

Marcelo Raul Romero Tappin

Desenvolvimento de metodologia analítica  
para a quantificação de tetranortriterpenóides  
em óleo de “andiroba”

PPVGS / INCQS

FIOCRUZ

2007

Desenvolvimento de metodologia analítica para a quantificação  
de tetranortriterpenóides em óleo de “andiroba”

Marcelo Raul Romero Tappin

Programa de Pós-graduação em Vigilância Sanitária  
Instituto Nacional de Controle da Qualidade em Saúde  
Fundação Oswaldo Cruz

Orientadores

Prof. Dr. Leonardo Lucchetti Caetano da Silva

Prof. Dr. Antonio Carlos Siani

Rio de Janeiro

2007

Desenvolvimento de metodologia analítica para a quantificação de tetranortriterpenoides em óleo de “andiroba”.

Marcelo Raul Romero Tappin

Dissertação submetida à Comissão Examinadora composta pelo corpo docente do programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle da Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz e por Professores convidados de outras instituições, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre.

Aprovado

---

Profa. Dra. Tereza Cristina dos Santos

---

Prof. Dr. Antonio Jorge Ribeiro da Silva

---

Profa. Dra. Maria das Graças M. O. Henriques

Orientadores:

---

Prof. Dr. Leonardo Luccetti Caetano da Silva

---

Prof. Dr. Antonio Carlos Siani

Rio de Janeiro

2007

Tappin, Marcelo Raul Romero

Desenvolvimento de metodologia analítica para a quantificação de tetranortriterpenoides em óleo de “andiroba”. / Marcelo Raul Romero Tappin. Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2007

xxi, 144p., il., tab.

Dissertação(Mestrado) – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Programa de Pós-graduação em Vigilância Sanitária, Rio de Janeiro, 2007. Orientadores: Leonardo Lucchetti Caetano da Silva e Antonio Carlos Siani.

*1. Carapa guianensis Aubl. 2. Óleo de “andiroba” 3. Tetranortriterpenoides 4. Cromatografia líquida de alta eficiência 5. Cromatografia a gás de alta resolução 6. Validação de metodologias analíticas. I. Título*

Dedicatória  
Dedico este trabalho à minha família  
aos meus pais, exemplo de vida

## Agradecimentos

A Katia, minha esposa, pelo apoio e força para realizar este trabalho.

A Marcos Jun pela ajuda inestimável durante tudo o trabalho.

A Norberto Polla, Shirley Trajano e Leonardo Coutada pelo apoio.

A Maria das Graças Henriques, Antonio Carlos Siani, Leonardo Lucchetti por acreditarem no meu trabalho.

E a todos aqueles que de alguma forma tornaram este trabalho possível.

Resumo:

O óleo de “andiroba” é um produto natural extraído das sementes de *Carapa guianensis* Aubl. que é conhecida por ser repelente de insetos e de ter uma ação antiinflamatória. Trabalhos indicam que os tetranortriterpenóides presentes no óleo são responsáveis por estas ações.

Uma metodologia analítica para a quantificação de tetranortriterpenóides em óleo de “andiroba” foi desenvolvida. Para tanto foi elaborado um método de preparo de amostra com extração em fase sólida e duas metodologias cromatográficas, uma por cromatografia líquida de alta eficiência e outra por cromatografia a gás de alta resolução. Para o desenvolvimento do método cromatográfico de CLAE utilizou-se um desenho experimental.

O método de extração em fase sólida foi realizado com um suporte de sílica, utilizando clorofórmio para eluir os glicerídeos e uma mistura clorofórmio acetonitrila para eluir os tetranortriterpenóides. O método de cromatografia líquida foi realizado em modo isocrático com fase móvel composta de água/acetonitrila/metanol 35:35:30, coluna C18 e detecção a 210 nm. O método de cromatografia em fase gasosa foi realizado em coluna de 95% metil silicone com 5% de fenil silicone e detecção em detector de ionização de chama.

Para uso como referência na quantificação de tetranortriterpenóides, a 7-desacetoxi-7-oxogedunina, um tetranortriterpenóide, foi isolado através de técnicas diversas como a extração sólido-líquido e extração em fase sólida. A 7-desacetoxi-7-oxogedunina foi caracterizado por cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas, ressonância magnética nuclear e calorimetria exploratória diferencial.

Com a 7-desacetoxi-7-oxogedunina como referência os dois métodos foram pré-validados, ambos apresentando bons resultados para os parâmetros de validação estudados.

Este trabalho contribui para a vigilância sanitária do óleo de “andiroba” e de produtos derivados na medida que fornece uma metodologia de análise, para as substâncias tidas como responsáveis pelas ações farmacológicas deste óleo.

## Abstract

Crabwood oil is a natural product extracted from *Carapa guianensis* Aubl. seeds, its antiinflammatory and repellent properties must be due to the presence of tetranortriterpenoids in this oil.

An analytical methodology for the determination of tetranortriterpenoids in crabwood oil was developed and a sample preparation method involving solid-phase extraction was also developed along with two chromatographic methods, one by high resolution gas chromatography and the other by high performance liquid chromatography. For the development of the HPLC method an experimental design was carried out.

The solid-phase extraction method used silica as support, chloroform to elute glycerides and a mixture of chloroform and acetonitrile to elute tetranortriterpenoids. The liquid chromatography was carried out in isocratic mode with mobile phase composition of water/acetonitrile/methanol 35:35:30, a C18 column and detection at 210 nm. Gas chromatography was carried out with a 95% methyl silicone 5% phenyl silicone column and flame ionization detection.

7-desacetoxy-7-oxogedunin was isolated through methods such as solid-liquid extraction and solid-phase extraction, to be used as reference for the determination of tetranortriterpenoids by the analytical methods. 7-desacetoxy-7-oxogedunin was characterized by Gas Chromatography-Mass Spectrometry, Nuclear Magnetic Resonance and Differential Scanning Calorimetry.

The use of 7-desacetoxy-7-oxogedunin as reference allowed the prevalidation of the two chromatographic methods developed. Both methods showed good performances in the validation parameters studied.

This work contributes to the sanitary surveillance of the crabwood oil and related products since it presents analytical procedures for the determination of the class of substances considered to be responsible for this oil's pharmacological properties.



## Lista de siglas

6 $\alpha$	-6 $\alpha$ -acetoxigedunina
7-oxo	-7-desacetoxi-7-oxogedunina
Ang	-angolensato de metila
CGAR	-Cromatografia em fase gasosa de alta resolução
CLAE	-Cromatografia líquida de alta eficiência
cm	-centímetro
CPB	-componentes de polaridade mais baixa
CPE	-componentes de polaridade mais baixa
EFS	-Extração em fase sólida
EM	-Espectrometria de massas
exp	-experimento
fr	-fração
g	-grama
Ged	-gedunina
mg	-miligrama
min.	-minuto
mL	-mililitro
RMN	-Ressonância Magnética Nuclear
TNTPD	-Tetranortriterpenóides

Lista de tabelas:

Tabela 1: Usos medicinais da <i>Carapa guianensis</i> .	3
Tabela 2: Matriz de experimentos para fluxo, volume injetado (Vollnj) e concentração de ácido na fase móvel (CA)	11
Tabela 3: Parâmetros de validação	13
Tabela 4: Condições de CGAR para análise de amostras de isolamento	18
Tabela 5: Solventes e fases testados por cromatografia em camada fina para a EFS	34
Tabela 6: Metodologias analíticas utilizadas nas alíquotas dos experimentos de EFS.	34
Tabela 7: condições dos experimentos preliminares de extração em fase sólida	36
Tabela 8: condições dos experimentos preliminares de Extração em Fase Sólida.	37
Tabela 9: Estudo da etapa de eluição de componentes de polaridade baixa	38
Tabela 10: Estudo da etapa de eluição de componentes de polaridade alta	39
Tabela 11: Metodologia de extração em fase sólida otimizada	40
Tabela 12: Metodologia de CLAE utilizada no estudo de recuperação	40
Tabela 13: Método inicial de CGAR	41
Tabela 14: Otimização de método de CGAR na coluna HP-5ms	42
Tabela 15: Otimização de método de CGAR na coluna HP-5ht.	42
Tabela 16: Otimização de método de CGAR na coluna HP-5ht (cont).	43
Tabela 17: Método de CLAE original	44
Tabela 18: Método preliminar desenvolvido para CLAE	44
Tabela 19: Método de preparo de amostra utilizada para o desenho experimental 1	45
Tabela 20: Desenvolvimento da fase móvel ternária	46
Tabela 21: Preparo da curva de calibração de CLAE	48
Tabela 22: Preparo da curva de calibração de CGAR	48

Lista de tabelas(cont):

Tabela 23: Metodologia dos parâmetros de validação.	48
Tabela 24: Metodologia cromatográfica para a detecção de tetranortriterpenóides	49
Tabela 25: Metodologia de preparo de amostra utilizada na quantificação	49
Tabela 26: Massas das frações que compuseram a amostra final.	50
Tabela 27: Rendimento e pureza dos experimentos de concentração de 7-oxo.	50
Tabela 28: Comparação dos deslocamentos de Hidrogênio obtidos com os da literatura.	54
Tabela 29: Comparação dos espectros de Carbono com literatura.	55
Tabela 30: Resultados dos estudos de recuperação	92
Tabela 31: Método otimizado de CLAE.	104
Tabela 32: Repetitividade do método de CLAE.	108
Tabela 33: Repetitividade do método CGAR.	109
Tabela 34: Limites de Detecção dos métodos de CLAE e CG.	111
Tabela 35: Limites de Quantificação dos métodos de CLAE e CG.	111
Tabela 36: Resultado da quantificação dos tetranortriterpenóides.	112
Tabela 37: Metodologia de CGAR otimizada.	114

Lista de Figuras:

Figura 1: Fotos da árvore, folhas, frutos, castanhas e casca da <i>C. guianensis</i> .	3
Figura 2: Tetranortriterpenóides isolados de <i>C. guianensis</i>	7
Figura 3: Tetranortriterpenóides isolados de <i>C. guianensis</i> .	8
Figura 4: Esquema de representação dos experimentos.	11
Figura 5: Esquema de desenho de composto central de dois fatores.	12
Figura 6: Fluxograma de isolamento de purificação de referência dos experimentos 1 e 2.	19
Figura 7: Fluxograma de isolamento e purificação de referência continuação dos experimentos 1 e 2.	20
Figura 8: Fluxograma de isolamento e purificação de referência do experimento 3.	21
Figura 9: Fluxograma de isolamento e purificação de referência do experimento 4.	22
Figura 10: Fluxograma de isolamento e purificação de referência continuação do experimento 4	23
Figura 11: Fluxograma de isolamento e purificação de referência do experimento 5.	24
Figura 12: Fluxograma de isolamento e purificação de referência continuação do experimento 5.	25
Figura 13: Fluxograma de isolamento e purificação de referência continuação do experimento 5	26
Figura 14: Fluxograma de isolamento e purificação de referência experimento 6	27
Figura 15: Fluxograma isolamento e purificação de referência experimento 7.	28
Figura 16: Fluxograma de isolamento e purificação de referência continuação dos experimentos 6 e 7.	29
Figura 17: Fluxograma de isolamento e purificação de referência do experimento 8.	30
Figura 18: Fluxograma de união de amostras de diversos.	31

Lista de Figuras (Cont):

Figura 19: Fluxograma da união final das amostras dos diferentes experimentos..	32
Figura 20: Desenho experimental com fase móvel binária de metodologia de CLAE	45
Figura 21: Desenho experimental com fase móvel ternária de método de CLAE.	47
Figura 22: Cromatograma da etapa de obtenção de 7-oxo do experimento 8 com detalhe.	51
Figura 23: Isolamento do grupo de tetranortriterpenoides do experimento 8. (1) Fração eluição de baixo de PB (CHCl <sub>3</sub> .); (2;3;4) Eluição de TNTPD's (CHCl <sub>3</sub> /MeCN 95:5) três frações a primeira e segunda de 20ml e a terceira de 10ml.; (5) Eluição de PE MeCN.	52
Figura 24: Purificação de 7-oxo do experimento 8.	53
Figura 25: Cromatograma da amostra final	54
Figura 26: Espectro de massa da fração final de 7-desacetoxi-7-oxogedunina.	54
Figura 27: Resultados do ensaio de pureza da fração final de 7-desacetoxi-7-oxo-gedunina.	56
Figura 28: Placas de cromatografia em camada fina do estudo de solvente	57
Figura 29: Cromatograma óleo de "andiroba" com as regiões dos três principais grupos de substâncias. Legenda: Ang: angolensato de metila; Ged: gedunina; 7-oxo: 7-desacetoxi-7oxogedunina; 6α: 6α-acetoxi-gedunina.	58
Figura 30: Cromatogramas do Experimento 1 Cromatogramas: 1-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> (3); 2-MeCN(3); 3-MeCN(4); 4-MeCN(5); 5-MeOH(4)	59
Figura 31: Cromatogramas das frações CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> do experimento 2.	60
Figura 32: Cromatogramas das frações MeCN do experimento 2.	61
Figura 33: Cromatogramas das frações MeOH do experimento 2.	62
Figura 34: Cromatogramas das frações CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> do experimento 3.	63

Lista de Figuras (Cont):

Figura 35: Cromatogramas das frações CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeCN 99/1 (V/V) do experimento 3.	64
Figura 36: Cromatogramas das frações MeCN do experimento 3.	65
Figura 37: Cromatogramas das frações CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> do experimento 4.	66
Figura 38: Cromatogramas das frações CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> do experimento 4.	67
Figura 39: Cromatogramas das frações CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeCN do experimento 4.	68
Figura 40: Cromatogramas das frações CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeCN do experimento 4.	69
Figura 41: Cromatogramas das frações CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> do experimento 5. O primeiro cromatograma refere-se aos primeiros 10ml de CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> .	70
Figura 42: Cromatogramas das frações CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> do experimento 5	71
Figura 43: Cromatogramas das frações MeCN do experimento 5	72
Figura 44: Cromatogramas da fração de 20ml de CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> do experimento 6.	73
Figura 45: Cromatogramas da frações CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeCN do experimento 6.	73
Figura 46: Detalhe de cromatograma da fração CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeCN (3) do experimento 6.	74
Figura 47: Cromatogramas das frações de MeCN do experimento 6.	74
Figura 48: Cromatograma da fração CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> do experimento 7.	75
Figura 49: Cromatograma da fração CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeCN do experimento 7.	75
Figura 50: Detalhe do cromatograma da fração CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeCN do experimento 7.	75
Figura 51: Cromatograma da fração MeCN do experimento 7.	75
Figura 52: Cromatogramas das frações CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> [1], CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeCN [2] e MeCN [3] do experimento 8.	76
Figura 53: Detalhe do cromatograma da fração MeCN [3] do experimento 8	76

Lista de Figuras (Cont):

Figura 54: Cromatogramas das fr. $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ [1], $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeCN}$ [2] e $\text{MeCN}$ [3] do exp. 9	77
Figura 55: Detalhe do cromatograma das frações de $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeCN}$ do experimento 9.	77
Figura 56: Cromatogramas das frações $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ [1] e $\text{MeCN}$ [2] do experimento 10.	78
Figura 57: Detalhe do cromatograma da fração $\text{MeCN}$ do experimento 10.	78
Figura 58: Cromatogramas das frações $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ [1] e $\text{MeCN}$ [2] do experimento 11	79
Figura 59: Detalhe dos cromatogramas da fração $\text{MeCN}$ do experimento 11.	79
Figura 60: Cromatogramas das frações $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ [1]. $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeCN}$ [2] e $\text{MeCN}$ [3] do experimento 12.	80
Figura 61: Cromatogramas das frações $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeCN}$ [1] e $\text{MeCN}$ [2] do experimento 12 aprox..	80
Figura 62: Cromatogramas das frações $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ [1]. $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeCN}$ [2] e $\text{MeCN}$ [3] do experimento 13.	81
Figura 63: Detalhe dos cromatogramas das frações $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeCN}$ [1] e $\text{MeCN}$ [2] do experimento 13	81
Figura 64: Cromatogramas das frações $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ [1], $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeCN}$ [2] e $\text{MeCN}$ [3] do experimento 14	82
Figura 65: Cromatogramas das frações $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ [1], $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeCN}$ 9/1 [2] e 8/2 (V/V) [3] e $\text{MeCN}$ [4] do experimento 15.	83
Figura 66: Cromatogramas das frações $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ [1], $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeCN}$ 9/1 [2] e 8/2 (V/V) [3] e $\text{MeCN}$ [4] do experimento 15.	84
Figura 67: Cromatogramas das frações $\text{CHCl}_3$ [1] e $\text{MeCN}$ [2] do experimento 16.	85
Figura 68: Detalhe do cromatograma da fração $\text{MeCN}$ do experimento 16.	85
Figura 69: Cromatogramas do experimento 1 da otimização da EFS, frações $\text{CHCl}_3$ (1, 2, 3 e 4, na ordem).	86

Lista de Figuras (Cont):

Figura 70: Cromatogramas do experimento 1 da otimização da EFS aproximados na região de TNTPDs. Frações $\text{CHCl}_3$ (1, 2, 3 e 4, na ordem).	87
Figura 71: Cromatogramas do experimento 1 da otimização da EFS, frações $\text{CHCl}_3$ (5, 6, 7 e 8, na ordem)	88
Figura 72: Cromatograma da fração MeCN do experimento 1.	89
Figura 73: Cromatogramas das frações de $\text{CHCl}_3$ /Hexano coletados no experimento 2. As frações vão do 1 ao 10, de cima para baixo. Legenda: 7-oxo: 7-desacetoxi-7-oxogedunina; Ang: angolensato de metila; 6 $\alpha$ : 6 $\alpha$ -acetoxi-gedunina; Ged: gedunina.	89
Figura 74: Gráfico de eluição de TNTPDs na fração $\text{CHCl}_3$ /MeCN do experimento 1 de otimização	90
Figura 75: Gráfico de eluição de TNTPDs na fração $\text{CHCl}_3$ /MeCN do experimento 2 de otimização.	90
Figura 76: Gráfico de eluição de TNTPDs na fração $\text{CHCl}_3$ /acetona do experimento 3 de otimização.	91
Figura 77: Cromatograma da segunda fração de $\text{CHCl}_3$ /acetona 95/5 (V/V) do experimento 4 de otimização.	91
Figura 78: Gráfico de eluição de TNTPDs na fração $\text{CHCl}_3$ /MeCN do experimento 5 de otimização.	92
Figura 79: Gráfico de Eluição de TNTPDs na fração $\text{CHCl}_3$ /MeCN do experimento 6 de otimização.	92
Figura 80: Cromatograma do óleo de “andiroba” no método inicial em coluna HP-5.	93
Figura 81: Cromatograma do óleo de “andiroba” no método estabelecido em coluna HP-5ht.	94
Figura 82: Detalhe do cromatograma do óleo de “andiroba” no método estabelecido em coluna HP-5ht.	94
Figura 83: Cromatograma do óleo de “andiroba” no método estabelecido em CG-EM em coluna HP-5ms.	95



Lista de Figuras (Cont):

Figura 84: Detalhe do cromatograma do óleo de “andiroba” no método estabelecido em CG-EM em coluna HP-5ms. Legenda: Ang: angolensato de metila; Ged: gedunina; 7-oxo: 7-desacetoxi-7-oxogedunina; 6 $\alpha$ : 6 $\alpha$ -acetoxi-gedunina.	95
Figura 85: Espectro de massas do angolensato de metila.	95
Figura 86: Espectro de massas da gedunina.	96
Figura 87: Espectro de massas do 7-desacetoxi-7-oxogedunina.	96
Figura 88 Espectro de massas do 6 $\alpha$ -acetoxi-gedunina	96
Figura 89: Cromatograma do precipitado de TNTPDs analisado no método original.	97
Figura 90: Cromatograma de uma amostra de óleo de “andiroba” analisada pelo método preliminar.	97
Figura 91: Cromatograma de 7-oxo analisado no método preliminar.	98
Figura 92: Cromatograma de angolensato de metila analisado no método preliminar.	98
Figura 93: Cromatograma de 6 $\alpha$ -acetoxi-gedunina analisado no método preliminar.	99
Figura 94: Cromatograma de gedunina analisado no método preliminar.	99
Figura 95: Cromatograma do segundo experimento do primeiro desenho experimental.	100
Figura 96: Cromatograma de uma amostra de óleo de andiroba a com fase móvel de MeCN/MeOH/H <sub>2</sub> O.	101
Figura 97: Tabela de efeitos principais do desenho experimental.	101
Figura 98: Tabela de ANOVA do desenho experimental.	102
Figura 99: Gráfico de <i>desirability</i> do desenho experimental.	102
Figura 100: Gráfico de superfície de resposta do desenho experimental em 3D.	103
Figura 101: Gráfico de superfície de resposta do desenho experimental em 2D.	103
Figura 102: Cromatograma do óleo de “andiroba” pelo método otimizado pelo desenho experimental	104

Lista de Figuras (Cont):

Figura 103: Regressão linear do método de CLAE.	105
Figura 104: Regressão linear do método de CG.	105
Figura 105: Gráfico de preditos x resíduos do método de CLAE.	106
Figura 106: Gráfico de preditos x resíduos do método de CG.	106
Figura 107: Gráfico de dispersão com modelo de CLAE.	107
Figura 108: Gráfico de dispersão com modelo de CG.	107
Figura 109: Espectros de UV e pureza dos tetranortriterpenóides	110

## Sumário

1.0	Introdução	
1.1	A espécie <i>Carapa guianensis</i>	1
1.1.1	Características botânicas	1
1.1.2	Estudos sobre a carapa guianensis voltados para a área de saúde.	3
1.1.3	Patentes	4
1.1.4	Tetranortriterpenoides	6
1.1.5	O óleo de “andiroba”	9
1.2	Desenvolvimento e garantia da qualidade de métodos analíticos	10
1.2.1	Desenho experimental	10
1.2.2	Validação	12
2.0	Objetivos	15
3.0	Materiais e Métodos	16
3.1	Isolamento e purificação de referência	16
3.1.1	Obtenção de fração enriquecida de 7-desacetoxi-7-oxogedunina	16
3.1.2	Isolamento do grupo de tetranortriterpenóides	17
3.1.3	Purificação de 7-oxo	17
3.1.4	Fluxogramas	18
3.1.5	Caracterização da amostra final reunida de 7-descetoxi-7-oxogedunina	33
3.2	Preparo da amostra de óleo de “andiroba” para análise por cromatografia	33
3.2.1	Seleção de solvente e fase	33
3.2.2	Ensaio das condições de extração em fase sólida	34
3.2.2.1	Estudos preliminares de extração em fase sólida	34
3.2.2.2	Otimização por etapas da extração em fase sólida	38
3.2.3	Estudo de recuperação	40
3.3	Desenvolvimento de métodos analíticos	41
3.3.1	Cromatografia a gás de alta resolução	41
3.3.2	Cromatografia líquida de alta eficiência	44
3.3.2.1	Fase móvel binária	44
3.3.2.2	Fase móvel ternária	46

3.4 Pré-validação	47
3.5 Quantificação de tetranortiterpenoides	49
4.0 Resultados	50
4.1 Isolamento e purificação de referência	50
4.1.1 Obtenção de fração enriquecida de 7-oxo	50
4.1.2 Isolamento do grupo de tetranortriterpenóides	52
4.1.3 Purificação de 7-oxo	53
4.1.4 Caracterização da amostra final	53
4.2 Preparo da amostra de óleo de “andiroba” para análise por cromatografia	57
4.2.1 Seleção de solvente e fase	57
4.2.2 Ensaio das condições de extração em fase sólida	58
4.2.2.1 Estudos preliminares de extração em fase sólida	58
4.2.2.2 Otimização por etapas da extração em fase sólida	86
4.2.3 Recuperação	92
4.3 Métodos analíticos	93
4.3.1 Cromatografia a gás de alta resolução	93
4.3.2 Cromatografia líquida de alta eficiência	97
4.4 Pré-Validação	105
4.4.1 Linearidade	105
4.4.2 Precisão	108
4.4.3 Seletividade	110
4.4.4 Limite de detecção	111
4.4.5 Limite de quantificação	111
4.5 Quantificação de tetranortiterpenoides	112
5.0 Discussão	113
5.1 Desenvolvimento de métodos de análise por CGAR	113
5.2 Preparo de amostra por extração em fase sólida	115
5.2.1 Seleção do solvente e da fase	115
5.2.2 Ensaio das condições de extração em fase sólida	116
5.2.2.1 Estudos preliminares de extração em fase sólida	116
5.2.2.2 Otimização por etapas da extração em fase sólida	118
5.2.3 Estudo de recuperação	119
5.3 Isolamento e purificação de referência	120

5.3.1	Obtenção de fração enriquecida de 7-oxo	120
5.3.2	Isolamento do grupo de tetranortriterpenóides	121
5.3.3	Purificação de 7-oxo	122
5.3.4	Caracterização da amostra	123
5.4	Desenvolvimento de método de análise por CLAE	123
5.4.1	Fase móvel binária	124
5.4.2	Fase móvel ternária	124
5.5	Pré-validação	126
5.5.1	Linearidade	126
5.5.2	Repetitividade	127
5.5.3	Seletividade	127
5.5.4	Limite de Detecção em Quantificação	127
5.6	Quantificação de tetranortriterpenóides	128
6.0	Conclusão	129
7.0	Referências	130
	Anexo I	140

## 1.0 Introdução

### 1.1 A espécie *Carapa guianensis* Aubl.

#### 1.1.1 Características Botânicas

A espécie *Carapa guianensis* Aubl. (Meliaceae), conhecida popularmente como “andiroba”, é uma árvore de grande porte, alcançando até 30m de altura com tronco reto e cilíndrico. A casca é amarga e avermelhada, fissurada em tiras estreitas, superficialmente caduca, com espessura de até 1 cm, apresentando descamação nas placas. As folhas são compostas longo-peciolados alternas, com 30-60 cm de comprimento e até 50 cm de largura, apresentando folíolos parimpinados com até 19 pares, em sua maioria opostos, ovais-oblongos, curtos-cuspidados ou agudos, subcoriáceos, verde-escuros, glabros, planos, de margem inteira, penínervos com nervuras secundárias bem marcadas. A árvore apresenta inflorescências em panículas axilares, principalmente na extremidade dos ramos, com cerca de 30 cm de comprimento. As flores são sub-sésseis, glabras, sub-globosas e de cor creme. O fruto é na forma de cápsula globosa deiscente, com 6-8 cm de diâmetro, tendo em seu interior 8-6 sementes, angulosas, ferrugíneas, que fornecem cerca de 70% de um óleo espesso, de cor amarelo-escuro. *C. guianensis* ocorre em toda a Amazônia, em matas de várzeas ou regiões alagadiças dos rios, as vezes formando pequenas aglomerações. Existe ainda nas Antilhas, Nicarágua, Peru, Suriname, Guianas, África tropical, Colômbia e Venezuela (Vieira et al., 2004). Na figura 1 estão apresentadas fotos da *C. guianensis* e suas partes.

