5
pp2	118	29,2
sob	142,8*	35,3*

*Valor estimado.

Figura 58 - Cromatogramas das frações obtidas no experimento 2 em escala aumentada.



(Tappin, 2012)

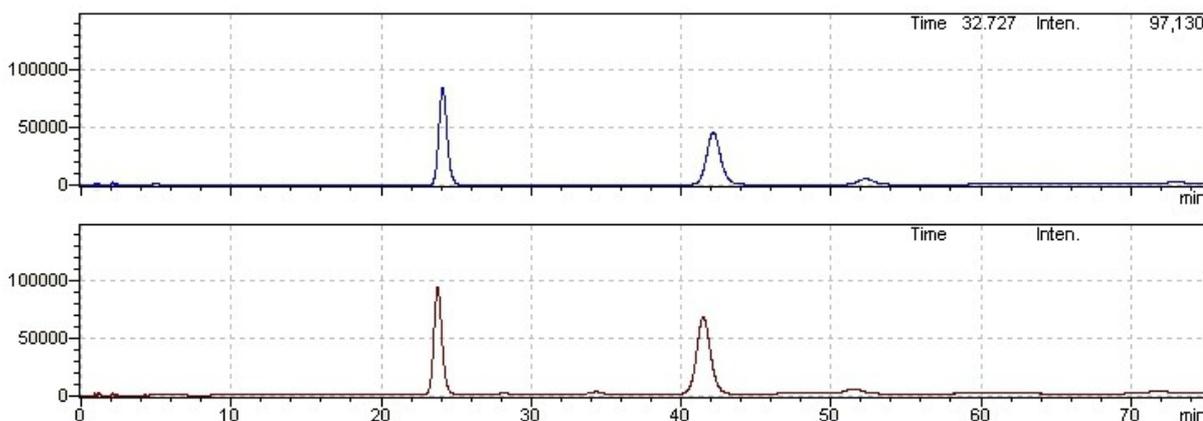
A **Tabela 22** apresenta as massas e os rendimentos resultantes da precipitação em escala aumentada de SPF2u. A **Figura 59** apresenta os cromatogramas destas amostras. A **Figura 60** apresenta um cromatograma de SPF2u.

Tabela 22 - Massa e rendimento da precipitação de SPF2u em escala aumentada.

Fração	Massa (mg)	Rendimento (%)
pp1	158,8	32,9
pp2	37,4	12,9
sob	285,8*	54,2*

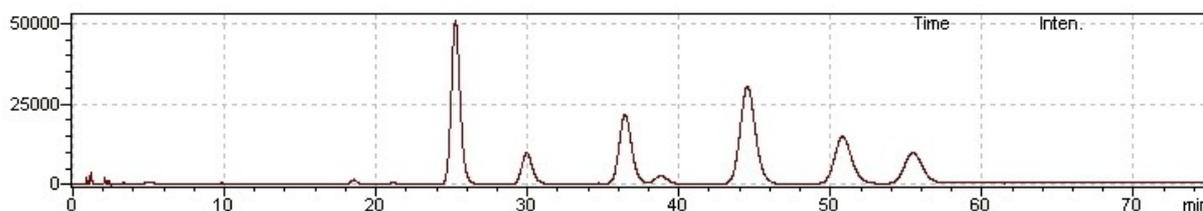
*Valor estimado.

Figura 59 - Cromatogramas das frações pp1 e pp2 da precipitação de SPF2u.



(Tappin, 2012)

Figura 60 - Cromatograma de SPF2u.



(Tappin, 2012)

5.5.3 Discussão

5.5.3.1 Testes de precipitação

Tappin (2007) utilizou um protocolo simples para tratar uma amostra concentrada em tetranortriterpenoides e purificar a 7-desacetóxi-7-oxogedunina, explorando a dissolução parcial dos tetranortriterpenoides em metanol em soluções muito concentradas. Duas razões de massa de amostra para volume de metanol

foram utilizadas: 10 mg para 100 μ l (experimento 2) e 10 mg para 200 μ l (experimento 1). Os resultados estão apresentados nas **Figuras 55 e 56**. É possível observar a purificação dos dois tetranortriterpenoides majoritários, a 7-desacetóxi-7-oxogedunina e a 6 α -acetoxigedunina, nas frações pp1 e pp2. Chama a atenção que o angolensato de metila é totalmente solúvel no metanol nesta proporção utilizada apesar de apresentar o seu sinal ligeiramente menos intenso do que o correspondente à 6 α -acetoxigedunina. Provavelmente isso ocorre porque a estrutura tridimensional da molécula do angolensato de metila é bem diferente dos demais tetranortriterpenoides presentes (**Figura 2**). Por outro lado, a gedunina tem estrutura similar às duas substâncias majoritárias, porém a sua presença minoritária na amostra perfaz uma concentração final insuficiente para a sua precipitação parcial.

5.5.3.2 Aumento de escala do processo de precipitação/purificação de SPF2

As duas concentrações foram testadas em escala maior. Os resultados estão apresentados nas **Figuras 57 e 58**. Os perfis cromatográficos se mostraram similares aos do experimento 1. No entanto, o rendimento do experimento 2 é maior quando se trata das frações ricas em tetranortriterpenoides alcançando cerca de 65% da massa inicial (**Tabelas 20 e 21**). A precipitação/purificação de SPF2u (**Figura 59**) resultou similar a SPF2, apenas o rendimento de pp2 se mostrou menor provavelmente porque a quantidade de tetranortriterpenoides presente na amostra é inferior à SPF2 (**Tabela 22**).

5.5.4 Conclusão e desdobramentos da precipitação/purificação de SPF2

O processo apresentou resultados satisfatórios com a obtenção de amostras com o 7-desacetóxi-7-oxogedunina e o 6 α -acetoxigedunina com majoritários. O desdobramento necessário para este protocolo é a determinação da solubilidade de cada tetranortriterpenoide em metanol. Conhecendo-se as quantidades destes na amostra, seria possível projetar o uso de volumes apropriados de metanol para maximizar a precipitação/purificação.

5.6 COLUNA PARA O ISOLAMENTO DE TETRANORTRITERPENOIDES.

5.6.1 Metodologia

5.6.1.1 *Otimização da coluna*

Para o isolamento de tetranortriterpenoides foi utilizada uma coluna cromatográfica de fase reversa. A fase estacionária utilizada foi a LiChroprep RP-18 (Merck, Darmstad, Alemanha). A não ser quando indicado, a fase estacionária foi condicionada em fase móvel e a amostra foi dissolvida no menor volume possível de CH₃CN e aplicada sobre a fase estacionária. Foram realizadas 11 colunas, visando conhecer e otimizar o processo. As fases móveis utilizadas foram compostas por acetonitrila, água e metanol; e as proporções utilizadas foram baseadas no planejamento experimental para o desenvolvimento de método analítico para CLAE-DAF (apresentado a seguir). A amostra utilizada foi o PPTn e uma amostra derivada de estudos de cristalização, denominada CTn com perfil similar a PPTn. O **Quadro 19** apresenta as variáveis otimizadas nas diferentes colunas.

Quadro 19 - Experimentos de coluna de fase reversa.

Experimento	Fase móvel*	Frações	Massa da fase (g)	Massa da amostra (mg)	Amostra	Observações
I	21:43:36	5 ml F1-F8 (total 40 ml)	1	50	SPF2	
II	21:43:36	5 ml F1-F8 (total 40 ml) 10 ml F9 (MeCN)	1	10	SPF2	
III	21:43:36	5 ml F1-F12 (total 60 ml) 10 ml F13 (MeCN)	2	10	SPF2	
IV	21:43:36	10ml F1-F2 5ml F3-F11 (total 65 ml) 10 ml F12 (MeCN)	2	10	PPTn	
V	21:43:36	30 ml F1 5 ml F2-F11 20 ml F12 (total 100 ml) 10 ml F13 (MeCN)	2	10	PPTn	Velocidade de 0,09 cm/s
VI	18,6:44:37,4	40 ml F1 5 ml F2-F11 (total 100 ml) 10 ml F12-F13 (MeCN)	2	10	PPTn	Velocidade de 0,09 cm/s
VII	18,6:44:37,4	65 ml F1 5 ml F2 40 ml F3 (total 110 ml) 10 ml F4 (MeCN)	2	10	PPTn	Velocidade de 0,09 cm/s
VIII	18,6:44:37,4	40 ml F1 5 ml F2-F11 (total 100 ml) 10 ml F12-F13 (MeCN)	2	35	PPTn	Velocidade de 0,09 cm/s
IX	18,6:44:37,4	40 ml F1 10 ml F2-F3 5 ml F4-F13 10 ml F14-F15 45 ml F16 (total 175 ml) 10 ml F17-F18 (MeCN)	4	20	PPTn	Velocidade de 0,09 cm/s
X	18,6:44:37,4	90 ml F1 1 ml F2-F6 35 ml F7 10 ml F8-F11 (total 170 ml) 10 ml F2 (MeCN)	4	20	PPTn	Velocidade de 0,09 cm/s
XI	18,6:44:37,4	20 ml F1 5 ml F2-F7 10 ml F8-F9 (total 70 ml) 10 ml F10 (MeCN)	1	5	PPTn	Velocidade de 0,09 cm/s

5.6.1.2 Aumento de escala da coluna para isolamento do tetranortriterpenoides

A escala da coluna de isolamento de tetranortriterpenoides foi aumentada em quatro experimentos. O cálculo de aumento de escala foi realizado de forma similar ao item 5.2.14. A fase móvel utilizada foi acetonitrila/água/metanol 18,6:44:37,4 com velocidade linear de 0,09 cm/s. O **Quadro 20** descreve as condições de cada coluna.

Quadro 20 - Aumento de escala da coluna de fase reversa

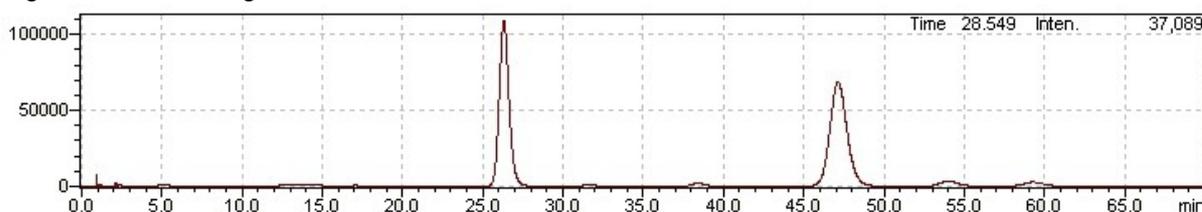
Experimento	A	B	C	D
Aumento de escala	16x	128x	128x	128x
Área transversal	2,544 cm ²	7,163 cm ²	7,163 cm ²	7,163 cm ²
Altura	30,8 cm	19,25 cm	19,25 cm	19,25 cm
Massa da fase	52,2 g	103,45 g	103,45 g	103,45 g
Massa da amostra	215 mg	517,25 mg	509,20 mg	200,1 mg
Frações	1504 ml (20 ml) F1 16 ml (20 ml) F2 880 F3 (Total 2400 ml) 160 ml F4 (MeCN)	3840 ml F1 640 ml F2 3200 ml F3 (Total 8960 ml) 1280 ml F4 (MeCN)	2000 ml F1 500 ml F2-F4 340 ml F5 640 ml F6 500 ml F7-F9 116 ml F10 (Total 6096) 1000 ml F11 (MeCN) 300 ml F12 (MeCN)	500 ml F1-F13 365 ml F14 (Total 6865) 1280 ml F15 (MeCN)

5.6.2 Resultados

5.6.2.1 Otimização da coluna

A **Figura 61** mostra um cromatograma da amostra CTn utilizada junto com o PPTn nas colunas de fase reversa.

Figura 61 - Cromatograma da amostra CTn.

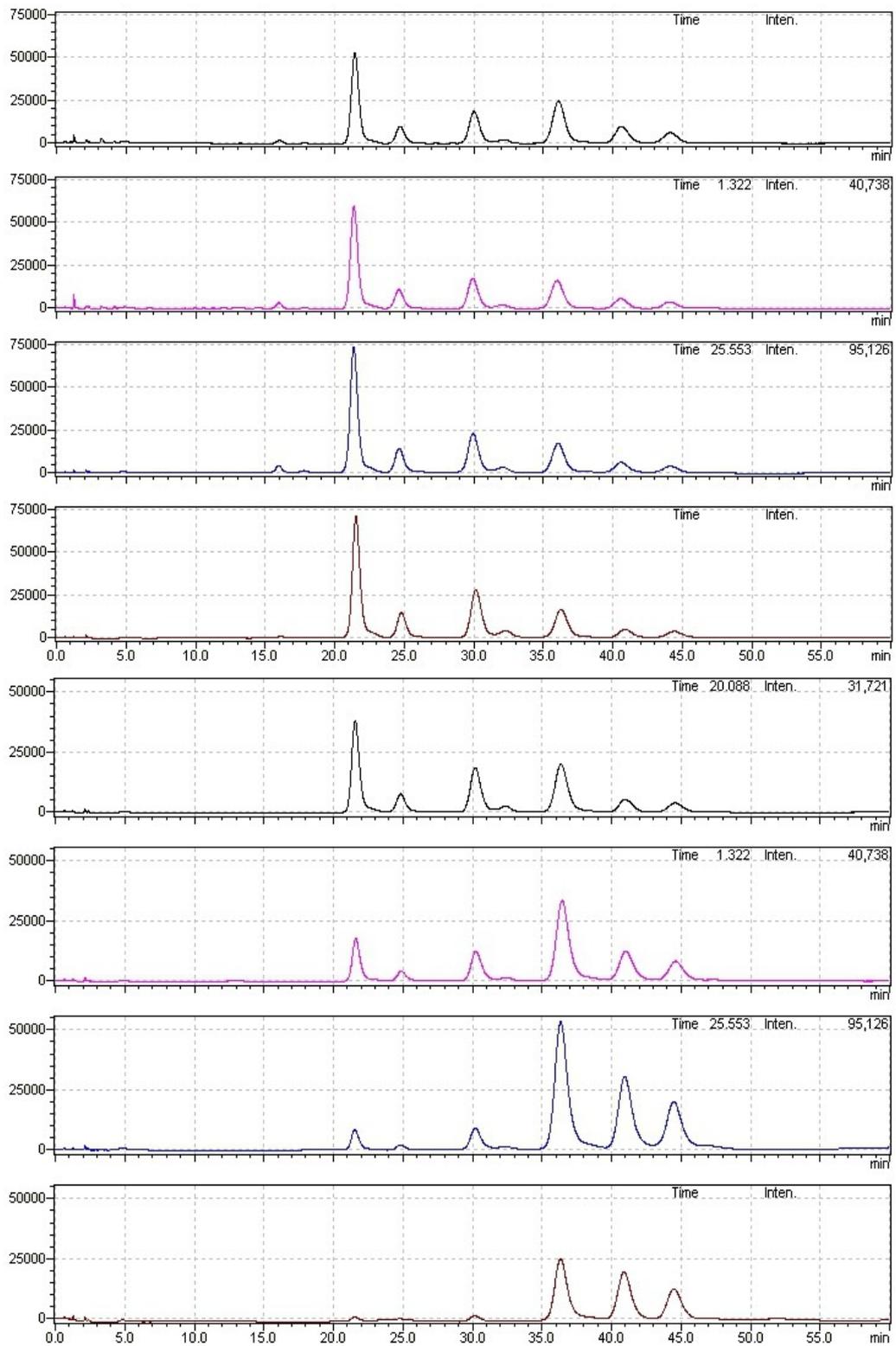


(Tappin, 2012)

Os resultados das onze colunas de fase reversa realizadas estão apresentados nos conjuntos de cromatogramas abaixo. As frações são

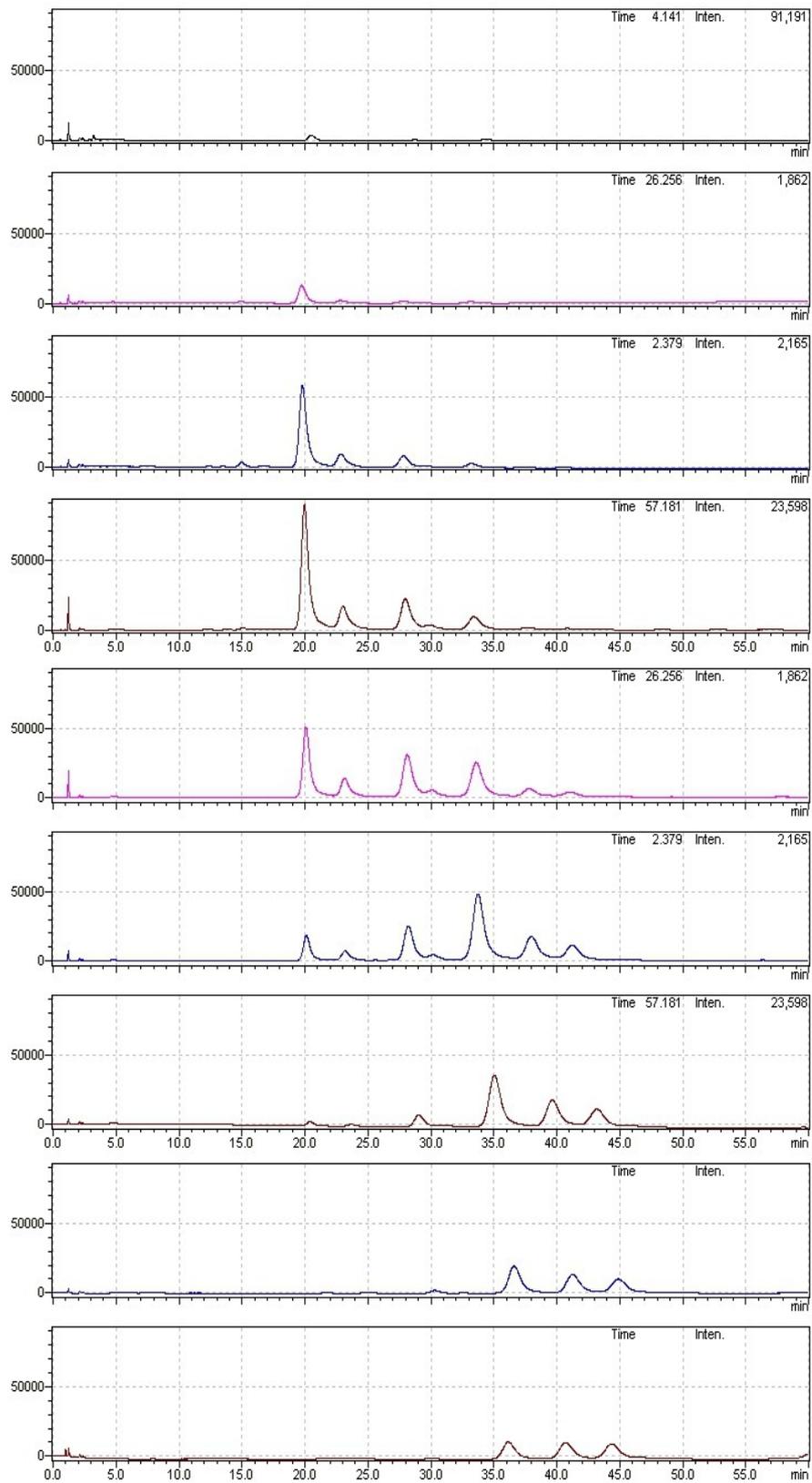
apresentadas na ordem de eluição.

Figura 62 - Cromatogramas das frações obtidas pela coluna de fase reversa.



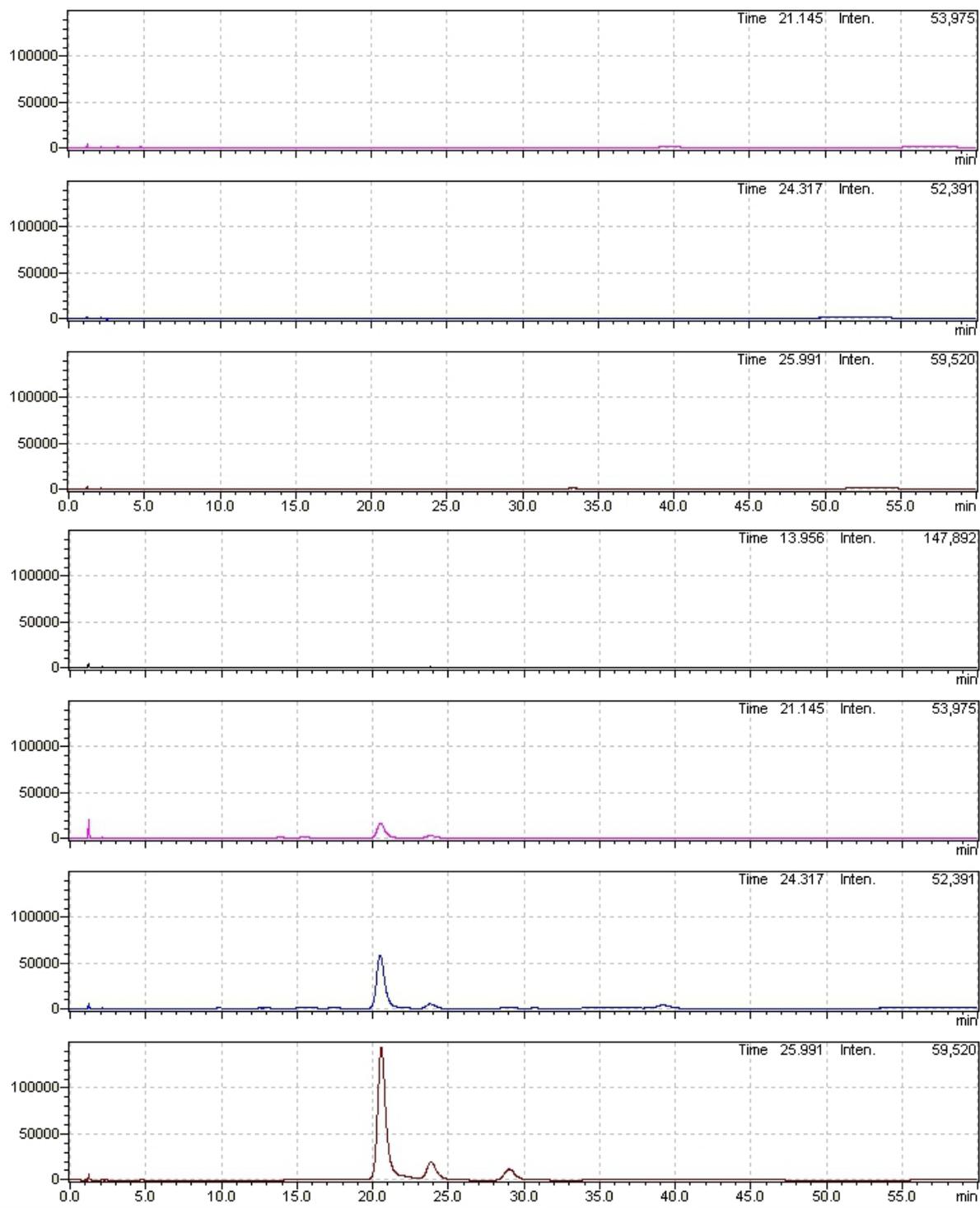
(Tappin, 2012)

Figura 63 - Cromatogramas das frações obtidas pela coluna de fase reversa II.



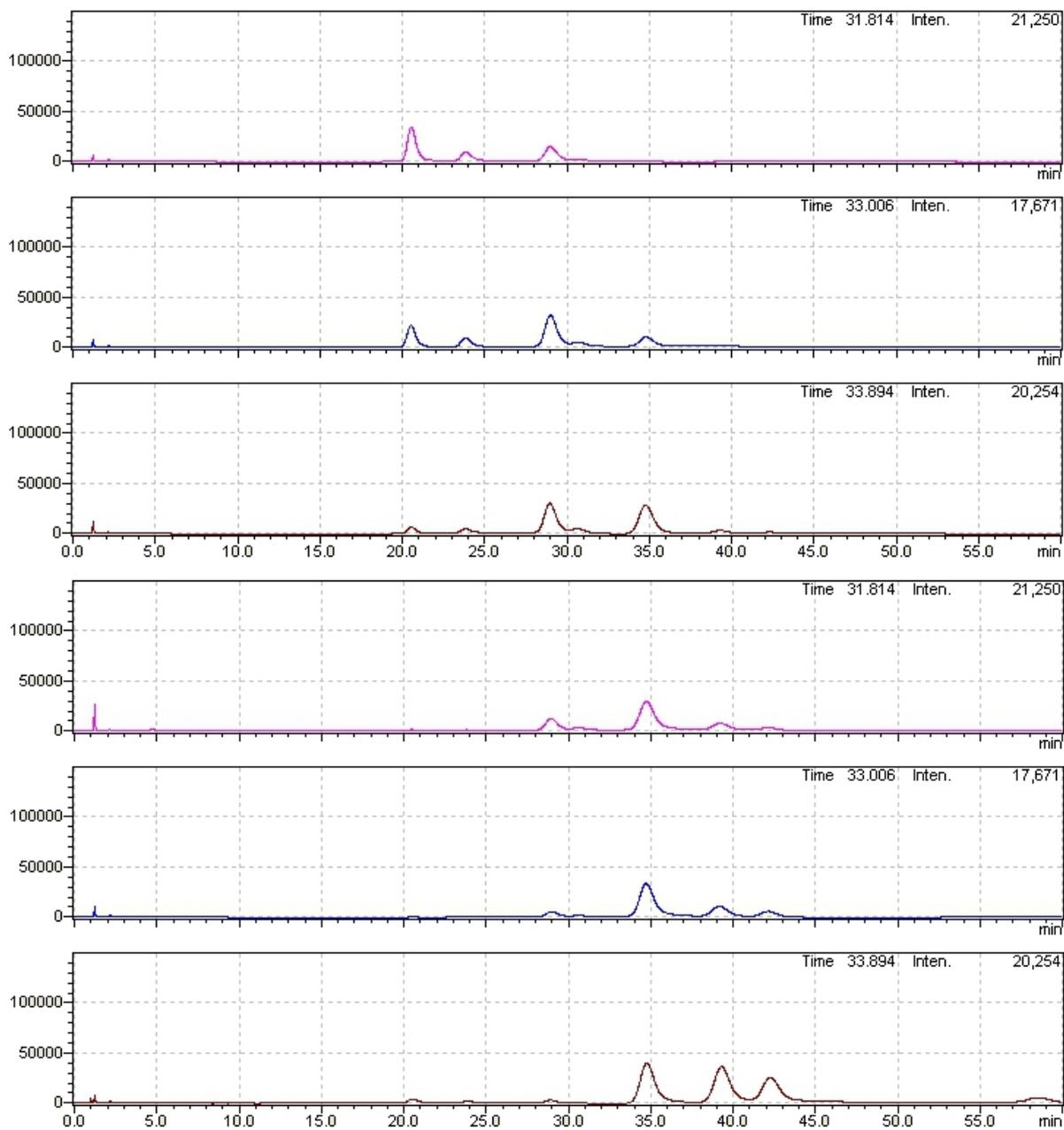
(Tappin, 2012)

Figura 64a - Cromatogramas das frações obtidas pela coluna de fase reversa III.



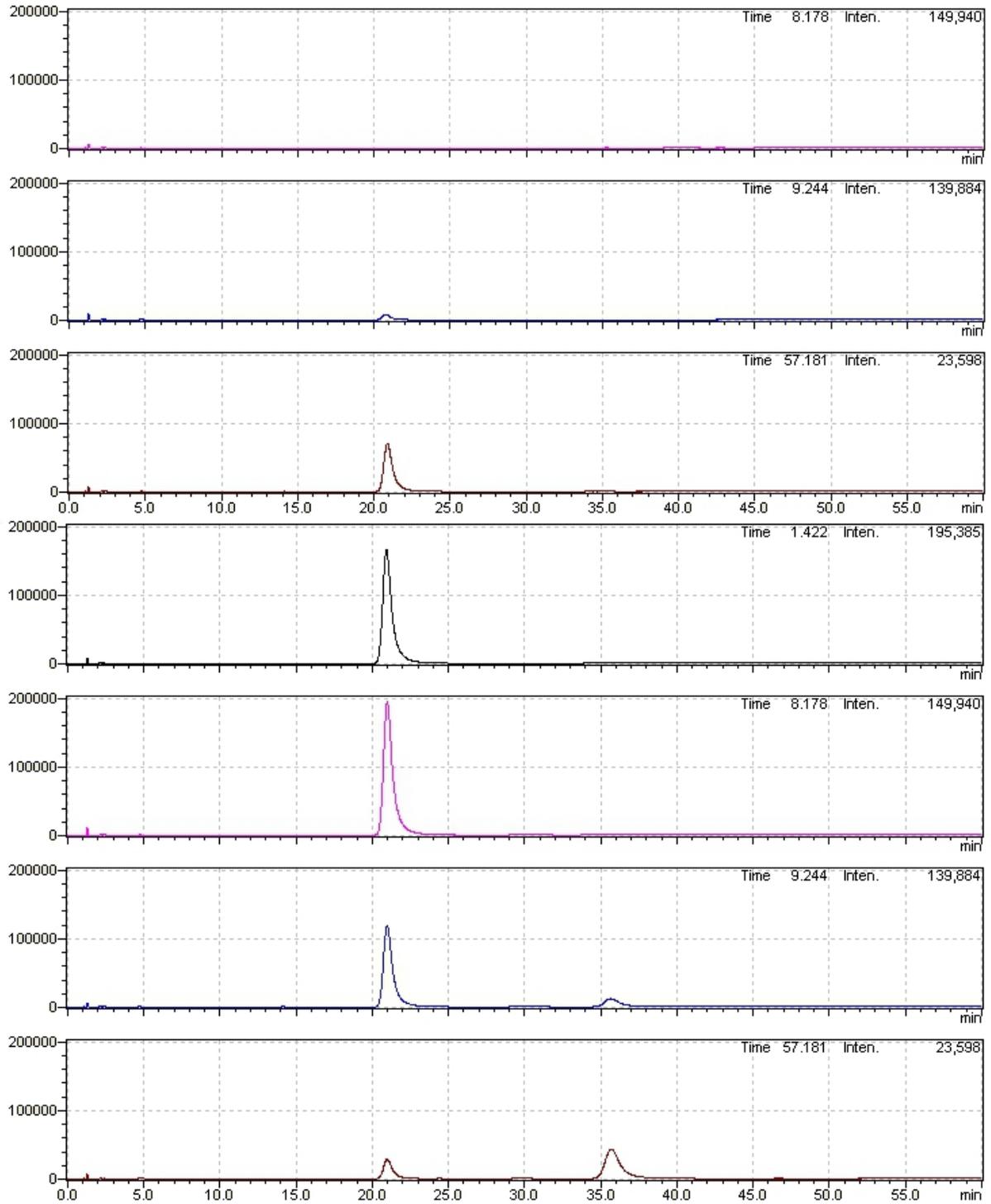
(Tappin, 2012)

Figura 64b: Cromatogramas das frações obtidas pela coluna de fase reversa III.



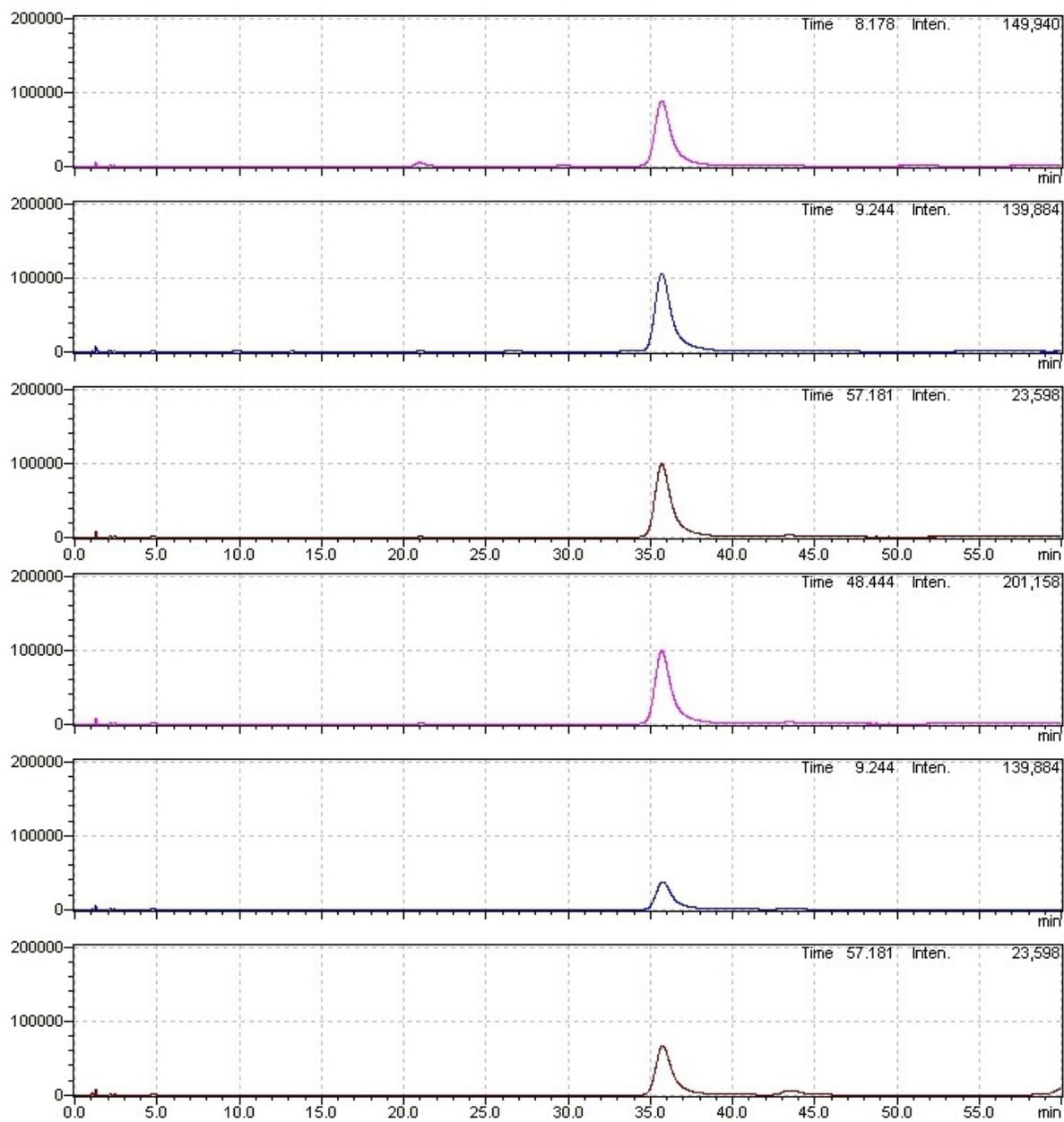
(Tappin, 2012)

Figura 65a - : Cromatogramas das frações obtidas pela coluna de fase reversa IV.



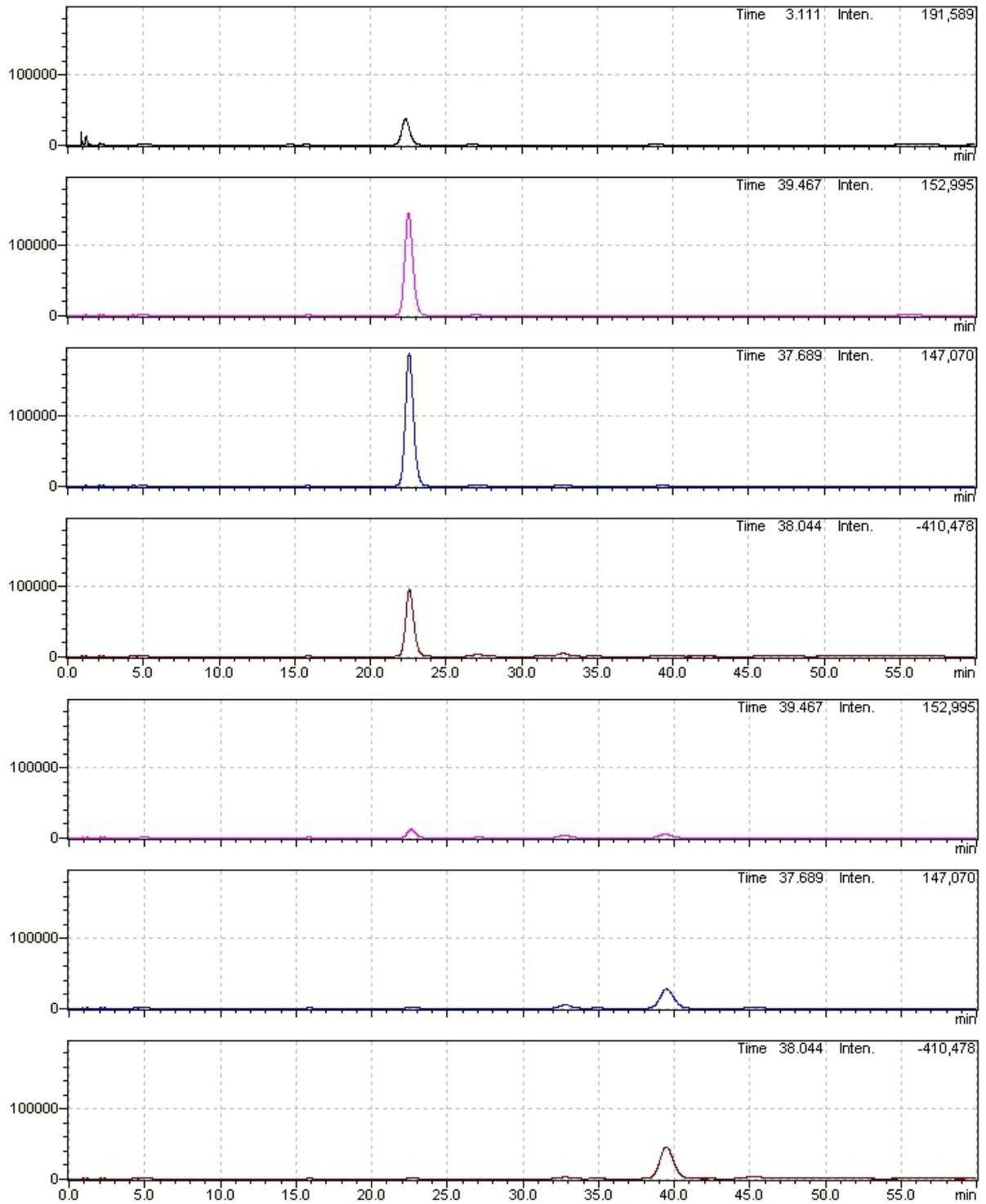
(Tappin, 2012)

Figura 65b - Cromatogramas das frações obtidas pela coluna de fase reversa IV.



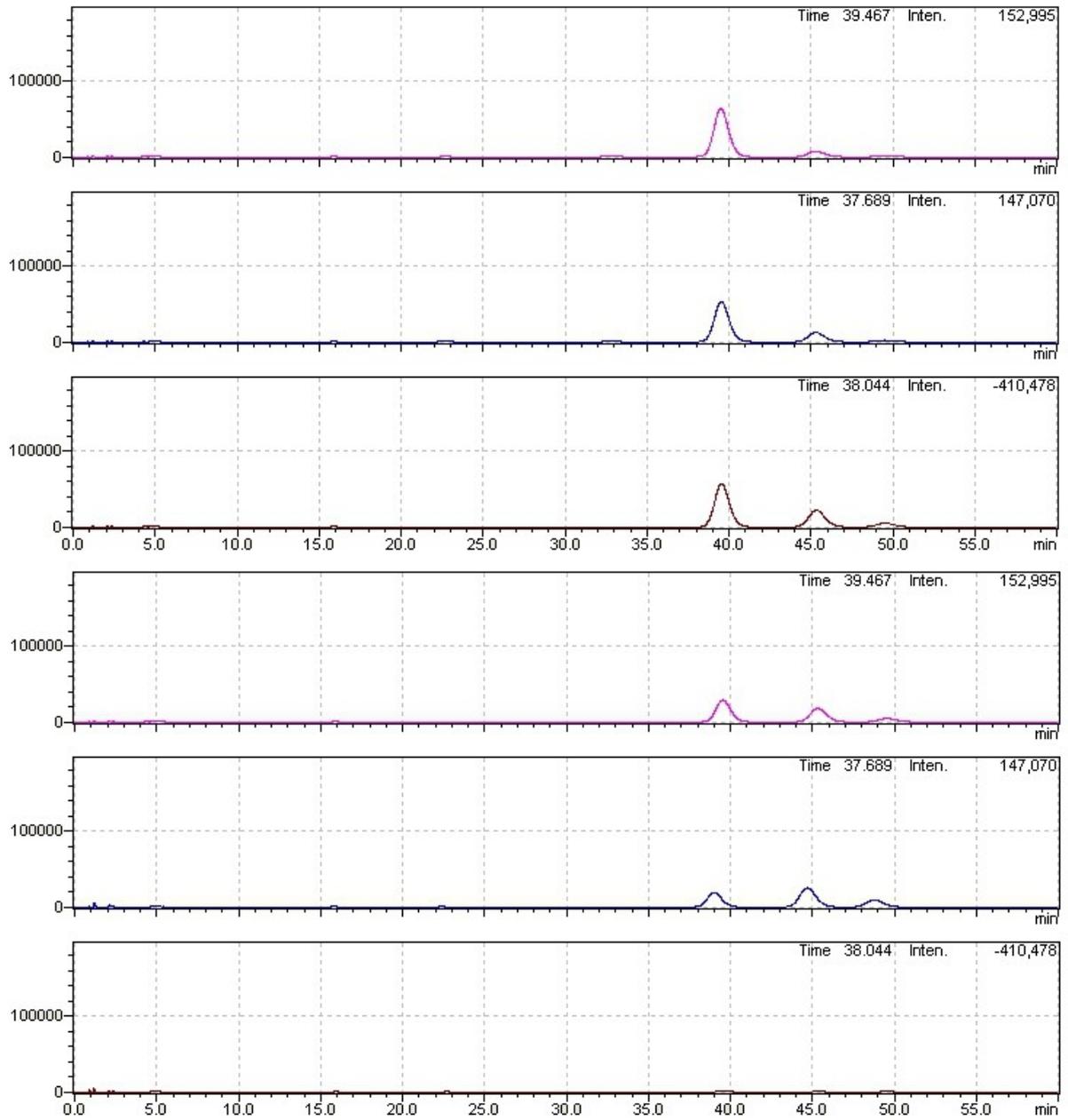
(Tappin, 2012)

Figura 66a - Cromatogramas das frações obtidas pela coluna de fase reversa V.



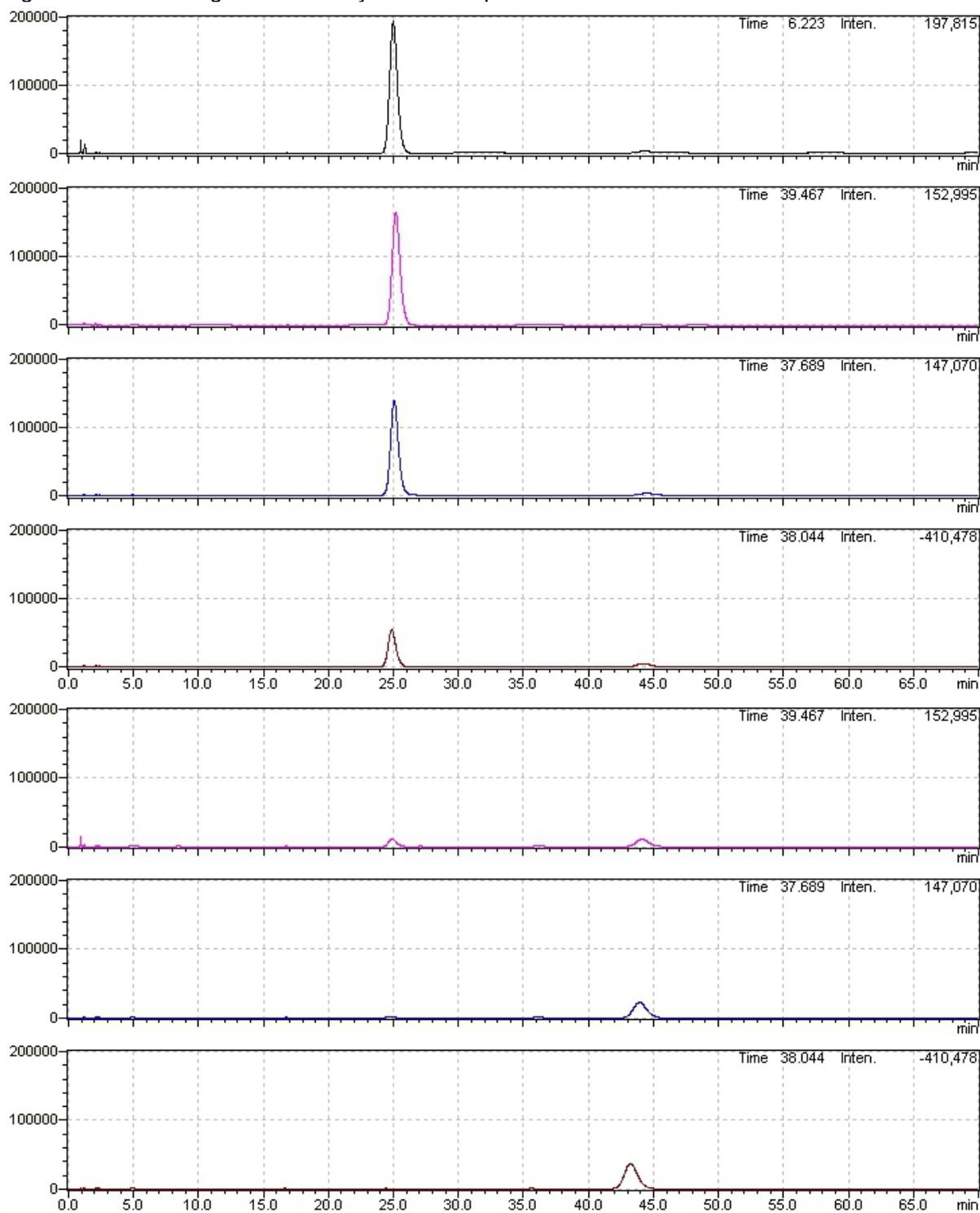
(Tappin, 2012)

Figura 66b - Cromatogramas das frações obtidas pela coluna de fase reversa V.



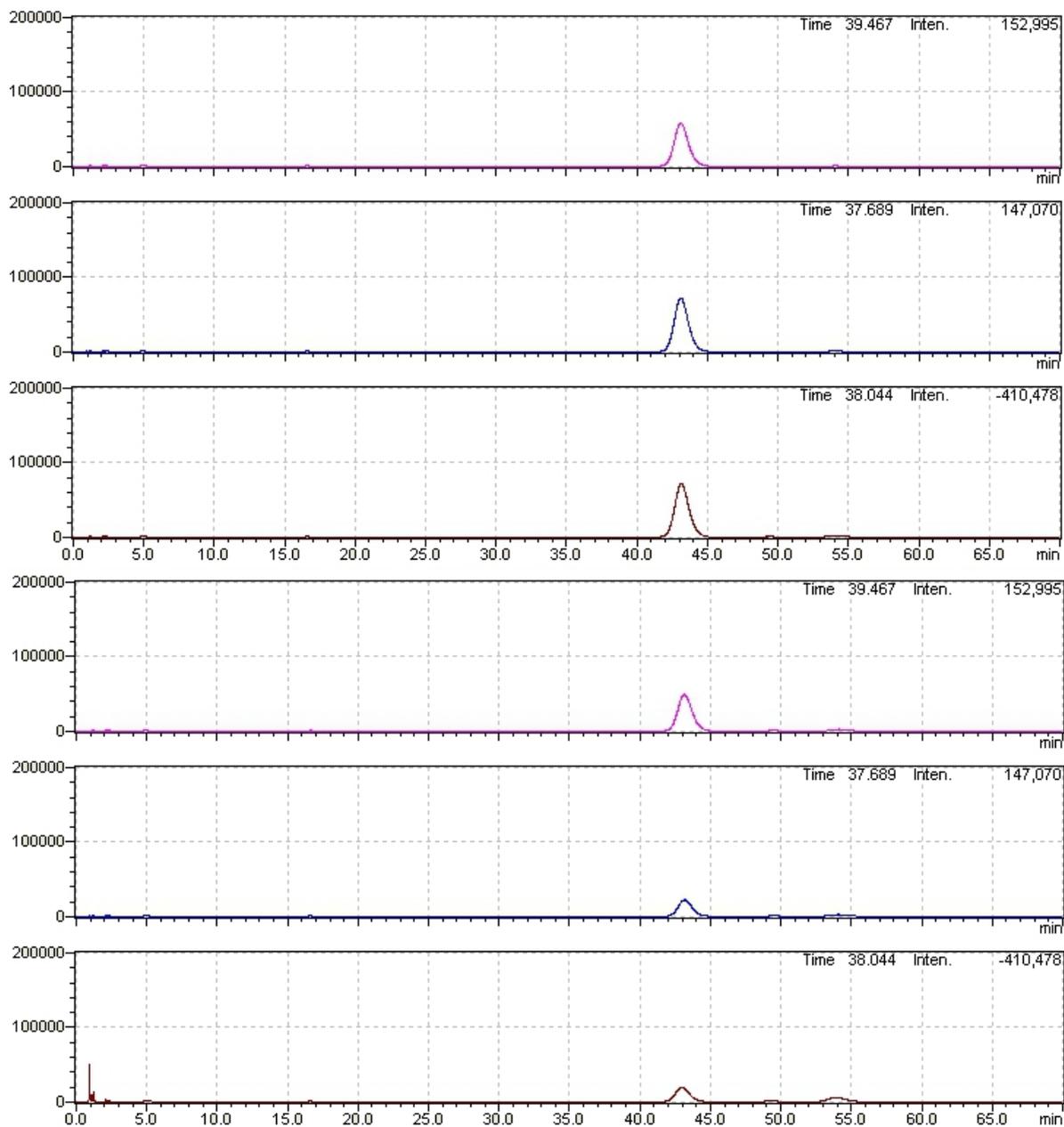
(Tappin, 2012)

Figura 67a - Cromatogramas das frações obtidas pela coluna de fase reversa VI.



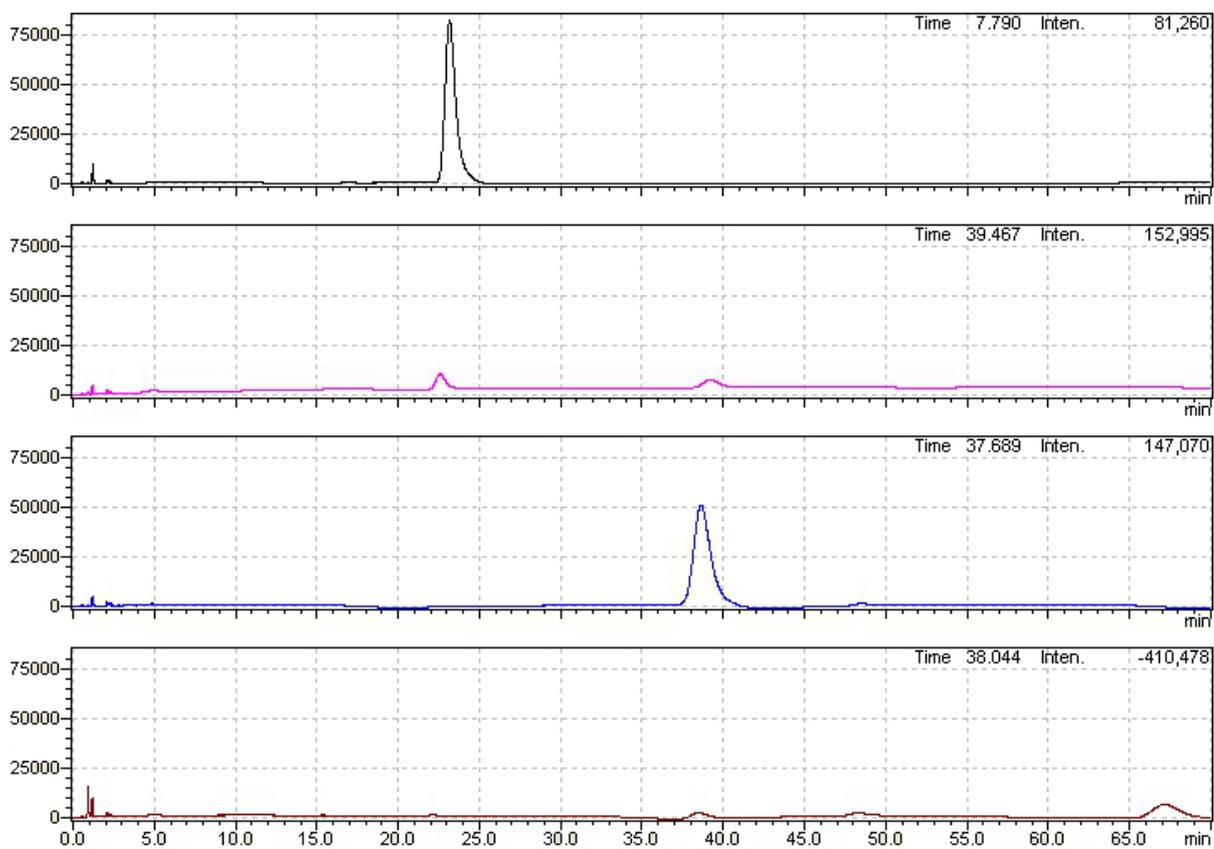
(Tappin, 2012)

Figura 67b - Cromatogramas das frações obtidas pela coluna de fase reversa VI.



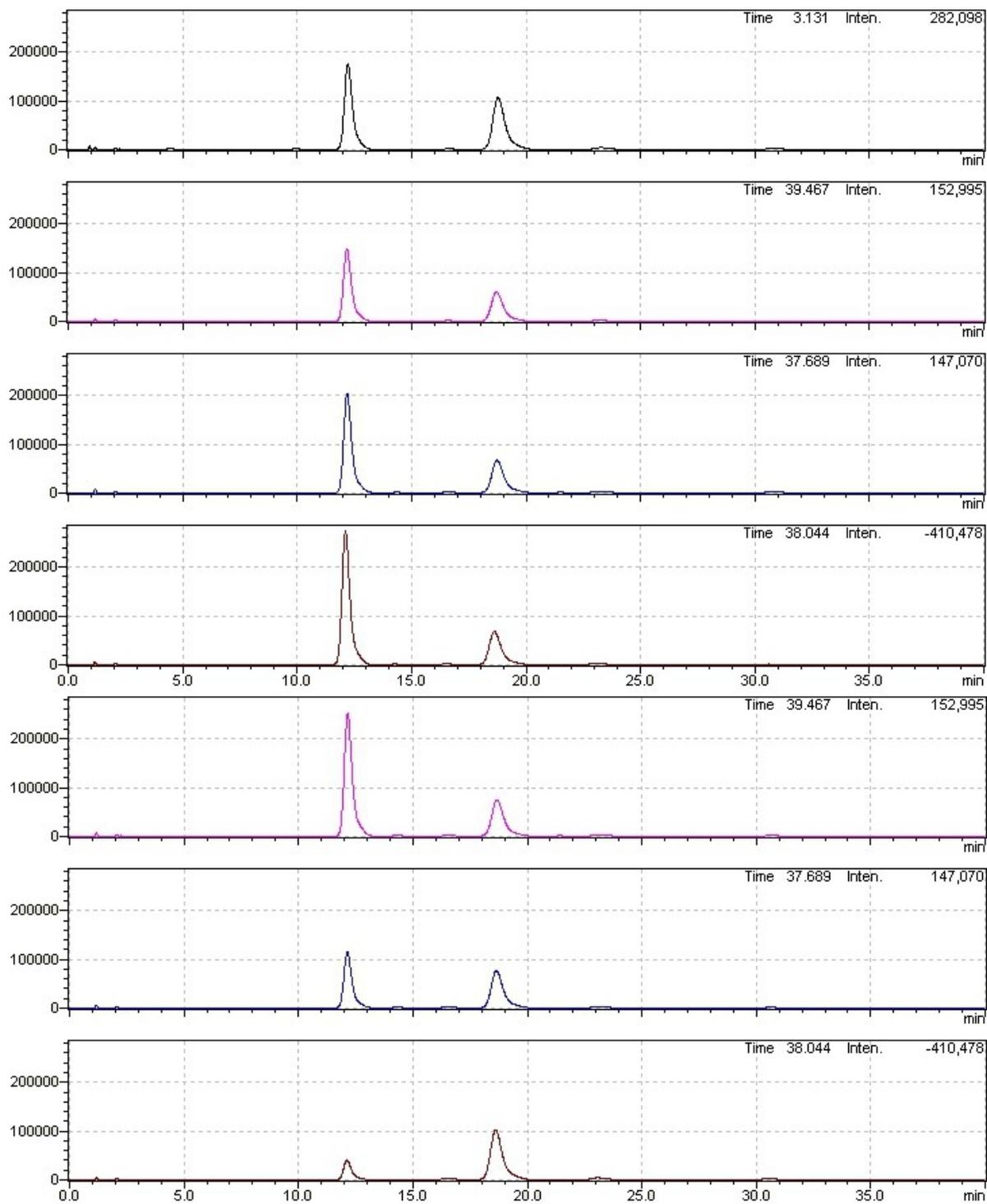
(Tappin, 2012)

Figura 68 - Cromatogramas das frações obtidas pela coluna de fase reversa VII.