Como espécie vegetal útil, a *C. guianensis* tem se mostrado uma árvore versátil, demonstrado pelos diversos trabalhos publicados sobre ela. É uma fonte de madeira de boa qualidade e seu cultivo é uma boa opção de reflorestamento em áreas degradadas (Bauch et al., 2000). Com este objetivo, foi estudada a morfologia da copa, para avaliar o espaço necessário para a o crescimento desta árvore (Tonini et al., 2005), assim como o fluxo de nutrientes e o balanço e o potencial de água relacionados ao crescimento em suas plantações (Dünisch et al., 2002; 2003). A longevidade das sementes também foi objeto de estudos, tanto em regiões de terra-firme como em várzea (Scarano et al., 2003). Outros trabalhos, com foco ecológico, abordaram a diversidade genética da *C. guianensis* (Hall et al., 1994; Dayanandan et al., 1999; Cloutier et al., 2005; Duminil et al., 2006); incluindo o impacto do desmatamento seletivo na diversidade genética desta árvore (Cloutier et al., 2007), assim como o impacto do desmatamento seletivo no fluxo de CO<sub>2</sub> destas regiões (Silva et al., 2004).





Figura 1: Fotos da árvore, folhas, frutos, castanhas e casca da *C. guianensis*.

O óleo, que é o principal produto desta árvore, é utilizado medicinalmente e vem sendo estudado com vários outros objetivos, por exemplo, como aditivo para prevenir a formação de depósitos em sistemas de exploração de petróleo (Rocha Junior et al., 2006), como matéria-prima para a produção de biotensoativo por processos microbiológicos (Costa et al., 2006) ou ainda no estudo de sistemas de produção de biodiesel (Abreu et al., 2004).



### 1.1.2 Estudos sobre *Carapa guianensis* e derivados voltados para a área de saúde.

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 et al., 1993), conforme descritos na tabela 1.

Tabela 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.
Diarréia	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, mistura que é pingada 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 na parede do cervix.

Coerentemente com os resultados relatados, as propriedades da *C. guianensis* no combate a insetos tem 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. Por outro lado, a atividade repelente a *Aedes sp* do óleo de “andiroba” foi

comparada à do repelente sintético largamente utilizado o N,N-dietil-3-metilbenzamida ou DEET, ao contrário do bagaço o óleo apresentou uma atividade repelente discreta muito inferior ao DEET (Miot et al., 2004). Em uma outra abordagem, dois trabalhos estudaram a atividade inseticida contra larvas de *Aedes sp.* ao invés da atividade repelente, Mendonça et al. (2005) demonstraram a atividade larvicida de várias plantas, onde se incluía o óleo de “andiroba”. Estes resultados não foram confirmados por Silva et al. (2006), ao comparar, em laboratório, a atividade larvicida do óleo de “andiroba” sobre duas linhagens de *Aedes aegypti*, já que os resultados variaram para as duas linhagens. A atividade larvicida do bagaço da *C. guianensis* contra larvas de *Aedes albopictus* também foi demonstrada por Silva et al. (2004) e, por fim, alguns tetranortriterpenóides foram isolados por Ambrozin et al. (2006), que também demonstraram uma moderada atividade inseticida destes contra as espécies de formigas *Atta sexdens rubropilosa*.

Outro alvo terapêutico que tem sido explorado, também coerente com o saber popular, é o efeito antiinflamatório da “andiroba”. A atividade antiedematogênica, analgésica e antialérgica do óleo de “andiroba” foi comprovada e os resultados indicaram os tetranortriterpenóides como responsáveis por este efeito (Penido et al., 2005). Estudos mais detalhados da atividade antiinflamatória dos TNTPD demonstraram sua ação terapêutica em modelos *in vivo* de artrite, assim como a atividade antialérgica em modelos mais específicos (Penido et al., 2006a e 2006b). Adicionalmente, o óleo de “andiroba” não evidenciou qualquer efeito toxicológico em ratos Wistar (Costa-Silva et al., 2007).

### **1.1.3 Patentes**

Trabalhos como estes acima descritos colaboraram decisivamente para a comprovação das propriedades da *C. guianensis* atribuídas popularmente. Tal conhecimento faz aumentar o desenvolvimento de produtos e aplicações e, portanto, o conseqüente depósito de patentes. Uma busca na ferramenta de pesquisa Derwent sobre patentes que tratam de “andiroba” ou *Carapa guianensis* conduzem a 13 patentes, as quais podem ser divididas entre cosméticos e medicinais. É interessante notar que quatro das patentes de cosméticos foram depositadas por M. de Castro del Castilho individualmente, sendo que cada uma trata de um cosmético com o óleo de “andiroba”: xampu (1993a), creme condicionador (1993b), sabonete (1993c) e creme hidratante (1993d). Estas patentes foram depositadas no Brasil e,

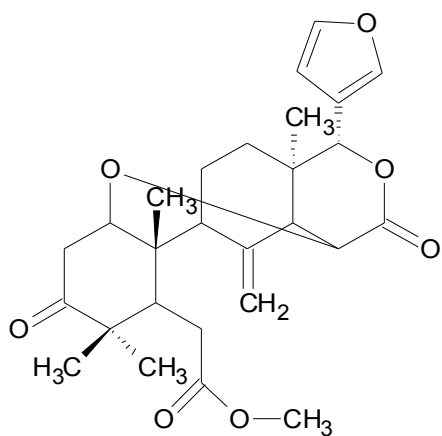
seguindo a legislação, não fazem nenhuma reivindicação terapêutica. As duas demais patentes foram depositadas no Japão; uma delas protege de forma generalizada o uso em formulações cosméticas externas, com o objetivo de melhorar as funções corporais, e são estendidas para outras espécies que não a *C. guianensis* (Lion Corp., 2001). A outra patente é mais específica, e refere-se ao uso de “andiroba” - não mencionando o nome *Carapa guianensis* - e outras plantas, em formulações cosméticas para a prevenção de cabelos brancos (Lion Corp., 2002).

Entre as patentes em saúde, duas são depositadas pela Fiocruz. Uma trata de formulações farmacêuticas com o óleo de “andiroba” e/ou tetranortriterpenóides extraídos desta, para o tratamento de condições alérgicas (2006). A segunda patente, já mencionada acima, trata de dispositivos repelentes baseados em bagaço de *C. guianensis* (2000). Duas outras patentes depositadas no Brasil tratam de formulações tópicas, uma para o tratamento de condições inflamatórias em geral (Gerolano et al., 1988) e outra para o tratamento de vitiligo (Moreira et al., 2000). Chama a atenção também uma terceira patente também depositada no Brasil (Machado et al., 2003) que trata de um dispositivo para repelência de insetos que utiliza óleo de “andiroba” e óleo de “eucalipto”; este tipo de atividade já está coberto pela patente acima mencionada (Fiocruz, 2000) e, por isso mesmo, talvez registrada na classe de jogos, esportes e brinquedos. Outra patente (LAB BIOLOGIE VEGETALE ROCHER YVES, 1998), depositada em vários países, porém não no Brasil, trata do uso de extrato da castanha em formulações tópicas para a prevenir a formação de celulite. Do mesmo autor, há uma outra patente, também sobre uma formulação tópica para o tratamento da celulite, na qual o extrato lipídico da “andiroba” compõe com o hidroalcoólico de “ginseng” e “guaraná” (LAB BIOLOGIE VEGETALE ROCHER YVES, 2003). É interessante notar que nos dois casos fala-se de “andiroba” e não de *C. guianensis*.

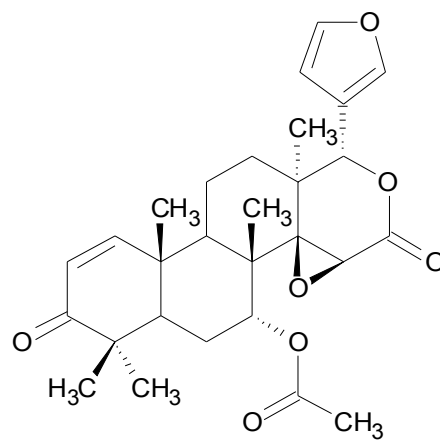
#### **1.1.4 Tetranortriterpenóides**

Os tetranortriterpenóides são moléculas do grupo degradado dos triterpenos, após a perda de 4 átomos de carbono da cadeia lateral. Esta classe de substâncias é conhecida pela sua atividade repelente de insetos e inseticida (Simões et al., 2001), na qual a substância mais conhecida é a azadiractina, produzida pela *Azadirachta indica* (Isman et al., 1990; Kumar et al., 1996; Nathan et al., 2006; Hallur et al., 2002). A azadiractina é talvez o tetranortriterpenóide no estágio mais

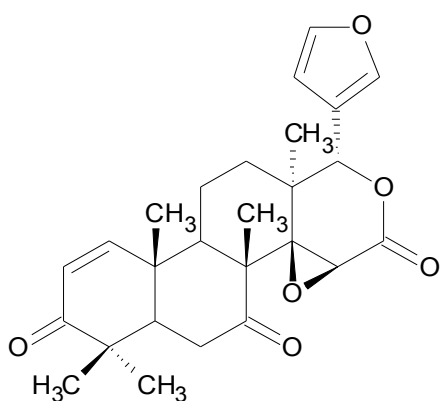
avançado de desenvolvimento tecnológico, considerando que já constitui a base de um produto repelente comercializado nos Estados Unidos (Simões et al., 2001). Alguns trabalhos já tratam da produção desta substância em culturas de células (Prakash et al., 2006; Satdive et al., 2007; Prakash et al., 2007), a partir da cultura da *A. indica* (Tewari et al., 2002; Nanang, 1998) ou da otimização dos processos de extração e purificação (Johnson et al., 1997; Sharma et al., 2003). Assim como a *C. guianensis*, a *A. indica* tem se mostrado bastante versátil, ao gerar estudos sobre temas tão variados, como biodiesel (Azam et al., 2005), como aditivo para adubação de solo (Mohanty et al., 2007) e como suplemento na alimentação de cabras (Patra et al., 2006). A presença de tetranortriterpenóides na *C. guianensis* é conhecida desde a década de 60 (Connolly et al., 1966; Marcelle et al., 1975; Lavie et al., 2001), também com registro em trabalhos mais recentes (Pereira, 1998). Alguns dos tetranortriterpenóides isolados da *C. guianensis* são a 11 $\beta$ -acetoxigedunina, 6 $\alpha$ ,11 $\beta$ -diacetoxigedunina, 7-desacetóxi-7-oxogedunina, andirobina; epoxiazadiradiona, 6 $\alpha$ -acetoxi-epoxiazadiradiona, 6 $\alpha$ -acetoxigedunina; a 6 $\alpha$ -hidroxigedunina, angolensato de metila e gedunina. As figuras 2 e 3 apresentam as estruturas de alguns deles. De *C. guianensis* foram também isolados glicérides, cumarinas, flavonóides e ácidos graxos de cadeia longa (Qi et al., 2003 e 2004).



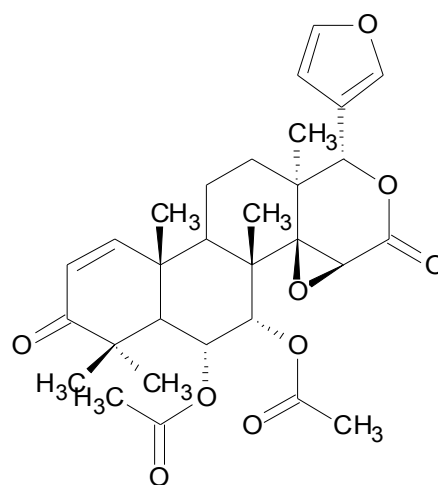
angolensato de metila



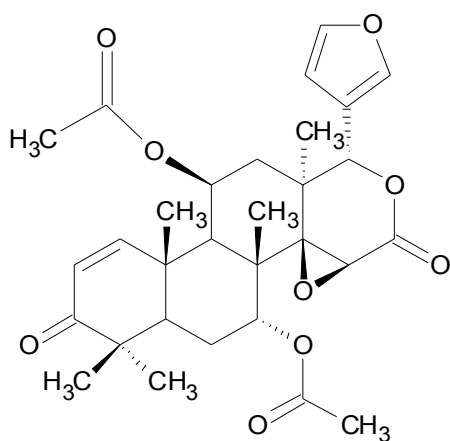
gedunina



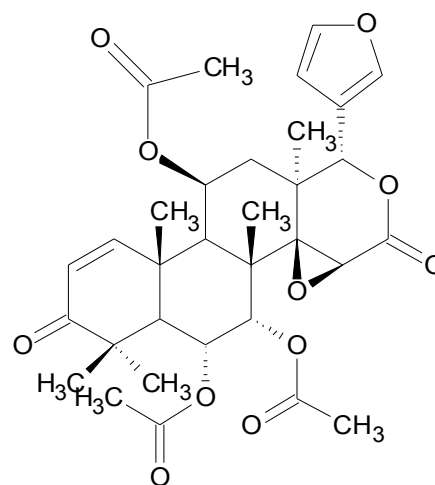
7-desacetoxi-7-oxogedunina



6 $\alpha$ -acetoxipedunina

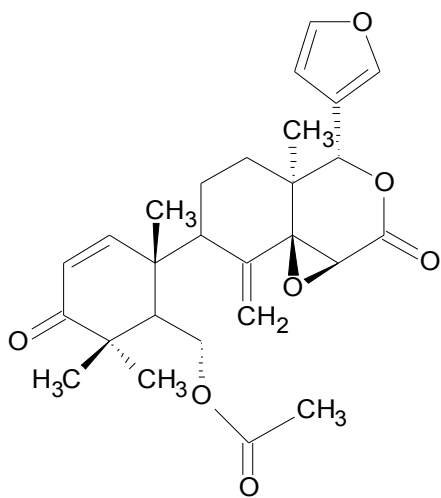


11 $\beta$ -acetoxipedunina

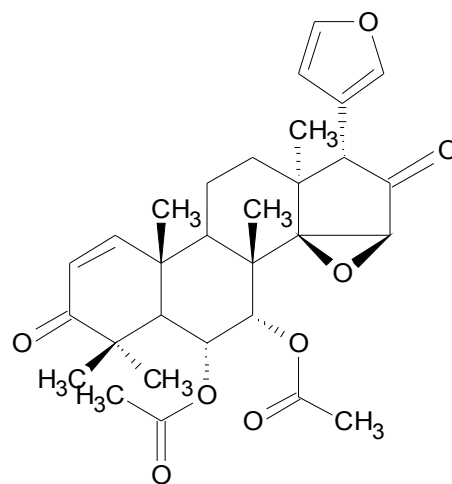


11 $\beta$ , 6 $\alpha$ -diacetoxipedunina

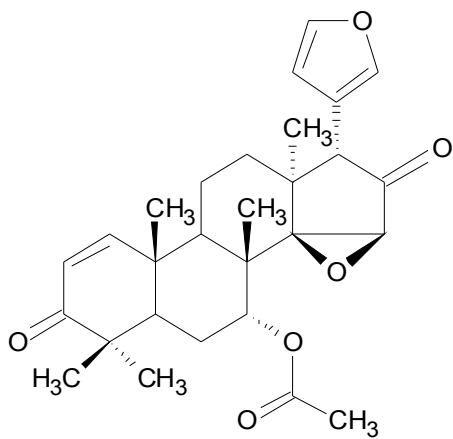
Figura 2: Tetranortriterpenóides isolados de *C. guianensis*



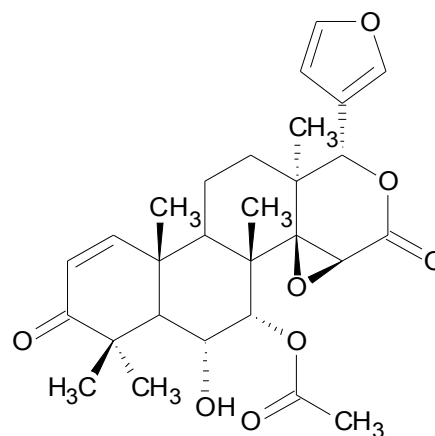
andirobina



6 $\alpha$ -acetoxi-epoxiazadiradiona



epoxiazadiradiona



6 $\alpha$ -hidroxigedunina

Figura 3: Tetranortriterpenóides isolados de *C. guianensis*.

### 1.1.5 O óleo de “andiroba”

O óleo de “andiroba” é o principal insumo extraído da *C. guianensis*. Ele é retirado da castanha, que tem cor branca levemente rosada, é compacta, pouco dura, oleosa e muito amarga. Cerca de até 43% da massa da castanha corresponde ao óleo de “andiroba”, que é extraído por prensagem das sementes britadas secas, método que garante cerca de 30% de rendimento. Outro método, de cunho artesanal, passa por uma fermentação das sementes por cerca de 20 dias formando, no final do processo, uma massa espessa chamada de bagaço. O bagaço é então acondicionado em calhas, por onde o óleo escorre para ser coletado. O rendimento deste processo é mais baixo, ficando ao redor de 18%. Várias empresas no norte do país produzem o óleo de “andiroba” com estes procedimentos visando à produção de insumos farmacêuticos, cosméticos ou com fins alimentares (Pereira, 1998). O óleo de “andiroba” é constituído principalmente de glicerídeos, ácidos graxos e substâncias minoritárias como os tetranortriterpenóides (Pereira, 1998). Para a análise destas substâncias estão indicadas a princípio técnicas cromatográficas convencionais como Cromatografia a Gás de Alta Resolução (CGAR) e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Ambas as técnicas já foram utilizadas anteriormente para o estudo de extratos derivados da *C. guianensis* (Pereira, 1998).

O óleo de andiroba é vendido indiscriminadamente, por exemplo na internet, (Orsa Florestal, 2007; Albrasil, 2007) propalando suas atividades acima mencionadas, mas sem um controle efetivo de sua qualidade.

## 1.2 Desenvolvimento e garantia da qualidade de métodos analíticos

Nos últimos anos o desenvolvimento de métodos analíticos têm sido aprimorado pelo uso de ferramentas estatísticas que conferem mais confiabilidade aos métodos analíticos desenvolvidos. Duas dessas ferramentas são o Desenho Experimental e a Validação de Métodos Analíticos. A seguir apresenta-se uma breve discussão sobre estas ferramentas.

### 1.2.1 *Desenho Experimental*

O desenvolvimento de métodos químico-analíticos é tradicionalmente realizado de forma empírica. Normalmente, varia-se um dos parâmetros mantendo-se os demais fixos; num procedimento que nem sempre permite a avaliação das interações entre os diferentes parâmetros envolvidos. Para contornar esta questão, se utilizam ferramentas estatísticas chamadas de Desenhos Experimentais. Estas ferramentas não são novas, uma vez que algumas delas datam da metade do século passado (Teófilo et al. apud Dohelert, 2006) e tiveram seu uso difundido com o avanço da informática através de softwares específicos que, no entanto, não foram desenvolvidos apenas com o objetivo de atender aos métodos analíticos, mas também ao desenvolvimento e a otimização de processos em geral. Existem vários tipos de desenhos experimentais e é necessário determinar qual o mais apropriado para cada situação.

No geral, os desenhos podem ser divididos em dois tipos, que também descrevem as etapas do trabalho: desenhos de triagem e desenhos de otimização. A etapa de triagem consiste em mapear todos os parâmetros envolvidos no processo, no intuito de determinar quais são significativos podendo-se, por exemplo, lançar mão de um planejamento fatorial. Neste planejamento, cada parâmetro tem, *a priori*, dois valores estipulados: por exemplo, o fluxo de uma análise cromatográfica pode ser fixado em 0,5 e 1,5 mL/minuto, com o nível inferior sendo denominado como -1, e o superior denominado como +1. Com estes valores limites de -1 e +1, definidos para cada parâmetro, projeta-se uma matriz, onde os dois valores são variados. A tabela 2 exemplifica uma matriz de experimento para um método de CLAE, que considera, além do fluxo, o volume injetado (Vollnj) e a concentração de ácido na fase móvel (CA) como parâmetros. O número de experimentos é igual a  $2^n$ , onde n é o número de parâmetros e neste exemplo pode ser representado por um cubo como na figura 4. Os experimentos são então realizados variando-se apenas



os fatores escolhidos e mantendo-se os demais fixos. Para a análise, deve-se escolher uma variável de saída que reflita o desempenho do processo como, por exemplo, a resolução entre sinais.

Tabela 2: Matriz de experimentos para fluxo, volume injetado (Vollnj) e concentração de ácido na fase móvel (CA).

Experimento	Fluxo	Vollnj	CA
1	0,5 (-1)	5 (-1)	0,1 (-1)
2	1,5 (+1)	5 (-1)	0,1 (-1)
3	0,5 (-1)	40 (+1)	0,1 (-1)
4	1,5 (+1)	40 (+1)	0,1 (-1)
5	0,5 (-1)	5 (-1)	1,0 (+1)
6	1,5 (+1)	5 (-1)	1,0 (+1)
7	0,5 (-1)	40 (+1)	1,0 (+1)
8	1,5 (+1)	40 (+1)	1,0 (+1)

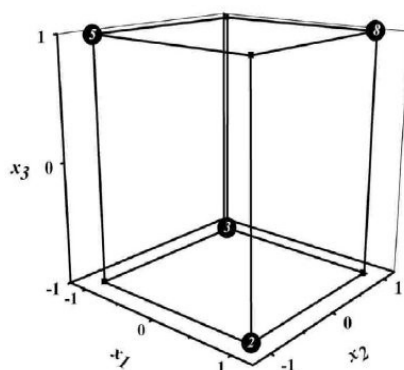


Figura 4: Esquema de representação dos experimentos.

O resultado da análise é a determinação da significância de cada parâmetro para o processo, observando-se que a significância é medida entre os níveis -1 e +1 pré-estipulados. A etapa que se segue é a de otimização. Os parâmetros que não demonstraram significância para o processo são fixados nos valores mais convenientes, geralmente o menor, e se realiza outro desenho com os parâmetros significantes. Neste presente exemplo, determinou-se que CA não é significativo e será utilizado o **desenho de composto central**, como planejamento de otimização para os dois parâmetros significantes. No desenho de composto central, além dos experimentos do planejamento fatorial, são realizados experimentos no ponto central dos parâmetros (definidos pela média entre -1 e +1) e o que se denomina de

experimentos estelares, assim chamados porque geram a forma de uma estrela no esquema do desenho. Um esquema de desenho de composto central com dois parâmetros é apresentado na figura 5.

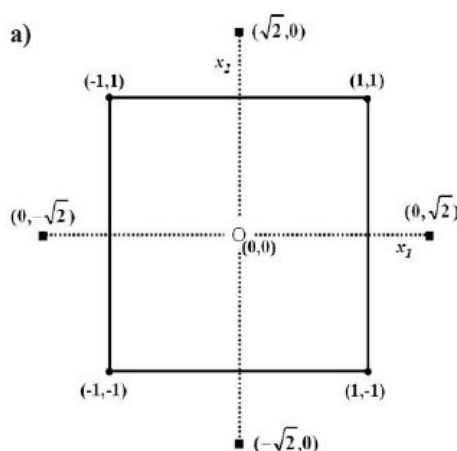


Figura 5: Esquema de desenho de composto central de dois fatores.

O desenho faz, portanto, um mapeamento das variáveis, e com o resultado da variável de saída montam-se gráficos de superfície de resposta. Para tanto, é necessário que se determine o valor desejado para a variável de saída ou **desirability**. Os gráficos de superfície de resposta serão montados em relação à **desirability** e os parâmetros, apontando os valores destes para valor ótimo da variável de saída (Teófilo et al., 2006; Araujo et al., 1996a; Araujo et al., 1996b).

### 1.2.2 Validação

Nos últimos anos, a validação de procedimentos e processos têm se colocado como uma etapa essencial para o desenvolvimento de métodos analíticos. Este procedimento já é exigido, por exemplo, como requisito para o registro de medicamentos, tanto sintéticos como fitoterápicos (Brasil, 2003a; Brasil, 2004). Também a concessão de certificados de boas práticas de fabricação requer a validação dos métodos analíticos (Brasil, 2003b). O processo de validação é o estudo da adequação do método analítico para realizar o que se propõe, ou seja, identificar e/ou quantificar a presença de uma ou mais substâncias em uma determinada matriz. A validação de métodos analíticos é normalmente realizada pela medida de diferentes parâmetros de desempenho (Taverniers et al., 2004; Ribani et al., 2004). Os resultados são então comparados com valores pré-estabelecidos que

dependem de fatores como a aplicação do método, a matriz da amostra, etc. Os parâmetros de validação de métodos cromatográficos estão apresentados na tabela 3.

Tabela 3: Parâmetros de validação(Tavarniers et al. 2004)

Parâmetros de validação	O que avalia
Seletividade	Avalia a capacidade do método em selecionar o sinal da molécula em estudo sem interferência de outros sinais.
Linearidade	Avalia se o método responde de forma linear a variação da concentração da molécula em estudo. Este parâmetro é restrito a faixa de concentração da curva de calibração.
Limite de Detecção	Menor concentração da molécula em estudo em que se pode diferenciar o sinal da molécula do sinal da linha de base.
Limite de Quantificação	Menor concentração da molécula em estudo em que se pode medir a amostra com um coeficiente de variação de 10%.
Exatidão	Avalia a capacidade do método de fornecer resultados próximos ao valor real.
Precisão	Avalia a variabilidade do método, a precisão pode ser dividida em três tipos: <ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Repetitividade – avalia a variabilidade do método entre corridas</li> <li>➤ Precisão intermediária – avalia a variabilidade do método quando sujeitos a variações intralaboratoriais como mudança de equipamento, de dia de analista, etc.</li> <li>➤ Reprodutibilidade – avalia a variabilidade dos resultados entre diferentes laboratórios.</li> </ul>
Robustez	Avalia a capacidade do método de fornecer resultados similares frente a pequenas variações do método.

A validação de métodos é um processo longo e complexo e, por isso, requer uma garantia mínima de que os métodos a serem validados tenham uma boa chance de serem aprovados. Neste sentido, alguns autores têm sugerido que, como etapa final do processo de desenvolvimento, inclua-se uma pré-validação, mas envolvendo menos experimentos, nos moldes do processo normal de validação (Tavarniers et al., 2004; Ribani et al., 2004). Grdinić et al. (2004) propõem dois processos complementares de pré-validação: (i) exploratória, com apenas oito experimentos, usando-se apenas duas replicatas em quatro níveis; e a (ii) pré-

validação completa, com quatro replicatas em seis níveis. Os parâmetros são então calculados e comparados a valores convencionados para técnica analítica e o objetivo da análise.

A validação está, portanto, inserida no processo de desenvolvimento de métodos analíticos, e é cientificamente aceita como sendo essencial para garantir a adequação do método.

## 2.0 Objetivos

Como pode ser verificado, os estudos com a *C. guianensis* têm demonstrado o alto potencial medicinal desta planta. Contudo, não se percebe, na maioria dos estudos, um cuidado maior com a padronização ou mesmo com a origem dos extratos e derivados utilizados desta planta, o que acarreta resultados discrepantes entre trabalhos com focos similares. Portanto, é importante e necessária a quantificação destas substâncias nos extratos de *C. guianensis* utilizados, com a finalidade de verificar a relação destes com a atividade. Por outro lado, há uma quantidade de patentes para produtos que utilizam extratos de *C. guianensis* na composição de dispositivos de repelência de insetos (saneantes), formulações tópicas antiinflamatórias (medicamentos), além de algumas formulações cosméticas. Para a segurança e eficácia do uso destes produtos, é essencial que se disponha de um método para que se possa quantificar estas substâncias em extratos de *C. guianensis*, ainda não disponíveis na literatura.

### Objetivos

- Desenvolver metodologia analítica para a quantificação de tetranortriterpenóides em óleo de *C. guianensis*. Para tanto as seguintes etapas tem que ser cumpridas:
  - Isolar e caracterizar pelo menos um dos tetranortriterpenóides para utilização como referência
  - Desenvolver um método de preparo de amostras para a análise de tetranortriterpenóides em óleo de “andiroba”.
  - **Desenvolver (incluindo validação) e comparar métodos analíticos para a análise de tetranortriterpenóides nas amostras preparadas.**

### 3.0 Material e Métodos

#### 3.1. Isolamento e purificação da referência

O isolamento de 7-desacetoxi-7-oxogedunina (7-oxo) foi realizado a partir de precipitado de tetranortriterpenóides (TNTPD) cedido por Pereira(1998), que o obteve a partir da extração com hexano do bagaço de “andiroba”, em aparelho extrator Soxhlet. O precipitado que se forma a partir do reciclo do solvente no Soxhlet, apresenta quatro TNTPDs: gedunina, angolensato de metila, 6 $\alpha$ -acetoxigedunina e o próprio 7-oxo. Foram retiradas oito amostras do precipitado, as quais foram tratadas com o objetivo de se isolar pelo menos um dos TNTPDs. As amostras foram tratadas por apenas três procedimentos, descritos de forma genérica nos itens 3.1.1; 3.1.2 e 3.1.3. A aplicação dos procedimentos em cada amostra está apresentada nos fluxogramas abaixo.

As amostras retiradas foram analisadas diretamente por cromatografia a gás de alta resolução ou por cromatografia a gás de alta resolução acoplada à espectrometria de massas, e os métodos utilizados estão apresentados na tabela 4. O cromatógrafo a gás foi um CG 6890 da Hewlett-Packard munido de um amostrador automático, um injetor *split-splitless* e um detector de ionização em chama. O equipamento foi controlado por um computador com o software *Chemstation* da *Agilent Technologies*, sendo os resultados analisados no mesmo computador. O cromatógrafo a gás acoplado ao espectrômetro de massas foi um CG 6890n *Agilent Technologies* com um injetor *split-splitless* e amostrador automático acoplado a um detector de massas 5973n também *Agilent Technologies*.

##### 3.1.1 Obtenção da fração enriquecida de 7-desacetoxi-7-oxogedunina

*Solução de extração* - Preparou-se uma mistura de hexano P.A. e acetato de etila P.A. na proporção de 1:2 (V/V) e uma mistura de metanol P.A. e água na proporção de 2:1 (V/V). As duas soluções são então misturadas e deixadas assentar para a formação de duas fases.

Foi pesada uma amostra com cerca de 1000 mg de precipitado de TNTPD em um erlenmeyer. Esta amostra é lavada com cerca de 20 ml de hexano em agitador por cerca de 2 minutos, sendo em seguida filtrada em papel de filtro analítico, que foi posteriormente retirado do funil e seca por exposição ao ambiente. A amostra seca foi transferida para um bécher e sobre ela foram adicionados 5 ml da fase superior

da solução de extração. Agitou-se levemente e deixou-se assentar para decantar o material não dissolvido. A fase líquida foi retirada com uma pipeta e filtrada em uma pipeta Pasteur provida interiormente com um chumaço de algodão, recolhendo-se o filtrado em um bécher. Após a retirada de toda a fase líquida de fase superior, foram adicionados 5 ml da fase inferior da solução de extração ao resíduo não dissolvido da amostra e repetido o procedimento realizado com a fase superior. As duas fases foram filtradas para um mesmo bécher. O resíduo da amostra no bécher e nas pipetas com algodão (mais que uma pipeta com chumaço, caso necessário) foram limpos com clorofórmio e recolhidos em novo bécher. O material recolhido foi posteriormente seco ao ar, este material será utilizado nas próximas etapas.

### **3.1.2 Isolamento do grupo de tetranortriterpenóides**

O isolamento do grupo de tetranortriterpenóides foi realizado com uma extração em fase sólida. O cartucho de extração consistiu em uma seringa de vidro de 5 ml com uma determinada quantidade de gel de sílica para coluna acondicionada entre dois discos de algodão hidrófilo. Foi utilizada sílica para coluna gel de sílica 60 mesh 0,063-0,200 mm, Merck. A extração consistiu sempre das seguintes etapas: (1) condicionamento da fase com solvente; (2) aplicação da amostra dissolvida em determinado volume de clorofórmio ou diclorometano; (3) eluição de componentes de polaridade mais baixa (CPB); (4) eluição de TNTPD; e (5) eluição de componentes de polaridade mais elevada (CPE). Cada etapa foi recolhida em um frasco diferente sendo que, em alguns casos, foram recolhidas mais de uma alíquota por etapa. Para as diferentes amostras foram utilizados solventes diferentes em cada etapa. Os volumes dos solventes utilizados também variaram para cada etapa. Estas variações citadas estão explícitas nos fluxogramas. As alíquotas foram deixadas secar à temperatura ambiente.

### **3.1.3 Purificação de 7-desacetoxi-7-oxogedunina**

Este procedimento consistiu em um tratamento com pequenos volumes de metanol P.A. adicionados com uma micropipeta. Agitou-se levemente até formar um pó branco, insolúvel no metanol. Deixou-se assentar o material e recolheu-se o solvente com a micropipeta. O procedimento foi repetido uma ou duas vezes.

Tabela 4: Condições de CGAR para análise de amostras de isolamento.

Cromatografia a gás de alta resolução	CGAR acoplada à espectrometria de massas
Coluna DB-5HT de 30 m de comprimento 250 µm de diâmetro interno e 0,1 µm de espessura de filme. 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 min. Injeção em modo <i>split</i> na razão de 1/20 a 270 °C. Detector de ionização em chama a 300 °C.	Coluna DB-5ms de 30 m de comprimento 250 µm de diâmetro interno e 0,1 µm de espessura de filme. Temperatura inicial de 150 °C, isoterma de 2 min. Taxa de aquecimento de 10 °C/min. Temperatura final de 325 °C. Isoterma final de 15 min. Injeção em modo <i>split</i> na razão de 1/20 a 270 °C. Fonte de 70 eV. Detector de massa com varredura de 40-500.

### 3.1.4 Fluxogramas

Os fluxogramas descrevendo os experimentos de isolamento e purificação da referência estão apresentados abaixo. Cada experimento está dividido em etapas representando cada um dos procedimentos descritos acima. As variações realizadas nos procedimentos para cada experimento estão citadas. No final estão apresentados fluxogramas representando a união de diversas amostras, com alta pureza de 7-oxo.



Etapa 1: Obtenção de fração enriquecida em 7-oxo

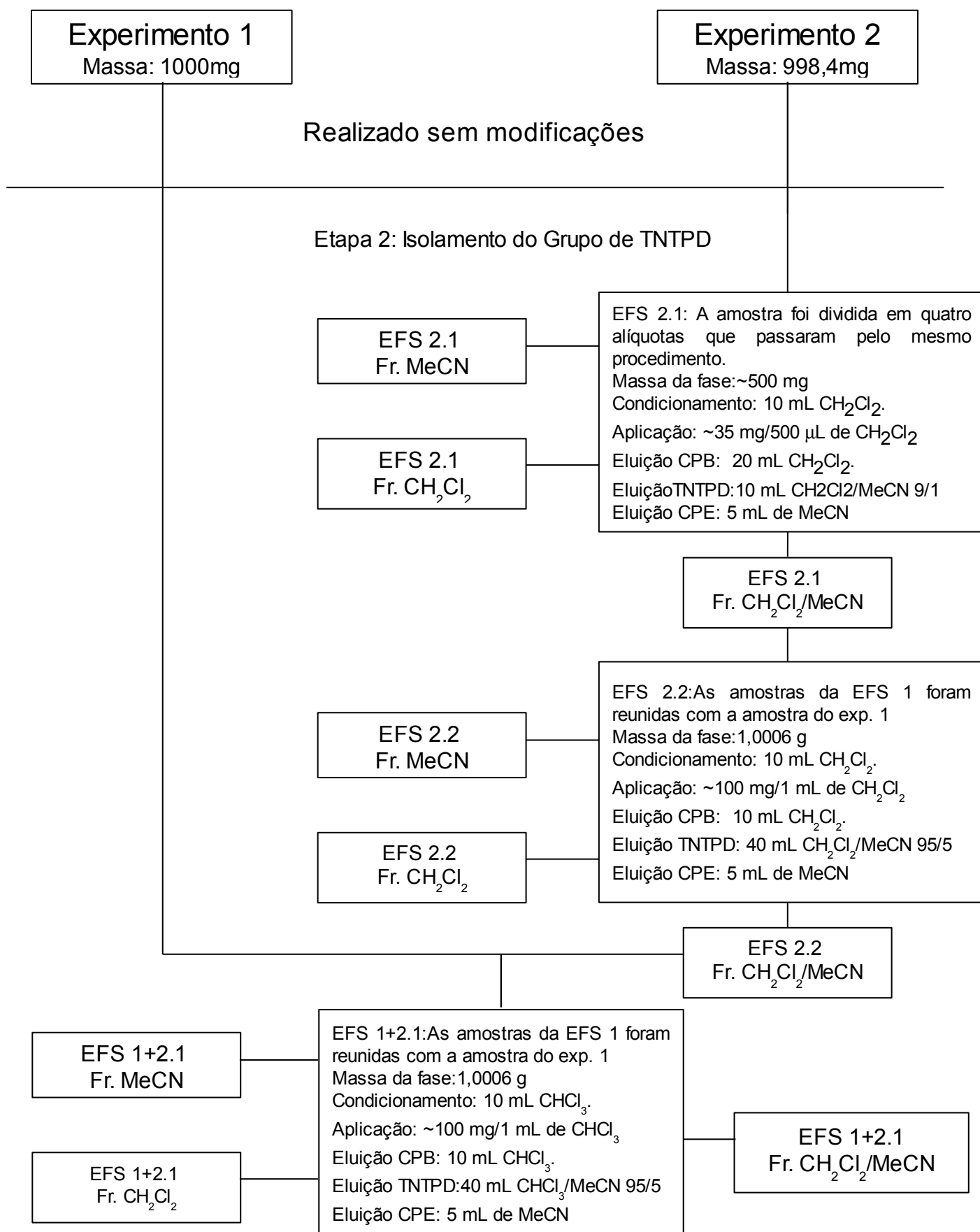


Figura 6: Fluxograma de isolamento de purificação da referência dos exp's 1 e 2.

### Etapa 3: Purificação de 7-oxo

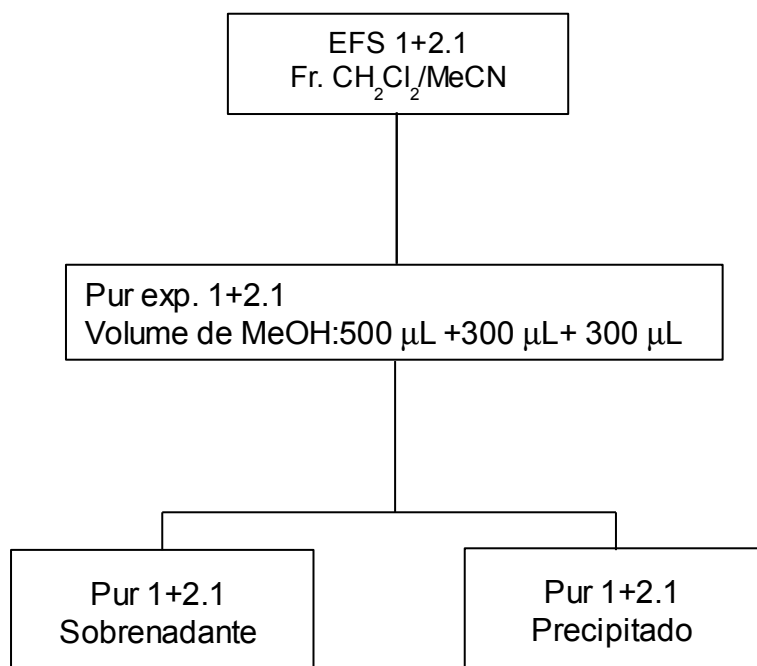


Figura 7: Fluxograma de isolamento e purificação da referência continuação dos exp's 1 e 2.

Etapa 1: Obtenção de fração enriquecida em 7-oxo

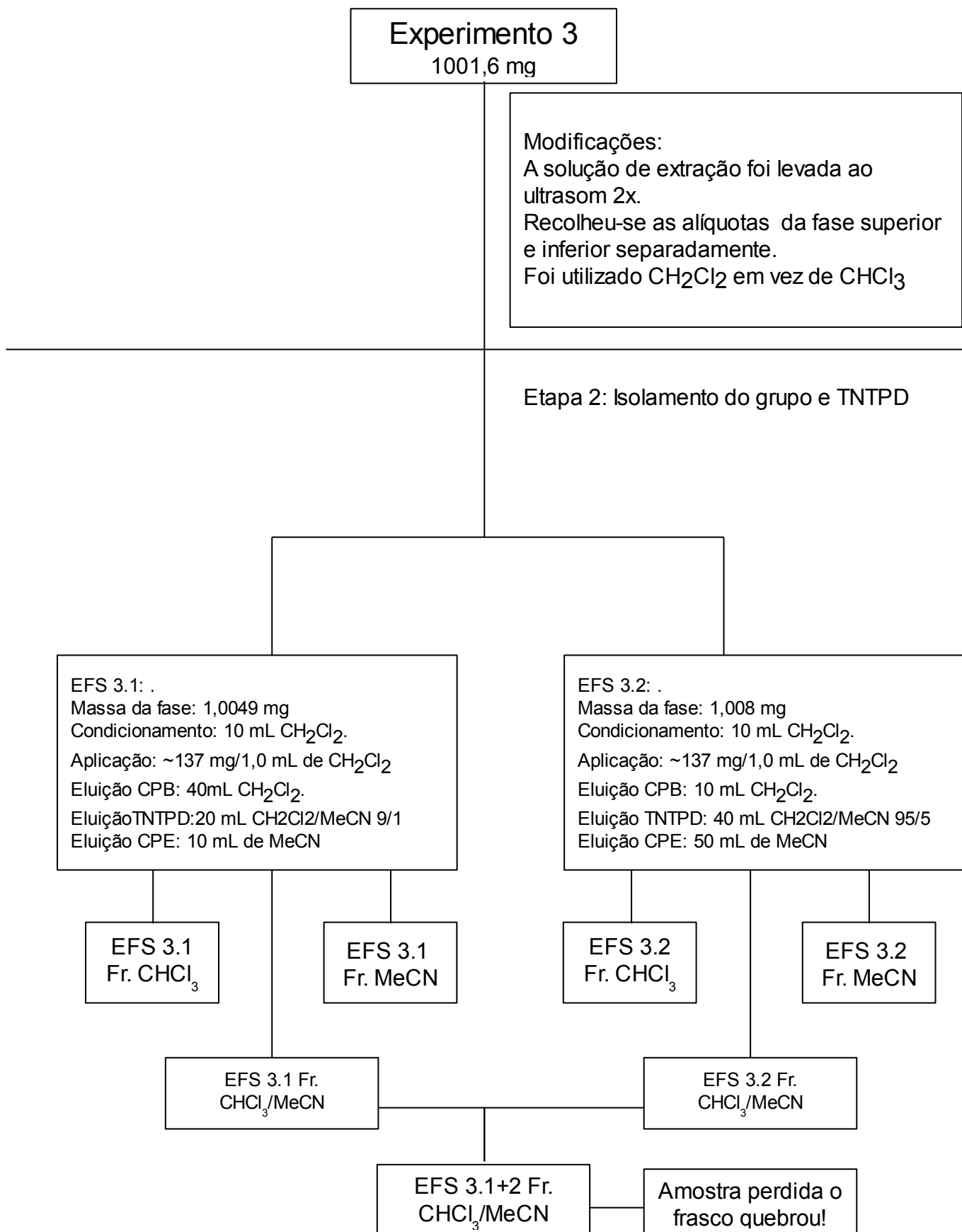


Figura 8: Fluxograma de isolamento e purificação da referência do exp 3.

Etapa 1: Obtenção de fração enriquecida em 7-oxo

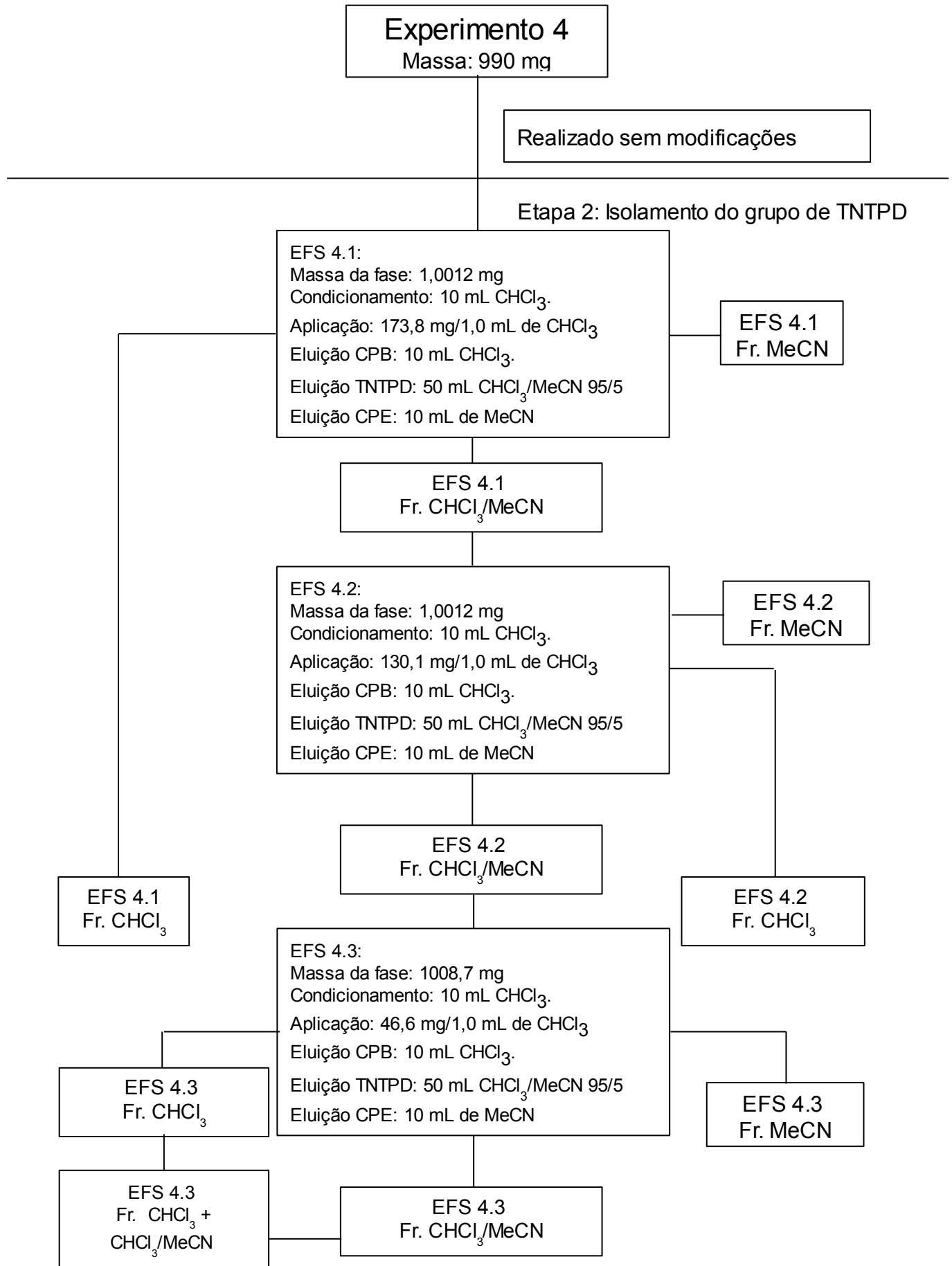


Figura 9: Fluxograma de isolamento e purificação da referência do exp 4.