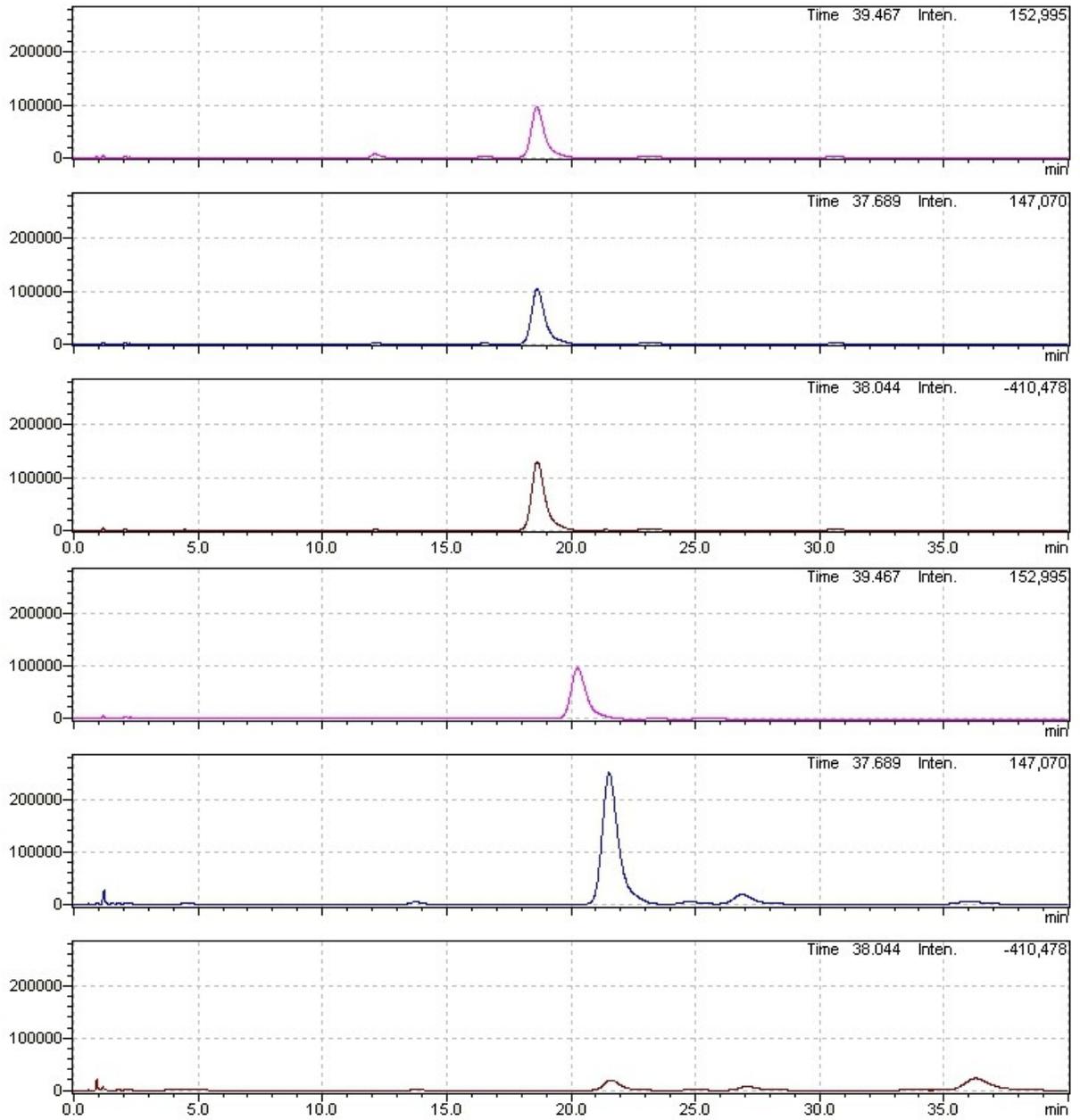
(Tappin, 2012)

Figura 69a - Cromatogramas das frações obtidas pela coluna de fase reversa VIII.



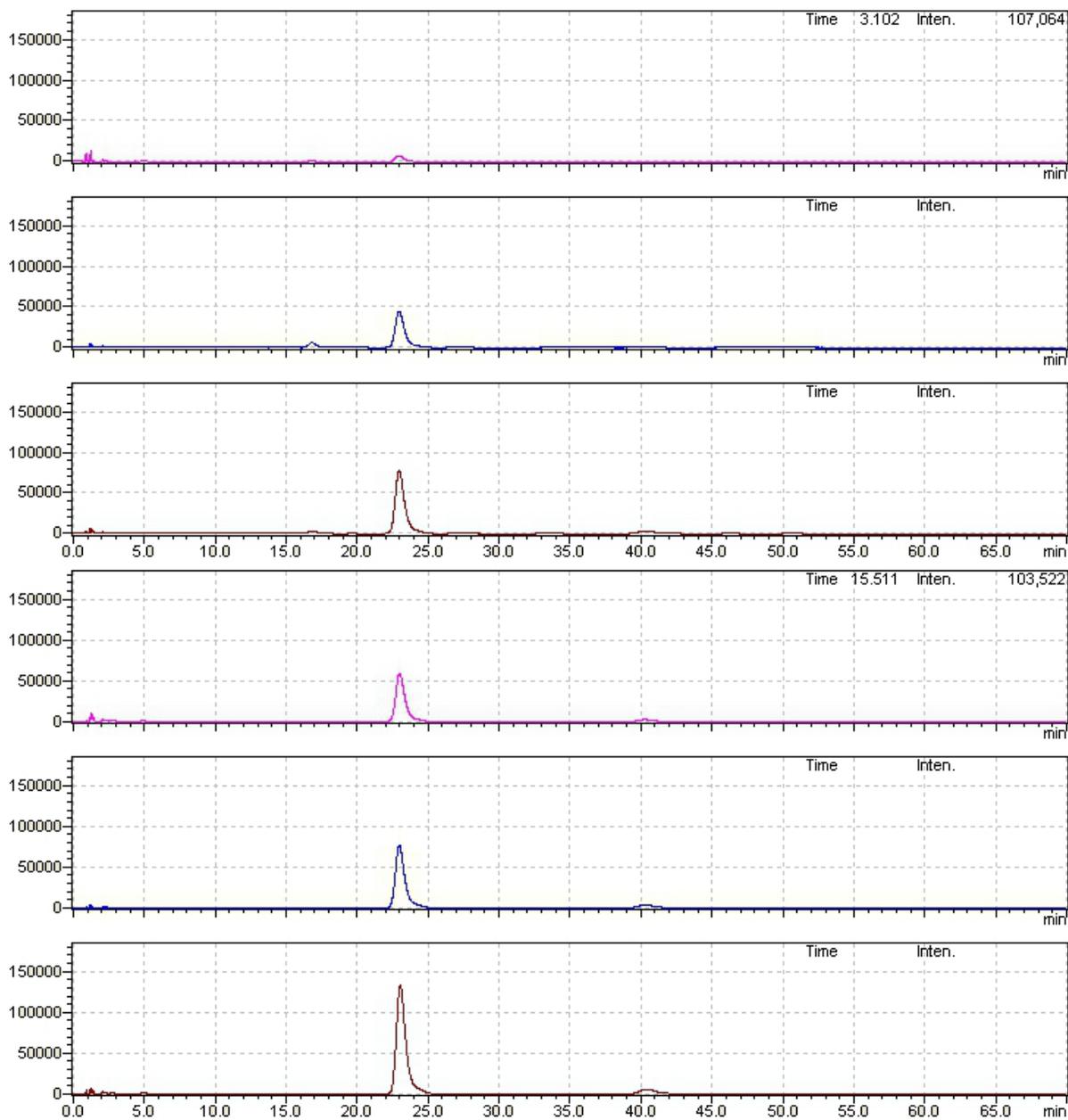
(Tappin, 2012)

Figura 69b - Cromatogramas das frações obtidas pela coluna de fase reversa VIII.



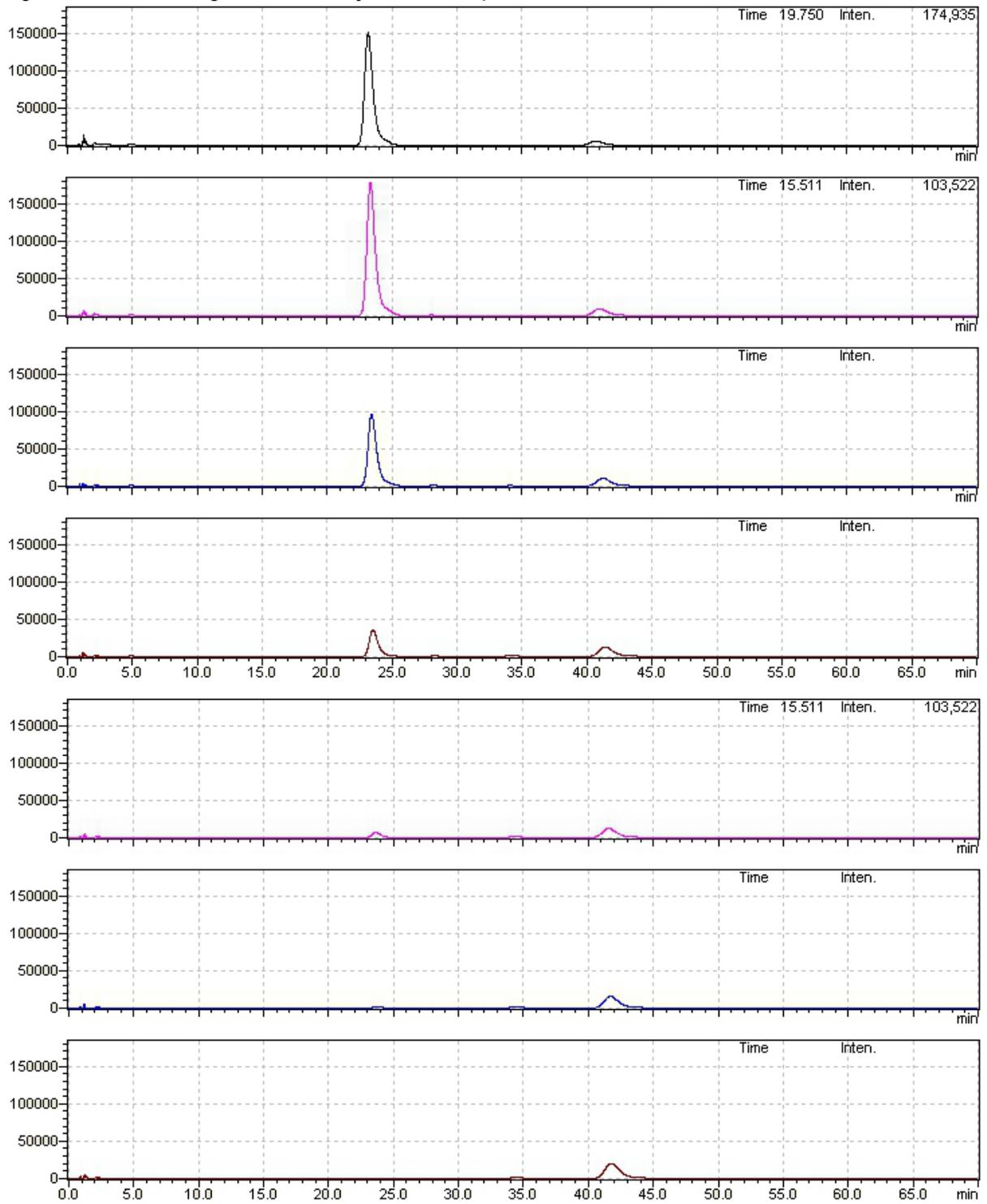
(Tappin, 2012)

Figura 70a - Cromatogramas das frações obtidas pela coluna de fase reversa IX.



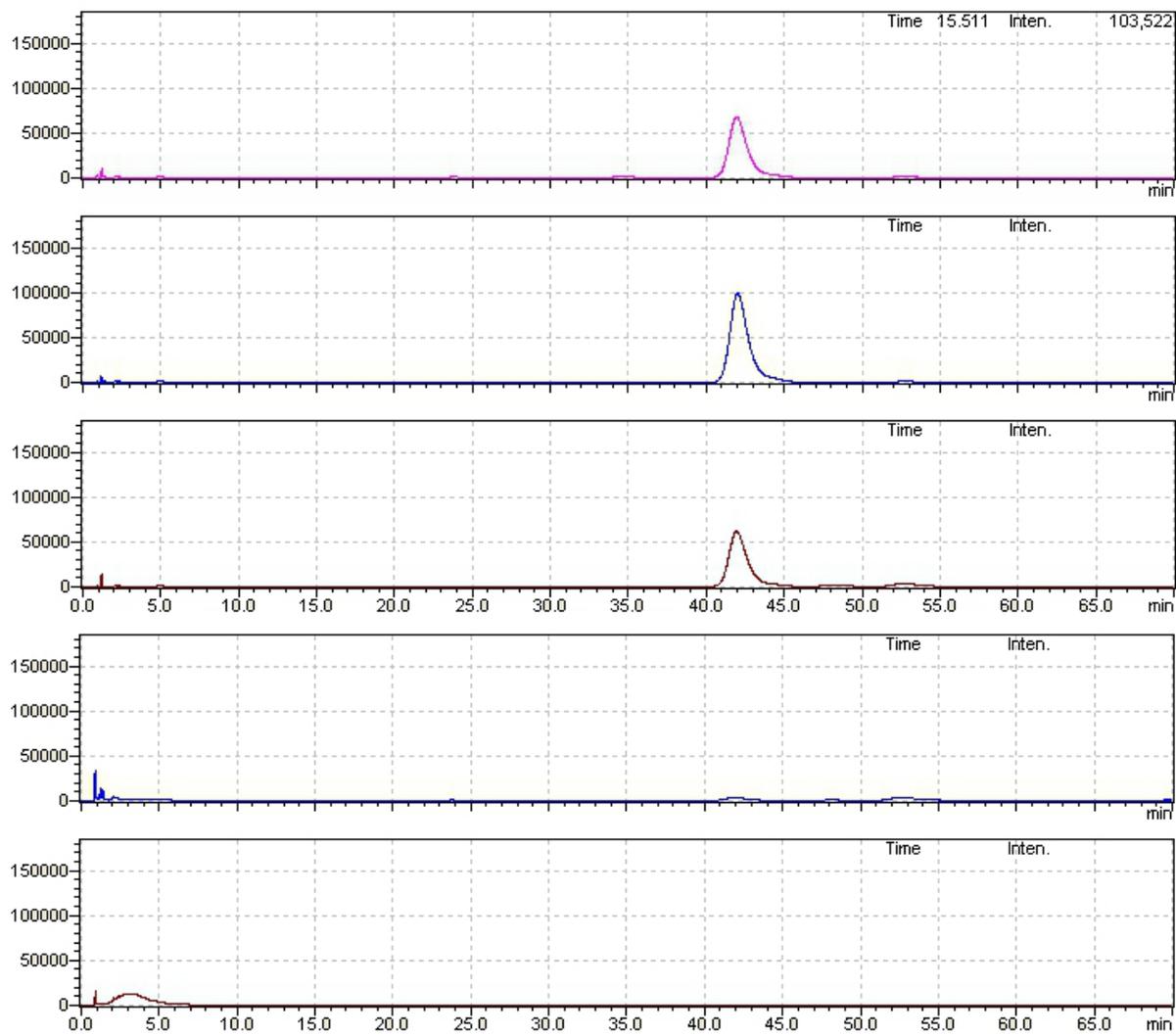
(Tappin, 2012)

Figura 70b - Cromatogramas das frações obtidas pela coluna de fase reversa IX.



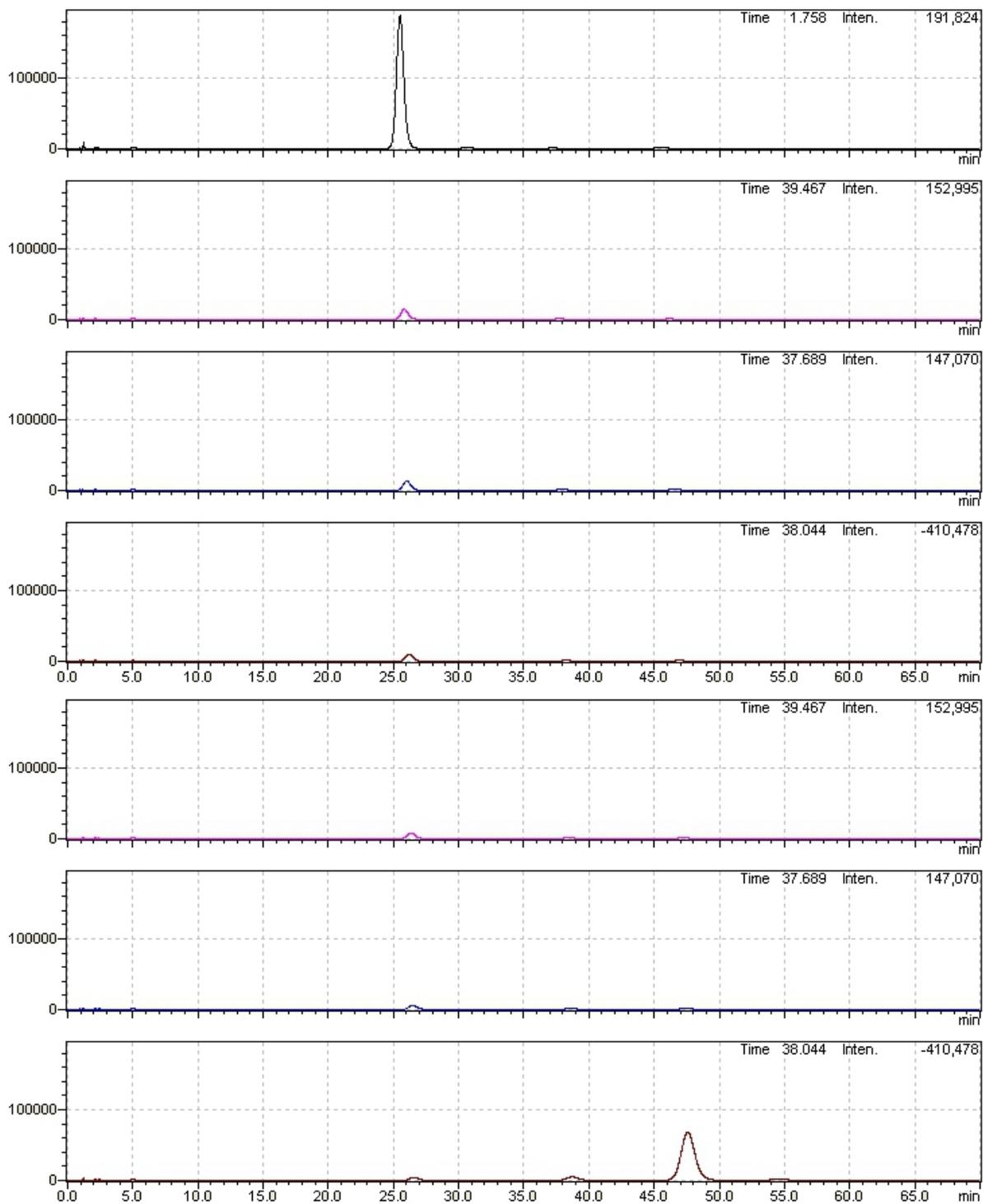
(Tappin, 2012)

Figura 70c - Cromatogramas das frações obtidas pela coluna de fase reversa IX.



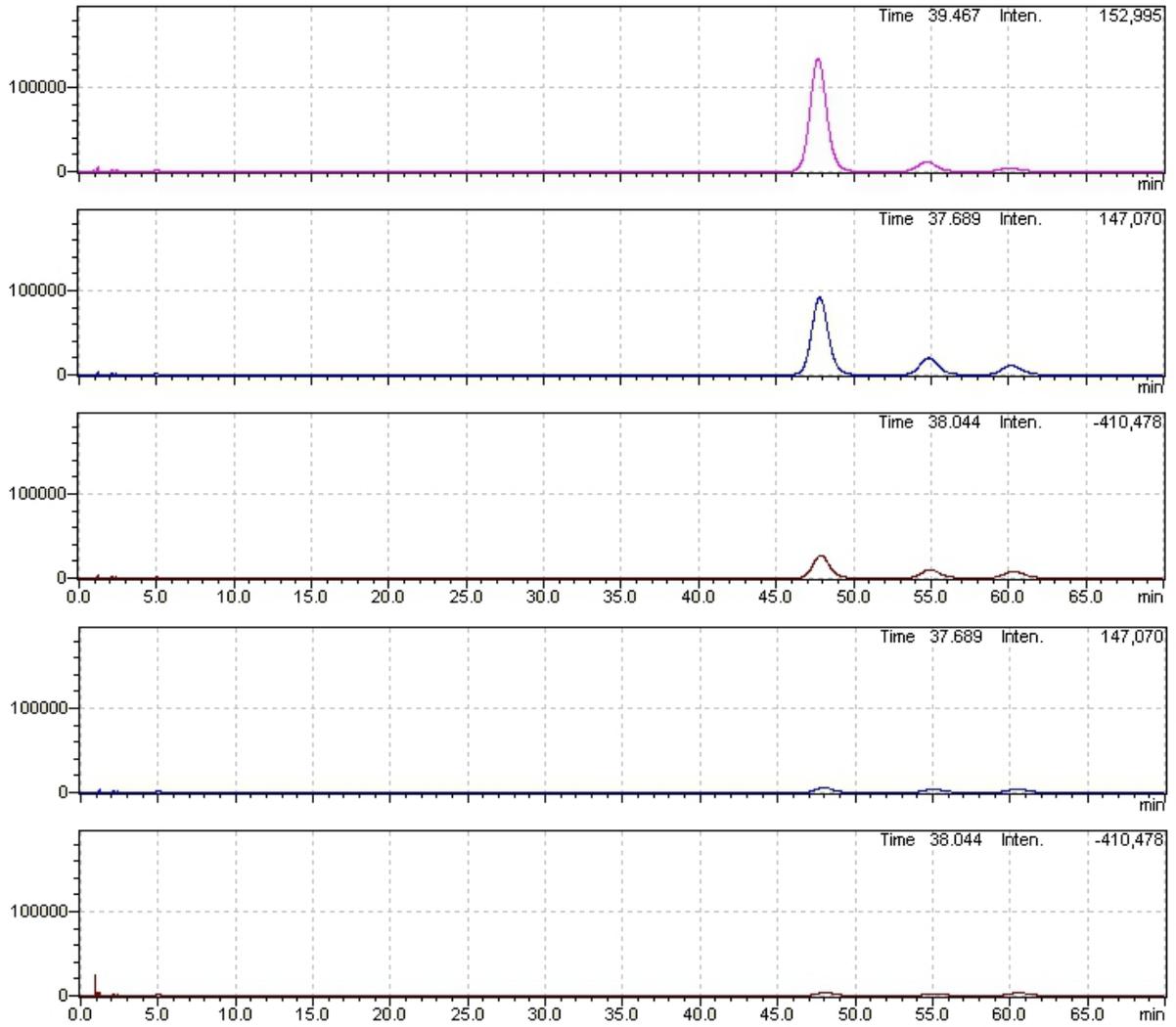
(Tappin, 2012)

Figura 71a - Cromatogramas das frações obtidas pela coluna de fase reversa X.



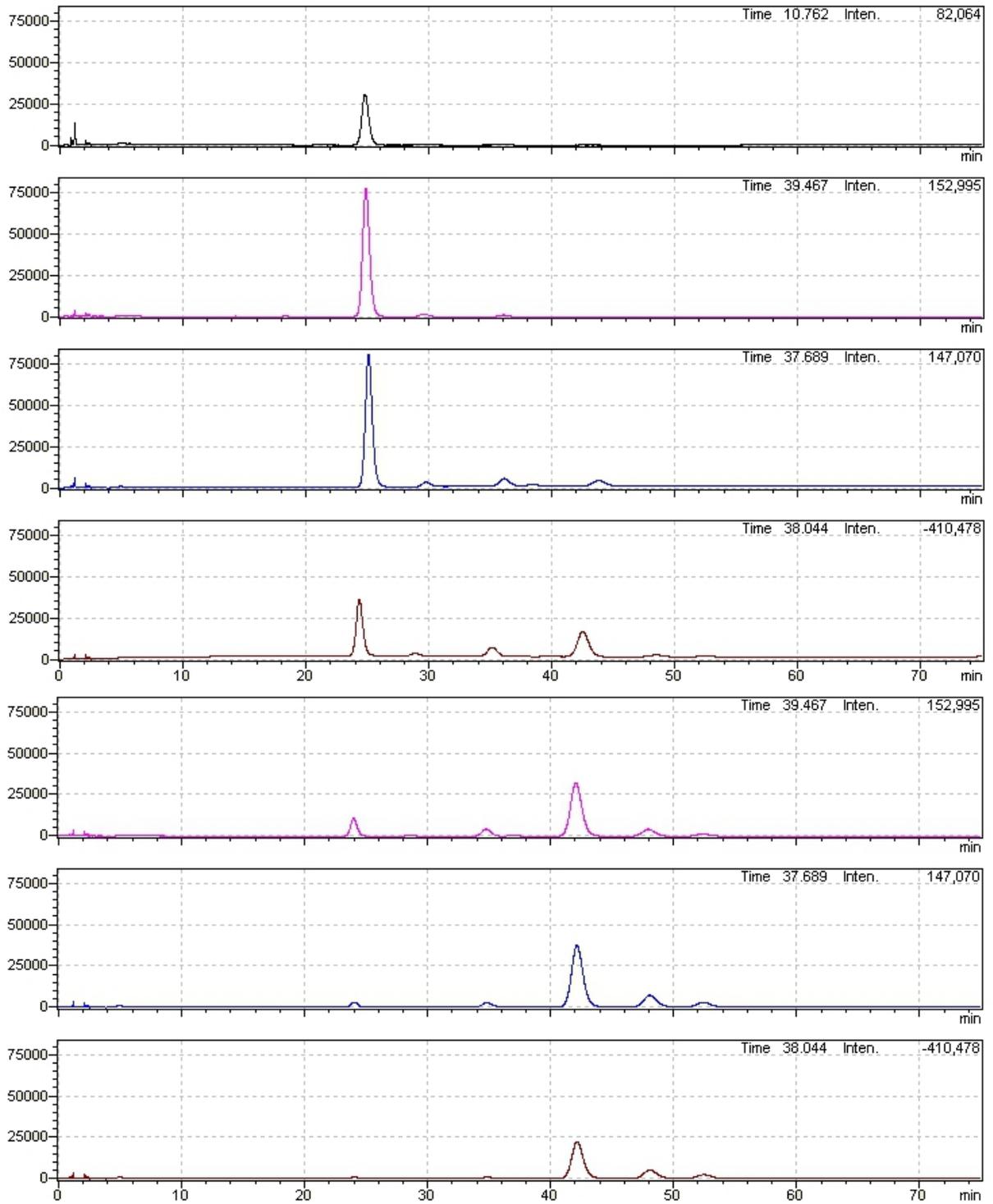
(Tappin, 2012)

Figura 71b - Cromatogramas das frações obtidas pela coluna de fase reversa X.



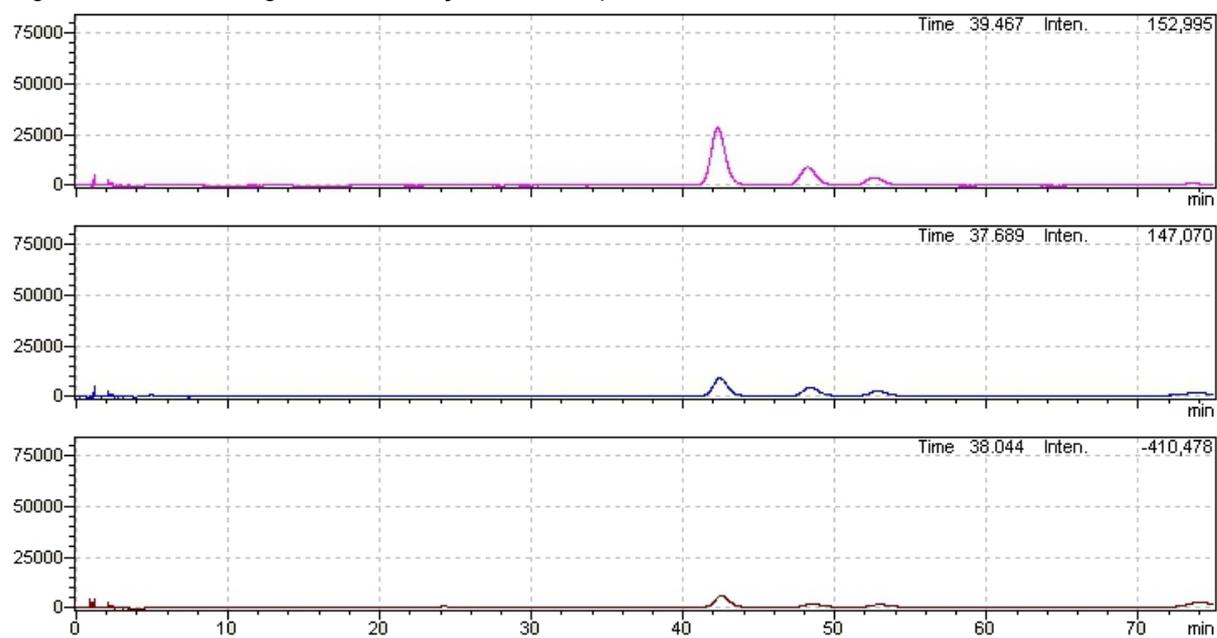
(Tappin, 2012)

Figura 72a - Cromatogramas das frações obtidas pela coluna de fase reversa XI.



(Tappin, 2012)

Figura 72b - Cromatogramas das frações obtidas pela coluna de fase reversa XI.



(Tappin, 2012)

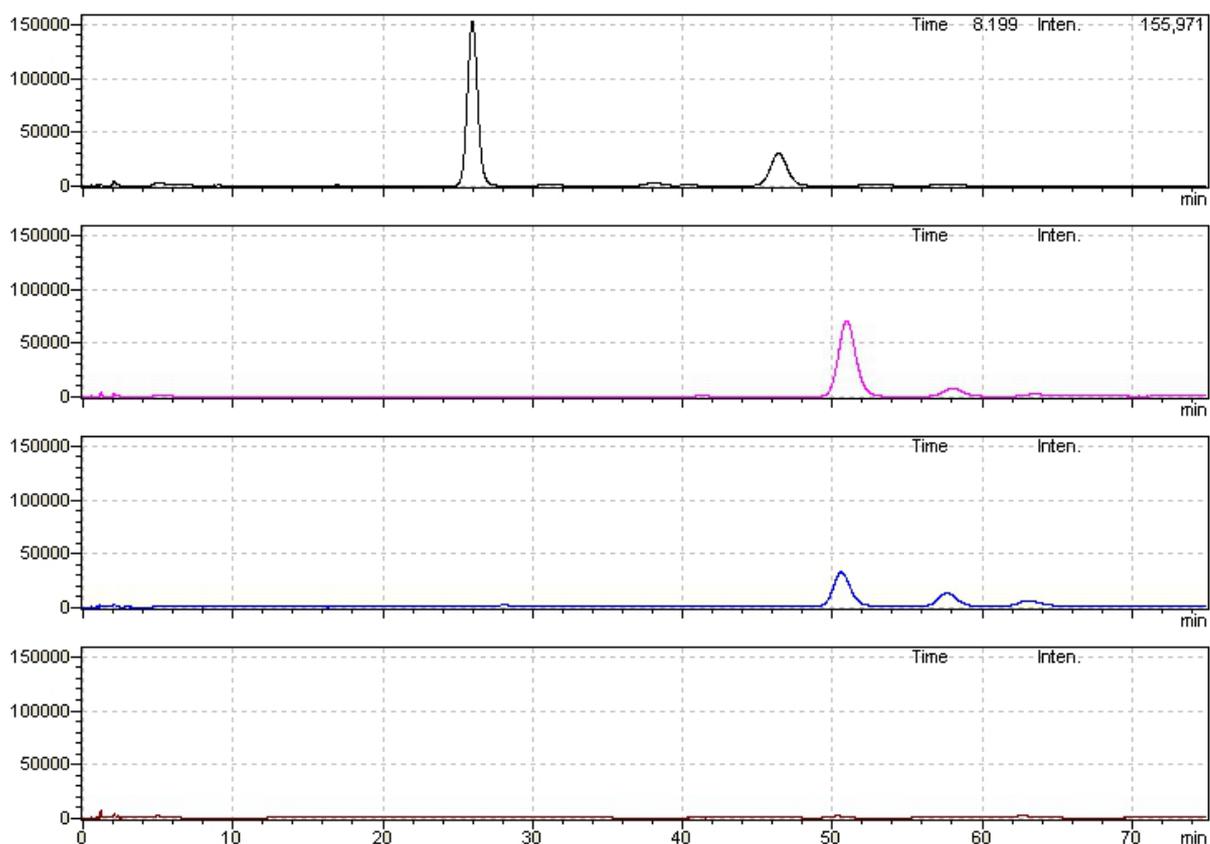
5.6.2.2 Aumento de escala da coluna para isolamento de tetranortriterpenoides.