### Etapa 3: Purificação de 7-oxo

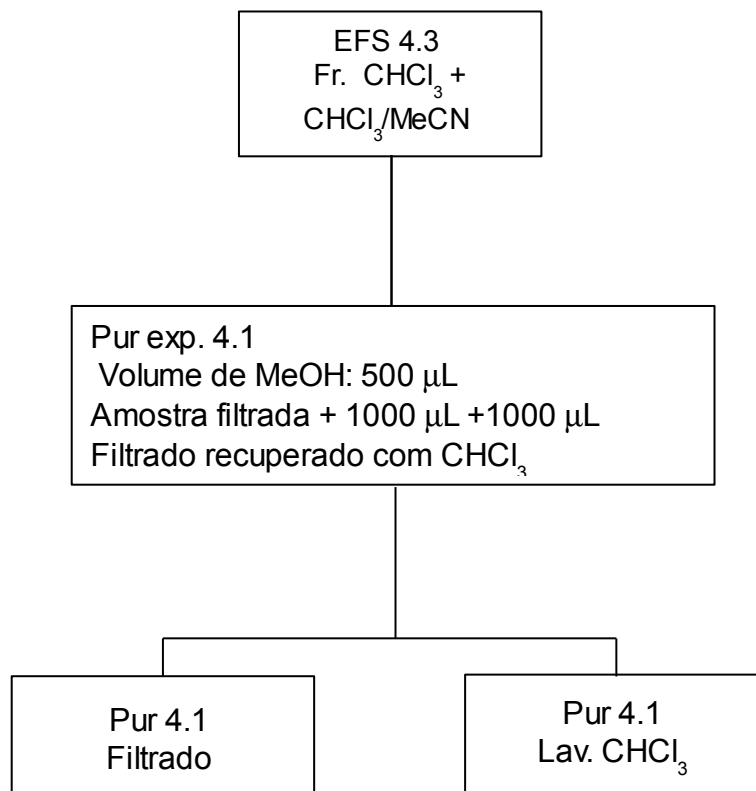


Figura 10: Fluxograma de isolamento e purificação da referência continuação do exp 4

Etapa 1: Obtenção de fração enriquecida de 7-oxo

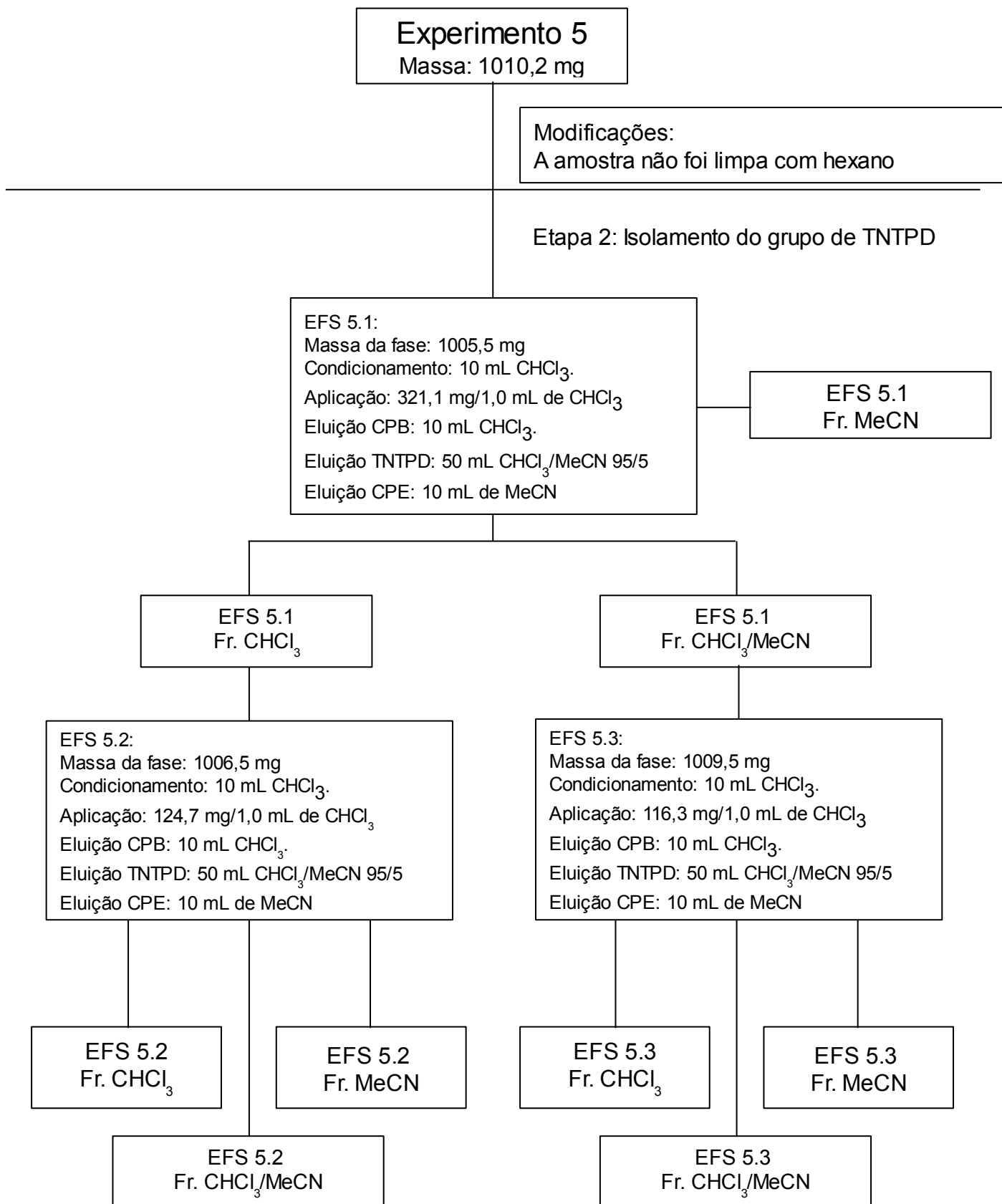


Figura 11: Fluxograma de isolamento e purificação da referência do exp 5.

## Etapa 2: Isolamento do Grupo de TNTPD

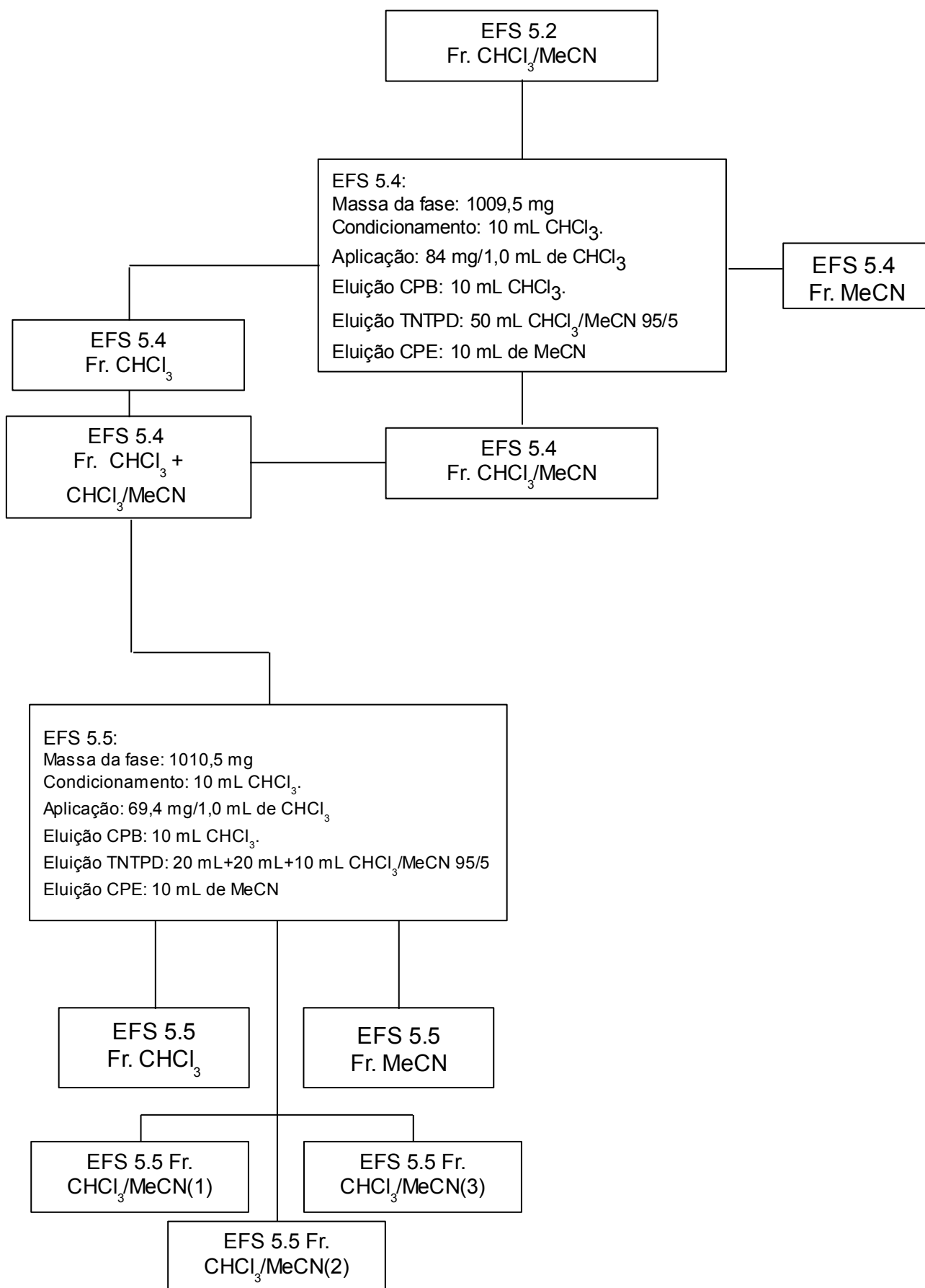


Figura 12: Fluxograma de isolamento e purificação da referência continuação do exp. 5.

Etapa 3: Purificação de 7-oxo

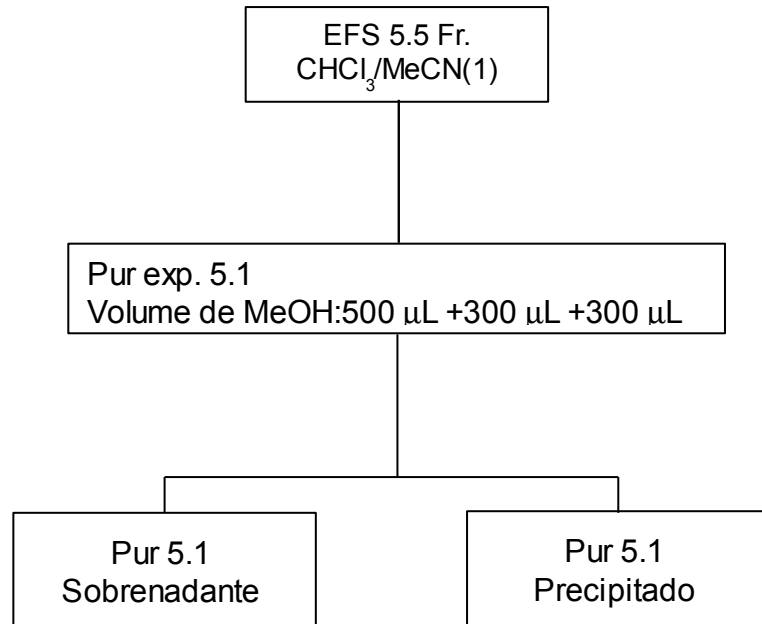


Figura 13: Fluxograma de isolamento e purificação da referência continuação do exp 5



Etapa 1: Obtenção de fração enriquecida em 7-oxo

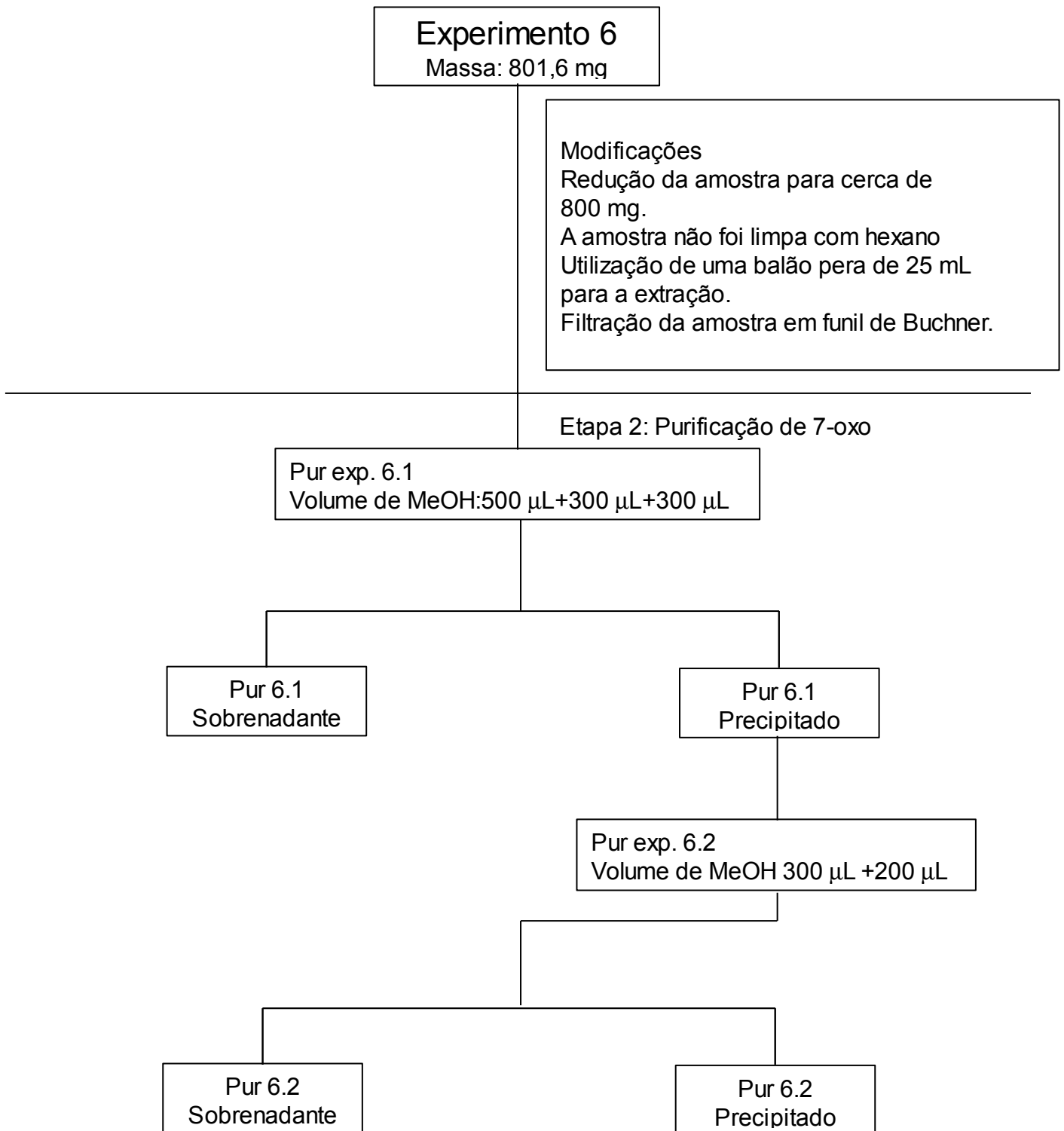


Figura 14: Fluxograma de isolamento e purificação da referência exp 6.

Etapa 1: Obtenção de fração enriquecida em 7-oxo

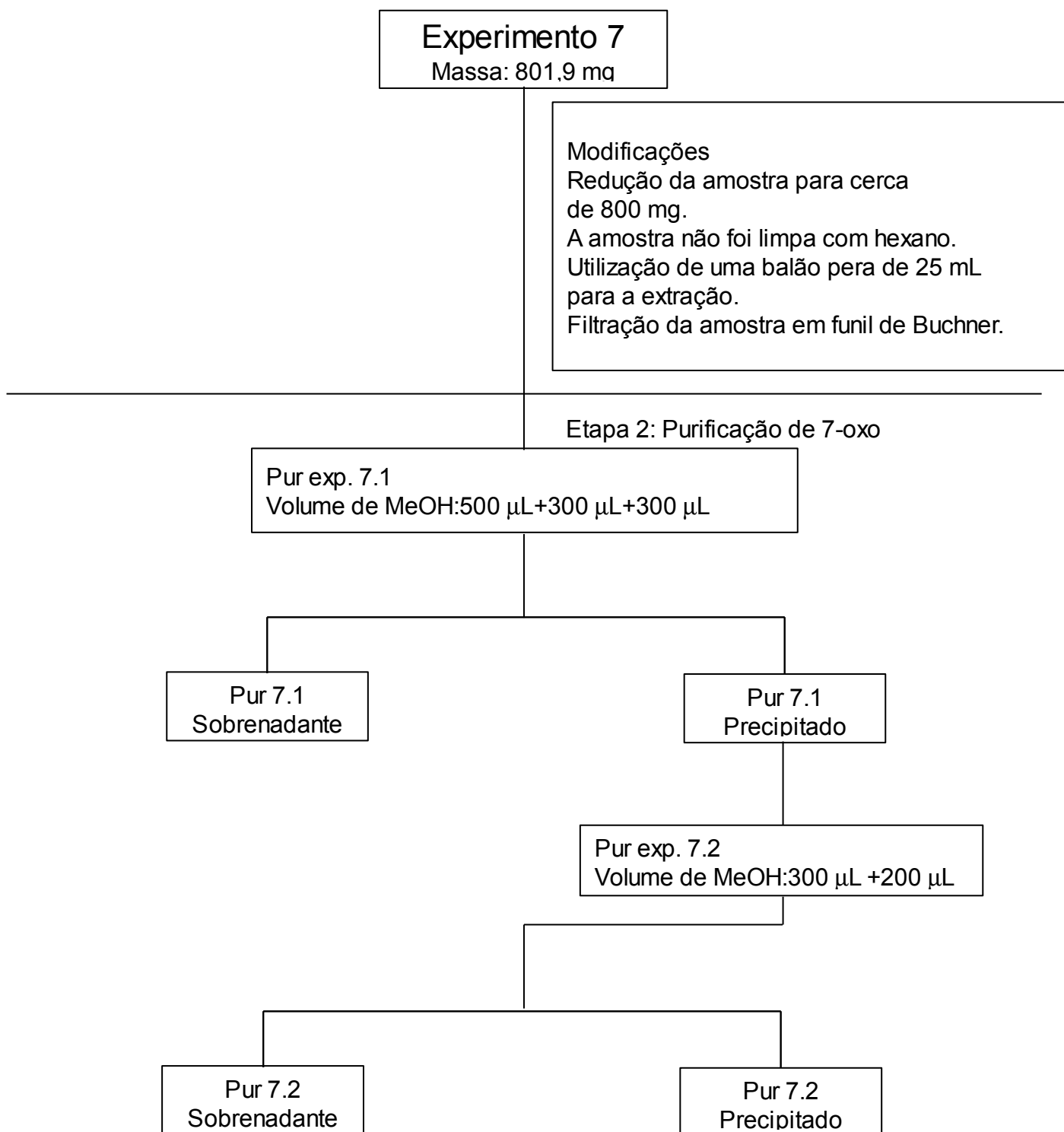


Figura 15: Fluxograma isolamento e purificação da referência exp 7.

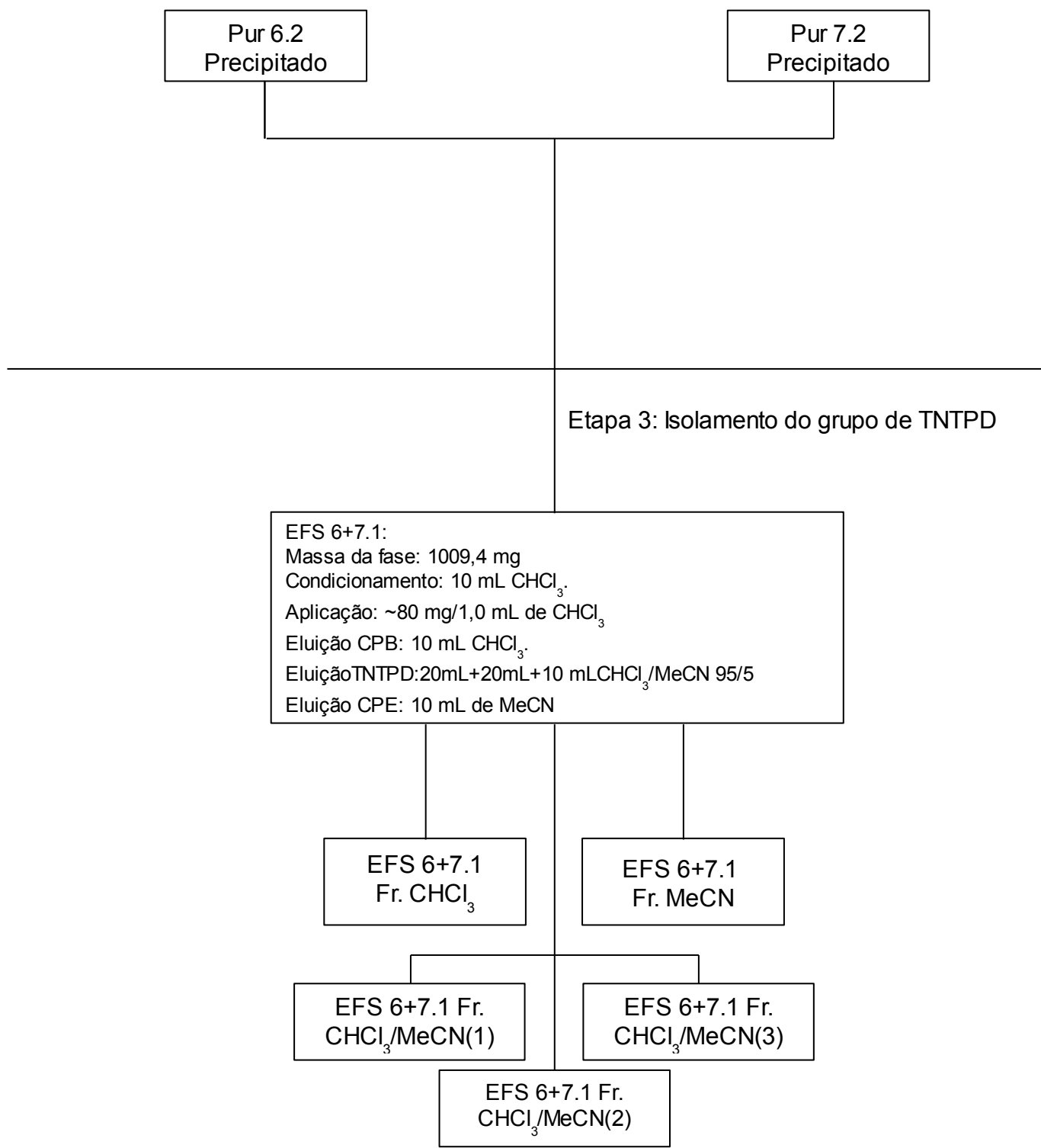


Figura 16: Fluxograma de isolamento e purificação da referência continuação dos exp's 6 e 7.

Etapa 1: Obtenção de fração enriquecida de 7-oxo

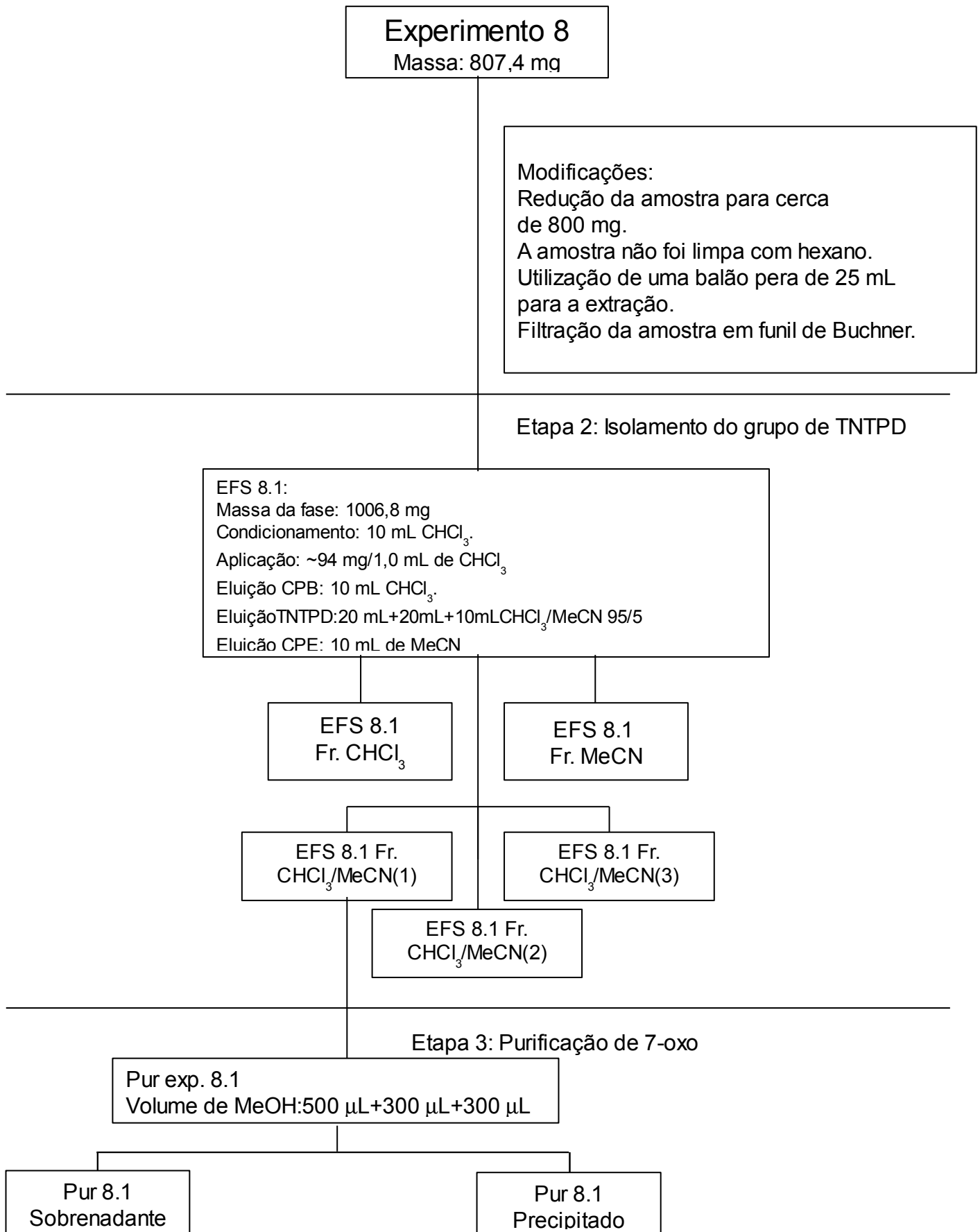


Figura 17: Fluxograma de isolamento e purificação da referência do experimento 8.

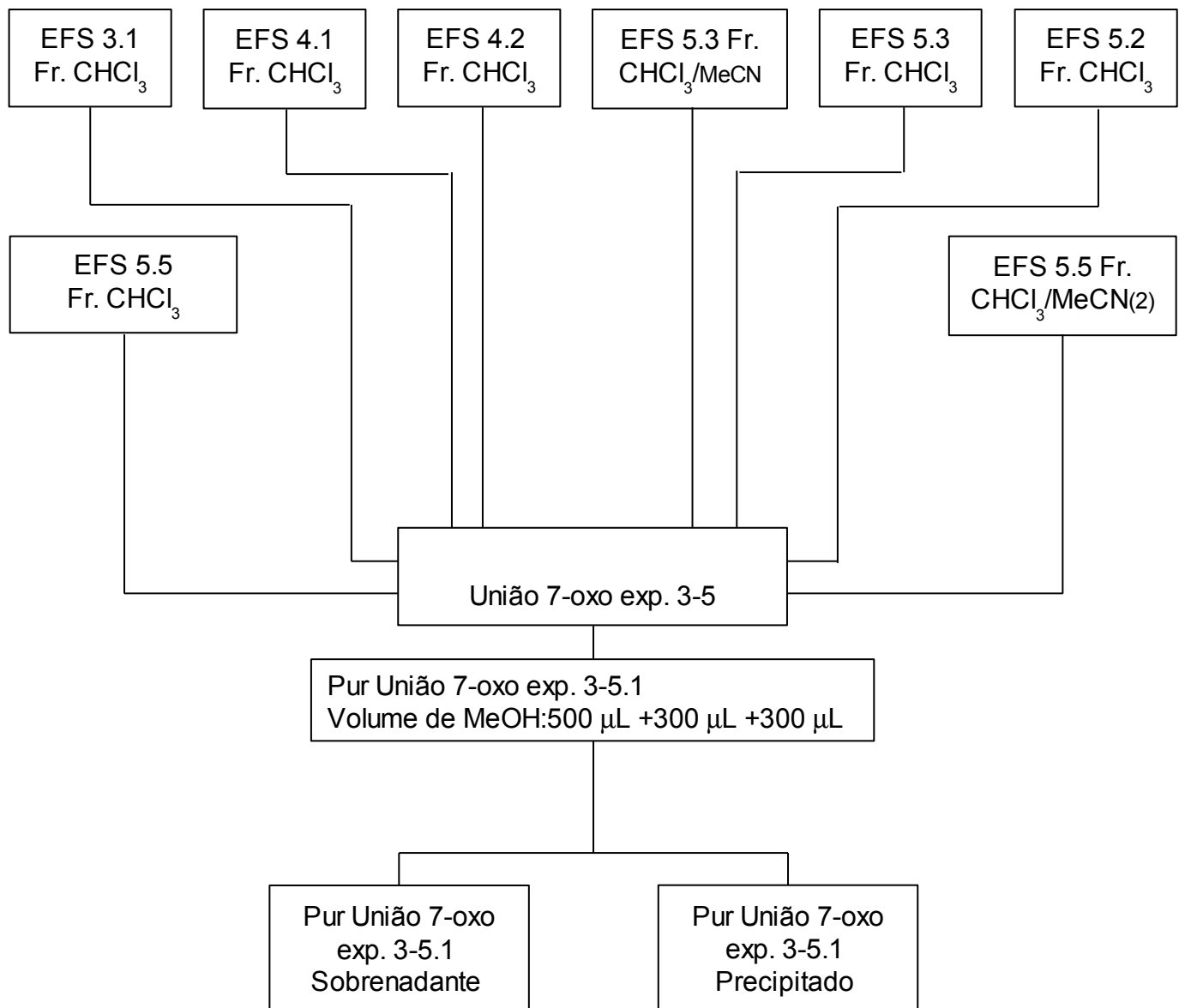


Figura 18: Fluxograma de união de amostras de diversos.

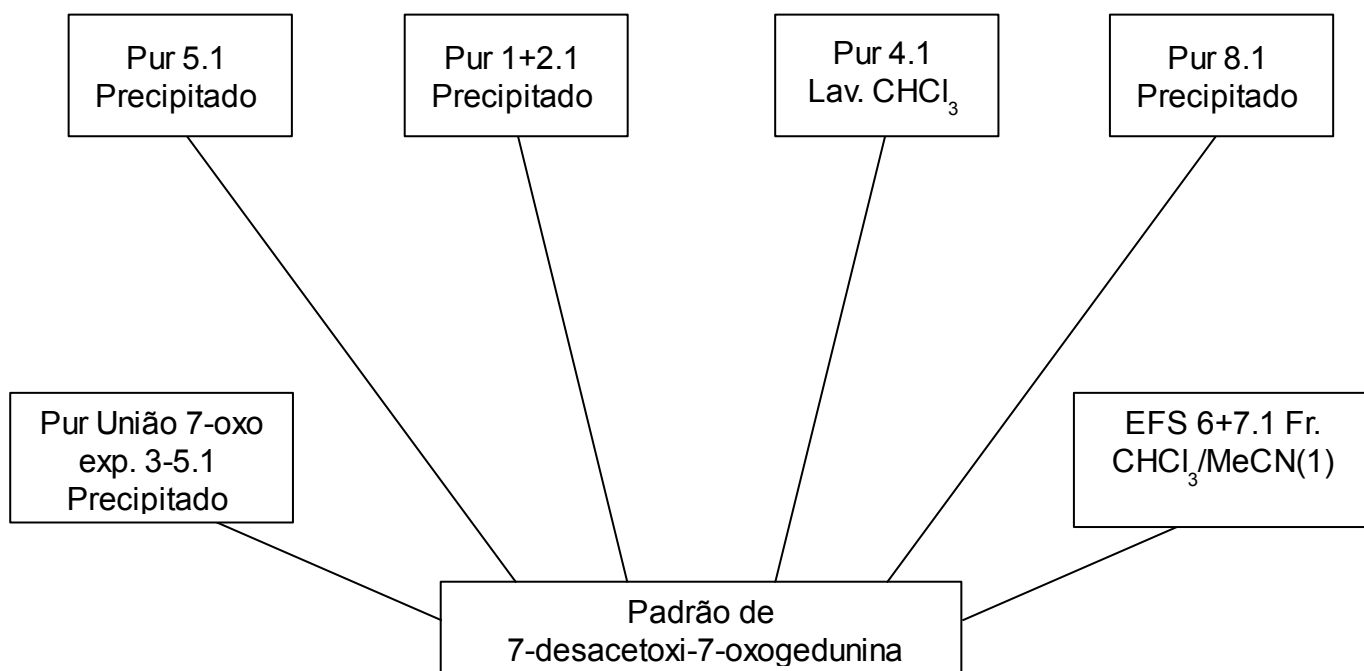


Figura 19: Fluxograma da união final das amostras dos diferentes experimentos.

### **3.1.5 Caracterização da amostra final reunida de 7-desacetoxi-7-oxogedunina**

7-desacetoxi-7-oxogedunina foi identificada por espectrometria de massas e por ressonância magnética nuclear, por comparação com dados descritos na literatura (Pereira, 1998). O método e o equipamento da espectrometria de massas são os mesmos descritos no item 3.1. A análise de ressonância magnética nuclear foi realizada no equipamento Bruker Avance 500, com a amostra dissolvida em  $\text{CDCl}_3$  a 500 MHz para o próton e 125 MHz para o Carbono 13.

O nível de pureza da amostra de 7-desacetoxi-7-oxogedunina foi obtido por Calorimetria Diferencial Exploratória no equipamento Mettler Toledo DSC822e. As condições do ensaio foram as seguintes: programação de temperatura de 25-300 °C com uma taxa de aquecimento de 10 °C/min. As amostras foram pesadas e analisadas em cadinho de alumínio de 40  $\mu\text{L}$  sob atmosfera de  $\text{N}_2$  com vazão de 80 mL/min. Foram realizadas 4 análises para cada amostra (4,82 mg; 4,97 mg; 4,95 mg; 4,81 mg).

### **3.2 Preparo da amostra de óleo de “andiroba” para análise por cromatografia.**

Para o preparo da amostra previamente à análise cromatográfica foi estudado um método de extração em fase sólida (EFS). O desenvolvimento desta método pode ser dividido em três partes: a primeira parte foi o estudo para a escolha da fase de extração, realizado por cromatografia em camada fina; a segunda parte consistiu no estudo das condições de uso da EFS em si em uma série de testes com o óleo de “andiroba”; por fim, foi realizado em estudo de recuperação com o 7-oxo isolado. O óleo de “andiroba” utilizado foi cedido pela empresa Brasmazon com sede no Pará fabricado no dia 13/03/2000 (Lote 001/2000).

#### **3.2.1 Seleção de solvente e fase.**

No estudo para a escolha da fase foram utilizadas as seguintes placas de cromatografia em camada fina: cromatoplaça gel de sílica 60  $\text{F}_{254}$  (Merck) ou sílica RP-18 (Merck), dimensões 20 x 20 cm e 0,1 mm de espessura. As corridas foram realizadas em cuba de 10 cm de altura, saturada com um papel de filtro embebido no solvente em teste. As placas foram cortadas em retângulos de 2 a 3 cm de largura, com 5 cm de comprimento. Foram aplicadas sempre duas amostras: uma correspondente ao óleo de “andiroba” e outra ao precipitado de TNTPDs, a 1 cm de altura da base e com pelo menos 1 cm de distância entre elas. Na tabela 5 estão

listados os sistemas de solventes que foram testados nos dois tipos de suporte.

Tabela 5: Solventes e fases testados por cromatografia em camada fina para a EFS.

Fase	gel de sílica60 F <sub>254</sub>	RP-18
Solventes	diclorometano; éter etílico; hexano; metanol; acetato de etila; diclorometano/acetonitrila 9/1 (V/V);	diclorometano

### 3.2.2 Ensaio das condições de extração em fase Sólida.

Para o estudo das condições de aplicação da EFS foram realizados experimentos preliminares, nos quais foram testadas várias condições de extração. Posteriormente, foram realizados experimentos mais específicos, otimizando cada etapa do procedimento. As alíquotas obtidas com estes experimentos foram analisadas por cromatografia a gás de alta resolução (CGAR) e por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Os métodos utilizados estão descritas na tabela 6.

Tabela 6 : Métodos analíticos utilizadas nas alíquotas dos experimentos de EFS.

Cromatografia a gás de alta resolução	Cromatografia líquida de alta eficiência
Coluna DB-5HT de 30 m de comprimento 250 µm de diâmetro interno e 0,1 µm de espessura de filme. 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 min. Fluxo de 1,0 ml/min. Injeção em modo <i>split</i> na razão de 1/20 a 270 °C. Detector de ionização em chama a 300 °C.	Coluna C18 de 250 x4,6 mm com fase C-18 de partículas regulares de 5 µm. Fluxo de 1,0 ml/min. Fase móvel de MeCN/H <sub>2</sub> O 56:44. Detecção no ultravioleta (PDA) com comprimento de onda de 210 nm. Volume injetado de 10 µL.

#### 3.2.2.1 Estudos preliminares de extração em fase sólida.

Os experimentos preliminares de EFS foram realizados com duas seringas de vidro, uma seringa de 10 mL, dimensões 90 mm altura x 14 mm de diâmetro, e outra de 5 mL, dimensões 73 mm de altura x 12 mm de diâmetro. Nestas seringas foi acondicionada uma determinada massa de sílica para coluna entre dois discos de algodão formando o “cartucho”. O acondicionamento foi realizado colocando-se primeiro um disco de algodão compactado pelo êmbolo. Sobre o disco foi vertida a massa pesada de sílica, acomodada na forma de um cilindro e, finalmente, colocado outro disco sobre essa fase, sendo todo este sistema compactado mais uma vez



pelo êmbolo. A sílica utilizada foi do tipo para coluna (gel de sílica 60 mesh 0,063-0,200 mm, Merck). O procedimento de EFS consistiu em 5 etapas: (1) condicionamento da fase com a passagem de um determinado volume de solvente; (2) aplicação de amostra dissolvida em um determinado volume de solvente; (3) eluição dos componentes da amostra de polaridade mais baixa com a passagem de um determinado volume de solvente pela fase; (4) eluição dos TNTPDs com a passagem de um determinado volume de solvente pela fase; e (5) eluição dos componentes de polaridade mais alta com a passagem de um determinado volume de solvente pela fase. O fluxo do solvente foi controlado pelo volume de adição sobre a fase a cada vez, por exemplo de 1 em 1 ou de 5 em 5 mililitros. As alíquotas de cada etapa foram colhidas separadamente, sendo que em alguns casos foram colhidas diversas alíquotas para a mesma fase separadamente. Em alguns casos foi utilizada pressão para acelerar a passagem do solvente ou para o acondicionamento. As alíquotas foram secas em fluxo de  $N_2$  e re-dissolvidas em  $CHCl_3$  para posterior análise por CGAR. Os experimentos preliminares realizados estão descritos nas tabelas 7 e 8.

Tabela 7: condições dos experimentos preliminares de extração em fase sólida.

Experimento	1	2	3	4	5
Fase	1 g	0,9999 g	1,001 g	1,0076 g	1,0039 g
Condicionamento	5 mL de Hexano	5 mL de Hexano	5 mL de Hexano	5 mL de Hexano	5 mL de Hexano
Massa aplicada	503,5 mg	204,4 mg	204,1 mg	204,6 mg	200,2 mg
Volume aplicado	1 mL de CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	1 mL de CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	1 mL de CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	1 mL de CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	1 mL de CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>
Eluição CPB*	5 mL CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	5 mL CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	5 mL CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	10 mL de CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	20 mL CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>
Eluição TNTPD's*	5 mL MeCN	5 mL MeCN	5 mL CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeCN 99/1(v/v)	5 mL CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeCN 99/1(v/v)	5 mL MeCN
Eluição CPA*	5 mL MeOH	5 mL MeOH	5 mL MeCN	5 mL MeCN	-
Eluição	1 em 1 mL	1 em 1 mL	1 em 1 mL	1 em 1 mL	1 em 1 mL
Seringa	10 mL	10 mL	10 mL	10 mL	10 mL
Experimento	6	7	8	9	10
Fase	1,0083 g	1,0065 g	502,2 mg	502,7 mg	505,4 mg
Condicionamento	5 mL de Hexano	5 mL de Hexano	5 mL de Hexano	5 mL de Hexano	5 mL de Hexano
Massa aplicada	200,2 mg	200,24 mg	100,12 mg	100,14 mg	100,14 mg
Volume aplicado	1 mL de CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	1 mL de CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	0,5 mL de CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	1 mL de CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	1 mL de CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>
Eluição CPB*	20 mL CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	20 mL CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	20 mL CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	20 mL CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	20 mL CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>
Eluição TNTPD's*	5 mL CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeCN 9/1(v/v)	10 mL CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeCN 9/1(v/v)	10 mL CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeCN 9/1(v/v)	10 mL CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeCN 9/1(v/v)	5 mL MeCN
Eluição CPA*	5 mL MeCN	5 mL MeCN	5 mL MeCN	5 mL MeCN	-
Eluição	1 em 1 mL	1 em 1 mL	Enchendo a seringa	1 em 1 mL	1 em 1 mL
Seringa	10 mL	10 mL	5 mL	5 mL	5 mL

\*PB-Polaridade Baixa, TNTPD-Tetranortriterpenóides, PA-Polaridade Alta.

Tabela 8: condições dos experimentos preliminares de Extração em Fase Sólida.

Experimento	11	12	13
Fase	500,6 mg	502,1 mg	505,4 mg
Condicionamento	5 mL de Hexano	5 mL de Hexano	10 mL de CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>
Massa aplicada	100,1 mg	102,24 mg	100,04 mg
Volume aplicado	1 mL de CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	1 mL de CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	0,5 mL de CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>
Eluição CPB*	30 mL CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	30 mL CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	20 mL CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>
Eluição TNTPD's*	5 mL MeCN	5 mL MeCN	10 mL CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeCN 99/1(v/v)
Eluição CPA*	-	-	5 mL MeCN
Eluição	1 em 1 mL	0,5 em 0,5 mL	1 em 1 mL
Seringa	5 mL	5 mL	5 mL
Experimento	14	15	16
Fase	505,4 mg	501,4 mg	503,2 mg
Condicionamento	10 mL de CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	10 mL de CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> Pr.*	10 mL de CHCl <sub>3</sub> Pr.*
Massa aplicada	100,04 mg	100,04 mg	102,0 mg
Volume aplicado	0,5 mL de CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	0,5 mL de CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	1 mL CHCl <sub>3</sub>
Eluição CPB*	20 mL CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	20 mL CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> Pr.*	20 mL CHCl <sub>3</sub>
Eluição TNTPD's*	10 mL CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeCN 9/1(v/v)	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeCN 10 mL-9/1 5 mL -8/2(v/v)**Pr.*	5 mL MeCN
Eluição CPA*	5 mL MeCN	5 mL MeCN Pr.*	-
Eluição	1 em 1 mL	1 em 1 mL	1 em 1 mL
Seringa	5 mL	5 mL	5 mL

\*PB:Polaridade Baixa, TNTPD:Tetranortriterpenóides, PA:Polaridade Alta. Pr: Etapa realizada sob pressão.

\*\*Primeiros 10 mL da primeira proporção de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeCN; depois 5 mL de segunda proporção.

### 3.2.2.2 Otimização por etapas da extração em fase sólida.

Na otimização das condições de EFS cada etapa do procedimento foi estudada separadamente. A etapa de eluição de componentes de baixa polaridade foi estudada com dois experimentos descritos na tabela 9.

Tabela 9: Estudo da etapa de eluição de componentes de polaridade baixa.

Experimento 1	Experimento 2
<ul style="list-style-type: none"><li>➤ Fase: 502,7 mg de sílica.</li><li>➤ Condicionamento: 10 mL de <math>\text{CHCl}_3</math> sob pressão recirculado uma vez.</li><li>➤ Amostra 151,35 mg de óleo de “andiroba” dissolvidos em 1 mL.</li><li>➤ Eluição de CPB*: 40 mL de <math>\text{CHCl}_3</math>.</li><li>➤ Eluição TNTPD: 5 mL de MeCN.</li><li>➤ Eluição CPA*: -</li><li>➤ Eluição: 5 em 5 mL.</li><li>➤ Alíquotas: Foram recolhidas alíquotas de 5 em 5 mL da eluição de PB.</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>➤ Fase: 501,3 mg de sílica.</li><li>➤ Condicionamento: 10 mL de <math>\text{CHCl}_3</math> sob pressão recirculado uma vez.</li><li>➤ Amostra 25,51 mg de óleo de “andiroba” dissolvidos em 1ml.</li><li>➤ Eluição de CPB*: 50 mL de <math>\text{CHCl}_3</math>/Hexano 95/5.</li><li>➤ Eluição TNTPD: 5 mL de MeCN.</li><li>➤ Eluição CPA*: -</li><li>➤ Eluição: 5 em 5 mL.</li><li>➤ Alíquotas: Foram recolhidas alíquotas de 5 em 5 mL da eluição de PB.</li></ul>

\*PB: Polaridade Baixa PA:Polaridade Alta TNTPD: tetranortriterpenóides.

As alíquotas resultantes foram secas em fluxo de  $\text{N}_2$ . As alíquotas do experimento 1 foram então re-dissolvidas em 1 mL de  $\text{CHCl}_3$  e analisadas por CGAR. As alíquotas resultantes do experimento 2 foram re-dissolvidas em 1 mL de MeCN e analisadas por CLAE. A etapa de eluição dos TNTPDs foi otimizada com a realização de seis experimentos, descritos na tabela 10. Neste caso, todas as alíquotas, depois de secas em fluxo de nitrogênio, foram re-dissolvidas em 1 mL de MeCN e analisadas por CLAE.

Tabela 10: Estudo da etapa de eluição de componentes de polaridade alta.

Experimento 1	Experimento 2	Experimento 3
<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Fase: 502,5 mg de sílica.</li> <li>➤ Condicionamento: 10 mL de CHCl<sub>3</sub> sob pressão recirculado 1 vez.</li> <li>➤ Amostra 50,1 mg de óleo de “andiroba” dissolvidos em 1 mL.</li> <li>➤ Eluição de CPB*: 40 mL de CHCl<sub>3</sub>.</li> <li>➤ Eluição TNTPD: 20 mL de CHCl<sub>3</sub>/MeCN 95/5 (V/V).</li> <li>➤ Eluição CPA*: 10 mL de MeCN.</li> <li>➤ Eluição: 5 em 5 mL.</li> <li>➤ Alíquotas: Foram recolhidas alíquotas de 5 em 5 mL da eluição de TNTPD.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Fase: 514,7 mg de sílica.</li> <li>➤ Condicionamento: 10 mL de CHCl<sub>3</sub> sob pressão recirculado 1 vez.</li> <li>➤ Amostra 51,75 mg de óleo de “andiroba” dissolvidos em 1 mL.</li> <li>➤ Eluição de CPB*: 40 mL de CHCl<sub>3</sub>.</li> <li>➤ Eluição TNTPD: 50 mL de CHCl<sub>3</sub>/MeCN 97,5/2,5 (V/V).</li> <li>➤ Eluição CPA*: 10 mL de MeCN.</li> <li>➤ Eluição: 5 em 5 mL.</li> <li>➤ Alíquotas: Foram recolhidas alíquotas de 5 em 5 mL da eluição de TNTPD.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Fase: 506,8 mg de sílica.</li> <li>➤ Condicionamento: 10 mL de CHCl<sub>3</sub> sob pressão recirculado 1 vez.</li> <li>➤ Amostra 52,9 mg de óleo de “andiroba” dissolvidos em 1 mL.</li> <li>➤ Eluição de CPB*: 40 mL de CHCl<sub>3</sub>.</li> <li>➤ Eluição TNTPD: 50 mL de CHCl<sub>3</sub>/Acetona 97,5/2,5 (V/V).</li> <li>➤ Eluição CPA*: 10 mL de Acetona.</li> <li>➤ Eluição: 5 em 5 mL.</li> <li>➤ Alíquotas: Foram recolhidas alíquotas de 5 em 5 mL da eluição de TNTPD.</li> </ul>
Experimento 4	Experimento 5	Experimento 6
<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Fase: 501,9 mg de sílica.</li> <li>➤ Condicionamento: 10 mL de CHCl<sub>3</sub> sob pressão recirculado 1 vez.</li> <li>➤ Amostra 51,05 mg de óleo de “andiroba” dissolvidos em 1 mL.</li> <li>➤ Eluição de CPB*: 40 mL de CHCl<sub>3</sub>.</li> <li>➤ Eluição TNTPD: 50 mL de CHCl<sub>3</sub>/Acetona 95/5 (V/V).</li> <li>➤ Eluição CPA*: 10 mL de MeCN.</li> <li>➤ Eluição: 5 em 5 mL.</li> <li>➤ Alíquotas: Foram recolhidas alíquotas de 5 em 5 mL da eluição de TNTPD.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Fase: 506,2 mg de sílica.</li> <li>➤ Condicionamento: 10 mL de CHCl<sub>3</sub> sob pressão recirculado 1 vez.</li> <li>➤ Amostra 25,51 mg de óleo de “andiroba” dissolvidos em 1 mL.</li> <li>➤ Eluição de CPB*: 40 mL de CHCl<sub>3</sub>/Hexano 95/5.</li> <li>➤ Eluição TNTPD: 50 mL de CHCl<sub>3</sub>/MeCN 95/5 (V/V).</li> <li>➤ Eluição CPA*: 10 mL de MeCN.</li> <li>➤ Eluição: 5 em 5 mL.</li> <li>➤ Alíquotas: Foram recolhidas alíquotas de 5 em 5 mL da eluição de TNTPD.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Fase: 501,0 mg de sílica.</li> <li>➤ Condicionamento: 10 mL de CHCl<sub>3</sub> sob pressão recirculado 1 vez.</li> <li>➤ Amostra 25,51 mg de óleo de “andiroba” dissolvidos em 1 mL.</li> <li>➤ Eluição de CPB*: 40 mL de CHCl<sub>3</sub>/Hexano 95/5 (V/V).</li> <li>➤ Eluição TNTPD: 50 mL de CHCl<sub>3</sub>/MeCN 97,5/2,5.</li> <li>➤ Eluição CPA*: 10 mL de MeCN.</li> <li>➤ Eluição: 5 em 5 mL.</li> <li>➤ Alíquotas: Foram recolhidas alíquotas de 5 em 5 mL da eluição de TNTPD.</li> </ul>

\*CPB: Componentes de Polaridade mais Baixa CPA: Componentes de Polaridade mais Alta TNTPD: tetranortriterpenóides.