Os resultados da coluna de aumento de escala estão apresentados a seguir. Não foi possível realizar a coluna A, pois a velocidade linear de 0,09 cm/s não foi atingida. Os resultados das demais colunas estão apresentados em seguida com a uma tabela de massas e rendimentos das frações e os cromatogramas de cada fração.

Tabela 23 - Massa e rendimento das frações da coluna B.

Fração	Massa (mg)	Rendimento (%)
F1	252,2	48,8
F2	52,8	10,2
F3	101,2	19,6
F4	3,7	0,7
Total	409,9	79,3

Figura 73 - Cromatogramas das frações da coluna B.

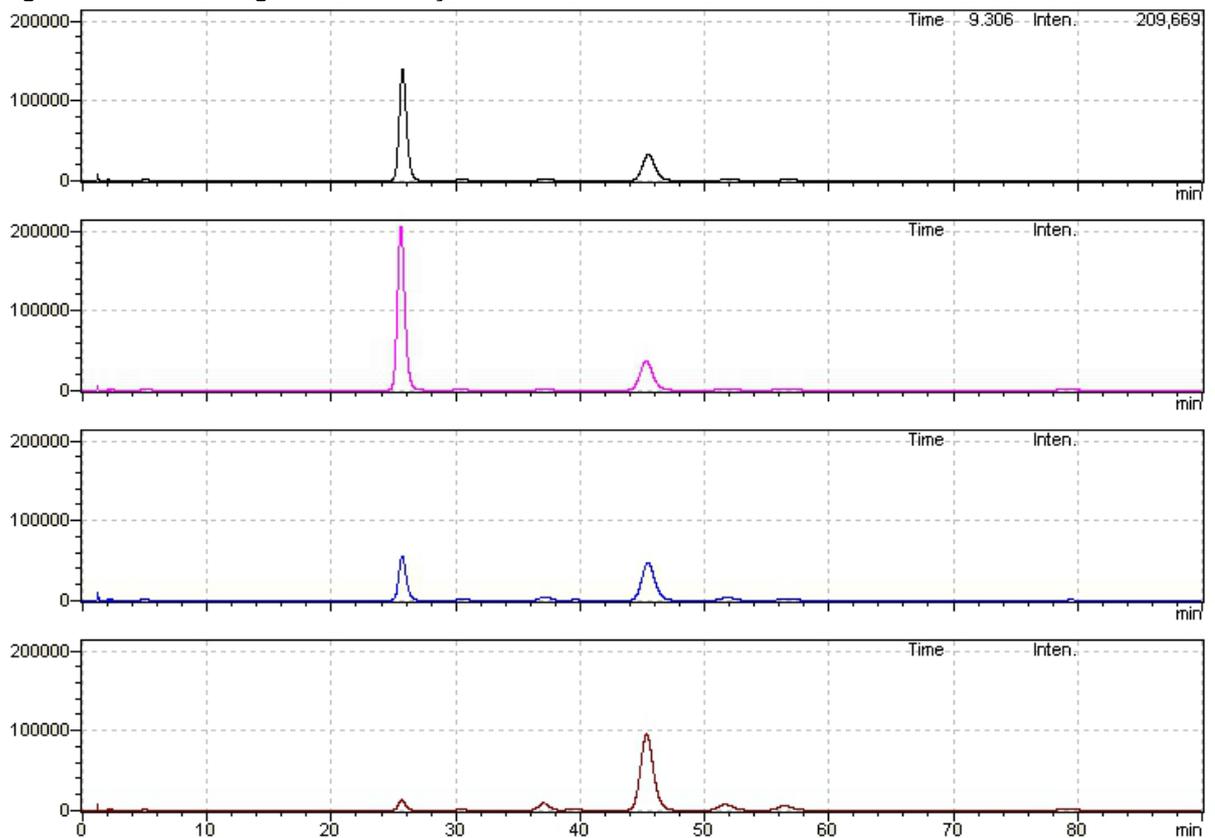


(Tappin, 2012)

Tabela 24 - Massa e rendimento das frações da coluna C.

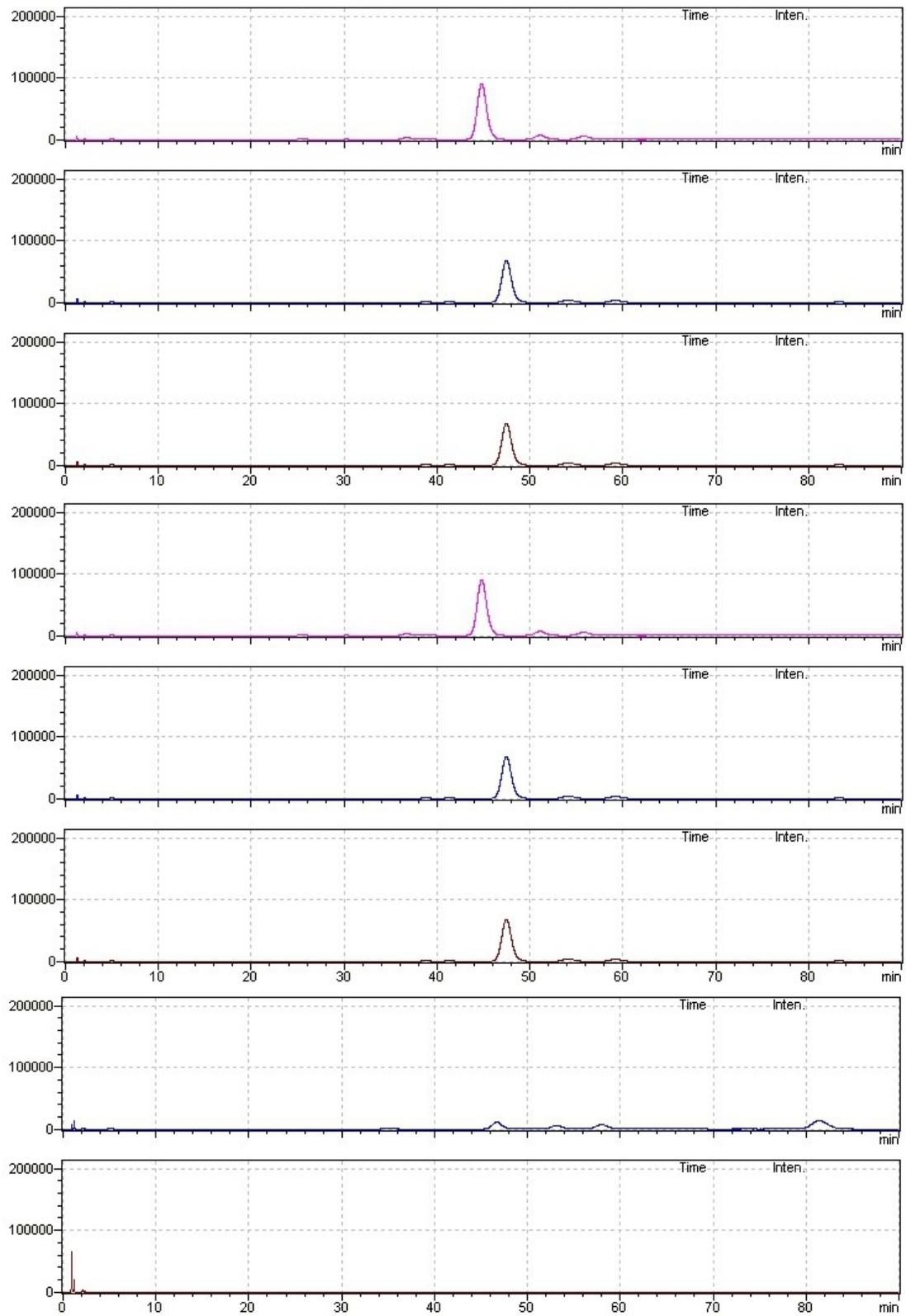
Fração	Massa (mg)	Rendimento (%)
F1	130	25,5
F2	49,2	9,7
F3	34,6	6,8
F4	29,3	5,8
F5	21,4	4,2
F6	40,9	8
F7	29,7	5,8
F8	18,1	3,6
F9	9	1,8
F10	8	1,6
F11	22	4,3
F12	2	0,4
Total	394,2	77,4

Figura 74a - Cromatogramas das frações da coluna C.



(Tappin, 2012)

Figura 74b - Cromatogramas das frações da coluna C.

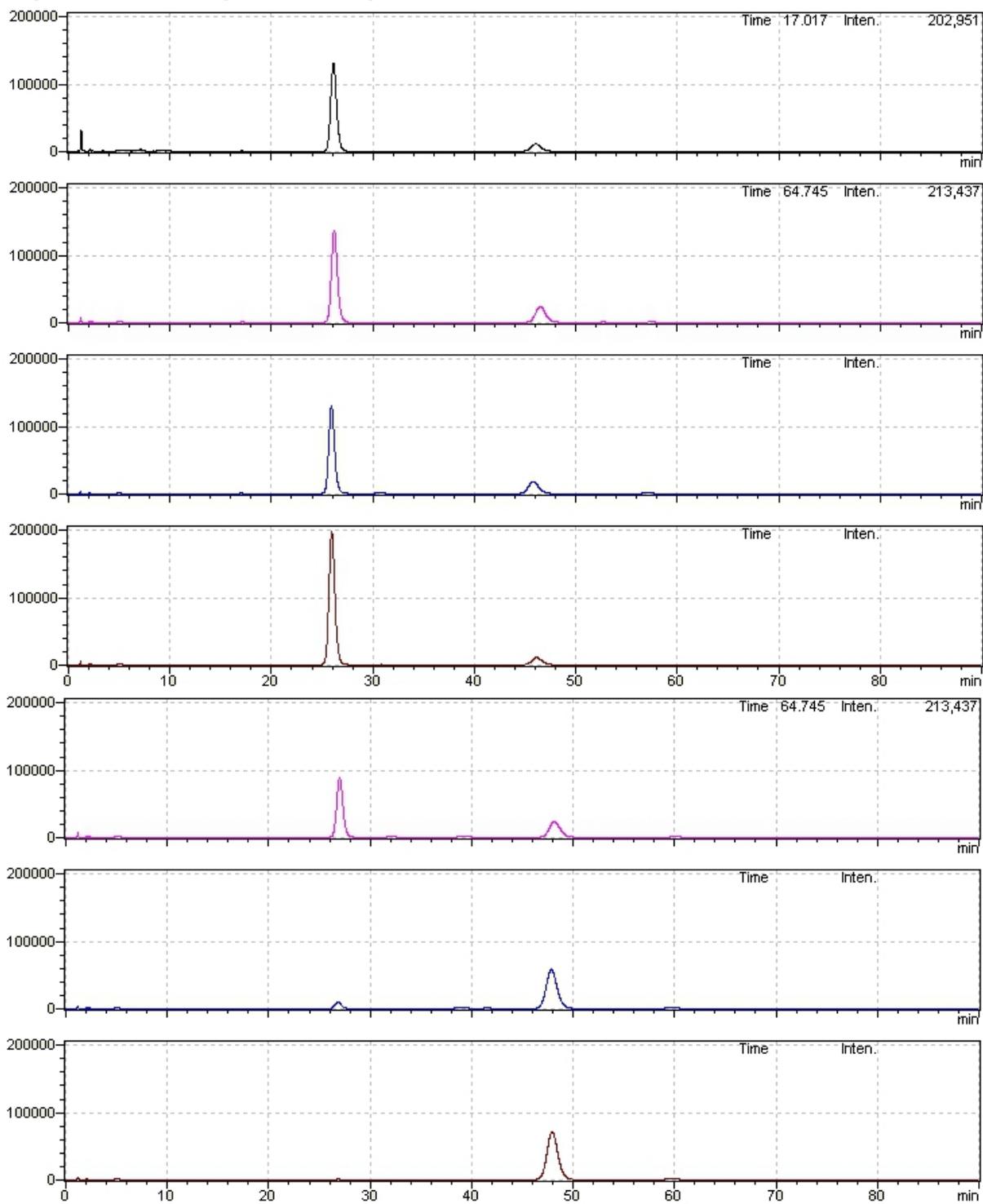


(Tappin, 2012)

Tabela 25 - Massa e rendimento das frações da coluna D.

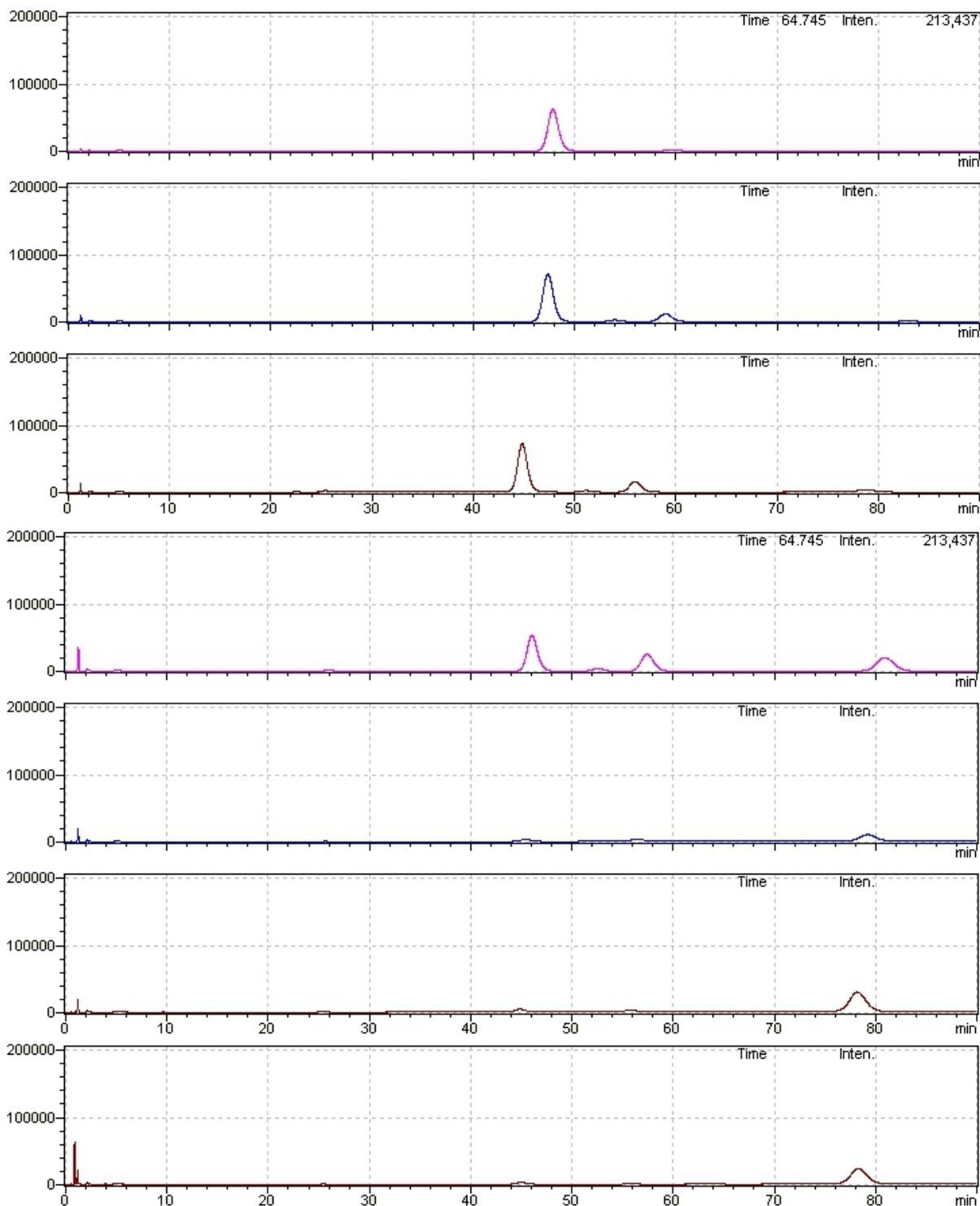
Fração	Massa (mg)	Rendimento (%)
F1	6	3
F2	12,9	6,4
F3	20,3	10,1
F4	40,3	20,1
F5	18	9
F6	14,4	7,2
F7	24,8	12,4
F8	28,3	14,1
F9	11	5,5
F10	4,7	2,3
F11	1,5	0,7
F12	3	1,5
F13	1,1	0,5
F14	7,3	3,6
Total	193,6	96,8

Figura 75a - Cromatogramas das frações da coluna D.



(Tappin, 2012)

Figura 75b - Cromatogramas das frações da coluna D.



(Tappin, 2012)

5.6.3 Discussão

5.6.3.1 Otimização da coluna de fase reversa

Além das amostras do item anterior as colunas também foram realizadas com a amostra CTn que resulta de estudos de cristalização (não apresentados) que tem

perfil cromatográfico similar a PPTn. Um cromatograma está apresentado na **Figura 61**.

O **Quadro 19** apresenta as características mais importantes das colunas de fase reversa realizadas para o isolamento de tetranortriterpenoides. As primeiras três colunas foram realizadas com SPF2, e as restantes com PPTn. Todas as fases móveis utilizadas decorrem do planejamento experimental de CLAE (apresentado abaixo), a ideia foi tentar prever a melhor separação com o menor uso de solvente possível.

A primeira coluna (**Figura 62**), apesar de evidenciar a não adequação desta técnica e das condições ali utilizadas para isolar um tetranortriterpenoide a partir de SPF2, resultou positiva quanto à obtenção de uma separação discreta entre 7-desacetóxi-7-oxogedunina e o 6 α -acetoxigedunina. Considerando que o resultado da coluna I evidenciava sinais de sobrecarga de amostra, a coluna II (**Figura 63**) foi realizada nas mesmas condições, porém com cinco vezes menos amostra. Os resultados indicaram uma separação melhor, apesar de ainda não ideal. Na coluna III (**Figura 64a e 64b**), a massa da fase estacionária foi duplicada, e o resultado mostrou uma separação bem mais resolvida, como resultado do aumento do número de pratos teóricos. No entanto, ficou evidente que a amostra SPF2 tem constituição muito complexa. Com a obtenção de PPTn, a coluna IV foi uma repetição da coluna III utilizando esta amostra (**Figuras 65a e 65b**). O resultado foi positivo, com a obtenção de frações enriquecidas tanto em 7-desacetóxi-7-oxogedunina como em 6 α -acetoxigedunina. Contudo, na tentativa de reproduzir a coluna IV, então, avaliou-se a velocidade linear da fase móvel, indicada como sendo essencial na reprodução e aumento de escala da coluna (Mazzei e d'Avila, 2003). Durante o desenvolvimento da extração em fase sólida, esta foi realizada com eluição por gravidade – o que tornava a velocidade razoavelmente constante. No entanto, a eluição em fase reversa exigiu a aplicação de pressão na cabeça coluna, pois neste sistema a fase móvel não elui apenas com a força da gravidade. Pelo fato de não se haver controlado inicialmente o equipamento utilizado (bomba de vácuo/pressão) e nenhuma forma constante e segura para se aplicar a pressão sobre a coluna, esta poderia ser a causa primária da falta de reprodutibilidade. Então uma válvula de coluna *flash* foi adaptada na cabeça da coluna, permitindo regular a pressão e, conseqüentemente, a velocidade de eluição. Considerando-se a possibilidade de se estar utilizando uma velocidade linear muito alta, que impede a 6 α -acetoxigedunina

de interagir com a fase estacionária, optou-se por uma velocidade reduzida sem, no entanto, otimizá-la diretamente, mas apenas operando outros parâmetros. A velocidade de 0,09 cm/s foi determinada empiricamente. O resultado da coluna V (**Figuras 66a e 66b**) mostrou que, ao reduzir a velocidade, a separação entre os dois principais tetranortriterpenoides melhorou consideravelmente. Uma nova fase móvel, contendo menos acetonitrila e mais água e metanol, foi testada na coluna VI (**Figuras 67a e 67b**). Os resultados foram positivos, melhorando a separação. A coluna VII (**Figura 68**) foi a repetição da coluna VII com apenas quatro frações, sendo F1 rica em 7-desacetóxi-7-oxogedunina e F3 rica em 6 α -acetoxigedunina.

Com o protocolo da coluna de separação desenvolvido, passou-se a considerar o aumento de escala. No entanto, ao se realizar os cálculos, constatou-se que a quantidade de amostra seria muito pequena para o volume utilizado de fase móvel. Este fato induziu ao ensaio da coluna VIII (**Figuras 69a e 69b**), com aplicação de uma massa maior de amostra. Os resultados não foram satisfatórios, revelando sinais evidentes de sobrecarga. Então a coluna IX (**Figuras 70a, 70b e 70c**) foi realizada, com base na coluna VII, duplicando a fase estacionária e a massa aplicada e aumentando também o volume de fase móvel sem, no entanto, duplicá-lo. O resultado foi uma separação muito boa entre os tetranortriterpenoides, devido ao aumento do número de pratos teóricos. A coluna X (**Figuras 71a e 71b**) foi a repetição da coluna IX, utilizando-se um número menor de frações, que resultou em uma fração altamente rica em 7-desacetóxi-7-oxogedunina e as últimas frações ricas em 6 α -acetoxigedunina.

Com este protocolo estabelecido, foi possível aumentar a escala e reduzir a quantidade de fase móvel. Tendo como base o mesmo protocolo de aumento de escala da extração em fase sólida, tentou-se aumentar a escala desta coluna (A, **Quadro 20**). Porém, não foi possível transpor este resultado para a coluna disponível (não era do tipo *flash* e portanto não dispunha da vedação apropriada), já que não se alcançou a velocidade linear de 0,09 cm/s. Como alternativa, considerou-se utilizar a coluna *flash* disponível, que acarretava outro tipo de impedimento: sua grande área transversal resultaria em uma fase estacionária com altura maior que a da coluna em si.

Daí, para avançar na aplicação dos parâmetros obtidos até então, testou-se uma nova coluna (coluna XII, **Figuras 72a e 72b**), que representaria o oposto da coluna XI, onde as massas da fase e da amostra seriam reduzidas pela metade.

Embora o resultado não tenha sido muito satisfatório, decidiu-se ensaiar o aumento da escala.

5.6.3.2 Aumento de escala da coluna para isolamento de tetranortriterpenoides

O aumento de escala deste protocolo está representado pelas colunas B e C (**Figuras 73, 74a e 74b**). Os resultados não foram satisfatórios, com evidências de sobrecarga, no entanto foram condizentes com a coluna XI onde há uma separação menor entre os dois picos majoritários. Com a coluna D (**Figuras 75a e 75b**), tentou-se obter uma melhora com a diminuição da carga, o que foi parcialmente alcançado, mas a fração rica em 7-desacetóxi-7-oxogedunina ainda resultou contaminada com 6 α -acetoxigedunina.

5.6.4 Conclusão e desdobramentos da coluna de fase reversa

Desta forma, é possível se considerar que uma coluna de fase reversa em pequena escala foi desenvolvida. Contudo, por limitações do laboratório, seu aumento de escala não foi totalmente bem sucedido. No entanto, uma coluna que produz frações isoladas com os 7-desacetóxi-7-oxogedunina e 6 α -acetoxigedunina como majoritários foi desenvolvida e teve sua escala aumentada.

Como desdobramentos válidos desta etapa, pode-se pontuar: (i) o aumento de escala da coluna desenvolvida em uma coluna *flash* de área transversal menor do que 7,163 cm²; (ii) aplicação deste protocolo em sistemas cromatográficos automatizados e (iii) O uso de fases estacionárias com tamanho de partícula menor que pode resultar em uma altura de fase estacionária menor com o mesmo número de pratos teóricos.

5.7 PRECIPITAÇÃO/PURIFICAÇÃO DAS FRAÇÕES DAS COLUNAS

5.7.1 Metodologia

5.7.1.1 Teste de precipitação e purificação de frações da coluna B

Um teste de precipitação/purificação foi realizado com o protocolo do experimento 1 do item 5.2.5.1, utilizando-se as frações 1 e 3 da coluna B, objetivando aumentar a pureza dos tetranortriterpenoides majoritários destas frações, respectivamente 7-desacetoxi-7-oxogedunina e 6 α -acetoxigedunina. Algumas amostras apresentaram nova precipitação no sobrenadante; este precipitado foi separado e denominado pp2.

5.7.1.2 Precipitação de frações das colunas de fase reversa

As frações obtidas nas colunas de maior escala B, C e D foram unidas segundo os tetranortriterpenoides majoritários de cada fração. Foram estabelecidos três grupos: o grupo 1 com dois subgrupos 1A e 1B, cujo tetranortriterpenoide majoritário é o 7-desacetóxi-7-oxogedunina; o grupo 2 que tem quantidades similares de 7-desacetoxi-7-oxogedunina e 6 α -acetoxigedunina e o grupo 3 com os subgrupos 3A, 3B, 3C e 3D, cujo tetranortriterpenoide principal é 6 α -acetoxigedunina. A classificação leva em conta a razão entre a área da substância principal e de seu maior contaminante, no caso dos grupos 1A, 1B e 2, a razão é entre as áreas do 7-desacetoxi-7-oxogedunina e 6 α -acetoxigedunina (7-oxo/6 α) e no caso dos grupos 3A, 3B, 3C e 3D duas razões foram consideradas: a razão entre as áreas do 6 α -acetoxigedunina e da gedunina (6 α /Ged) e a razão entre as áreas da 6 α -acetoxigedunina e o sinal de uma substância desconhecida que elui entre estes dois últimos tetranortriterpenoides (6 α /des). O **Quadro 21** apresenta a classificação das frações.

Quadro 21 - Classificação e união das frações.

Grupo / Subgrupo					
1A	1B	2	3A	3B	3C
Col. D F4	Col. B: F1pp, F1pp2; Col. C: F1, F2; Col. D: F1, F2, F3, F5.	Col. B: F1sob, Col. C: F3	Col. B: F2sob.; Col. D: F6, F7, F8.	Col. C: F4, F5, F6, F7.	Col. B: F3pp, F3pp2; Col. C: F8; Col. D F9.
Condição de classificação					
7-oxo/6 α > 10	1<7-oxo/6 α <10	7-oxo/6 α \leq 0,5	6 α /Ged > 20 6 α /des < 0	10<6 α /Ged<20 5>6 α /des > 0	6 α /Ged<10 6 α /des>5

Todas os subgrupos, menos o grupo 2, foram purificados pelo protocolo do experimento 2 do item 2.1.16. O precipitado dos grupos 1B (1Bpp), 3A (3App), 3B (3Bpp), 3C (3Cpp) e 3D (3Dpp) foram novamente purificados pela mesma técnica.

Para facilitar a identificação da amostra, os sobrenadantes e precipitados serão denominados da seguinte maneira: primeiro, o nome do subgrupo (ex. 3A), em seguida a fração do processo (“pp1” para primeiro precipitado, “pp2” para precipitado formado no sobrenadante e “sob” para o sobrenadante). O número de vezes que aparecem estes sufixos é o número de vezes que a amostra passou pelo processo. Exemplo: 3App1sob: *sobrenadante da segunda precipitação do precipitado da primeira precipitação da amostra do subgrupo 3A.*

5.7.1.3 Re-teste de precipitação/purificação da amostra 3App1sob

A amostra 3App1sob foi repurificada por um novo protocolo. Para cada 10 mg da amostra foram adicionados sobre ela 300 µl de MeOH. O frasco foi agitado e deixado em repouso para decantar. Então o sobrenadante foi retirada e um volume correspondente a 60% do inicial foi adicionado. Novamente o frasco foi agitado, decantado e o sobrenadante foi retirado. Este último ciclo foi repetido 5 vezes.

5.7.1.4 Re-precipitação / purificação do grupo 3

Algumas amostras do grupo 3 foram unidas em dois grupos para uma purificação. Foram denominados dois grupos F e G. Amostras unidas no grupo F apresentam razão entre o 6 α -acetoxigedunina e a gedunina maior que 50, e o grupo G apresenta uma razão entre o 6 α -acetoxigedunina e a gedunina entre 10 e 50. Os agrupamentos das amostras estão no **Quadro 22**. Estas amostras foram re-precipitadas pelo protocolo descrito no item 5.2.7.3.

Quadro 22 - União de amostras do grupo 3.