### 3.2.3 Estudo de recuperação

O estudo de recuperação consistiu na realização de um experimento de preparo de amostra na qual o óleo de “andiroba” dissolvido em  $\text{CHCl}_3$  foi substituído por 7-oxo também dissolvido em  $\text{CHCl}_3$ . O estudo foi realizado duas vezes com a mesma solução.

*A solução amostra* – A solução de 7-oxo foi preparada pesando-se 5,0mg do mesmo e transferindo para um balão de 10 mL. Esta solução foi então dissolvida na proporção de 1:10 e transferindo 1 mL para um balão de 10 mL. Levando-se em conta a pureza da referência, a concentração final foi de 47,4  $\mu\text{g/mL}$ .

O método de extração em fase sólida utilizada está descrito na tabela 11. A alíquota da eluição de TNTPD foi analisada por CLAE, utilizando o método descrito na tabela 12. A alíquota foi seca em fluxo de  $\text{N}_2$ , re-dissolvida em 4 mL de MeCN e, em seguida, transferida para um balão volumétrico de 5 mL onde o volume foi completado com MeCN. Para a quantificação do 7-oxo, foi preparada uma solução-padrão de 7-oxo a 23,6  $\mu\text{g/mL}$ . Esta referência foi injetado quatro vezes e a concentração dos TNTPDs foi calculada por padronização externa.

Tabela 11: Método de extração em fase sólida otimizada.

Método de EFS
➤ Fase: ~500 mg de gel de sílica.
➤ Condicionamento: 10 mL de $\text{CHCl}_3$ sob pressão recirculado uma vez.
➤ Amostra 47 $\mu\text{g}$ de 7-oxo dissolvidos em 1 mL.
➤ Eluição de CPB*: 40 mL de $\text{CHCl}_3$ /Hexano 95/5 (V/V).
➤ Eluição TNTPD: 15 mL de $\text{CHCl}_3$ /MeCN 95/5 (V/V).
➤ Eluição CPA*: < 10 mL de MeCN.
➤ Eluição: 5 em 5 ml.

Tabela 12: Método de CLAE utilizada no estudo de recuperação.

Parâmetros Cromatográficos
➤ Coluna: C18 (250 x 4,5 mm, 5 $\mu\text{m}$ de tamanho de partícula).
➤ Fase móvel: MeCN/ $\text{H}_2\text{O}$ /MeOH (35:35:30, V/V/V).
➤ Fluxo: 0,9 mL/min.
➤ Detector: UV (PDA) em varredura de 190-400 nm.
➤ Comprimento de onda: 210 nm.
➤ Volume injetado: 20 $\mu\text{L}$ .

### 3.3 Desenvolvimento de Métodos Analíticos

#### 3.3.1 Cromatografia a gás de alta resolução (CGAR)

O método analítico para a análise por cromatografia a gás de alta resolução (CGAR) foi desenvolvido em cromatógrafo a gás CG 6890 da Hewlett-Packard munido de um amostrador automático, um injetor *split-splitless* e um detector de ionização em chama. O equipamento foi controlado por um computador com o software Chemstation da Agilent technologies, sendo os resultados analisados no mesmo computador. Foram utilizadas duas colunas: (1) HP-5ms (*Agilent Technologies*) com 30 m de comprimento, 250 µm de diâmetro interno e 0,25 µm de espessura de filme; (2) DB-5ht (*Agilent Technologies*) com 30 m de comprimento, 320 µm de diâmetro interno e 0,100 µm de espessura de filme. O método inicial do qual se partiu o desenvolvimento está descrito na tabela 13.

Tabela 13: Método inicial de CGAR.

Parâmetros Cromatográficos
➤ temperatura inicial: 150 °C.
➤ Isoterma: 2 minutos.
➤ Taxa de aquecimento: 5 °C/minuto.
➤ Temperatura final: 250 °C.
➤ Isoterma final: 20 minutos.
➤ Fluxo do gás de arraste: 1,0 mL/minuto.
➤ Temperatura do injetor: 270 °C.
➤ Temperatura do detector: 300 °C.
➤ Coluna: HP-5ms (30 m de comprimento x 250 µm de diâmetro interno x 0,25µm de espessura de filme).

O método foi desenvolvido variando-se os parâmetros de análise com o objetivo de se obter uma boa resolução dos sinais dos TNTPDs. Para a coluna (1) foram realizadas seis injeções, cada uma com alguma modificação em relação ao método inicial. As modificações estão descritas na tabela 14. Para a coluna (2) foram realizadas 13 injeções, também com algumas modificações em cada uma, descritas na tabela 15 e 16.

Tabela 14: Otimização de método de CGAR na coluna HP-5ms.

Injeção	Modificações
1	Método inicial
2	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Aumento da temperatura inicial para 200 °C.</li> <li>➤ Aumento da temperatura final para 300 °C</li> <li>➤ Diminuição da taxa de aquecimento para 2 °C/min.</li> </ul>
3	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Aumento do fluxo para 1,5 mL/min.</li> <li>➤ Aumento da temperatura final para 300 °C</li> </ul>
4	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Aumento da taxa de aquecimento para 10 °C/min.</li> <li>➤ Aumento do fluxo para 1,5 mL/min.</li> <li>➤ Aumento da temperatura final para 300 °C</li> </ul>
5	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Temperatura do forno em 300 °C sem nenhuma programação de aquecimento.</li> </ul>
6	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Diminuição da taxa de aquecimento para 2 °C/min.</li> <li>➤ Aumento da temperatura final para 300 °C.</li> </ul>

Tabela 15: Otimização de método de CGAR na coluna HP-5ht.

Injeção	Modificações
1	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Elevação da taxa de aquecimento para 10 °C/min.</li> <li>➤ Elevação da temperatura final para 400 °C</li> <li>➤ <i>Split</i> 1/20</li> <li>➤ Concentração de 200mg/mL</li> </ul>
2	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Elevação da taxa de aquecimento para 10 °C/min.</li> <li>➤ Elevação da temperatura final para 400 °C</li> <li>➤ <i>Split</i> 1/20</li> <li>➤ Concentração de 40 mg/mL</li> </ul>
3	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Elevação da taxa de aquecimento para 10 °C/min.</li> <li>➤ Elevação da temperatura final para 400 °C</li> <li>➤ <i>Split</i> 1/30</li> <li>➤ Concentração de 40 mg/mL</li> </ul>
4	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Elevação da taxa de aquecimento para 10 °C/min.</li> <li>➤ Elevação da temperatura final para 400 °C</li> <li>➤ <i>Split</i> 1/50</li> <li>➤ Concentração de 40 mg/mL</li> </ul>
5	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Elevação da taxa de aquecimento para 10 °C/min.</li> <li>➤ Elevação da temperatura final para 400 °C</li> <li>➤ Elevação Fluxo para 1,5 mL/min.</li> <li>➤ <i>Split</i> 1/50</li> <li>➤ Concentração de 40 mg/mL</li> </ul>
6	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Elevação da temperatura inicial para 200 °C.</li> <li>➤ Elevação da taxa de aquecimento para 10 °C/min.</li> <li>➤ Elevação da temperatura final para 400 °C</li> <li>➤ <i>Split</i> 1/50</li> <li>➤ Concentração de 40 mg/mL</li> </ul>



Tabela 16: Otimização de método de CGAR na coluna HP-5ht (cont).

Injeção	Modificações
7	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Elevação da temperatura inicial para 200 °C.</li> <li>➤ Elevação da taxa de aquecimento para 10 °C/min.</li> <li>➤ Elevação da temperatura final para 400 °C</li> <li>➤ Elevação do fluxo para 1,5 mL/min.</li> <li>➤ <i>Split</i> 1/50</li> <li>➤ Concentração de 40 mg/mL</li> </ul>
8	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Elevação da temperatura inicial para 200 °C.</li> <li>➤ Elevação da taxa de aquecimento para 10 °C/min até 300 °C e após diminuição para 5°C/min até 400 °C</li> <li>➤ Elevação do fluxo para 1,5 mL/min.</li> <li>➤ <i>Split</i> 1/50</li> <li>➤ Concentração de 40 mg/mL</li> </ul>
9	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Elevação da temperatura inicial para 200 °C.</li> <li>➤ Elevação da taxa de aquecimento para 10 °C/min até 300 °C e após diminuição para 50°C/min até 400 °C.</li> <li>➤ Elevação do fluxo para 2,0 mL/min.</li> <li>➤ <i>Split</i> 1/50</li> <li>➤ Concentração de 40 mg/mL</li> </ul>
10	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Elevação da taxa de aquecimento para 15 °C/min.</li> <li>➤ Elevação da temperatura final para 400 °C</li> <li>➤ Elevação do Fluxo para 2,0 mL/min.</li> <li>➤ <i>Split</i> 1/50</li> <li>➤ Concentração de 40 mg/mL.</li> </ul>
11	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Elevação da taxa de aquecimento para 15 °C/min.</li> <li>➤ Elevação da temperatura final para 400 °C</li> <li>➤ <i>Split</i> 1/50</li> <li>➤ Concentração de 40 mg/mL.</li> </ul>
12	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Elevação da taxa de aquecimento para 10 °C/min.</li> <li>➤ Elevação da temperatura final para 400 °C</li> <li>➤ Diminuição do fluxo para 0,5 mL/min.</li> <li>➤ <i>Split</i> 1/50</li> <li>➤ Concentração de 40 mg/mL.</li> </ul>
13	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Diminuição da temperatura inicial para 100 °C</li> <li>➤ Elevação da taxa de aquecimento para 10 °C/min.</li> <li>➤ Elevação da temperatura final para 400 °C</li> <li>➤ <i>Split</i> 1/50</li> <li>➤ Concentração de 40 mg/mL</li> </ul>

### 3.3.2 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

O método de CLAE foi desenvolvido em um equipamento Shimadzu modelo Prominence com os seguintes módulos: unidade controladora do sistema CBM-20A, bomba de solvente LC-20AT, equipado com válvula quaternária geradora de gradiente, amostrador automático SIL-20A e detector de arranjo de fotodiodos SPD-M20A. O desenvolvimento do método foi dividido em duas partes. Na primeira efetuou-se o estudo com o uso de uma fase móvel binária e na segunda parte com o uso de uma fase móvel ternária. A identificação dos sinais foi realizada com a injeção de frações ricas nos TNTPDs.

Tabela 17: Método de CLAE original.

Parâmetros Cromatográficos
➤ Coluna C18 (250 x 4,5 mm, 5 µm de tamanho de partícula).
➤ Fases móveis: A (H <sub>2</sub> O com 0,01% de TFA) e B (MeCN com 0,01% de TFA).
➤ Gradiente: de 20% de B a 100% de B em 80 min.
➤ Fluxo: 1,0 mL/min.
➤ Detector: UV (PDA) em varredura de 210-400 nm.
➤ Comprimento de onda: 254nm.

#### 3.3.2.1 Fase móvel binária

O estudo da fase móvel binária foi baseado na método utilizada por Pereira (1998) e encontra-se descrita na tabela 17. Foram realizadas algumas injeções do óleo de “andiroba” e do precipitado de TNTPD para uma avaliação inicial neste método. O método descrito na tabela 18 é resultado desta avaliação e foi utilizado para estudo de preparo da amostra como método preliminar.

Tabela 18: Método preliminar desenvolvido para CLAE.

Parâmetros Cromatográficos
➤ Coluna C18 (250 x 4,5 mm, 5 µm de tamanho de partícula).
➤ Fase móvel: MeCN/H <sub>2</sub> O 56/44 (V/V).
➤ Fluxo: 1,0 mL/min.
➤ Detector: UV (PDA) em varredura de 190-400 nm.
➤ Comprimento de onda: 210 nm.
➤ Volume injetado: 10 µL.

Baseado neste método foi realizado um experimento de otimização com desenho experimental, utilizando o desenho de composto central com superfície de resposta. O desenho foi gerado no programa Statistica 5.5 no módulo *Experimental Design*. O

desenho foi de três fatores, um bloco e 17 corridas, com duas repetições no ponto central. Os fatores escolhidos foram a porcentagem de acetonitrila na fase móvel (FM) composta de água e acetonitrila (FM%MeCN), o fluxo de fase móvel e o volume injetado (VolInj). A descrição de cada uma das corridas (ou injeções) com os valores assumidos para cada fator, estão apresentadas na figura 20. Os resultados foram analisados no mesmo *software* em que o desenho foi gerado. A amostra utilizada foi preparada segundo o método descrito na Tabela 19.

EXPERIM. DESIGN Standard Run	FM%MeCN	Fluxo	VolInj
1	51,00	,50	5,00
2	51,00	,50	15,00
3	51,00	1,50	5,00
4	51,00	1,50	15,00
5	61,00	,50	5,00
6	61,00	,50	15,00
7	61,00	1,50	5,00
8	61,00	1,50	15,00
9	49,23	1,00	10,00
10	62,77	1,00	10,00
11	56,00	,32	10,00
12	56,00	1,68	10,00
13	56,00	1,00	3,23
14	56,00	1,00	16,77
15 (C)	56,00	1,00	10,00
16 (C)	56,00	1,00	10,00
17 (C)	56,00	1,00	10,00

Figura 20: Desenho experimental com fase móvel binária do método de CLAE.

Tabela 19: Método de preparo de amostra utilizada para o desenho experimental 1.

#### Método de EFS

- Fase: ~500 mg de sílica
- Condicionamento: 10 mL de CHCl<sub>3</sub> sob pressão recirculado 1 vez
- Amostra 47 µg de 7-oxo dissolvidos em 1 mL
- Eluição de PB\*: 40 mL de CHCl<sub>3</sub>.
- Eluição TNTPD: 40 mL de CHCl<sub>3</sub>/MeCN 95/5 (V/V)
- Eluição PA\*: - 10 mL de MeCN
- Eluição: 5 em 5 mL

### 3.3.2.2 Fase móvel ternária:

O estudo da fase móvel ternária foi iniciado com a realização uma série de injeções variando-se a composição da fase móvel entre MeCN, H<sub>2</sub>O e MeOH. Estas variações estão apresentadas na tabela 20.

Tabela 20: Desenvolvimento da fase móvel ternária.

Experimento	Composição da fase móvel		
	MeCN	MeOH	H <sub>2</sub> O
1	50	25	25
2	50	20	30
3	50	15	35
4	50	10	40
5	45	25	30
6	40	30	30
7	35	35	30
8	30	40	30
9	30	35	35
10	25	40	35
11	35	30	35

Em seguida foi realizado um experimento de otimização com desenho experimental. A desenho utilizado foi o de composto central com superfície de resposta. O desenho foi gerado no programa *Statistica 5.5* no módulo *Experimental Design*. O desenho foi de três fatores, um bloco e 16 corridas com uma repetição no ponto central. Os fatores escolhidos foram o fluxo de fase móvel, o volume injetado (Vollnj) e a porcentagem de acetonitrila na fase móvel composta de metanol, água e acetonitrila (FM%MeCN), sendo que neste experimento a porcentagem de água se manteve fixa em 35%. A descrição de cada uma das corridas (ou injeções) com os valores assumidos para cada fator estão apresentadas na figura 21. Os resultados foram analisados no mesmo *software* em que o desenho foi gerado.

EXPERIM. DESIGN	FM%MeCN	Fluxo	VolInj
1	25,00	,50	10,00
2	25,00	,50	30,00
3	25,00	1,50	10,00
4	25,00	1,50	30,00
5	45,00	,50	10,00
6	45,00	,50	30,00
7	45,00	1,50	10,00
8	45,00	1,50	30,00
9	22,13	1,00	20,00
10	47,87	1,00	20,00
11	35,00	,36	20,00
12	35,00	1,64	20,00
13	35,00	1,00	7,13
14	35,00	1,00	32,87
15 (C)	35,00	1,00	20,00
16 (C)	35,00	1,00	20,00

Figura 21: Desenho experimental com fase móvel ternária de método de CLAE.

### 3.4 Pré-validação

A pré-validação do método foi realizada com base no método de pré-validação completa descrita por Grdinić (2004), que consistiu no preparo de duas curvas de calibração, uma para CLAE e outra para CGAR, com seis concentrações eqüidistantes e quatro injeções de cada concentração. Nos dois casos, foi pesada uma quantidade de 7-oxo e foram realizadas diluições como apresentado na tabelas 21 e 22. Os resultados foram analisados segundo o descrito na tabela 23. A pré-validação por CGAR foi realizada com a seguinte coluna: BP-5 (SGE) de 30 m de comprimento, 320 µm de diâmetro interno e 0,25 µm de espessura de filme e o método utilizado foi o seguinte: temperatura inicial de 150 °C, isoterma de 2 min, taxa de aquecimento de 15 °C/min, temperatura final de 330 °C, fluxo de 2,0 mL/min, isoterma final de 5 min, injeção em modo *split* na razão de 1/10 a 270 °C e detecção por ionização em chama a 300 °C. Os resultados foram analisados no programa *Statistica 5.5*.

Tabela 21: Preparo da curva de calibração de CLAE.

Concentração ( $\mu\text{g/mL}$ )	Preparo
50 (solução-mãe)	Pesados 5,0 mg transferidos para balão volumétrico de 100 mL
40	20 mL da solução-mãe para balão de 25 mL
30	15 mL da solução-mãe para balão de 25 mL
20	10 mL da solução-mãe para balão de 25 mL
10	5 mL da solução-mãe para balão de 25 mL
1	1 mL da solução 10 $\mu\text{g/mL}$ para balão de 10 mL

Tabela 22: Preparo da curva de calibração de CGAR.

Concentração ( $\mu\text{g/mL}$ )	Preparo
500 (solução-mãe)	Pesados 5,0 mg transferidos para balão volumétrico de 10 mL
250	1 mL da solução-mãe para balão de 2 mL
200	2 mL da solução-mãe para balão de 5 mL
150	3 mL da solução-mãe para balão de 10 mL
100	1 mL da solução-mãe para balão de 5 mL
50	1 mL da solução-mãe para balão de 10 mL
1	1 mL da solução de 50 $\mu\text{g/mL}$ para balão de 10 mL

Tabela 23: Metodologia dos parâmetros de validação.

Parâmetro de Validação	Metodologia
Linearidade	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Regressão Linear</li> <li>➤ Cálculo de coeficientes de correlação e determinação</li> <li>➤ Análise de variância</li> <li>➤ Teste t para diferença do intercepto de zero</li> <li>➤ Gráfico de resíduos x preditos</li> <li>➤ Gráfico de dispersão com modelo linear</li> </ul>
Seletividade	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Pureza de sinal por espectro de UV (CLAE)</li> <li>➤ Desenho Experimental (CLAE)</li> </ul>
Precisão - repetitividade	Cálculo de desvio-padrão e coeficiente de variação.
Limite de Detecção	$LD = (DP_{int} \times 3)/CA$
Limite de Quantificação	$LQ = (DP_{int} \times 10)/CA$

$DP_{int}$  : Desvio padrão do intercepto.

### 3.5 Quantificação de Tetranortriterpenóides

Duas amostras de óleo de “andiroba” foram analisadas por CLAE para a quantificação dos TNTPDs. O método de preparo de amostra utilizado é a descrito na tabela 24 e a método cromatográfica está descrita na tabela 25.

Tabela 24: Método cromatográfica para a detecção de tetranortriterpenóides.

Parâmetros Cromatográficos
➤ Coluna: C18 (250 x 4,5 mm, 5 µm de tamanho de partícula).
➤ Fase móvel: MeCN/H <sub>2</sub> O/MeOH (35:35:30, V/V/V).
➤ Fluxo: 0,9 mL/min
➤ Detector: UV (PDA) em varredura de 190-400 nm.
➤ Comprimento de onda: 210 nm.
➤ Volume injetado: 20µL

Para a quantificação dos TNTPDs foi preparada uma solução-padrão de 7-oxo com 23,6 µg/mL. Esta solução-padrão foi injetada quatro vezes e a concentração dos TNTPDs calculada por padronização externa. O método de preparo de amostra foi a mesma utilizada no item 3.2.3. As amostras, após pesadas (126,8 mg e 127 mg), foram dissolvidas em balões volumétricos com 5 mL de CHCl<sub>3</sub>.

Tabela 25: Método de preparo de amostra utilizada na quantificação.

Método de EFS
➤ Fase: ~500 mg de sílica.
➤ Condicionamento: 10 mL de CHCl <sub>3</sub> sob pressão recirculado uma vez.
➤ Amostra 25mg de óleo dissolvidos em 1 mL.
➤ Eluição de CPB*: 40 mL de CHCl <sub>3</sub> /Hexano 95/5 (V/V).
➤ Eluição TNTPD: 15 mL de CHCl <sub>3</sub> /MeCN 95/5 (V/V).
➤ Eluição CPA*: < 10 mL de MeCN.
➤ Eluição: 5 em 5 mL

## 4.0 Resultados

### 4.1 Isolamento e purificação do “padrão”.

As massas obtidas no final de cada experimento de isolamento e purificação estão discriminadas na tabela 26.

Tabela 26 Massas das frações que compuseram a amostra final.

Frações	Massa (mg)
LM 1 + 2.1 precipitado	30,9
LM 4.1 precipitado	8,9
LM 5.1 precipitado	27,9
LM 6 + 7.1 Fr precipitado	42,3
LM 8.1 precipitado	27,4
LM união 7-oxo exp. 3-5.1 precipitado	42,5
Total	179,9

#### 4.1.1 Obtenção de fração enriquecida em 7-oxo

Na tabela 27 estão apresentados os resultados de pureza cromatográfica de 7-oxo e rendimento em massa para cada experimento referente a etapa de obtenção de fração enriquecida em 7-oxo e na figura 22 está apresentado cromatograma desta etapa do experimento 8.

Tabela 27: Rendimento e pureza dos experimentos de concentração de 7-oxo.

Experimento	Porcentagem de 7-oxo	Rendimento (%)
1	78,8%	10%
2	64,1%	14%
3	58,5%	27,4%
4	65,7%	17,6%
5	77,5%	32,2%
6	59,4%	16,2%
7	62,4%	27,4%
8	68,7%	11,6%





#### 4.1.2 Isolamento do grupo de tetranortriterpenóides.

O resultado do isolamento do grupo de TNTPD do experimento 8 está apresentado na figura 23.

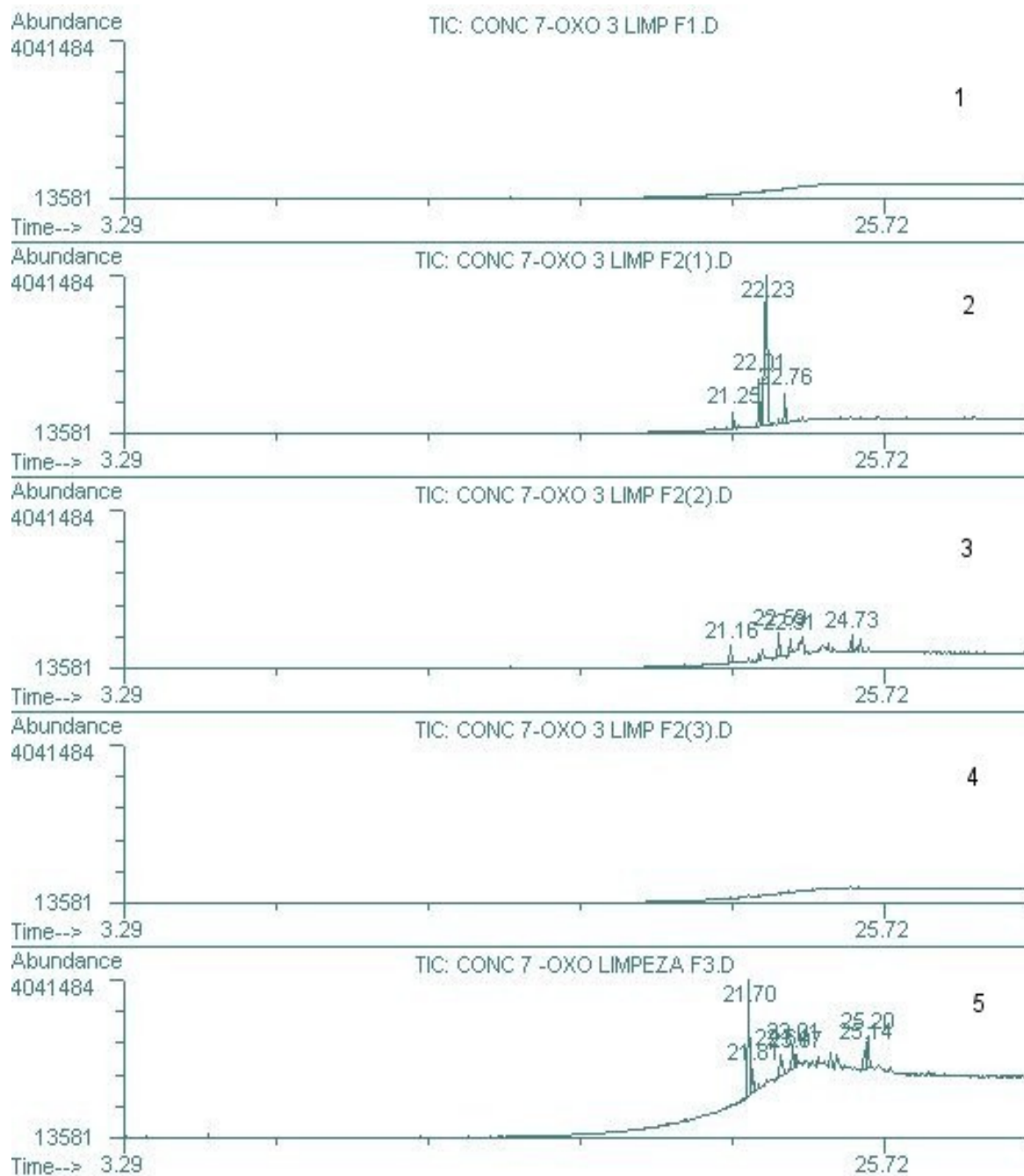


Figura 23: Isolamento do grupo de tetranortriterpenoides do experimento 8.

(1) Fração eluição de baixo de PB (CHCl<sub>3</sub>.); (2;3;4) Eluição de TNTPD's (CHCl<sub>3</sub>/MeCN 95:5) três frações a primeira e segunda de 20ml e a terceira de 10ml.; (5) Eluição de PE MeCN.

#### 4.1.3 Purificação do 7-oxo.

O resultado da purificação de 7-oxo está apresentado na figura 24 com o cromatograma da etapa de purificação de 7-oxo do experimento 8. Esta amostra rendeu 27,4mg e pureza cromatográfica de 95,2%.

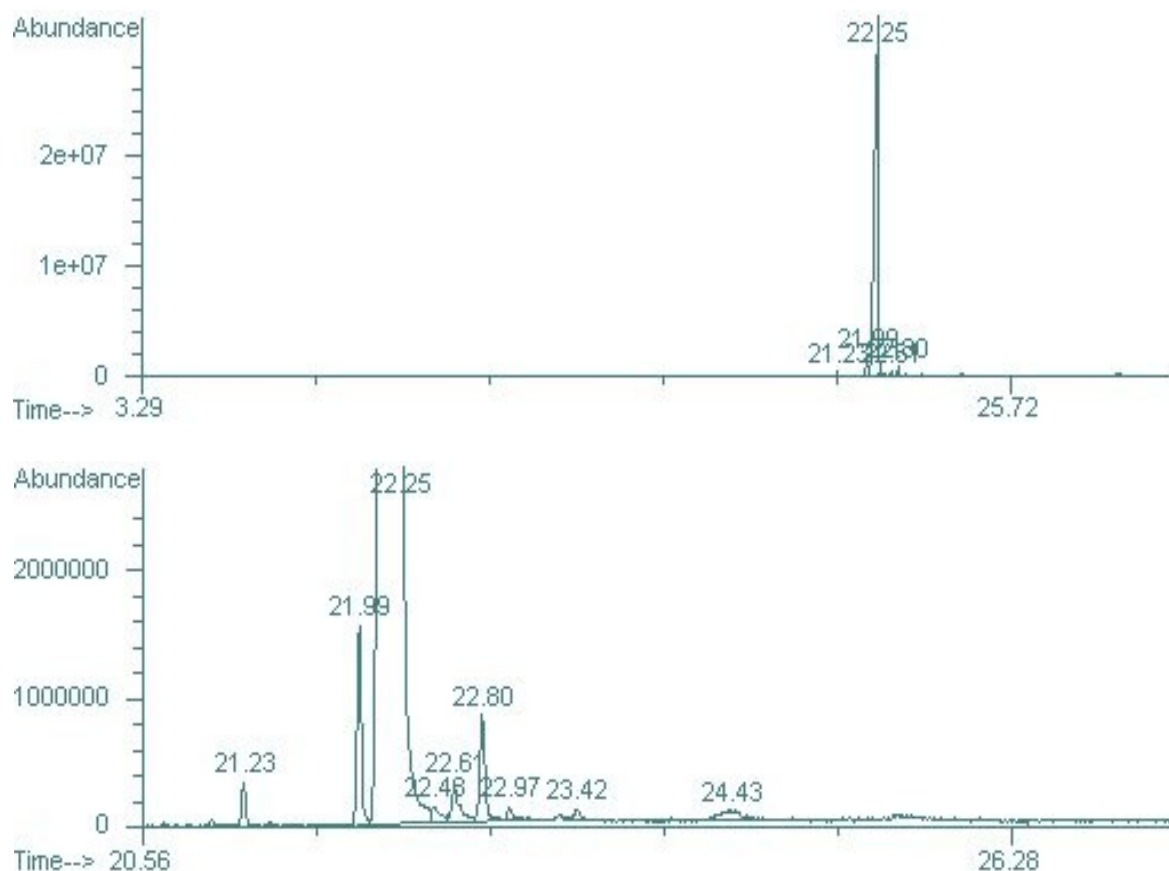


Figura 24: Purificação de 7-oxo do experimento 8.

#### 4.1.4 Caracterização da amostra final.

O resultados da caracterização da amostra final por espectrometria de massas acoplada a CGAR estão apresentados na figuras 25 e 26 que mostram respectivamente o cromatograma e o espectro de massas da amostra final. O resultado da caracterização da amostra por ressonância magnética nuclear está apresentado na tabela 28 e 29 que mostra a comparação entre os sinais de da literatura e os sinais obtidos para hidrogênio e carbono, respectivamente. O resultado da análise de pureza por Calorimetria Exploratória Diferencial está mostrado na figura 27

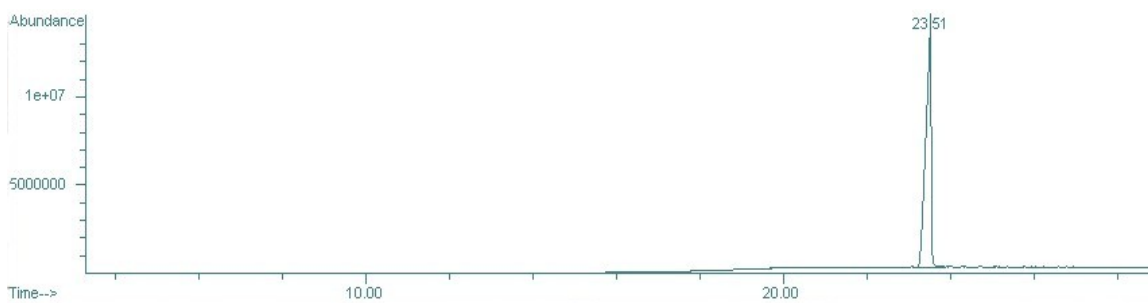


Figura 25: Cromatograma da amostra final

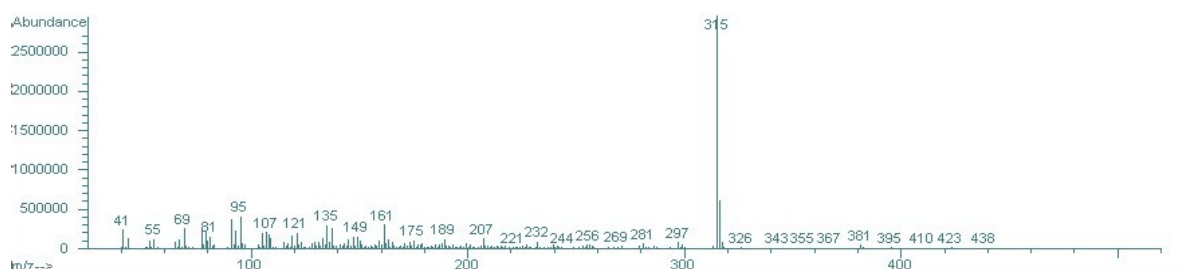


Figura 26: Espectro de massa do “padrão” de 7-desacetóxi-7-oxogedunina.

Tabela 28: Comparação dos deslocamentos de Hidrogênio obtidos com os da literatura. Ambos utilizaram clorofórmio deuterado, a frequência da literatura foi de 25 MHz e a Referência de 125 MHz.

Deslocamentos da Literatura* (Pereira, 1998)	Deslocamentos Obtidos*
7,42	7,42
7,08	7,09
6,35	6,37
5,91	5,94
5,47	5,47
3,89	3,87
2,91	2,90
2,40	2,40
2,21	2,22
1,94	1,98
1,52	1,51
1,44	1,45
1,35	1,36
1,22	1,22
1,16	1,16
1,13	1,14

\*(em ppm)

Tabela 29: Comparação dos espectros de Carbono com literatura. Ambos utilizaram clorofórmio deuterado, a frequência da literatura foi de 25 MHz e a Referência de 125 MHz.

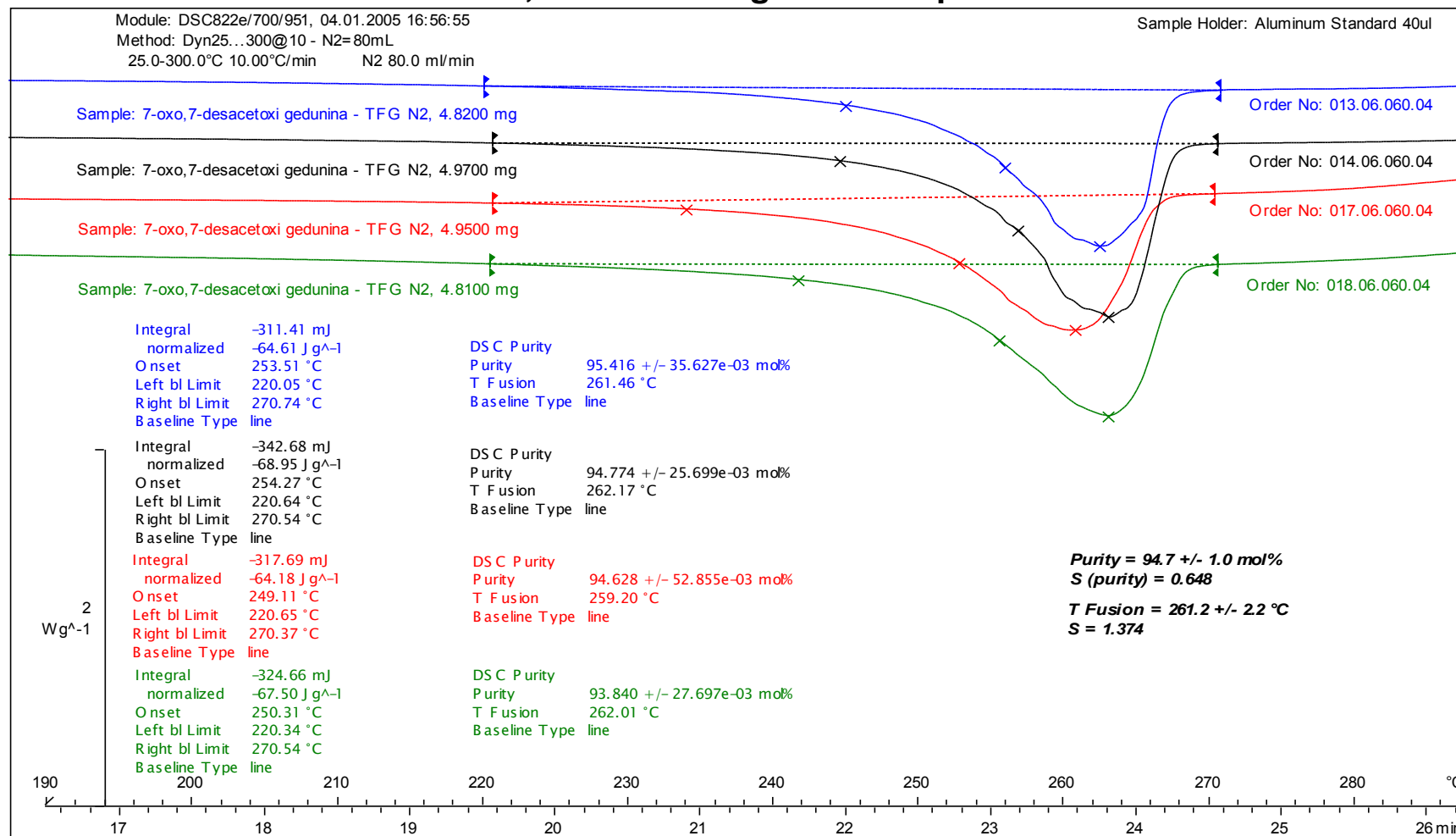
Deslocamentos da Literatura* (Pereira, 1998)	Deslocamentos Obtidos*
208,73	208,18
203,78	203,27
167,42	166,85
156,43	155,95
143,82	143,12
141,78	141,01
127,20	126,45
121,02	120,16
110,52	109,78
96,03	-
78,35	77,99
66,39	65,54
55,38	54,57
54,48	53,57
48,37	47,60
45,94	45,22
40,39	39,57
38,54	37,69
37,43	36,70
32,87	32,23
-	29,70
27,70	26,98
21,61	20,94
21,37	20,65
20,47	19,85
18,12	17,39
17,90	17,18

\*(em ppm)

^exo

### 7-oxo,7-desacetoxi gedunina - pureza

19.01.2007 11:17:17



FIOCRUZ:CTM:PMA:LEES: Rafael

STAR<sup>®</sup> SW 8.10

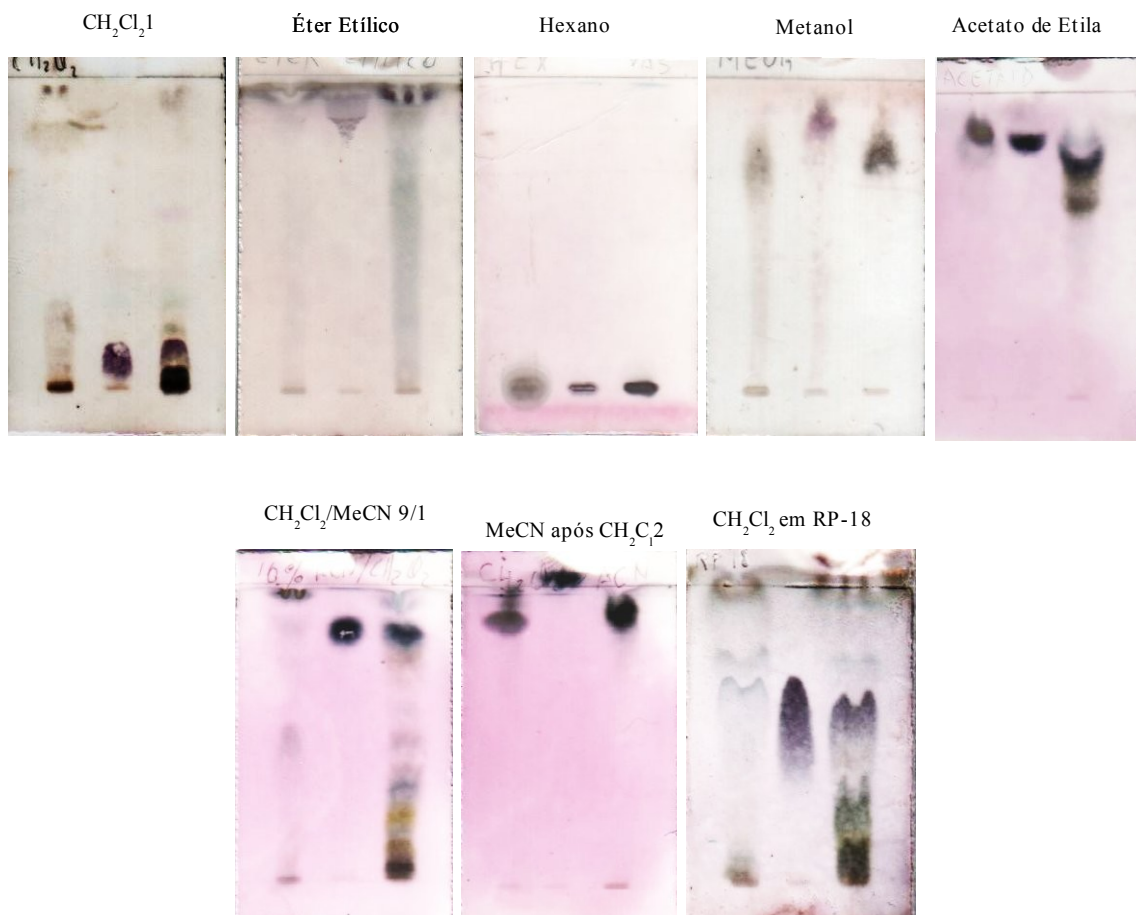
Figura 27: Resultados do ensaio de pureza do padrão de 7-desacetóxi-7-oxo-gedunina.

## 4.2 Preparo da amostra de óleo de “andiroba” para análise por cromatografia.

### 4.2.1 Seleção de solvente e fase

As placas de cromatografia em camada fina estão apresentadas na figura 28.

Figura 28: Placas de cromatografia em camada fina do estudo de solvente



estas placas são repetições das originais. No ponto à esquerda está aplicado o óleo de “andiroba”, no ponto central o “padrão” de 7-oxo e no ponto à direita o precipitado de TNTPD.

## 4.2.2 Ensaios das condições de extração em fase sólida.

### 4.2.2.1 Estudos preliminares de extração em fase sólida

Os resultados dos ensaios preliminares de SPE estão apresentados nas figuras 29 até 68. Cada figura apresenta uma série de cromatogramas de das frações recolhidas na ordem de eluição. Para efeito de comparação, a figura 29 mostra o cromatograma do óleo de “andiroba” com as respectivas regiões.

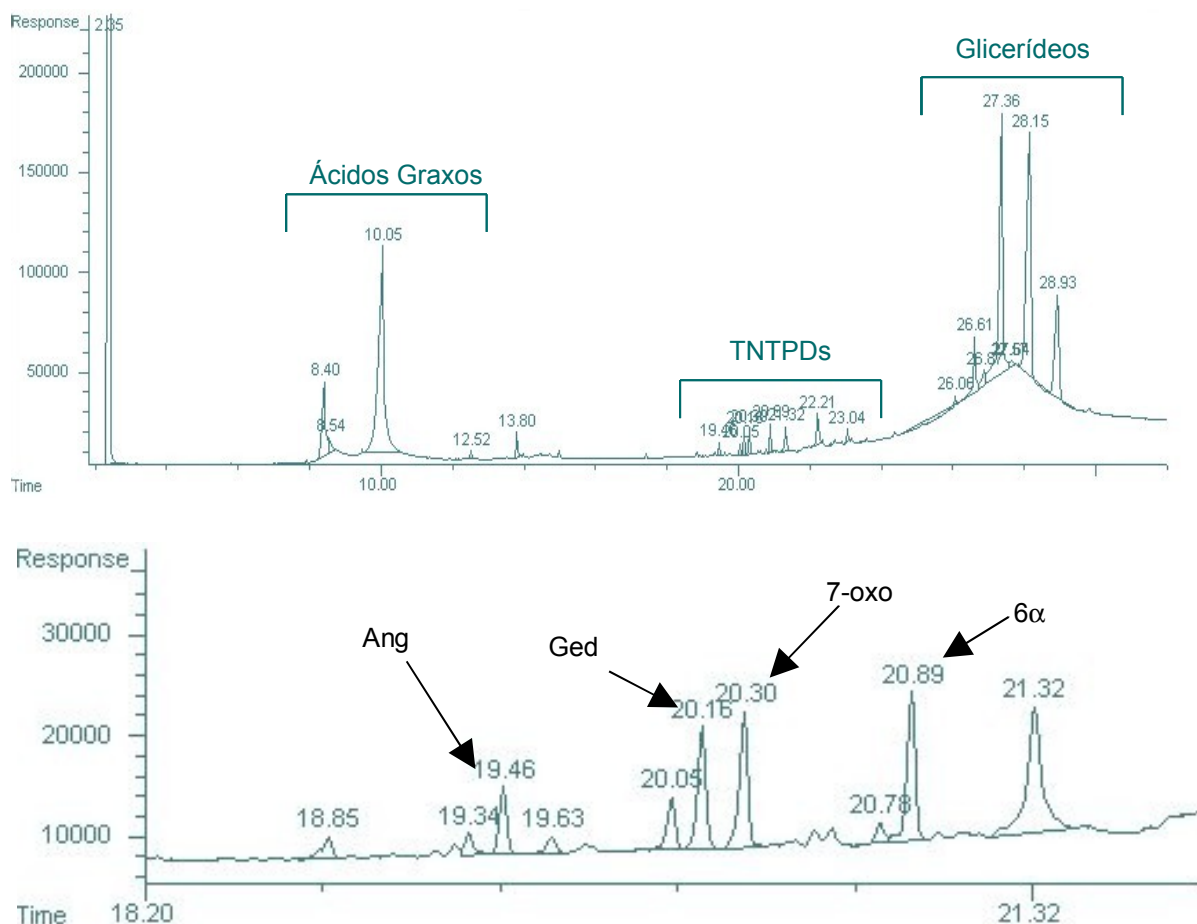


Figura 29: Cromatograma óleo de “andiroba” com as regiões dos três principais grupos de substâncias. Legenda: Ang: angolensato de metila; Ged: gedunina; 7-oxo: 7-desacetóxi-7-oxo-gedunina; 6α: 6α-acetóxi-gedunina.