Grupo F	Grupo G
3App2; 3App1pp1; 3App1sobpp1	3Bpp2; 3Bpp1pp1; 3Bpp1sob; 3App1sobsob; 3Cpp2; 3Cpp1pp1; 3Cpp1sob; 3Dpp1pp1; 3Dpp1sob.
Condição de classificação	
7-oxo / 6 α > 50	10 < 7-oxo / 6 α < 50

5.7.2 Resultados

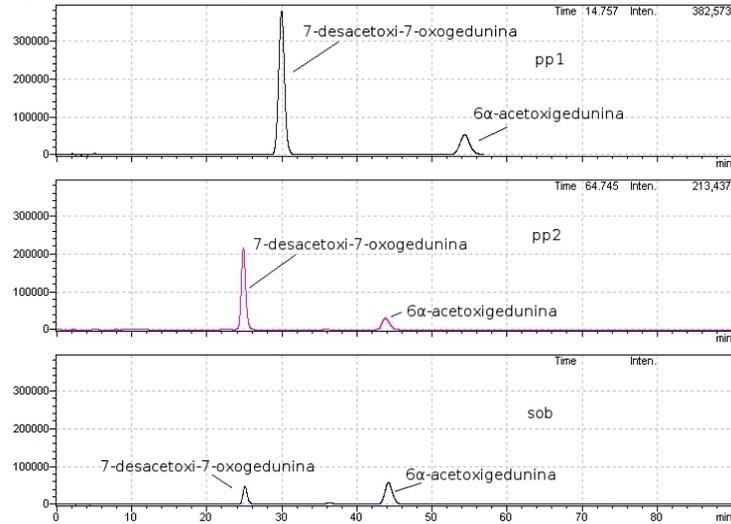
5.7.2.1 Precipitação e purificação de frações da coluna B

A **Tabela 26** mostra o aumento da razão entre os principais tetranortriterpenoides precipitados/purificados em cada fração, acompanhados das figuras com os cromatogramas correspondentes.

Tabela 26 - Razões entre áreas de tetranortriterpenoides em frações da coluna B, após purificação.

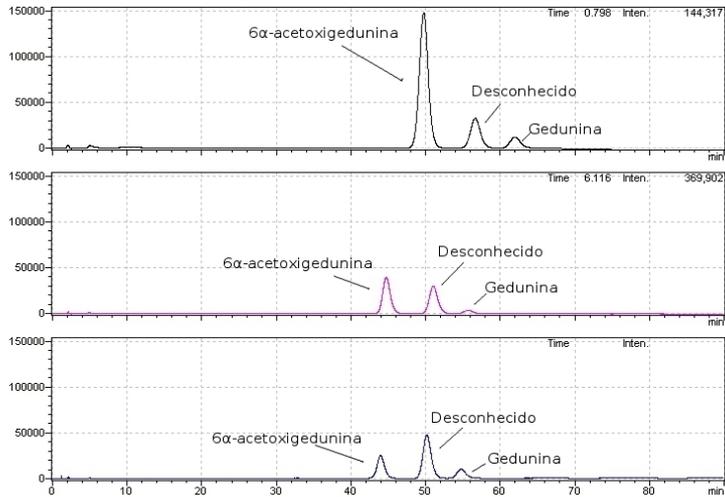
Fração	Razão	Amostra original	Fração pp1
F1	7-desacetóxi-7-oxogedunina / 6 α -acetoxigedunina	3,1	4,4
F3	6 α -acetoxigedunina / gedunina	2,3	4,1

Figura 76 - Cromatogramas das frações resultantes da purificação da fração F1.



(Tappin, 2012)

Figura 77 - Cromatogramas das frações resultantes da purificação da fração F3.



(Tappin, 2012)

5.7.2.2 Agrupamento das frações das colunas de fase reversa com perfis cromatográficos similares

A **Tabela 27** traz as massas resultantes de cada grupo após a união.

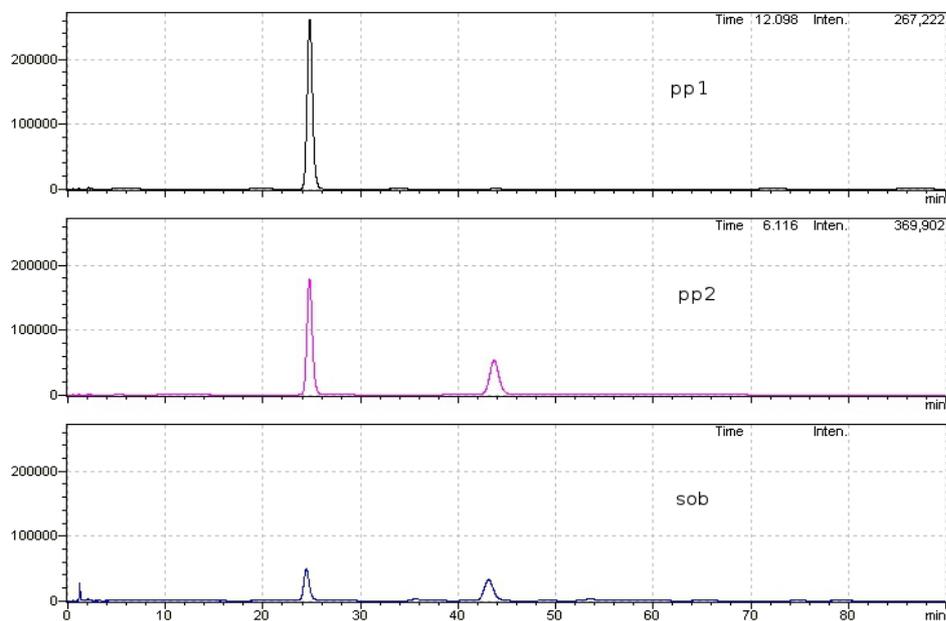
Tabela 27: Massa dos grupos originados da união de frações.

Grupo	Massa (mg)
1A	40,3
1B	400
3A	110,2
3B	107,9
3C	77,8
3D	30,4

5.7.2.3 Precipitações das frações de coluna de fase reversa

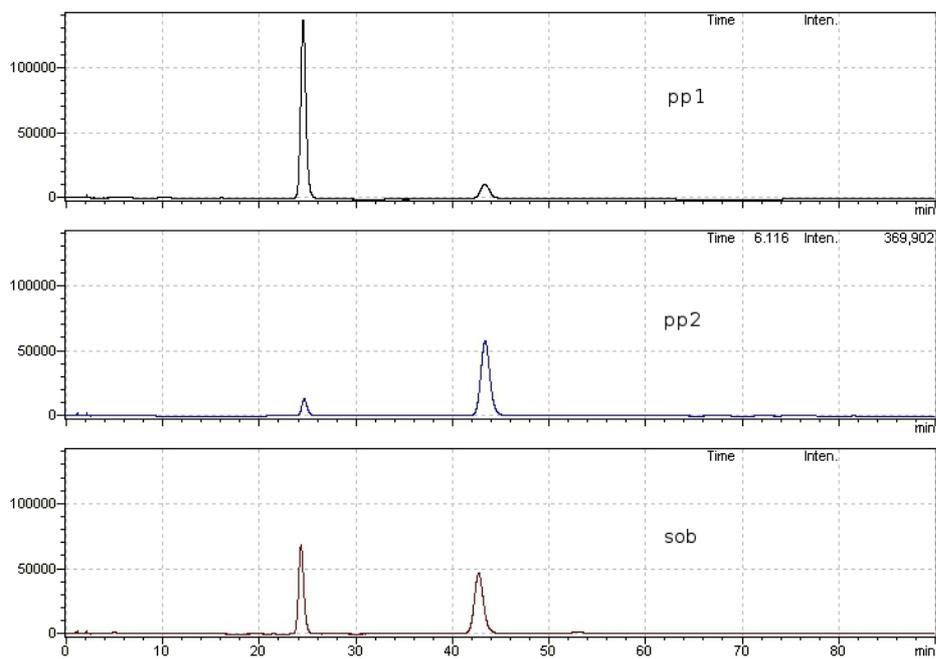
As figuras a seguir apresentam os cromatogramas das frações resultantes da precipitação/putificação dos grupos apresentados na **Tabela 27**.

Figura 78 - Cromatogramas das frações resultantes da purificação do grupo 1A.



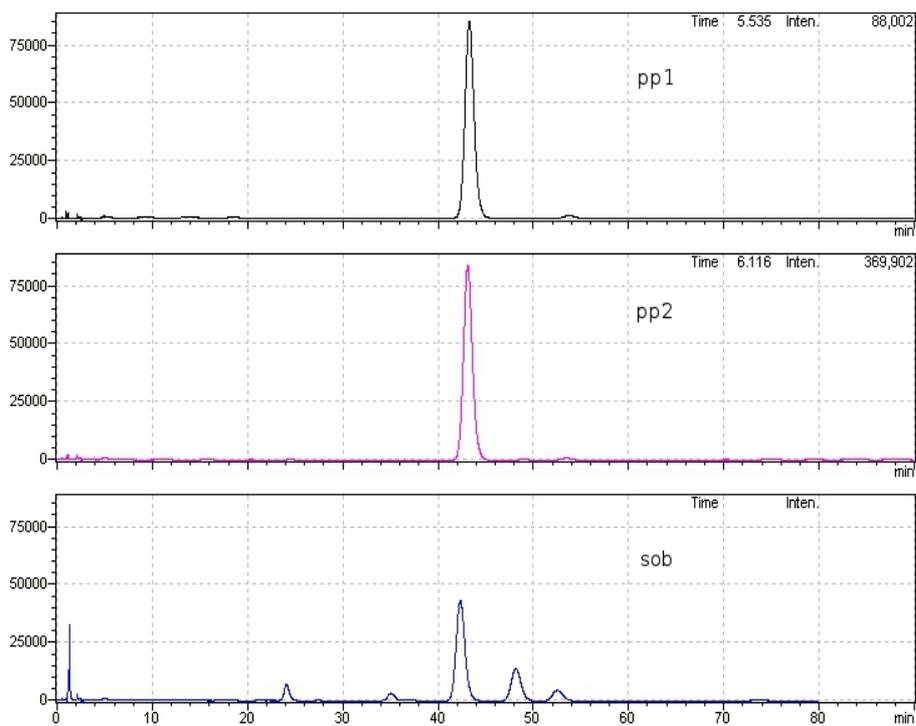
(Tappin, 2012)

Figura 79 - Cromatogramas das frações resultantes da purificação do grupo 1B.



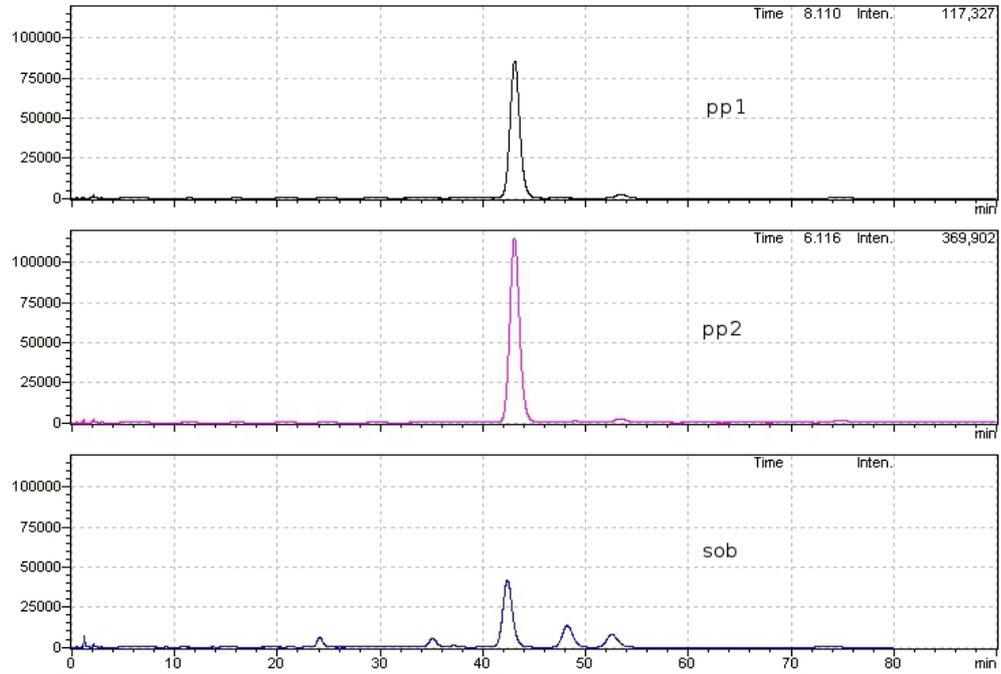
(Tappin, 2012)

Figura 80 - Cromatogramas das frações resultantes da purificação do grupo 3A.



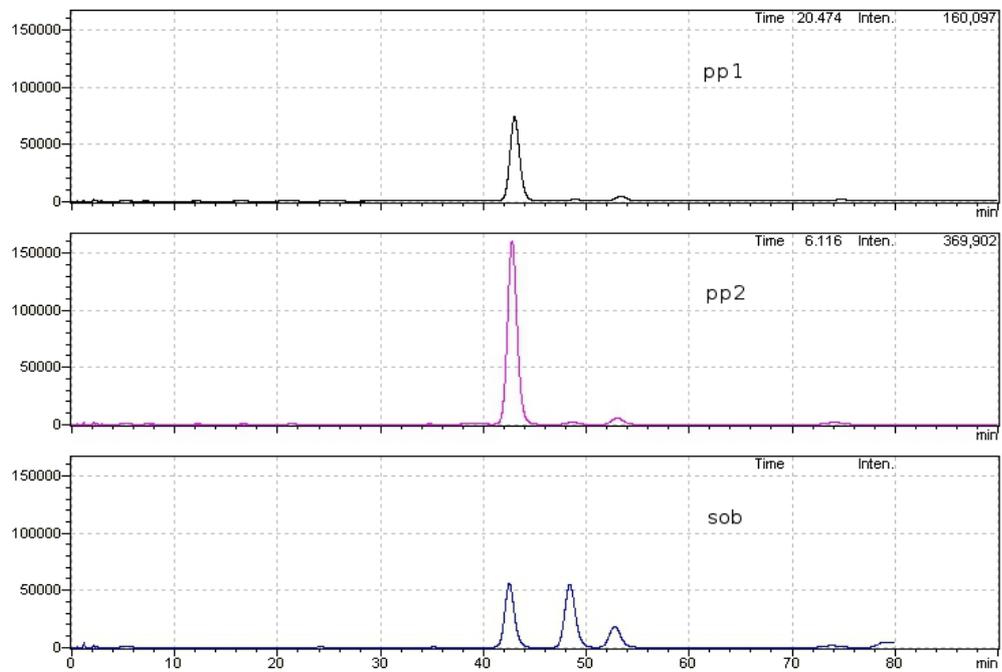
(Tappin, 2012)

Figura 81 - Cromatogramas das frações resultantes da purificação do grupo 3B.



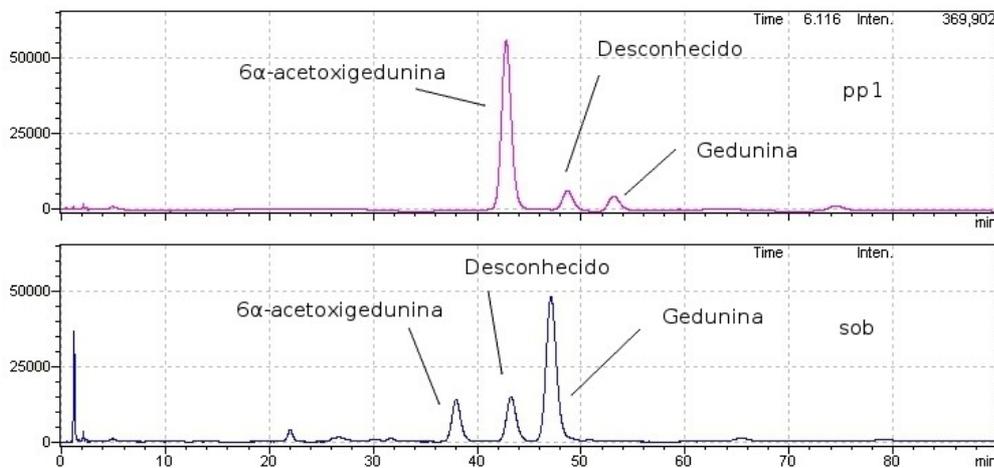
(Tappin, 2012)

Figura 82 - Cromatogramas das frações resultantes da purificação do grupo 3C.



(Tappin, 2012)

Figura 83 - Cromatogramas das frações resultantes da purificação do grupo 3D.



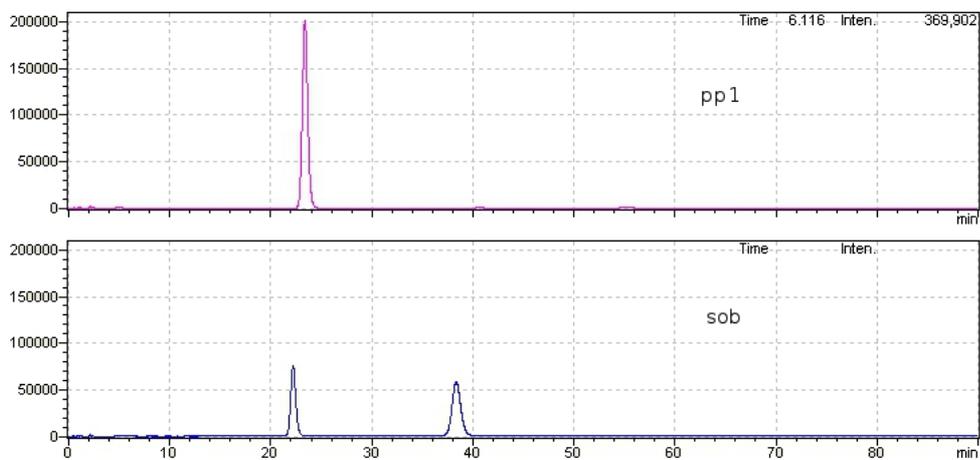
(Tappin, 2012)

Tabela 28 - Resultados das amostras pp1 resultantes da precipitação/purificação.

Amostra	Descrição da razão medida	Razão resultante	Massa da fração (mg)	Rendimento (%)
1App1	7-desacetoxi-7-oxogedunina / 6α-acetoxigedunina	143	30,5	75,7
1Bpp1	7-desacetoxi-7-oxogedunina / 6α-acetoxigedunina	7,2	280,8	70,0
3App1	6α-acetoxigedunina / Gedunina	80,5	81	72,7
3Bpp1	6α-acetoxigedunina / Gedunina;	34,1	72,5	67,2
3Cpp1	6α-acetoxigedunina / Gedunina; 6α-acetoxigedunina / Desconhecido	15,7; 60,1	48,6	62,5
3Dpp1	6α-acetoxigedunina / Gedunina; 6α-acetoxigedunina / Desconhecido	9,5; 7,9	21,3	70,1

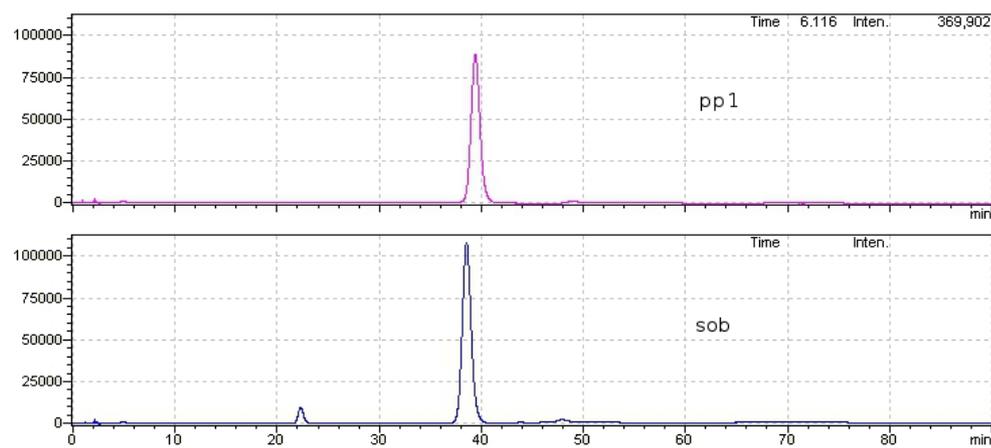
Os resultados da re-precipitação/purificação das amostras 1Bpp1, 3App1, 3Bpp1, 3Cpp1 e 3Dpp1 estão apresentados nas figuras abaixo.

Figura 84 - Cromatogramas das frações resultantes da re-purificação do grupo 1Bpp1.



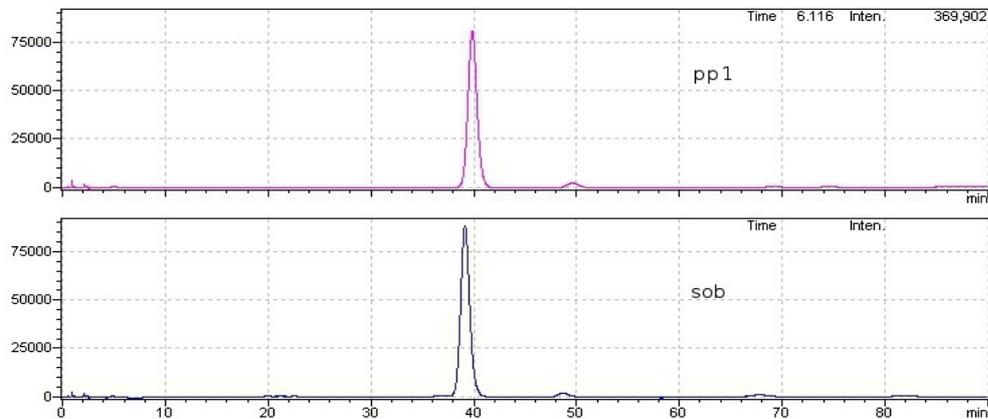
(Tappin, 2012)

Figura 85 - Cromatogramas das frações resultantes da re-purificação do grupo 3App1.



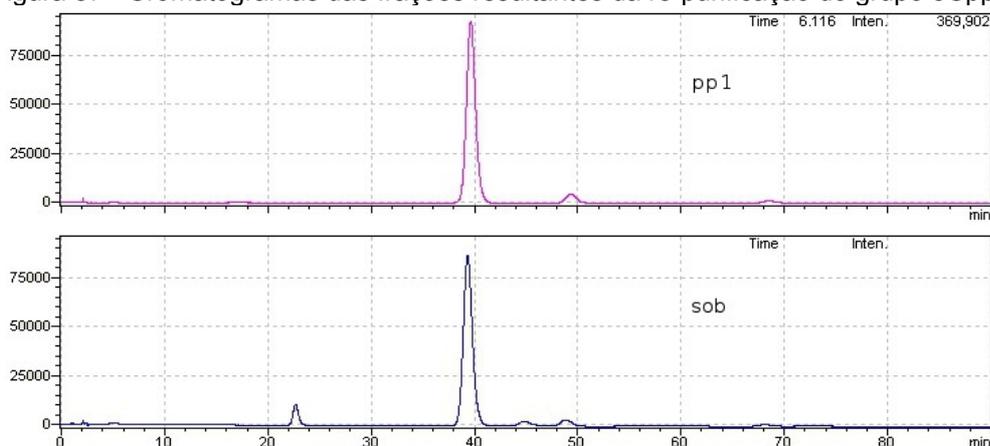
(Tappin, 2012)

Figura 86 - Cromatogramas das frações resultantes da re-purificação do grupo 3Bpp1.



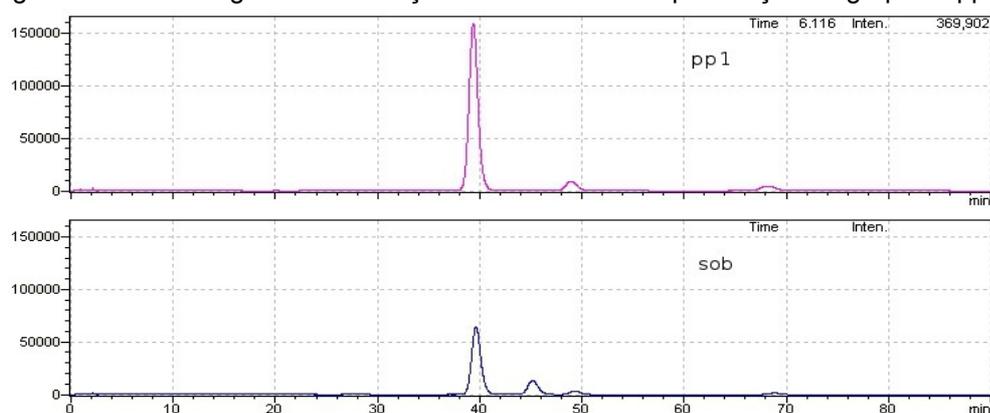
(Tappin, 2012)

Figura 87 - Cromatogramas das frações resultantes da re-purificação do grupo 3Cp1.



(Tappin, 2012)

Figura 88 - Cromatogramas das frações resultantes da repurificação do grupo 3Dpp1.



(Tappin, 2012)

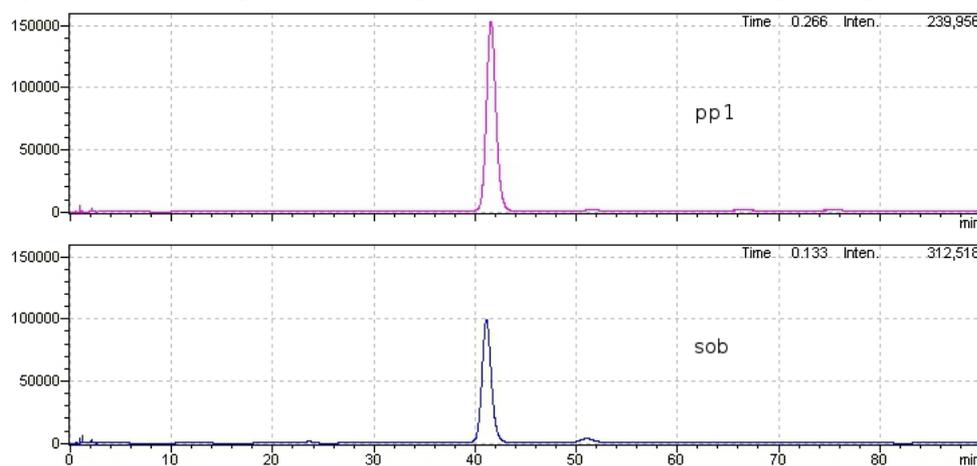
Tabela 29 - Resultados das amostras pp1 resultantes da reprecipitação/purificação.

Amostra	Descrição da razão medida	Razão resultante	Massa da fração (mg)	Rendimento (%)
1Bpp1pp1	7-desacetoxi-7-oxogedunina / 6 α -acetoxigedunina	213,8	206,4	73,5
3App1pp1	6 α -acetoxigedunina / Gedunina	72,6	64,7	79,9
3Bpp1pp1	6 α -acetoxigedunina / Gedunina;	32,1	57,9	79,9
3Cp1pp1	6 α -acetoxigedunina / Gedunina; 6 α -acetoxigedunina / Desconhecido	17,3; 802	36,9	75,9
3Dpp1pp1	6 α -acetoxigedunina / Gedunina; 6 α -acetoxigedunina / Desconhecido	15,3; 413	6,6	31,0

5.7.2.4 Re-teste de precipitação/purificação da amostra 3App1sob

Os resultados do re-teste de precipitação/purificação estão apresentados para a amostra 3App1sob. A massa da amostra original foi de 14,6 mg e a razão de 6 α -acetoxigedunina/Gedunina foi de 70,5.

Figura 89 - Cromatogramas das frações resultantes da re-purificação do grupo 3App1sob .



(Tappin, 2012)

Tabela 30 - Resultados da precipitação/purificação de 3App1sob.

Amostra	Descrição da razão medida	Razão resultante	Massa da fração	Rendimento
3App1sob	7-desacetoxi-7-oxogedunina / 6 α -acetoxigedunina	164,7	9,2 mg	63,0%

5.7.2.5 Agrupamento das frações nos grupos 3F e 3G

As massas resultantes do agrupamento estão apresentados na **Tabela 31**.

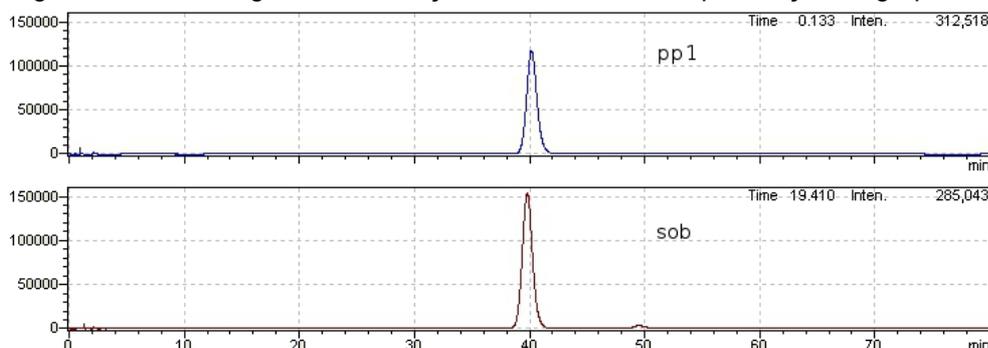
Tabela 31: Massas dos grupos 3F e 3G.

Grupo	Massa
3F	64,2 mg
3G	121,1 mg

5.7.2.6 Precipitação/purificação dos grupos F e G

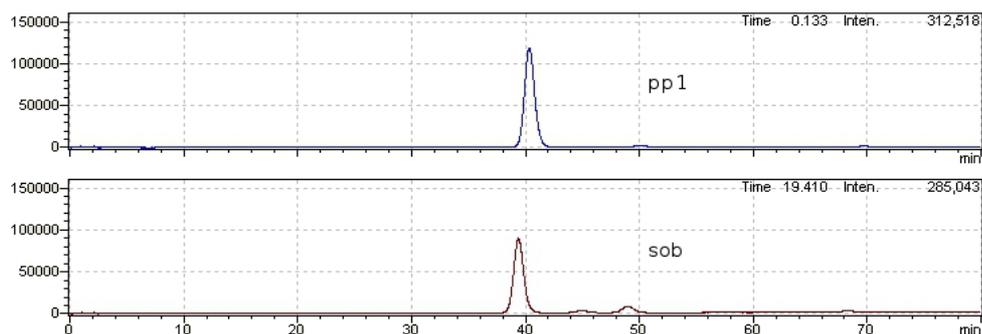
Os cromatogramas para as amostras dos grupos F e G estão apresentados nas **Figuras 90 e 91** com os resultados consolidados na **Tabela 32**.

Figura 90 - Cromatogramas das frações resultantes da re-purificação do grupo 3F.



(Tappin, 2012)

Figura 91 - Cromatogramas das frações resultantes da repurificação do grupo 3G.



(Tappin, 2012)

Tabela 32 - Resultado da purificação dos grupos 3F e 3G.

Grupo	Razão resultante	Massa da fração	Rendimento	Pureza cromatográfica
3Fpp1	124,4	45,7 mg	71,2%	98,8
3Gpp1	47,4	77,1 mg	63,7%	97,1

5.7.3 Discussão

5.7.3.1 Precipitação/purificação de frações da coluna B

Como as principais frações derivadas das colunas de fase reversa apresentam um tetranortriterpenoide majoritário ou, 7-desacetóxi-7-oxogedunina ou 6a-acetoxigedunina, mas ainda com contaminantes, o processo de precipitação/purificação com metanol apresentado por Tappin (2007) foi testado para a obtenção precipitado rico no tetranortriterpenoide majoritário. As amostras escolhidas foram as frações F1 e F3 da coluna B. Os resultados estão apresentados

na **Tabela 26** e nas **Figuras 76** e **77**. Eles indicam um aumento na pureza dos respectivos tetranortriterpenoides majoritários.

5.7.3.2 *Agrupamento das frações das colunas de fase reversa com perfís cromatográficos semelhantes.*

Assim, as frações oriundas das três colunas em escala aumentada foram classificadas segundo a pureza do tetranortriterpenoide majoritário, como mostra o **Quadro 21**. A **Tabela 27** apresenta as massas dos grupos.

5.7.3.3 *Precipitação/purificação das frações agrupadas das colunas de fase reversa*

A precipitação/purificação foi realizada segundo o protocolo do experimento 1 indicado no **Quadro 17**. Este protocolo foi escolhido, pois uma vez que a pureza destas amostras é muito mais alta que a pureza do SPF2, a utilização de um volume menor de metanol deveria favorecer a precipitação de tetranortriterpenoides majoritários.

A pureza foi medida pelo cálculo da razão entre o tetranortriterpenoide majoritário e seu(s) principal(is) contaminante(s). Nos grupos 1A, 1B e 2 a razão foi calculada entre a área do 7-desacetóxi-7-oxogedunina e 6 α -acetoxigedunina. Nos grupos 3A, 3B, 3C e 3D a razão foi calculada entre as áreas da 6 α -acetoxigedunina e a gedunina. Nos grupos 3C e 3D ainda foi calculada a razão entre as áreas de 6 α -acetoxigedunina e um contaminante desconhecido. Em todos os grupos, a pureza resultante do precipitado foi maior do que a pureza máxima determinada para a classificação (**Tabela 28** e **Figuras 78 a 83**), com exceção do grupo 1B, cuja razão máxima é 10, apresentando uma razão de 7,5. Nos grupos 3C e 3D, a razão entre a 6 α -acetoxigedunina e o contaminante desconhecido aumentou. Os rendimentos estiveram entre 62-75%.

A re-precipitação pelo mesmo protocolo resultou em uma pureza maior para amostra 1Bpp1pp1 com uma razão de 213. No entanto, as amostras do grupo 3 não apresentaram melhora, à exceção do grupo 3D. Com relação ao contaminante desconhecido, ele praticamente desapareceu das amostras 3C e 3D (**Tabela 29** e **Figuras 84 a 88**).

A amostra 1Bpp1pp1 tem massa de 206,4 mg (73,5% de rendimento) e foi selecionada para as etapas de identificação e estudo de otimização e estabelecimento de massa mínima do protocolo de certificação.

5.7.3.4 *Re-teste de precipitação/purificação da amostra 3App1sob*

Como não houve melhora na re-precipitação dos grupos 3, um teste foi realizado com a amostra 3App1sob aumentando o volume de metanol por massa da amostra. O resultado mostrou um aumento significativo da razão na fração pp1 (**Tabela 30**).

5.7.3.5 *Agrupamento das frações dos grupos 3 nos grupos F e G*

As amostras dos grupos 3 foram reagrupadas nos grupos 3F e 3G. A **Tabela 31** mostra a massa resultante.

5.7.3.6 *Precipitação/purificação dos grupos 3F e 3G*

O resultado do tratamento mostrou um aumento significativo na pureza do grupo 3F (**Tabela 32**). O grupo 3G não apresentou uma melhora tão boa, ficando a pureza perto do valor máximo de sua classificação. No entanto, é pertinente mencionar que o intervalo da classificação do grupo 3G é bem amplo, com razões de 6 α -acetoxigedunina/gedunina entre 10 e 50, e a maioria das frações que o compõem este grupo se encontra bem abaixo da razão final (valores não apresentados). Estas duas amostras foram selecionadas para as etapas de identificação e estudo de otimização e estabelecimento de massa mínima do protocolo de certificação. No entanto não houve tempo hábil para realizar a segunda etapa.

5.7.4 *Conclusão e desdobramentos da precipitação/purificação de frações das colunas de fase reversa*

Assim, o protocolo de Tappin foi aplicado no caso presente, com algumas modificações, e permitiu obter amostras de 7-desacetóxi-7-oxogedunina e 6 α -acetoxigedunina com uma massa representativa e com alta pureza. Os desdobramentos desta etapa são essencialmente os mesmos da precipitação/purificação de SPF2.

5.8 RENDIMENTO TOTAL DO PROCESSO E COMPARAÇÃO COM A LITERATURA

A **Tabela 33** mostra o rendimento individual de cada etapa e o rendimento acumulado, nos experimentos com escala aumentada.

Tabela 33 - Rendimento do processo de isolamento.

Etapa de isolamento	Rendimento (%)	Rendimento acumulado (%)	Rendimento acumulado a partir de PP (%)
Extração das sementes	0,84	0,84	100
Partição Líquido Líquido de PP	81,2	0,68	81,2
Extração em fase sólida de PPsG	21,3	0,14	17,3
Precipitação / Purificação SPF2	64,7	0,09	11,2
Coluna de fase reversa de PPTn	48,6*; 42,2**	0,044*; 0,038**	5,4*; 4,7**
Precipitação / Purificação de frações ricas	49	0,022*; 0,019**	2,6*; 2,3**

* Referente a 7-desacetóxi-7-oxogedunina; ** Referente a 6 α -acetoxigedunina.

O rendimento das precipitações foi considerado 70%.

A **Tabela 33** evidencia a pequena quantidade de tetranortriterpenoides na polpa das sementes de andiroba, que constituem menos de 0,3% da amostra para os dois tetranortriterpenoides majoritários. No entanto, é interessante observar que a massa individual dos dois tetranortriterpenoides majoritários foi cerca de 2% da massa de PP. Os pontos críticos deste processo são, sem dúvida, as precipitações / purificações. Como não se conhece a solubilidade individual de cada substância, o rendimento destas etapas pode estar subestimado. Além disso, caso a coluna de fase reversa com mais pratos teóricos fosse exequível, é possível também que a última etapa não fosse necessária, fato que dobraria o rendimento. É importante lembrar que este processo depende da presença de tetranortriterpenoides parcialmente solúveis em metanol com pureza razoável. O angolensato de metila, por exemplo, não pode ser isolado por este método, pois é totalmente solúvel no metanol. Para o seu isolamento, outras técnicas devem ser aplicadas a partir da extração em fase sólida.

Para avaliar a eficácia do processo, os resultados foram comparados com o trabalho de Silva e colaboradores (Silva e colaboradores, 2009), onde os autores utilizaram cromatografia em contracorrente (CCC) para o isolamento de tetranortriterpenoides a partir de extrato do bagaço de *C. guianensis*, extraído da mesma forma que a polpa das sementes no protocolo apresentado. Ao todo foram isolados seis tetranortriterpenoides em uma única corrida cromatográfica, a partir de 800 mg do extrato. A **Tabela 34** mostra as massas e os rendimentos para as

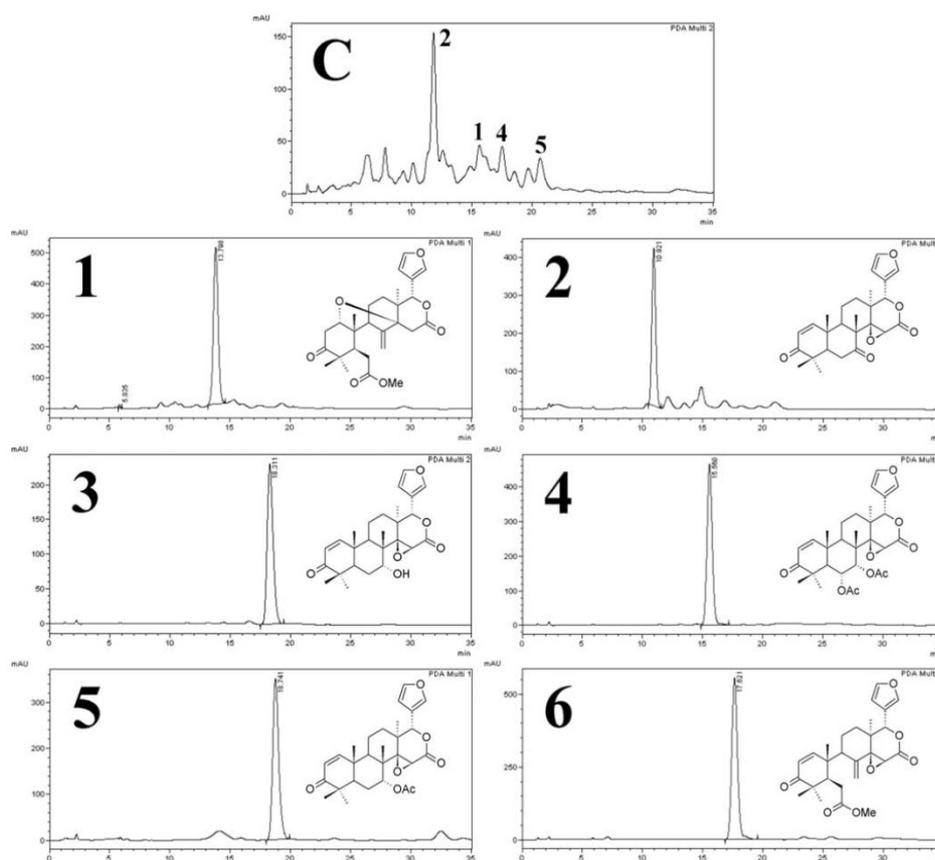
substâncias individuais. A **Figura 92** mostra os cromatogramas deste estudo.

Tabela 34 - Tetranortriterpenoides isolados por Cromatografia em Contra-Corrente.

Nº	Tetranortriterpenoide	Massa (mg)	Rendimento (%)
1	angolensato de metila	28,7	3,6
2	7-desacetóxi-7-oxogedunina	17,9	2,2
3	deacetilgedunina	3,7*	0,4
4	6 α -acetoxigedunina	40,1	5,0
5	gedunina	21	2,6
6	andirobina	5,8	0,7
-	Total	117,2	14,5

*Isolado posteriormente em placa de sílica, a partir de uma fração da CCC.

Figura 92 - Cromatogramas do isolamento por CCC.



(Silva et al., 2009)

Os rendimentos em CCC obtidos pelos autores para os dois tetranortriterpenoides isolados são compatíveis com os obtidos no presente estudo, apesar da pureza do 7-desacetóxi-7-oxogedunina não ter sido compatível. É interessante notar na **Figura 92** o cromatograma correspondente ao extrato bruto.

Há claramente uma predominância de 7-desacetóxi-7-oxogedunina (substância 2) na amostra. Isto demonstra, na prática, a variação de composição do extrato dependendo da origem da amostra.

Os dois processos têm suas vantagens e desvantagens. O CCC pode ser realizado em uma única etapa, ao passo que o processo proposto é realizado em várias etapas diferentes. No entanto, ficou evidente que todas as etapas desenvolvidas são facilmente escalonáveis, com a possível exceção da cromatografia de fase reversa. Já o escalonamento em CCC envolve equipamento e instalações especiais, de baixa exequibilidade. Por outro lado seria interessante combinar os dois processos, realizando, por exemplo, a separação por CCC da amostra SPF2, com uma quantidade mínima de contaminantes.

5.9 DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO ANALÍTICO DE CG PARA ANÁLISE DE PP

5.9.1 Metodologia

5.9.1.1 *Planejamento Experimental*

A otimização do método analítico para CG foi baseada no método do **Quadro 5**. Foi aplicado um planejamento de composto central e as variáveis estudadas foram fluxo e a taxa de aquecimento. Os experimentos estão descritos no **Quadro 23**, com as injeções sendo realizadas em ordem aleatória. As respostas medidas são as resoluções entre os picos co-eluídos e os tetranortriterpenoides.

Quadro 23 - Experimentos para otimização do método cromatográfico de CG.

Experimento	Fluxo (ml/min)	Taxa de aquecimento (°C/min)
1	1,6	3
2	1,6	9
3	2	3
4	2	9
5	1,5	6
6	2,1	6
7	1,8	1,76
8	1,8	10,24
9	1,8	6
10	1,8	6
11	1,8	6
12	1,8	6
13	1,8	6
14	1,8	6
15	1,8	6
16	1,8	6

5.9.1.2 Quantificação dos tetranortriterpenoides na amostra de PP

Com o método desenvolvido no item anterior, foram quantificados os tetranortriterpenoides presentes nas amostras. Uma curva de calibração foi preparada preparando-se uma solução-mãe com cerca de 4 mg de 7-oxo em CH₂Cl₂ num balão volumétrico de 10 ml. As soluções para a construção da curva foram preparadas segundo o **Quadro 24**. Estas soluções foram injetadas na seguinte ordem: 400, 40, 320, 80, 160, 120, realizando-se quatro séries de injeção.

Quadro 24 - Preparo da curva de calibração de 7-desacetóxi-7-oxogedunina.

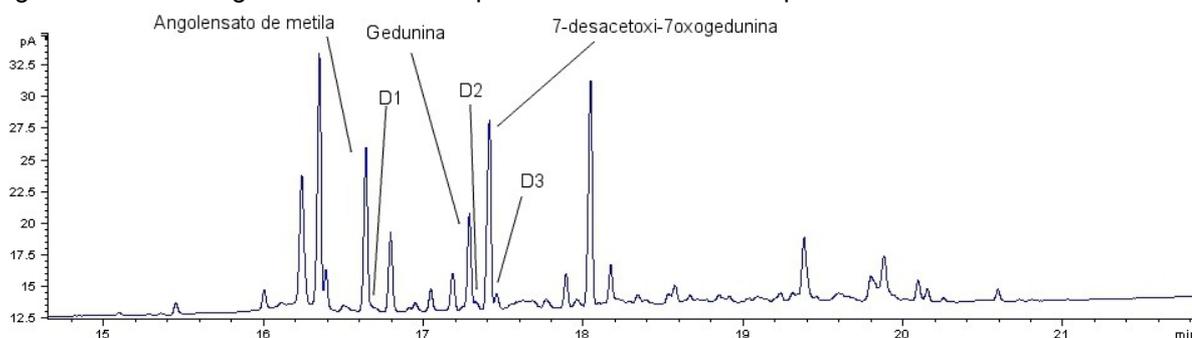
Solução (µg/ml)	Volume de solução	Volume do balão (ml)
320	4 ml da solução mãe	5
240	3 ml da solução mãe	5
160	2 ml da solução mãe	5
120	1 ml da solução de 240 µg/ml	2
80	1 ml da solução de 160 µg/ml	2
40	1 ml da solução de 40 µg/ml	2

5.9.2 Resultados

5.9.2.1 Desenvolvimento de método analítico por CG para análise de PP

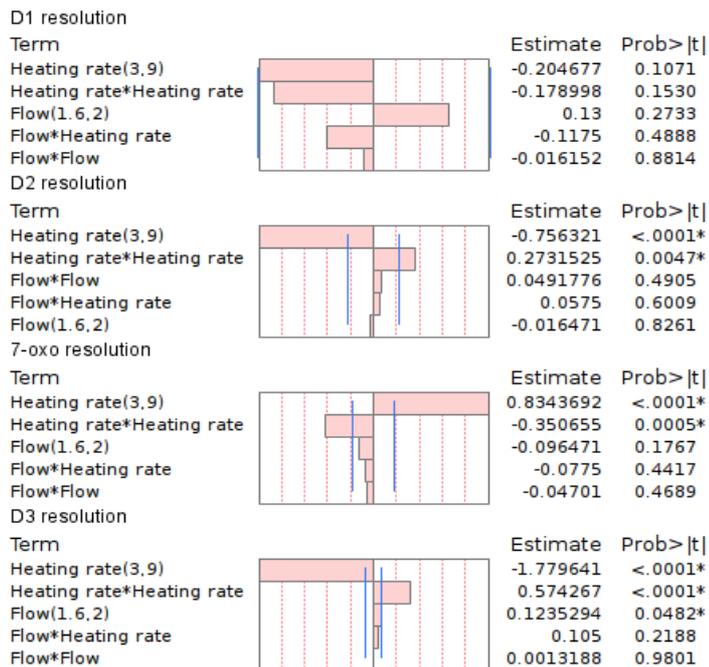
A **Figura 93** mostra um cromatograma da amostra de PP no método descrito no **Quadro 5**, onde estão apresentadas as resoluções utilizadas como resposta no planejamento. A **Figura 94** mostra o gráfico de Pareto para cada resposta estudada. A **Figura 95** mostra o gráfico do modelo em função das variáveis. A **Tabela 35** apresenta os métodos testados tendo como base o modelo calculado pelo planejamento, assim como os resultados esperados e encontrados. A **Figura 96** mostra um cromatograma no método otimizado.

Figura 93 - Cromatograma de PP obtido pelo método analítico do quadro 5.



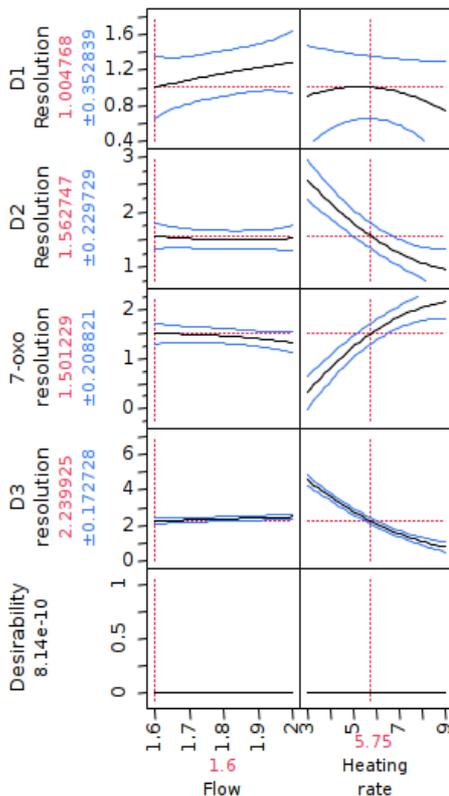
(Tappin, 2012)

Figura 94 - Gráfico de Pareto da otimização do método de CG.



(Tappin, 2012)

Figura 95 - Gráfico do modelo em função das variáveis da otimização do método de CG.

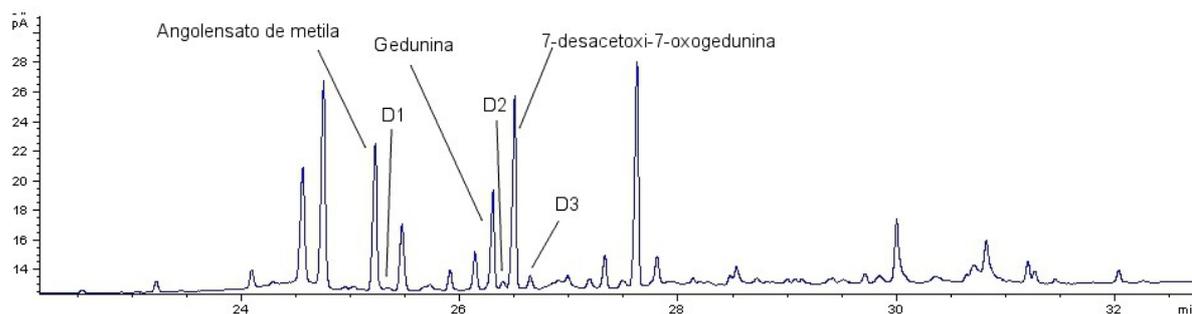


(Tappin, 2012)

Tabela 35 - Resultados previstos pelo modelo e os obtidos experimentalmente

Condições de análise		Previsto		
Fluxo (ml/min)	Taxa de aquecimento (°C/min)	Resolução de D1	Resolução de D2	Resolução de 7-oxo
1,6	5,75	1,00 ± 0,35	1,56 ± 0,23	1,50 ± 0,21
1,7	5,8	1,10 ± 0,26	1,50 ± 0,17	1,50 ± 0,16
1,8	5,8	1,16 ± 0,26	1,48 ± 0,17	1,48 ± 0,15
1,9	5,92	1,21 ± 0,26	1,44 ± 0,17	1,45 ± 0,16
2	6,15	1,24 ± 0,35	1,42 ± 0,23	1,42 ± 0,21
Condições de análise		Experimental		
Fluxo (ml/min)	Taxa de aquecimento (°C/min)	Resolução de D1	Resolução de D2	Resolução de 7-oxo
1,6	5,75	1,26	1,47	1,50
1,7	5,8	1,35	1,35	1,46
1,8	5,8	1,30	1,33	1,43
1,9	5,92	1,17	1,33	1,36
2	6,15	1,35	1,44	1,37

Figura 96 - Cromatograma de PP no método otimizado.



(Tappin, 2012)

5.9.2.2 Quantificação dos tetranortriterpenoides na amostra de PP

A **Tabela 36** mostra o coeficiente de variação de cada concentração. O coeficiente de determinação (R^2) foi 0,99911 e o coeficiente de determinação ajustado (R^2 -ajustado) foi 0,99907. A **Tabela 37** apresenta a quantificação dos TNTP na amostra CGPP.

Tabela 36 - Coeficientes de variação de cada concentração da curva.

Concentração ($\mu\text{g/ml}$)	Coeficiente de variação (%)
320	0,66
240	1
160	1,5
120	1,96
80	3,22
40	3,36

Tabela 37 - Teor dos TNTP na amostra CGPP.

Tetranortriterpenoide	Teor (%)
Angolensato de metila	3,36
Gedunina	5,44
7-desacetóxi-7-oxogedunina	6,71
6 α -acetoxigedunina	7,76
Total	23,27

5.9.3 Discussão

5.9.3.1 *Desenvolvimento de método analítico por CG para análise de PP*

Em trabalho anterior, (Tappin, 2007) foi desenvolvido um método de cromatografia em fase gasosa para a análise de tetranortriterpenoides em óleo de andiroba. O método está descrito no **Quadro 5** e foi aplicado à amostra de PP. A **Figura 93** mostra o resultado dessa análise, onde é possível verificar a coeluição de substâncias com os tetranortriterpenoides presentes na amostra. O planejamento experimental foi então elaborado de modo a otimizar a taxa de aquecimento e o fluxo de gás de arraste. As respostas medidas são as indicadas. O gráfico de Pareto na **Figura 94** mostra que a taxa de aquecimento foi o parâmetro mais significativo, e nenhum dos dois foi significativo para a resolução de D1. O gráfico da **Figura 95** mostra como as resoluções variam com os parâmetros. Normalmente, em uma otimização, começa-se a avaliar o parâmetro mais significativo. No entanto, devido a limitações do equipamento, o fluxo só pode ser ajustado na primeira casa decimal, e apenas cinco fluxos são possíveis. Então, para cada fluxo foi determinada a taxa de aquecimento ótimo medindo-se, pelo modelo, o valor da resolução esperada com a faixa de erro. A amostra de PP foi então injetada nestas condições e as resoluções medidas. Como evidencia a **Tabela 35**, todos os valores experimentais caíram dentro da faixa prevista pelo modelo, demonstrando sua adequação. O método de fluxo de 1,6 ml/min e 5,75 °C/min foi então selecionado, pois apresenta resoluções maiores para D3 e 7-desacetóxi-7-oxogedunina. Nesta condição, a resolução de D1 cai para um valor próximo de 1,26; no entanto, como a intensidade de D1 é muito menor que a dos demais, concluiu-se que o impacto no resultado final seria desprezível. A **Figura 96** mostra o cromatograma na condição otimizada. A curva de calibração analisada foi satisfatória. A amostra foi então quantificada e o resultado está apresentado na **Tabela 37**.

5.9.4 Conclusão e desdobramentos do desenvolvimento de método analítico de CG para análise de PP

Um método analítico por cromatografia com fase gasosa foi desenvolvido com sucesso para a análise do precipitado da extração de polpa de sementes de PP. Esta ferramenta pode ser utilizada para controlar a qualidade deste processo de extração e de todas as etapas subsequentes.

5.10 Desenvolvimento de método para análise de SPF2 por CLAE

5.10.1 Metodologia

5.10.1.1 *Planejamento Experimental*

A fase móvel do método de análise por CLAE foi otimizada por planejamento de mistura. A fase móvel é composta de três solventes: acetonitrila, água e metanol. A fração de cada solvente na fase móvel foi determinada através de planejamentos experimentais de mistura. Foram realizados ao todo três planejamentos sucessivos em diferentes intervalos de mistura dos três solventes. Os planejamentos estão apresentados no **Quadro 25**.

Quadro 25 - Planejamentos de mistura para a otimização da fase móvel de CLAE.

Solvente	Planejamento 1			Planejamento 2			Planejamento 3	
	MeCN	H ₂ O	MeOH	MeCN	H ₂ O	MeOH	MeCN	H ₂ O
Proporção 1	25,0	25,0	50,0	20,8	45,9	33,3	29,2	35,4
Proporção 2	25,0	50,0	25,0	20,8	33,3	45,9	16,6	41,7
Proporção 3	50,0	25,0	25,0	33,3	33,3	33,3	22,9	41,7
Proporção 4	25,0	37,5	37,5	20,8	39,6	39,6	22,9	35,4
Proporção 5	37,5	25,0	37,5	27,1	33,3	39,6	16,6	35,4
Proporção 6	37,5	37,5	25,0	27,1	39,6	33,3	16,6	48
Proporção 7	33,3	33,3	33,3	25,0	37,5	37,5	20,8	39,6

O fluxo da fase móvel utilizado foi de 1 ml/min e o volume de injeção de 5 µl, com os sinais sendo detectados a 210 nm. Em todos os planejamentos, utilizou-se uma solução de 1 mg/ml de amostra em acetonitrila. A composição da fase móvel foi determinada no último planejamento.

5.10.1.2 *Quantificação dos tetranortriterpenoides na amostra de SPF2*

A amostra SPF2 foi analisada quantitativamente utilizando-se a fase móvel otimizada, utilizando-se como referência uma amostra isolada de 7-desacetoxi-7-oxogedunina com cerca de 96% de pureza. A curva foi preparada segundo o **Quadro 26**.

Quadro 26 - Curva de calibração.

Solução ($\mu\text{g/ml}$)	Volume de solução	Volume do balão (ml)
330	Solução-mãe	10
264	4 ml da solução mãe	5
198	3 ml da solução mãe	5
132	2 ml da solução mãe	2
66	1 ml da solução de 132 $\mu\text{g/ml}$	2
33	1 ml da solução de 58 $\mu\text{g/ml}$	2

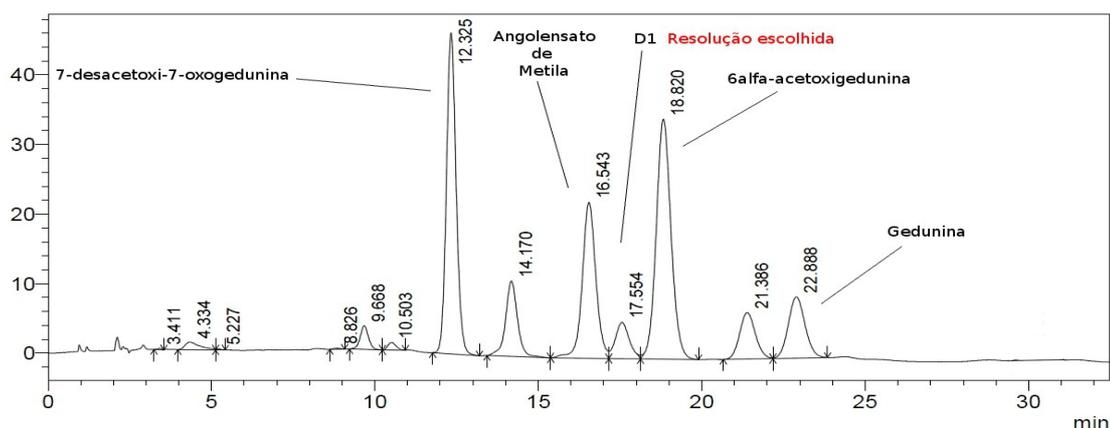
As amostras foram quantificadas quanto aos teores de tetranortriterpenoides e corrigidas pela pureza da referência estimada por DSC.

5.10.2 Resultados

5.10.2.1 *Planejamento experimental*

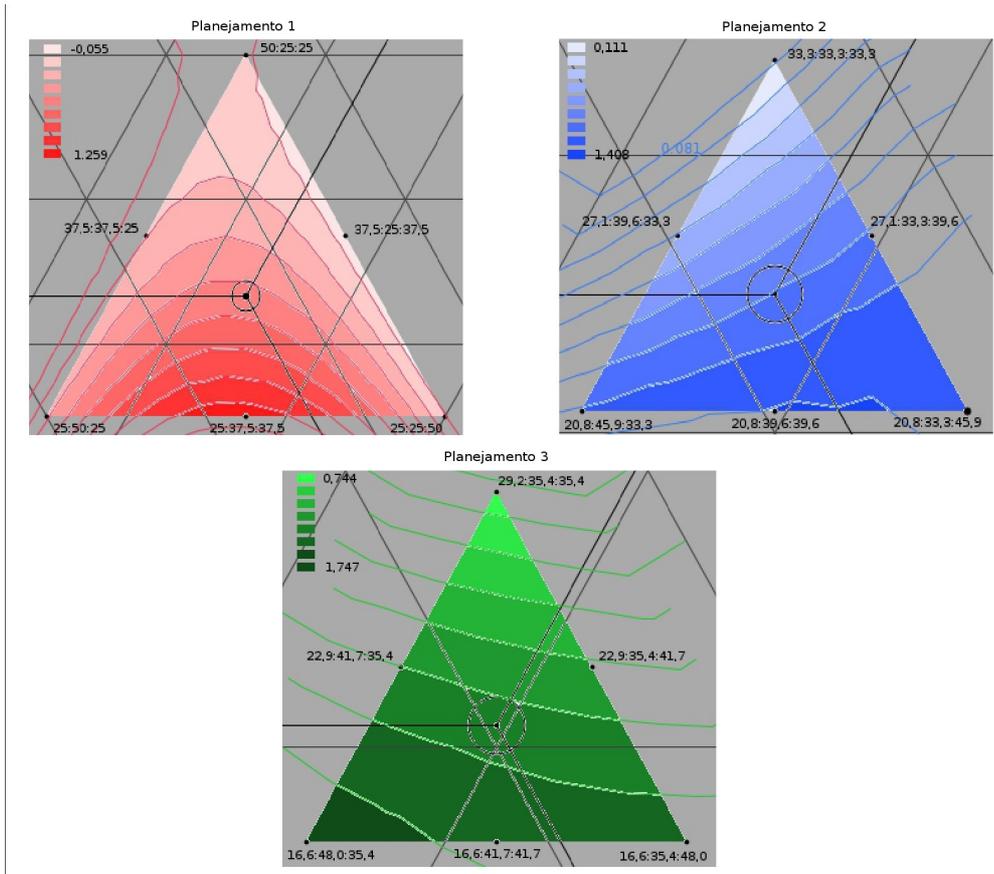
A **Figura 97** mostra um cromatograma CLAE de SPF2 com fase móvel acetonitrila/água/metanol 25:37,3:37,5. A **Figura 98** mostra os gráficos de superfície de resposta de cada planejamento realizado. A **Figura 99** e **100** mostram respectivamente o gráfico de Pareto e o gráfico do modelo em função das variáveis do planejamento 3 (item 2.3). A **Figura 101** mostra um cromatograma da amostra SPF2 na fase móvel otimizada.

Figura 97 - Cromatograma de SPF2 na fase móvel 25:37,3:37,5 (acetonitrila/água/metanol).



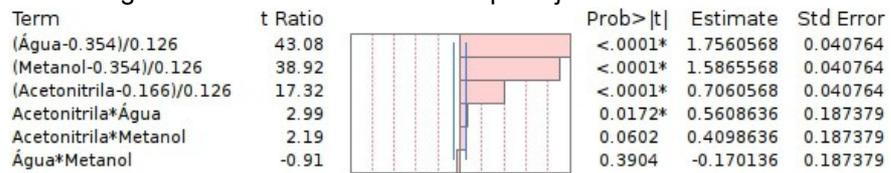
(Tappin, 2012)

Figura 98 - Gráficos de superfície de resposta dos três planejamentos realizados.



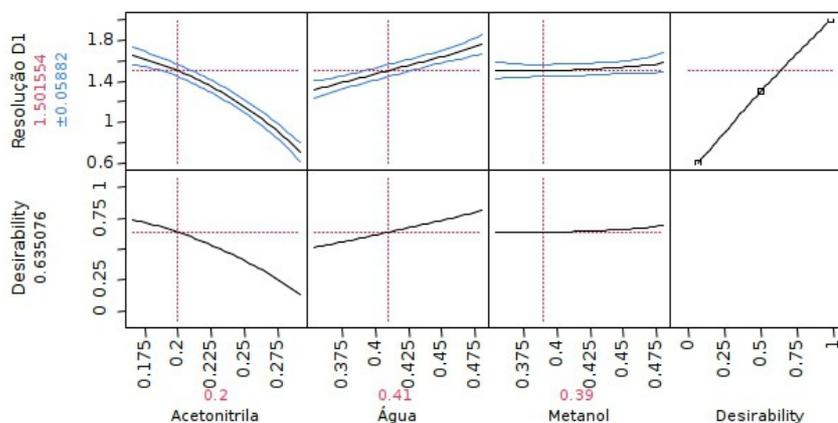
(Tappin, 2012)

Figura 99 - Gráfico de Pareto do planejamento 3.



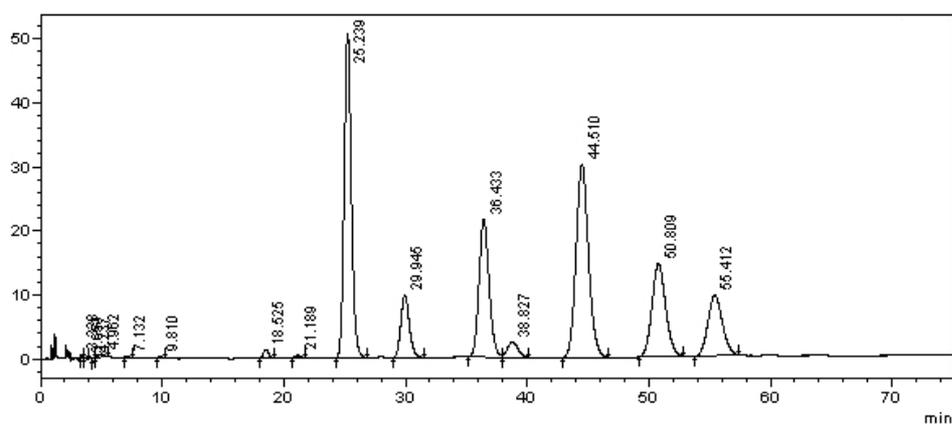
(Tappin, 2012)

Figura 100 - Gráfico do modelo em função das variáveis do planejamento 3.



(Tappin, 2012)

Figura 101 - Cromatograma CLAE da amostra SPF2 utilizando a fase móvel otimizada.



(Tappin, 2012)

5.10.2.2 Quantificação dos tetranortriterpenóides em SPF2

Uma curva de calibração foi analisada para quantificar os tetranortriterpenóides. A análise da regressão mostrou a adequação da curva com um coeficiente de determinação R^2 de 0,9998. O maior coeficiente de variação entre as análises é de 1,14%. Os quatro tetranortriterpenóides presentes na amostra foram quantificados e os teores estão apresentados na **Tabela 38**.

Tabela 38: Conteúdos individuais de tetranortriterpenoides em SPF2.

Tetranortriterpenoide	Teor (%)
angolensato de metila	10,8
gedunina	6,7
7-desacetóxi-7-oxogedunina	19,4
6 α -acetoxigedunina	20,2
Total	57,1

5.10.3 Discussão

5.10.3.1 *Desenvolvimento de método analítico por CLAE para a análise de SPF2*

Para o monitoramento dos resultados das etapas de precipitação/purificação de SPF2 e a coluna de fase reversa de PPTn, um método analítico por CLAE foi desenvolvido. A estratégia adotada foi otimizar a composição da fase móvel ternária com um planejamento de mistura. Os solventes utilizados foram acetonitrila, água e metanol.

Foram realizados ao todo três planejamentos, o **Quadro 24** mostra suas composições. O objetivo foi realizar inicialmente um planejamento com uma variação grande de composição de fase móvel. Este planejamento apontou como melhor condição, ainda que não ideal, a composição 25:37,5:37,5 (acetonitrila/água/metanol) apresentada na **Figura 97**. É possível observar que o 7-desacetóxi-7-oxogedunina e a gedunina encontram-se bem resolvidos de seus picos vizinhos, no entanto o mesmo resultado não é obtido para o angolensato de metila e a 6 α -acetoxigedunina. Ao analisar os resultados verificou-se que a resolução do pico desconhecido D1 com o angolensato de metila é a de maior dificuldade, então esta resolução foi escolhida como resposta para este planejamento e os demais subsequentes.

O segundo planejamento utilizou uma variação de composições bem menor ao redor da composição 25:37,5:37,5 (acetonitrila/água/metanol). A ideia foi utilizar composições de fase móvel mais próximas que pudessem indicar de forma segura a composição onde a resolução escolhida seria maior que 1,5. Os resultados foram coerentes com o planejamento anterior, no entanto a maior resolução atingida foi 1,4, o que levou a um terceiro planejamento.

O último planejamento teve a mesma variação de composição do planejamento anterior, no entanto, está deslocado para uma menor quantidade de

acetonitrila. Neste planejamento foram obtidas resoluções de até 1,7, no entanto, de forma a encurtar o tempo de análise foi escolhida uma composição em que a resolução estivesse em 1,5. A composição 20:41:39 (acetonitrila/água/metanol) apresentou esta resolução. A **Figura 98** mostra os gráficos de superfície de resposta dos três planejamentos. A **Figura 99** mostra o gráfico de Pareto deste planejamento e a **Figura 100** mostra o gráfico da resposta em função das variáveis. Um cromatograma na condição otimizada está apresentado na **Figura 101**.

Uma curva de calibração com esta fase móvel foi preparada, mostrando-se satisfatória. Os tetranortriterpenóides de SPF2 foram quantificados correspondendo a 57,1% da amostra.

5.10.4 Conclusão e desdobramentos do desenvolvimento de método para análise de SPF2 por CLAE

Um método analítico por cromatografia líquida de alta eficiência foi desenvolvido com sucesso para a análise da amostra de SPF2 resultante da etapa de extração em fase sólida. Este método é complementar ao método de cromatografia com fase gasosa desenvolvido no item anterior. No entanto, ao contrário do método anterior, este pode ser aplicado apenas a amostras com pureza de tetranortriterpenóides igual ou maior a SPF2, pois a análise de amostras mais complexas resultaria em sinais de tetranortriterpenóides sem a resolução adequada.

6. CONCLUSÃO

Um protocolo para a certificação de material de referência para derivados de plantas medicinais foi proposto. Este protocolo tem como base o ISO GUIA 35, o estado da arte da calorimetria diferencial exploratória e da ressonância magnética nuclear quantitativa e as limitações para a certificação de substâncias de referência para plantas medicinais. Desta última se conclui que as principais dificuldades são a obtenção de substâncias derivadas de plantas medicinais com pureza adequada e massa suficiente. A massa mínima de substância para a certificação foi calculada.

Foi desenvolvido, com escala aumentada, um processo de isolamento de tetranortriterpenoides a partir de polpa de sementes de *Carapa guianensis*, que tem o potencial de, futuramente, obter material suficiente para certificação. Não foi possível obter, adequadamente e em tempo hábil, um tetranortriterpenoide para certificação, devido principalmente a dificuldades relacionadas a origem do material vegetal.

Como forma de ilustrar o protocolo, os dois tetranortriterpenoides isolados e mais dois ácidos triterpênicos foram submetidos às primeiras etapas do protocolo proposto. Os resultados indicaram que o ácido ursólico é a única das quatro substâncias analisadas já com pureza adequada para a certificação.

BIBLIOGRAFIA

ACQUISTUCCI ET AL., Evaluation of the Moisture and Ash Contents In Wheat Mills By Multistep Programmed Thermogravimetry, **Thermochimica Acta**, v. 188, n.1, p.51-62, October 1991.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Instrução Normativa nº 5, de 11 de dezembro de 2008. Determina a publicação da "lista de medicamentos fitoterápicos de registro simplificado". **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, poder executivo, Brasília, DF, 12 de Dezembro de 2008. Seção 1, p. 56.

_____ Instrução Normativa nº 5, de 04 de abril de 2010. Fica estabelecida a lista de referências bibliográficas para avaliação de segurança e eficácia de medicamentos fitoterápicos, conforme anexo da presente instrução normativa. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, poder executivo, Brasília, DF, 05 de abril de 2010. Seção 1, p. 91.

_____ Resolução RDC nº 14 de 04 de abril de 2010. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, poder executivo, Brasília, DF, 05 de abril de 2010. Seção 1, p. 85.

AL-DEEN ET AL., An uncertainty budget for the determination of the purity of glyphosate by quantitative nuclear magnetic resonance (QNMR) spectroscopy RID D-6805-2011, **Accreditation and Quality Assurance**, v. 9, n.1-2, p.55-63, January 2004.

AMBROZIN ET AL., Limonoids from andiroba oil and Cedrela fissilis and their insecticidal activity, **Journal Of The Brazilian Chemical Society**, v. 17, n.3, p.542-547, May 2006.

BARICEVIC ET AL., Topical anti-inflammatory activity of Salvia officinalis L. leaves: the relevance of ursolic acid, **Journal of Ethnopharmacology**, v. 75, n.2-3, p.125-132, May 2001.

BLACK, Seasonal Variation of Phenolic Constituents and Medicinal Activities of Northern Labrador Tea, *Rhododendron tomentosum ssp subarcticum*, an Inuit and Cree First Nations Traditional Medicine, **Planta Medica**, v. 77, n.14, p.1655-1662, September 2011.

BRASIL. Decreto nº 5813, de 22 de Junho de 2006. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder executivo, Brasília, DF, 22 de junho de 2006.

BURTON, QUILLIAN, WALTER, Quantitative H-1 NMR with external standards: Use in preparation of calibration solutions for algal toxins and other natural products, **Analytical Chemistry**, v. 77, n.10, p.3123-3131, May 2005.

CHEN, XIA E TAN, High-performance liquid chromatographic analysis of bioactive triterpenes in *Perilla frutescens*, **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 32, n.6, p.1175-1179, August 2003.

COSTA-SILVA ET AL., A toxicological evaluation of the effect of *Carapa guianensis* Aublet on pregnancy in Wistar rats, **Journal Of Ethnopharmacology**, v. 112, n.1, p.122-126, May 2007.

COSTA-SILVA ET AL., Acute and subacute toxicity of the *Carapa guianensis* Aublet (Meliaceae) seed oil, **Journal Of Ethnopharmacology**, v. 116, n.3, p.495-500, March 2008.

DROZDZEWSKA ET AL., Differential scanning calorimetry to measure the purity of polycyclic aromatic hydrocarbons, **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 88, n.3, p.757-762, June 2007.

EURACHEM/CITAC, Quantifying uncertainty in Analytical Measurement, 2. ed. 2000. Disponível em: <http://www.eurachem.org/guides/pdf/QUAM2000-1.pdf>

Farmacopeia Brasileira. 5. ed. Brasília: ANVISA, 2010 v. 1.

FOUCAULT, A. P. (Org.) Centrifugal Partition Chromatography, Nova York, Marce Dekker, 1994.

FREITAS, A. Estrutura do mercado do segmento de fitoterápicos no contexto atual da indústria farmacêutica brasileira. Ministério da Saúde. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/estudo_fitoterapicos.pdf
Acessado em: 19/11/2010.

FULTON ET AL., Detection and Determination of Dilute, Low-molecular-weight Organic-compounds In Water By 500-mhz Proton Nuclear-magnetic-resonance Spectroscopy, **Analytical Chemistry**, v. 64, n.4, p.349-353, February 1992.

GAO ET AL., A comparative uncertainty study of the purity assessment of chemical reference substances using differential scanning calorimetry (DSC) and mass balance method, **Thermochimica Acta**, v. 525, n.1-2, p.1-8, October 2011.

GIRON, Applications of thermal analysis and coupled techniques in pharmaceutical industry, **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 68, n.2, p.335-357, 2002.

HAMMER E JOHNS, Tapping an Amazonian Plethora - 4 Medicinal-Plants Of Marajo Island, Para (Brazil), **Journal Of Ethnopharmacology**, v. 40, n.1, p.53--75, September 1993.

HUTCHINSON ET AL., Comparison of the response of four aerosol detectors used with ultra high pressure liquid chromatography, **Journal of Chromatography A**, v. 1218, n.12, p.1646-1655, March 2011.

INMETRO, Vocabulário Internacional de Metrologia 1. ed. Rio de Janeiro, 2009.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION, Impurities: Guidelines for residual solvents, 2011. Disponível em:

http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q3C/Step4/Q3C_R5_Step4.pdf

INTERNATIONAL STANDARDIZATION HARMONIZATION, ISO GUIDE 35: Reference Materials – General and Statistical Principles for certification. Geneva, 2006.

JAEGER ET AL., Pentacyclic Triterpene Distribution in Various Plants - Rich Sources for a New Group of Multi-Potent Plant Extracts, **Molecules**, v. 14, n.6, p.2016-2031, June 2009.

JAKI ET AL., Purity-Activity Relationships of Natural Products: The Case of Anti-TB Active Ursolic Acid, **Journal of Natural Products**, v. 71, n.10, p.1742-1748, October 2008.

KESTENS, Differential scanning calorimetry method for purity determination: A case study on polycyclic aromatic hydrocarbons and chloramphenicol, **Thermochimica Acta**, v. 524, n.1-2, p.1-6, September 2011.

KIM ET AL. Certification of a pure reference material for the ginsenoside Rg (1), **Accreditation and Quality Assurance**, v. 15, n.2, p.81-87, February 2010.

LAMBERTY, SCHIMMEL, PAUWELS, The study of the stability of reference materials by isochronous measurements, **Fresenius Journal of Analytical Chemistry**, v. 360, n.3-4, p.European Commiss; AOAC Int; European Inst Reference Mat \& Measurements, February 1998.

LAURENZI, A.E.B.S. LAURENZI W.L. e BATALHA, M.O. Barreiras e oportunidades na comercialização de plantas medicinais provenientes da agricultura familiar. **Informações Econômicas**, v. 34, n. 3, p. 16-25, 2004.

LISINGER ET AL., Estimating the uncertainty of stability for matrix CRMs, **Fresenius Journal of Analytical Chemistry**, v. 370, n.2-3, p.183-188, June 2001.

MA ET AL., Purity determination and uncertainty evaluation of theophylline by mass balance method, high performance liquid chromatography and differential scanning calorimetry, **Analytica Chimica Acta**, v. 650, n.2, p.227-233, September 2009.

MALIK ET AL., Production of the anticancer drug taxol in *Taxus baccata* suspension cultures: A review, **Process Biochemistry**, v. 46, n.1, p.23-34, January 2011.

MANIARA ET AL., Method performance and validation for quantitative analysis by H-1 and P-31 NMR spectroscopy. Applications to analytical standards and agricultural chemicals, **Analytical Chemistry**, v. 70, n.23, p.4921-4928, December 1998.

MATHKAR, The use of differential scanning calorimetry for the purity verification of pharmaceutical reference standards, **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 49, n.3, p.627-631, April 2009.

MAZZEI, J.L. D,AVILA, L.A., Chromatographic Models as Tools for Scale-up of

Isolation of Natural Products by Semi-preparative HPLC, **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 26, n. 2, p. 177-193, 2003.

MENDONÇA, Activities of some Brazilian plants against larvae of the mosquito *Aedes aegypti*, **Fitoterapia**, v. 76, n.7-8, p.629--636, December 2005.

MEUSINGER, Qualitative and quantitative determination of oxygenates in gasolines using H-1 nuclear magnetic resonance spectroscopy, **Analytica Chimica Acta**, v. 391, n.3, p.277-288, June 1999.

NCUBE, FINNIE, VAN STADEN, Seasonal variation in antimicrobial and phytochemical properties of frequently used medicinal bulbous plants from South Africa RID F-3102-2010, **South African Journal of Botany**, v. 77, n.2, p.387-396, April 2011.

NIKOLIC ET AL., Paclitaxel as an anticancer agent: isolation, activity, synthesis and stability, **Central European Journal of Medicine**, v. 6, n.5, p.527-536, October 2011.

NOGUEIRA ET AL., Development studies of captopril certified reference material, **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 47, n.2, p.339--350, April 2011.

PAULI, JAKI, LANKIN, Quantitative H-1 NMR: Development and potential of a method for natural products analysis, **Journal of Natural Products**, v. 68, n.1, p.133-149, January 2005.

_____ ET AL., A routine experimental protocol for qHNMR illustrated with taxol, **Journal of Natural Products**, v. 70, n.4, p.589-595, April 2007.

PAUWELS, J. LAMBERTY, A. SCHIMMEL, H. The determination of the uncertainty of reference materials certified by laboratory intercomparison, **Accreditation and Quality Assurance**, v. 3, p. 180-184, 1998.

PENIDO, Anti-allergic effects of natural tetranortriterpenoids isolated from *Carapa guianensis* Aublet on allergen-induced vascular permeability and hyperalgesia, **Inflammation Research**, v. 54, n.7, p.295--303, July 2005.

_____, Antiinflammatory effects of natural tetranortriterpenoids isolated from *Carapa guianensis* Aublet on zymosan-induced arthritis in mice, **Inflammation Research**, v. 55, n.11, p.457--464, November 2006.

Pereira, J.F.G. **Estudo químico e biológico de *Carapa guianensis* Aubl.** 1998. 262p. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Química, Rio de Janeiro, 1998.

RAZBORSEK ET AL., Determination of oleanolic, betulinic and ursolic acid in Lamiaceae and mass spectral fragmentation of their trimethylsilylated derivatives, **Chromatographia**, v. 67, n.5-6, p.433-440, March 2008.

REIF, K. SIEVERS, H. STEFFEN, J. The Role of Chemical Reference Standards as Analytical Tools in the Quality Assessment of Botanical Materials – A European

Perspective. **HerbalGram**. n. 63, p. 38-43, 2004.

RIOS, Effects of triterpenes on the immune system, **Journal of Ethnopharmacology**, v. 128, n.1, p.1-14, March 2010.

SAITO, A new traceability scheme for the development of international system-traceable persistent organic pollutant reference materials by quantitative nuclear magnetic resonance, **Accreditation and Quality Assurance**, v. 14, n.2, p.79-86, February 2009.

SALEEN ET AL., Antimicrobial natural products: an update on future antibiotic drug candidates, **Natural Product Reports**, v. 27, n.2, p.238-254, 2010.

SANDER, L. C. SHARPLESS, K. E. e WISE, S. A., Dietary supplement Standard Reference Materials, **Life Sciences**, v. 78, n.18, p.2044-2048, March 2006.

SILVA, The use of andiroba *Carapa guianensis* as larvicide against *Aedes albopictus*, **Journal Of The American Mosquito Control Association**, v. 20, n.4, p.456--457, December 2004.

_____ Larvicidal effect of andiroba oil, *Carapa guianensis* (Meliaceae), against *Aedes aegypti*, **Journal Of The American Mosquito Control Association**, v. 22, n.4, p.699--701, December 2006.

SILVA ET AL., Isolation of limonoids from seeds of *Carapa guianensis* Aublet (Meliaceae) by high-speed countercurrent chromatography., **Phytochemical Analysis**, v. 20, n.1, p.77--81, Jan 2009.

SONI ET AL., Variation in E- and Z-guggulsterones of *Commiphora wightii*, **South African Journal of Botany**, v. 76, n.3, p.421-424, August 2010.

SPORN ET AL., New Synthetic Triterpenoids: Potent Agents for Prevention and Treatment of Tissue Injury Caused by Inflammatory and Oxidative Stress, **Journal of Natural Products**, v. 74, n.3, p.537--545, March 2011.

TAVERNIERS, BOCKSTAELE E DE LOOSE, Trends in quality in the analytical laboratory. I. Traceability and measurement uncertainty of analytical results, **TRAC-TRENDS IN ANALYTICAL CHEMISTRY**, v. 23, n.7, p.480-490, JUL-AUG 2004.

TAPPIN, M.R.R. **Desenvolvimento de metodologia analítica para a quantificação de tetranortriterpenóides em óleo de “andiroba”**. 2007. 144p. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, Dissertação (Mestrado em Vigilância Sanitária) – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2007.

_____ Lucchetti, L. Sobre a Legislação de Registro de Fitoterápicos. **Revista Fitos**, v. 3, n. 1, p. 17-30 , 2007.

_____ ET AL., Análise química quantitativa para a padronização do óleo de copaiba por cromatografia em fase gasosa de alta resolução, **Química Nova**, v. 27, n. 2, p. 236-240, 2004.

TOMASSETTI, CAMPANELLA E AURELI, Thermogravimetric Analysis of Some Spices and Commercial Food-products - Comparison With Other Analytical Methods For Moisture-content Determination .3., **Thermochemica Acta**, v. 143, n., p.15-26, May 1989.

TOPCU, Bioactive triterpenoids from Salvia species, **Journal of Natural Products**, v. 69, n.3, p.482-487, March 2006.

VAN DER VEEN ET AL., Uncertainty calculations in the certification of reference materials. 2. Homogeneity study, **Accreditation and Quality Assurance**, v. 6, n.1, p.26--30, January 2001.

VAN DOOREN E MULLER, Purity Determinations of Drugs With Differential Scanning Calorimetry (dsc) - A Critical-review, **International Journal of Pharmaceutics**, v. 20, n.3, p.217-233, 1984.

VAN VUUREN ET AL., Seasonal and geographical variation of Heteropyxis natalensis essential oil and the effect thereof on the antimicrobial activity RID C-3109-2008, **South African Journal of Botany**, v. 73, n.3, p.441-448, July 2007.

Vieira, A.H. et al. Silvicultura de espécies florestais em Rondônia. Bases de Dados Versão Eletrônica, Centro Agroflorestral de Rondônia – CPAFRO. EMBRAPA. Rondônia. Dez 2004.

Disponível em:

<http://www.cpafro.embrapa.br/embrapa/bases/andiroba.htm>

Acessado em: 26/09/2007

WALKER, R.F. Accreditation of reference materials producers. **Accreditation and Quality Assurance**, n. 4, p. 360-365, 1999.

YU ET AL., Development of Fingerprints for Quality Control of Acorus species by Gas Chromatography/Mass Spectrometry, **Bulletin of the Korean Chemical Society**, v. 32, n.5, p.1547-1553, May 2011.

ZOPPI, LINARES E LONGHI, Quantitative analysis of enalapril by H-1 NMR spectroscopy in tablets, **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 37, n.3, p.627--630, March 2005.

WHO. General guidelines for the establishment, maintenance and distribution of chemical reference substances. **WHO Technical Reports Series**. n. 943, p. 59-82, 2007.

_____. Quality Control Methods for Medicinal Plant Materials, **World Health Organization**, Geneva, 1998.

Disponível em:

<http://www.who.int/medicinedocs/collect/edmweb/pdf/h1791e/h1791e.pdf>

Acessado em 26/09/2007

ANEXO A – CÁLCULOS ESTATÍSTICOS

A1) Análise de Variância

Para a realização de cálculos da incerteza da homogeneidade e estabilidade é necessária a aplicação de análise de variância, a seguir serão apresentado resumidamente os cálculos básicos. A Análise de Variância é uma técnica estatística utilizada para comparar diversos grupos de resultados simultaneamente buscando determinar se há uma diferença significativa entre eles.

A1.1) Análise de Variância simples

Van der Veen(ref) descreveu o cálculo para a análise de variância com as seguintes expressões. Para uma quantidade a de grupos e n replicatas de cada grupo:

$$SS_{total} = \sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^{n_i} (Y_{ij} - \bar{y}_i)^2 \quad (1)$$

Onde

$$\bar{y} = \frac{1}{\sum_{i=1}^a n_i} \sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^{n_i} Y_{ij} \quad (2)$$

Onde \bar{y} é a grande média, a o número de grupos e n o número de elementos em cada grupo.

$$SS_{intra} = \sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^{n_i} (y_{ij} - \bar{y}_i)^2 \quad (3)$$

Onde SS_{intra} é a soma dos quadrados intragrupo.

$$SS_{entre} = \sum_{i=1}^a n_i (\bar{y}_i - \bar{y})^2 \quad (4)$$

Onde SS_{entre} é a soma dos quadrados entre grupos.

$$MS_{intra} = \frac{SS_{intra}}{\sum_{i=1}^a n_i - a} \quad (5)$$

Onde MS_{intra} é a média dos quadrados intragrupo.

$$MS_{entre} = \frac{SS_{entre}}{a-1} \quad (6)$$

Onde MS_{entre} é a média dos quadrados entre grupos.

O resultado da análise de variância é obtido através do cálculo da estatística F :

$$F = \frac{MS_{entre}}{MS_{intra}} \quad (7)$$

O valor de F é comparado a uma tabela de valores críticos. Se o valor calculado for maior que o valor tabelado para a confiança desejada e o número de graus de liberdade correspondente, o resultado é dito significativo e há uma diferença entre os grupos. Caso contrário não há diferença significativa entre os grupos.

A1.2) Análise de Variância em dois níveis “nested”.

Em algumas situações de comparação de resultados há além de grupos subgrupos, o que fornece um novo nível de comparação de resultados. Levando isso em consideração as expressões (1) a (4) são reescritas para acomodar o novo nível, sendo a o número de grupos, b o número de subgrupos e n o número de replicatas de cada subgrupo:

$$SS_{total} = \sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^{b_i} \sum_{k=1}^{n_{ij}} (y_{ijk} - \bar{y})^2 \quad (8)$$

$$\bar{y} = \frac{1}{\left(\sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^{b_i} n_{ij}\right)} \sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^{b_i} \sum_{k=1}^{n_{ij}} y_{ijk} \quad (9)$$

$$SS_{intra} = \sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^{b_i} \sum_{k=1}^{n_{ij}} (y_{ijk} - \bar{y}_B)^2 \quad (10)$$

Onde \bar{y}_B é a média do subgrupo.

$$SS_{entre} = \sum_{i=1}^a n_i (\bar{y}_A - \bar{y})^2 \quad (11)$$

$$SS_{B<A} = \sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^{b_i} n_{ij} (\bar{y}_B - \bar{y}_A)^2 \quad (12)$$

Onde $SS_{B<A}$ é a soma dos quadrados do subgrupos (B) nos grupos (A) e \bar{y}_A é a média do grupo (A). De forma similar a (5) e (6) a média dos quadrados é calculada:

$$MS_{intra} = \frac{SS_{intra}}{\sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^{b_i} n_{ij} - \sum_{i=1}^a b_i} \quad (13)$$

$$MS_{entre} = \frac{SS_{entre}}{a-1} \quad (14)$$

$$MS_{B<A} = \frac{SS_{B<A}}{\sum_{i=1}^a b_i - a} \quad (15)$$

O resultado da análise de variância é obtido através do cálculo da estatística F para cada nível:

$$F_A = \frac{MS_{entre}}{MS_{intra}} \quad (16)$$

$$F_B = \frac{MS_{entre}}{MS_{intra}} \quad (17)$$

Novamente os valores de F são comparados a uma tabela de valores críticos. Se os valores calculados forem maiores que os valores tabelados para a confiança desejada e o número de graus de liberdade correspondente, o resultado é dito significativo e há uma diferença entre os grupos. Caso contrário não há diferença significativa entre os grupos.

A2) Regressão linear (análise de tendência)

A regressão linear é uma técnica estatística comum que é utilizada para modelar duas ou mais variáveis dependentes por variáveis independentes. Em certificação de material de referencia é utilizado para a análise de tendência do teste de homogeneidade e estabilidade. Abaixo são apresentadas as expressões básicas para regressão linear simples, que segue o seguinte modelo.

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X + \varepsilon \quad (18)$$

Onde β_0 é o coeficiente linear e β_1 o coeficiente angular da reta e ε o erro aleatório. β_1 e β_0 são calculados pelas seguintes expressões:

$$b_1 = \frac{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})(Y_i - \bar{Y})}{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2} \quad (19)$$

$$b_0 = \bar{Y} - b_1 \bar{X} \quad (20)$$

Onde X é a variável independente, Y a variável dependente, n o número de pares de dados, \bar{X} e \bar{Y} são as médias de X e de Y respectivamente. Os desvios padrões de b_1 e b_0 podem ser calculados:

$$s(b_1) = \frac{s}{\sqrt{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}} \quad (20)$$

Onde

$$s^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (Y_i - b_0 - b_1 X_i)^2}{n-2} \quad (21)$$

Onde a expressão (21) se refere ao desvio padrão da regressão.

A variância de b_0 é calculada por:

$$V(b_0) = V(\bar{Y} - b_1 \bar{X}) = s^2 \left[\frac{1}{n} + \frac{\bar{X}^2}{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2} \right] = \frac{s^2 \sum_{i=1}^n X_i^2}{n \sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2} \quad (22)$$

Para se testar a significância de b_1 o valor de um fator t correspondente a $s(b_1)$ pode ser comparado ao valor crítico com $n-2$ graus de liberdade e uma confiança adequada. Outra forma é realizar uma análise de variância de forma similar ao descrito acima:

Tabela A1: Análise de variância da regressão.

Fonte da Variância.	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Quadrados médios	F
Regressão	1	$\sum_{i=1}^n (\hat{Y}_i - \bar{Y})^2$	$MS_{regressão}$	$F = \frac{MS_{regressão}}{s^2}$
Resíduos	$n-2$	$\sum_{i=1}^n (Y_i - \hat{Y}_i)^2$	$s^2 = \frac{SS}{(n-2)}$	
Total, corrigido para \bar{Y}	$n-1$	$\sum_{i=1}^n (Y_i - \bar{Y})^2$		

A estatística F resultante pode ser testada para significância em uma tabela F . Caso seja significativa b_1 é significativo.

ANEXO B – CÁLCULO DE INCERTEZA DE MÉTODOS ANALÍTICOS.

B1) Introdução

Uma parte essencial da certificação de materiais de referência é a determinação da incerteza associada ao seu uso. Esta incerteza é derivada, entre outras fontes, da incerteza da medição da propriedade do MRC. Neste anexo é apresentado um exemplo de determinação de incerteza retirado do *Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement* da Eurachem (ref) para ilustrar o processo. Estão primeiramente reapresentadas as expressões (1) e (2) do cálculo da incerteza combinada para referência. Em seguida, o exemplo.

B2) Exemplo de cálculo de incerteza.

$$u_{med} = \sqrt{u(x_1)^2 + u(x_2)^2 + u(x_3)^2 + \dots + u(x_n)^2} \quad (1)$$

$$u_{med} = \sqrt{\left(\frac{u(x_1)}{x_1}\right)^2 + \left(\frac{u(x_2)}{x_2}\right)^2 + \left(\frac{u(x_3)}{x_3}\right)^2 + \dots + \left(\frac{u(x_n)}{x_n}\right)^2} \quad (2)$$

Onde u_{med} é a incerteza combinada da medição, x_n são as fontes de incerteza, $u(x_n)$ é a incerteza de x_n .

A expressão (1) é utilizada quando o modelo inclui apenas somas ou subtrações e a expressão (2) quando o modelo inclui apenas multiplicações ou divisões. Em caso de um modelo misto, o modelo pode ser dividido em partes que podem ser calculadas por (1) ou (2).

Exemplo de determinação da incerteza: *Preparação de uma solução padrão de hidróxido de sódio contra hidrogenoftalato de potássio (KHP).*

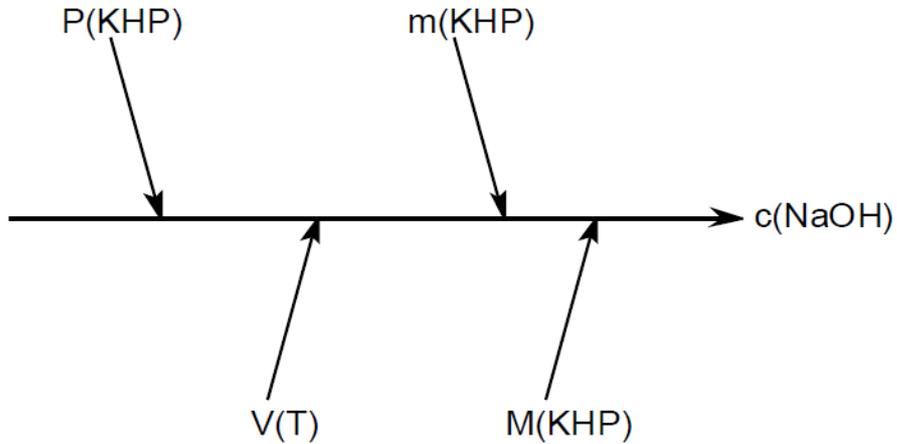
A expressão matemática que define a concentração é:

$$C_{NaOH} = \frac{1000 \cdot m_{KHP} \cdot P_{KHP}}{M_{KHP} \cdot V_T} \quad (3)$$

Onde C_{NaOH} é a concentração de NaOH, m_{KHP} é a massa de KHP pesada, P_{KHP} é a pureza do KHP de referência como fração de massa, M_{KHP} é a massa molar do KHP e V_T é o volume de solução de NaOH utilizado.

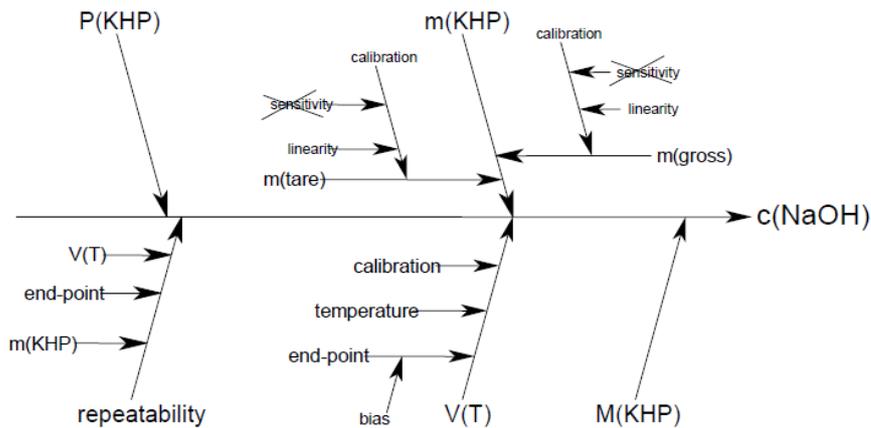
Para facilitar a análise é preparado um gráfico de causa e efeito para melhor evidenciar as fontes de incerteza.

Figura B1 - Exemplo de gráfico de causa e efeito.



Como vemos na **Figura B1**, o gráfico é montado da seguinte forma: uma seta horizontal representa a medida que está sendo realizada. Sobre ela incidem setas menores ou ramos que representam cada componente principal da expressão (3). Em seguida, sob cada ramo, incidem outros ramos que levam em conta as fontes de incerteza de cada (**Figura B2**).

Figura B2 - Exemplo de gráfico de causa e efeito detalhado.



A incerteza é calculada pela combinação das incertezas de todas as fontes discriminadas no gráfico de causa e efeito. Segue o detalhamento das fontes de incerteza deste exemplo.

- *Massa de KHP*: a incerteza da pesagem é determinada pelo certificado de calibração da balança. Como vemos no gráfico da **Figura B2**, há duas

principais fontes de incerteza para a pesagem do KHP: a tara do frasco e a pesagem do KHP. Sob as duas incidem as fontes de incerteza de pesagem que são a repetitividade e a incerteza da calibração da balança. Sob esta última ainda incidem as incertezas da linearidade e da sensibilidade (erro sistemático). Uma vez que a pesagem foi feita por diferença, esta última é cortada restando apenas a incerteza da calibração. A incerteza de repetitividade foi colocada sob uma nova seta que engloba toda a incerteza da metodologia tornando o cálculo mais simples. O certificado de calibração da balança indica a incerteza de linearidade é de $\pm 0,15$ mg. Neste caso, o fabricante da balança recomenda utilizar distribuição retangular* para converter a incerteza da linearidade em incerteza padrão da seguinte forma:

$$\frac{0,15}{\sqrt{3}} = 0,09 \text{mg} \quad (4)$$

Como foram realizadas duas pesagens, uma para a tara e outra para a massa do KHP, este valor de incerteza padrão é multiplicado por 2. Assim, utilizando (1) a incerteza da pesagem será:

$$u(m_{KHP}) = \sqrt{2 \cdot (0,09)^2} \quad (5)$$

$$u(m_{KHP}) = 0,13 \text{ mg} \quad (6)$$

- *Pureza do KHP*: a pureza do KHP é apresentada com estando entre os limites de 99,95% e 100,05% ou $1,0000 \pm 0,0005$. Como não há mais informações sobre a distribuição da incerteza então será assumida a incerteza retangular*. Assim como em (4), a incerteza padrão é:

$$\frac{0,0005}{\sqrt{3}} = 0,00029 \quad (7)$$

- *Massa molar de KHP*: a fórmula molecular do KHP é $\text{C}_8\text{H}_5\text{O}_4\text{K}$. A IUPAC divulga, bianualmente, a incerteza das medições de massa de todos os

elementos da tabela periódica. Assim, a incerteza da massa molecular do KHP é derivada das incertezas dos elementos que o compõem. As massas atômicas e as incertezas de cada elemento do sal estão apresentadas na **Tabela B1**, atualizadas para a última versão da IUPAC (Eurachen/CITAC, 2000).

Tabela B1 - Massas atômicas e incertezas dos elementos de KHP.

<i>Elemento</i>	<i>Massa atômica</i>	<i>Incerteza indicada</i>	<i>Incerteza padrão</i>
C	12.0106	± 0,0010	± 0,00058
H	1,00798	± 0,00014	± 0,000081
O	15,99940	± 0,00037	± 0,000214
K	39,0983	± 0,0001	± 0,00006

Os valores de incerteza publicados pela IUPAC apresentam uma distribuição retangular e, por isso, os valores da incerteza padrão foram calculados como em (4). A incerteza da soma de cada elemento é calculada multiplicando a incerteza padrão de cada uma pelo número de átomos de cada elemento presentes em KHP. Assim, as incertezas dos elementos estão apresentadas na **Tabela B2**.

Tabela B2 - Cálculo das incertezas total de cada elemento.

<i>Elemento</i>	<i>Cálculo</i>	<i>Resultado</i>	<i>Incerteza padrão</i>
C	8 x 12.0106	96,0848	± 0,00464
H	5 x 1,00798	5,03990	± 0,000405
O	4 x 15,99940	63,99760	± 0,000856
K	1 x 39,0983	39,0983	± 0,00006

Assim, o cálculo da incerteza da massa molecular é:

$$u(M_{KHP}) = \sqrt{0,00464^2 + 0,000405^2 + 0,000856^2 + 0,00006^2} = 0,00474 \text{ gmol}^{-1} \quad (8)$$

- **Volume de solução utilizado:** as fontes de incerteza do volume de solução utilizado são: repetitividade do uso, temperatura, calibração e erro sistemático do ponto final de calibração. Tal como para a pesagem, a repetitividade é avaliada em uma seta separada. A incerteza derivada da falta de controle da temperatura é calculada utilizando-se o coeficiente de expansão da água

($2,1 \times 10^{-4} \text{ } ^\circ\text{C}^{-1}$), levando-se em consideração uma variação de $\pm 3 \text{ } ^\circ\text{C}$.

$$\frac{19 \cdot 2,1 \cdot 10^{-4} \cdot 3}{1,96} = 0,006 \text{ ml} \quad (9)$$

Neste cálculo foi considerada uma distribuição normal.

O fabricante informa que o limite de exatidão da calibração da bureta é de $\pm 0,03 \text{ ml}$.

Neste caso é assumida uma distribuição triangular (ver sessão 5B):

$$\frac{0,03}{\sqrt{6}} = 0,006 \text{ ml} \quad (10)$$

Como neste exemplo foi utilizado um equipamento para a titulação, esta foi realizada sob uma camada de argônio. Não há, portanto, indicação de que possa ocorrer um erro sistemático de detecção devido à carbonatação da solução. Desta forma, o erro foi considerado desprezível.

Repetitividade: a incerteza derivada das operações realizadas no experimento são agrupadas na seta da repetitividade; é utilizada a medida de repetitividade determinada experimentalmente a partir dos estudos de validação do método analítico.

A **Tabela B3** mostra os valores de cada fonte de incerteza desta medição e suas respectivas incertezas. Baseada na expressão (3), a expressão (11) é utilizada para o cálculo:

$$\frac{u_c(C_{NaOH})}{C_{NaOH}} = \sqrt{0,0005^2 + 0,00033^2 + 0,00029^2 + 0,000023^2 + 0,00070^2} = 0,00097 \quad (11)$$

$$u_c(C_{NaOH}) = C_{NaOH} \cdot 0,00097 = 0,00010 \quad (12)$$

Tabela B3 – Fontes de incerteza e seus respectivos valores.

<i>Fonte de Incerteza</i>	<i>Valor</i>	<i>Incerteza $u(x_n)$</i>	<i>Incerteza relativa $u(x_n)/x_n$</i>
Repetitividade	1,0	0,0005*	0,0005
Massa de KHP	0,3888 g	0,00013 g	0,00033
Pureza de KHP	1,0	0,00029	0,00029
Massa molar de KHP	204,2206 g mol ⁻¹	0,00474 g mol ⁻¹	0,000023
Volume de NaOH	18,65 ml	0,013 ml	0,0007

*Valor obtido dos estudos de validação.

Uma vez estabelecida a incerteza da medição, esta será utilizada para expressar o resultado. Para tanto, o valor da incerteza é multiplicado por um fator de abrangência obtendo-se como resultado a incerteza expandida “*k*”, o resultado final será expresso junto com um intervalo de +1 e -1 a incerteza expandida, no qual o resultado real se encontra com uma determinada confiança. A escolha do fator *k* leva em consideração o nível de confiança requerido, a distribuição do resultado e o número de graus de liberdade. Na maioria dos casos é assumida a distribuição normal, *k*=2 é utilizado para 95% de confiança. No caso de poucos graus de liberdade, a distribuição de *t* de Student é recomendada. Neste caso, o valor de *k* depende do número de graus de liberdade (Eurachem/CITAC, 2000).

B3) Cálculo da incerteza pela técnica de Calorimetria Diferencial Exploratória.

A calorimetria diferencial exploratória (CDE) foi apresentada no **Capítulo 3**. Nesta seção será apresentado o cálculo da incerteza desta técnica proposto por Gao e colaboradores (2011). Os autores identificam as seguintes fontes de incerteza para a técnica: medição da entalpia, massa molecular do analito, fração fundida, determinação da temperatura de fusão, determinação da depressão de temperatura de fusão, pesagem e outras variáveis que afetam a determinação da pureza (expressas como *f*).

Estas fontes são baseadas na expressão abaixo.

$$x_2 = \frac{QMF\Delta T}{mRT_0^2} \cdot f \quad (13)$$

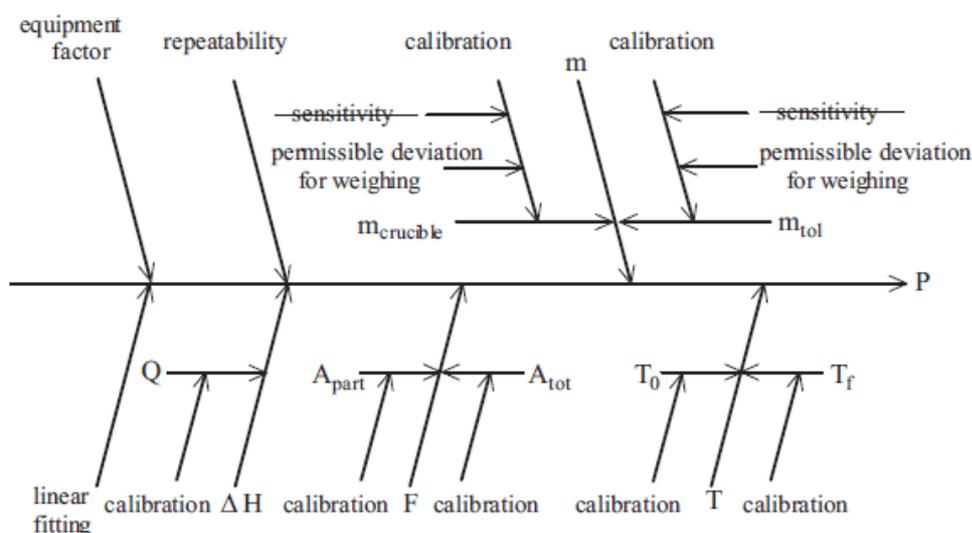
Onde x_2^* é a fração molar da impureza, *Q* é a entalpia da medição, *M* é a massa molecular, *F* a fração fundida, ΔT é a depressão da temperatura de fusão, *m* é a

massa pesada da amostra, R é a constante dos gases e T_0 a temperatura de fusão. A expressão da incerteza é a que segue:

$$u_{x_2}^2 = \left(\frac{u_c(Q)}{Q}\right)^2 + \left(\frac{u_c(M)}{M}\right)^2 + \left(\frac{u_c(F)}{F}\right)^2 + \left(\frac{u_c(\Delta T)}{\Delta T}\right)^2 + \left(\frac{u_c(m)}{m}\right)^2 + \left(u_c \frac{T_0}{T_0}\right)^2 + \left(\frac{u_c(f)}{f}\right)^2 \quad (14)$$

A incerteza da entalpia é calculada a partir da incerteza do Índio padrão utilizado para a calibração do equipamento. A incerteza da massa molecular é calculada a partir das incertezas dos elementos divulgada pela IUPAC. A incerteza de F é calculada a partir da incerteza da correção linear de F . As incertezas da temperatura são calculadas a partir da incerteza do Índio padrão, da repetitividade da medida e do erro de T_0 . A incerteza da massa é calculada a partir da incerteza da balança e da repetitividade da pesagem. A incerteza dos fatores adicionais é calculada a partir do erro do *software* e da variabilidade dos resultados. A **Figura B3** apresenta o diagrama de causa e efeito desta técnica.

Figura B3 - Diagrama de causa e efeito da incerteza da análise por CDE.



B4) Cálculo da incerteza para a técnica de ressonância magnética nuclear de hidrogênio quantitativa (RMNHq).

A Ressonância magnética nuclear de hidrogênio já foi apresentada no **Capítulo 3**. Al-Deen e colaboradores (2004) apresentaram o cálculo de incerteza que segue apontando as seguintes fontes de incerteza: massa molecular do analito,

massa molecular da referência, incerteza da pesagem, área dos sinais do analito e da referência e pureza da referência. Estas fontes de incerteza estão baseadas na expressão abaixo:

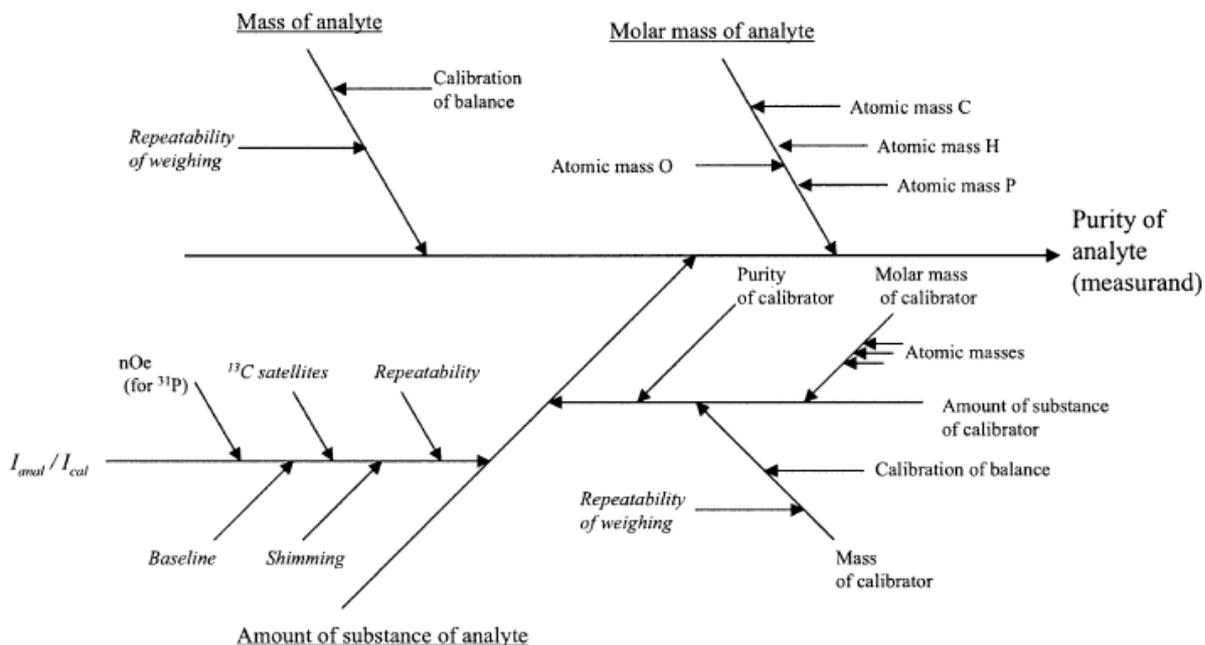
$$P_{analito} = \frac{I_{analito} m_{ref} \rho_{ref} M_{analito}}{I_{ref} m_{analito} \rho_{analito} M_{ref}} \quad (15)$$

Onde $P_{analito}$ é a pureza do analito, $I_{analito}$ é a área do analito, m_{ref} é a massa da referência, $\rho_{analito}$ é o número de núcleos no sinal do analito, $M_{analito}$ é a massa molecular no analito, I_{ref} é a área da referência, $m_{analito}$ é a massa do analito, ρ_{ref} é o número de núcleos no sinal da referência e M_{ref} é a massa molecular da referência. A incerteza é calculada pela seguinte expressão.

$$u_{P_{analito}}^2 = \left(\frac{u_I^2}{I_{ref}^2} \right) \cdot \left(1 - \frac{I_{analito}}{I_{ref}} \right)^2 + \left(\frac{u_m^2}{m_{analito}^2} \right) \cdot \left(1 - \frac{m_{ref}}{m_{analito}} \right)^2 + \left(\frac{u_M^2}{M_{ref}^2} \right) \cdot \left(1 - \frac{M_{analito}}{M_{ref}} \right)^2 + \left(\frac{u_{P_{ref}}}{P_{ref}} \right)^2 \quad (15)$$

As incertezas das massas moleculares são calculadas a partir da incerteza dos elementos divulgada pela IUPAC. A incerteza da pesagem é baseada na incerteza da calibração da balança. A incerteza das áreas dos sinais é calculada a partir da repetitividade destes sinais com o cálculo do desvio padrão e erro padrão. A incerteza da referência é calculada a partir dos certificados da mesma. O cálculo da incerteza apresentado em (15) é um pouco diferente pois as fontes de incerteza não são todas independentes entre si; assim, fontes similares foram agrupadas em uma única expressão. A **Figura B4** mostra o diagrama de causa e efeito da análise por RMNHq.

Figura B4 - Diagrama de causa e efeito da incerteza da análise de RMNHq.

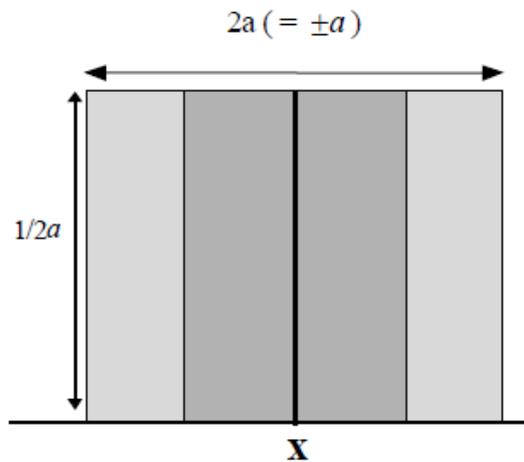


B5) Tipos de incerteza

O documento da Eurachem *Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement* define dois tipos de avaliação de incerteza: tipo A e tipo B. As incertezas do tipo A são aquelas avaliadas por análise estatística, enquanto as do tipo B são aquelas avaliadas por outros meios. Um exemplo foi apresentado por Kim e colaboradores ao certificar uma amostra de ginsenosídeo Rg1. Ao calcular a incerteza das impurezas orgânicas os autores utilizaram CLAE acoplado a detector de AFD e detector de DAC. Apesar do segundo detector ser considerado como universal, sua resposta varia durante a corrida ao utilizar gradiente. Por outro lado, as respostas de diferentes substâncias variam significativamente no uso do DAD. Para compensar as diferenças entre as duas técnicas os autores calcularam a diferença da fração de ginsenosídeo Rg1 entre os dois detectores e consideraram esse valor como incerteza. Este valor foi escolhido por uma avaliação não estatística, portanto é incerteza de tipo B.

Os tipos de incerteza estão ligados ao tipo de distribuição que consideram que tenham. Três tipos de distribuição são normalmente utilizados em cálculo de incerteza: retangular, triangular e normal. A distribuição retangular é denominada assim porque, dentro do seu intervalo, a probabilidade de acontecer um resultado é constante.

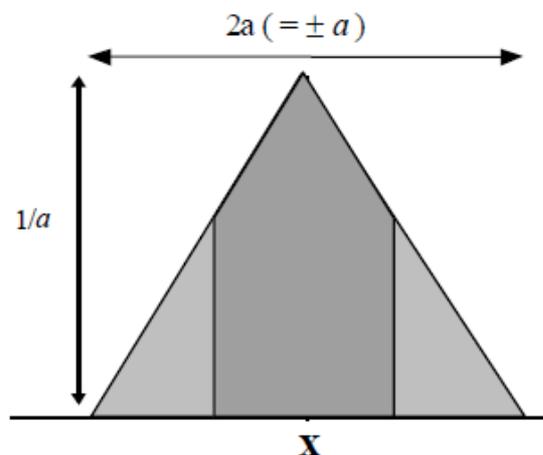
Figura B5 - Distribuição retangular.



A **Figura B5** apresenta uma representação da distribuição retangular. Para uma incerteza a com média X a probabilidade de ocorrer um resultado é igual no intervalo $X \pm 2a$. Este tipo de distribuição é utilizada quando não se tem conhecimento da distribuição dos dados. Para o cálculo da incerteza padrão a incerteza é dividida por $\sqrt{3}$.

A distribuição triangular, por outro lado, favorece a ocorrência de resultados mais próximos da média.

Figura B6 - Distribuição triangular.



A **Figura B6** apresenta uma representação da distribuição triangular. Para uma incerteza a com média X , a probabilidade de ocorrer um resultado no intervalo $X \pm 2a$ é maior próximo da média e menor nas extremidades do intervalo. Esta

distribuição é utilizada quando se tem a percepção de que a distribuição dos dados não é homogênea mas não se comprovou a normalidade. Para o cálculo da incerteza padrão divide-se a incerteza por $\sqrt{6}$.

Tanto a distribuição retangular quanto a triangular são utilizadas em incertezas do tipo B.

A distribuição normal é aquela normalmente utilizada em avaliações estatísticas quando se conhece que a distribuição dos dados é normal (**Figura B7**). Nesta distribuição a incerteza é o desvio padrão e a incerteza padrão é o erro padrão. Esta distribuição é utilizada em incertezas do tipo A.

Figura B7 - Distribuição normal.