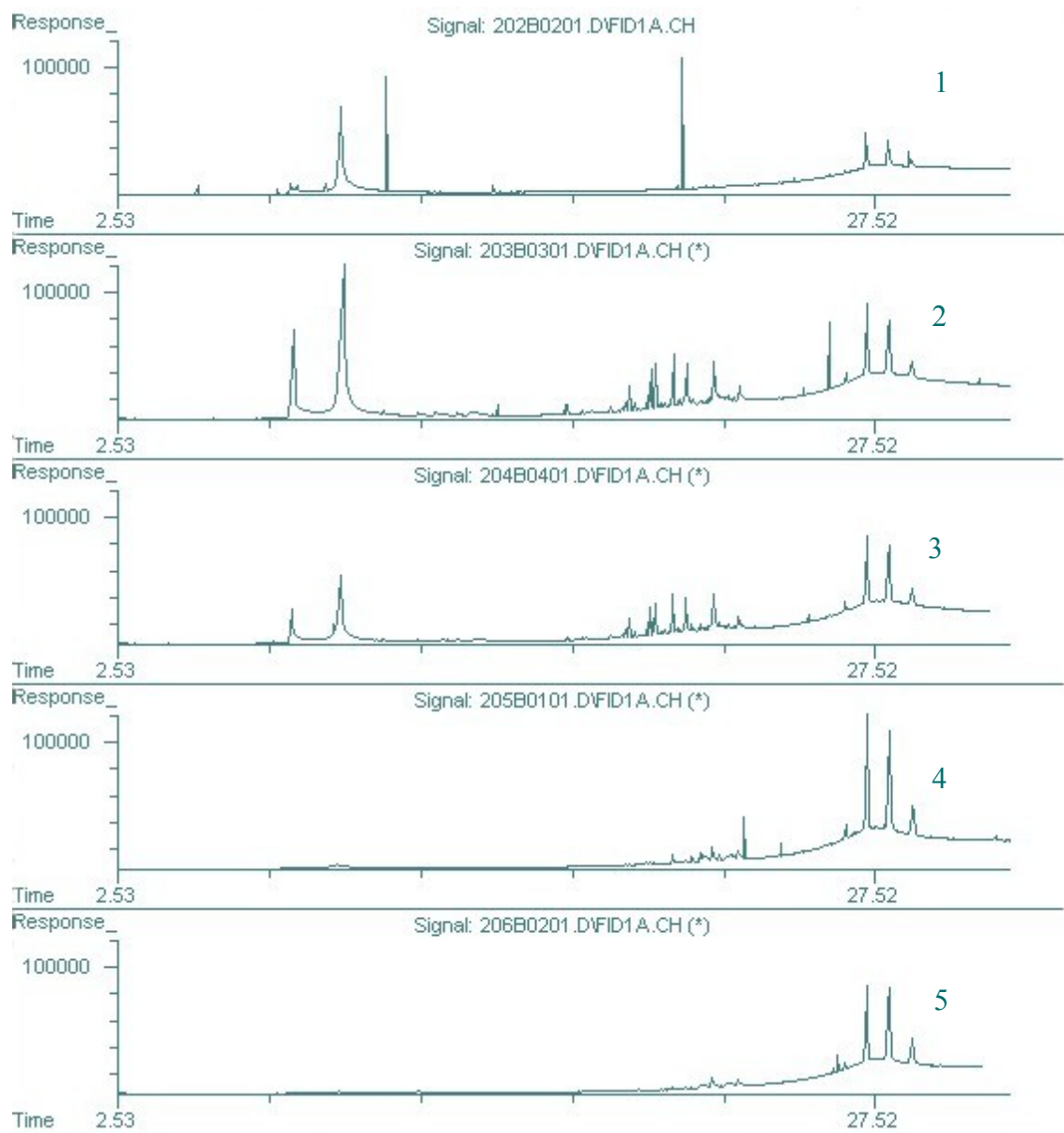


Figura 30: Cromatogramas do Experimento 1 Cromatogramas: 1-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>(3); 2-MeCN(3); 3-MeCN(4); 4-MeCN(5); 5-MeOH(4)

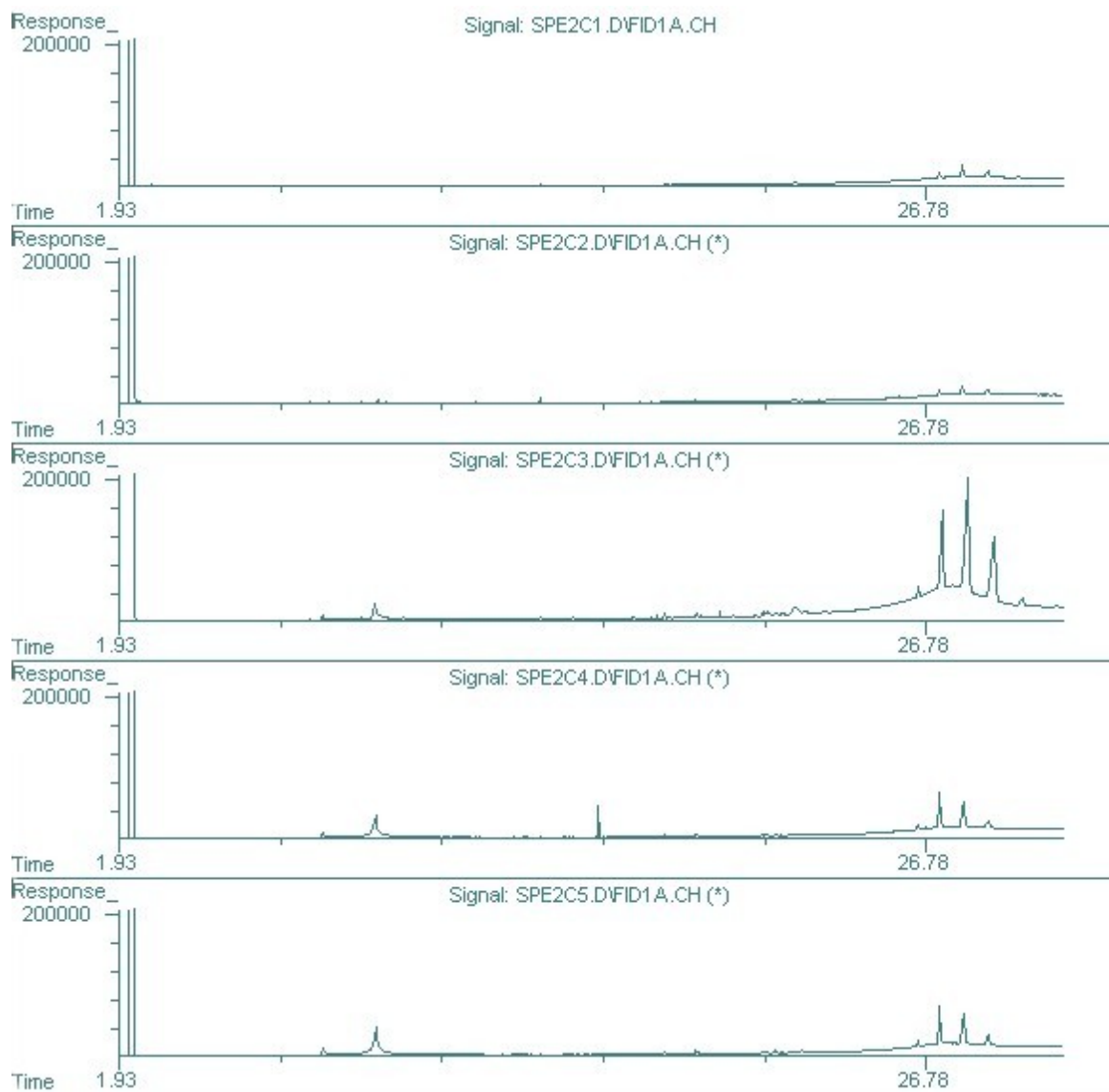


Figura 31: Cromatogramas das frações  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  do experimento 2.

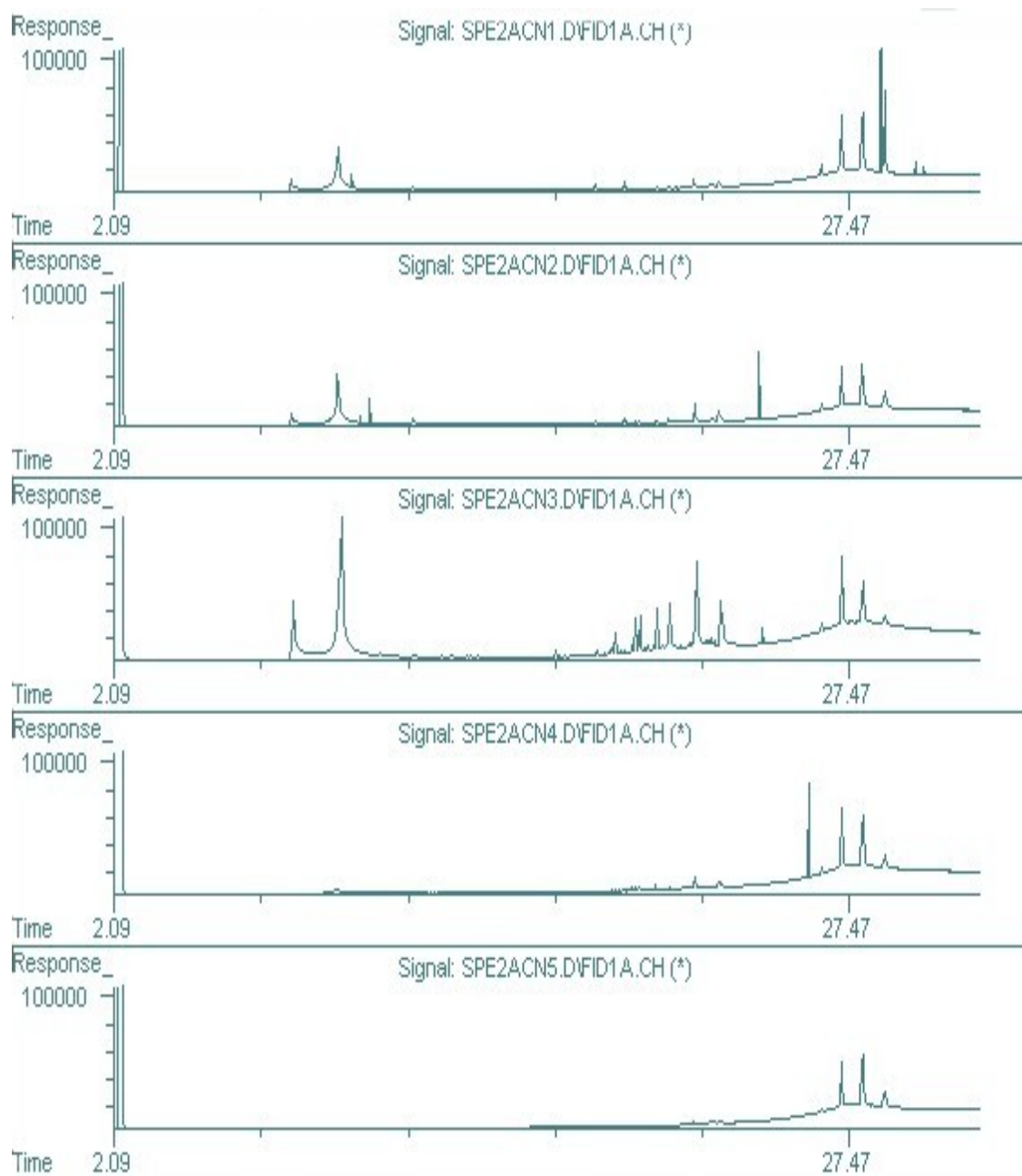


Figura 32: Cromatogramas das frações MeCN do experimento 2.

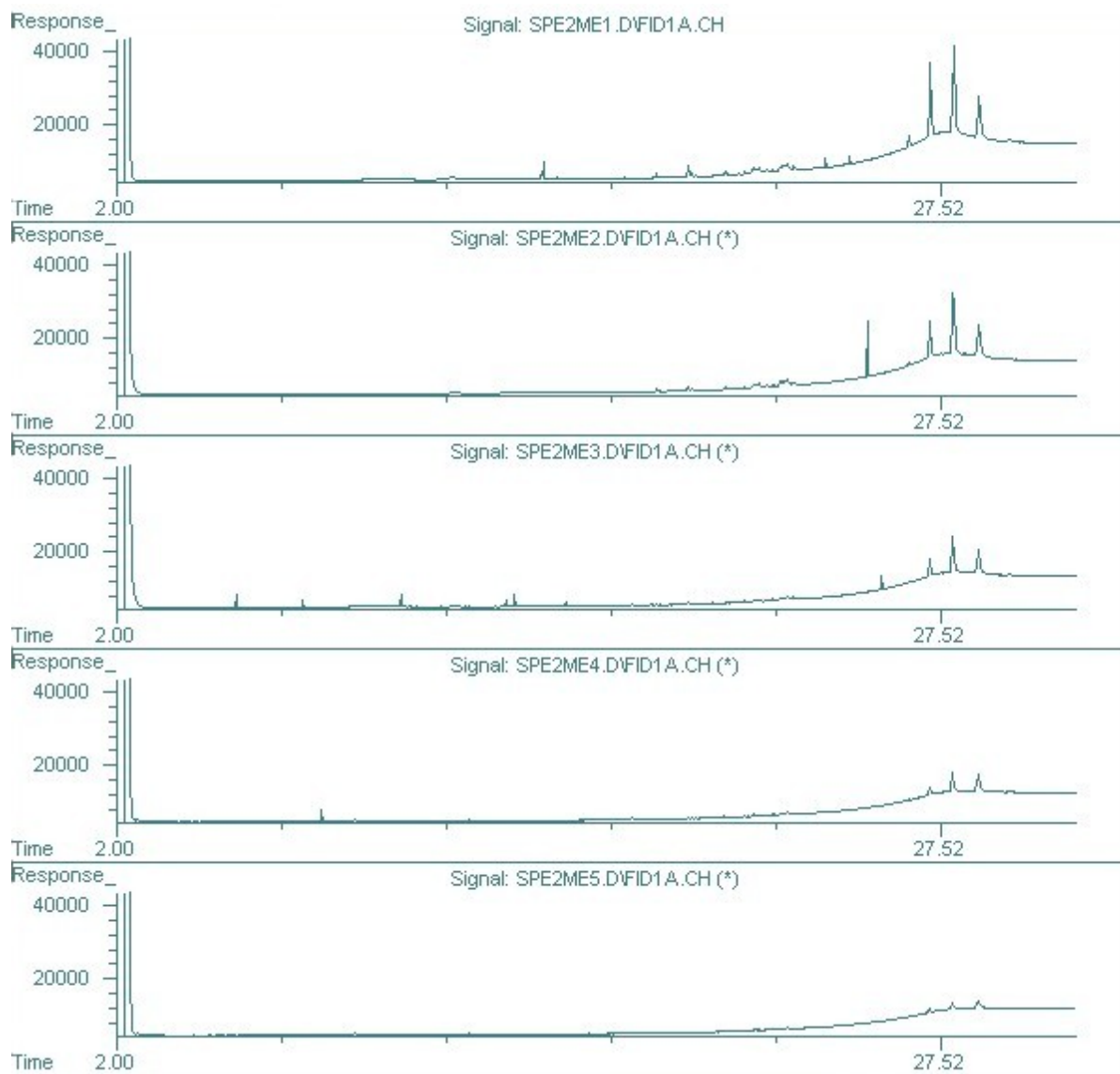


Figura 33: Cromatogramas das frações MeOH do experimento 2.

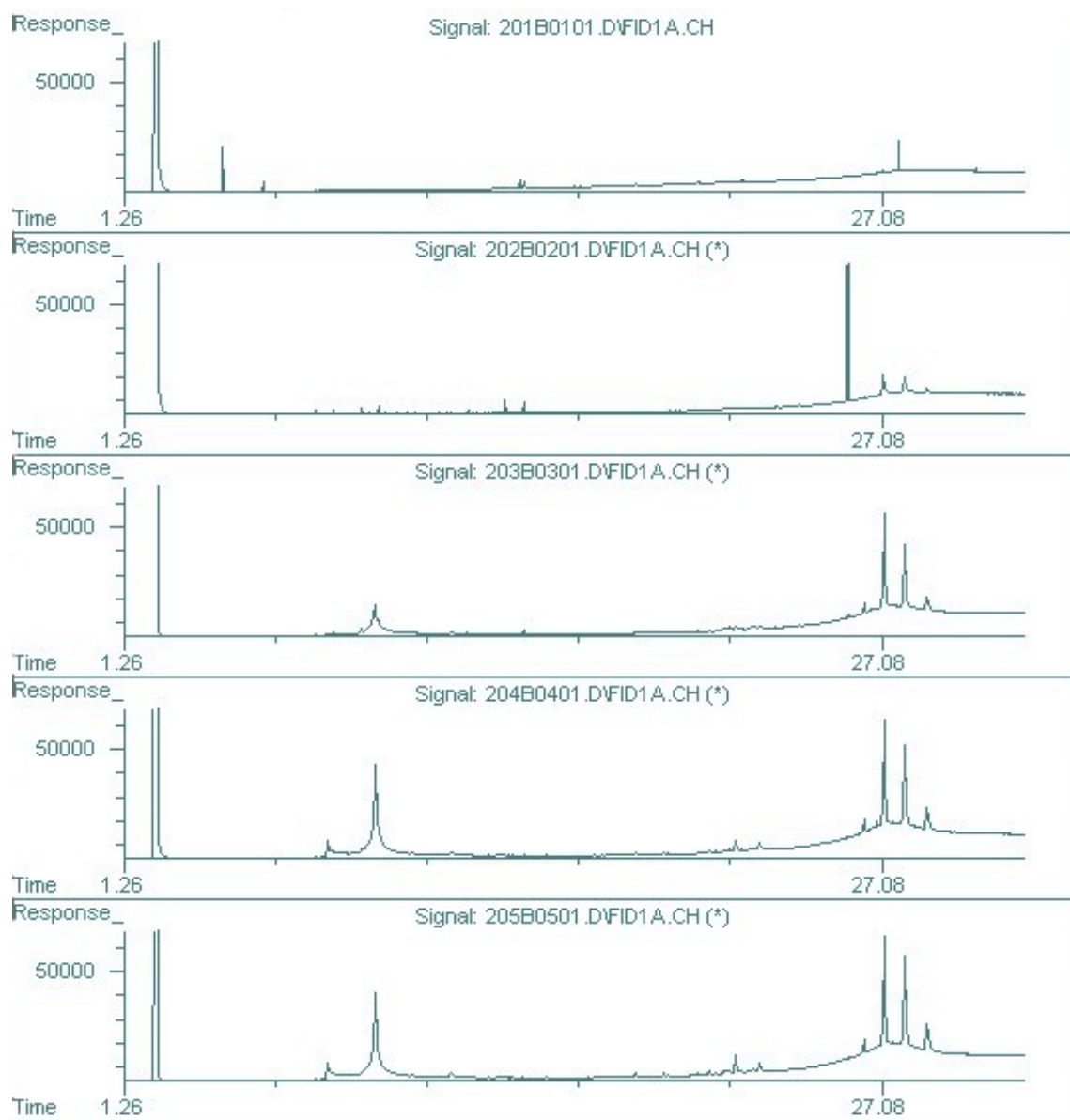


Figura 34: Cromatogramas das frações CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> do experimento 3.

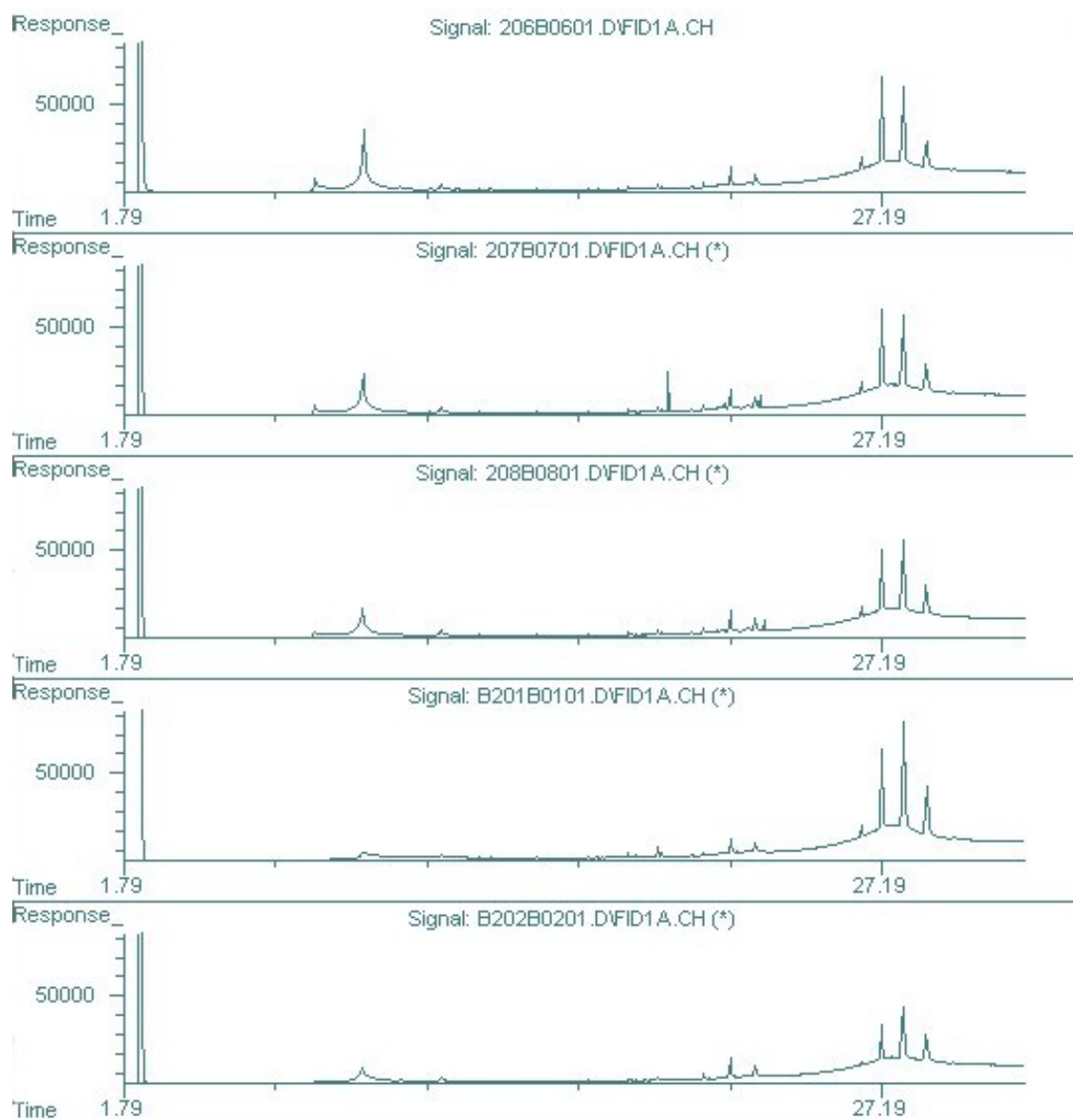


Figura 35: Cromatogramas das frações CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeCN 99/1 (V/V) do experimento 3.

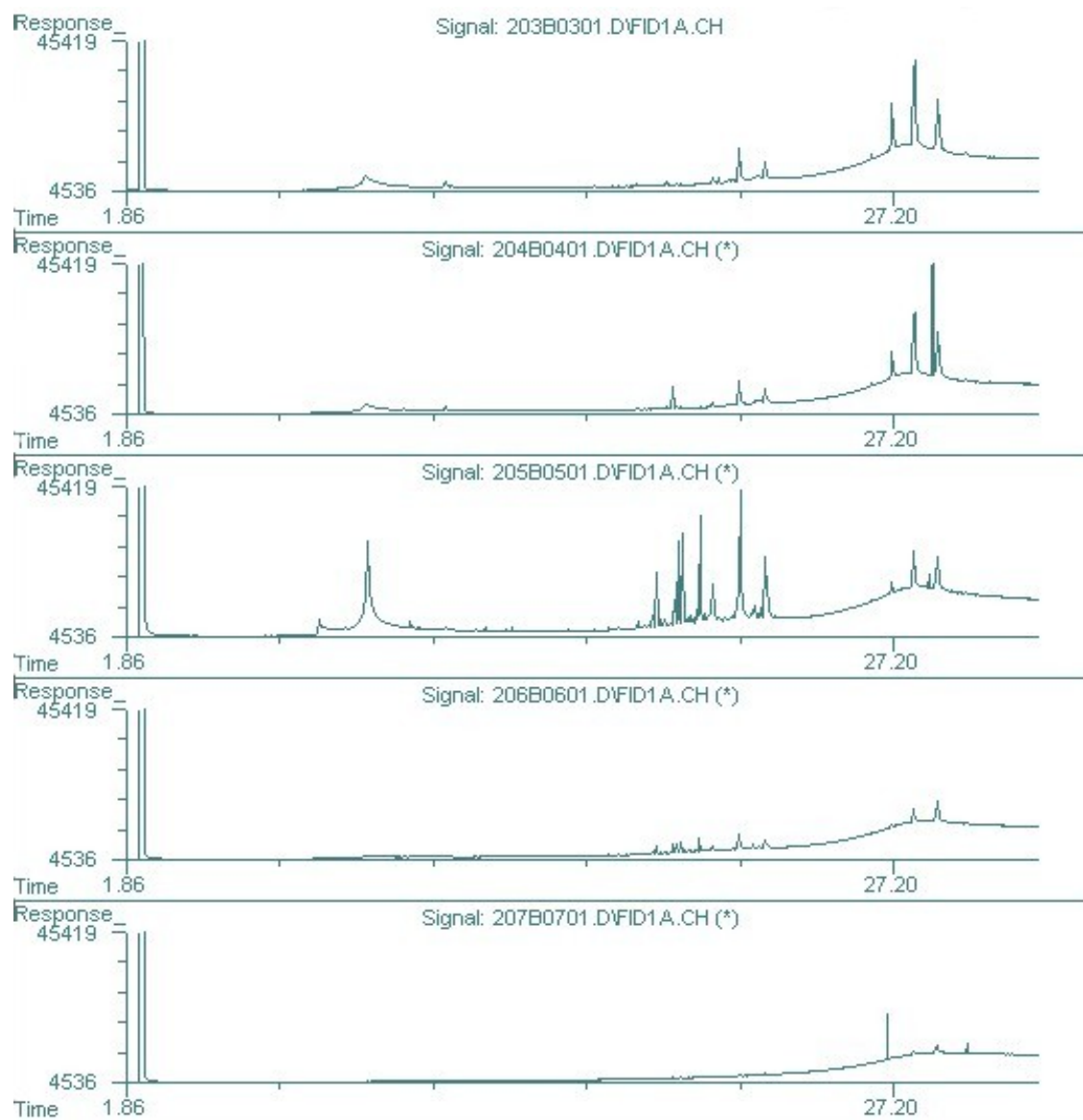


Figura 36: Cromatogramas das frações MeCN do experimento 3.

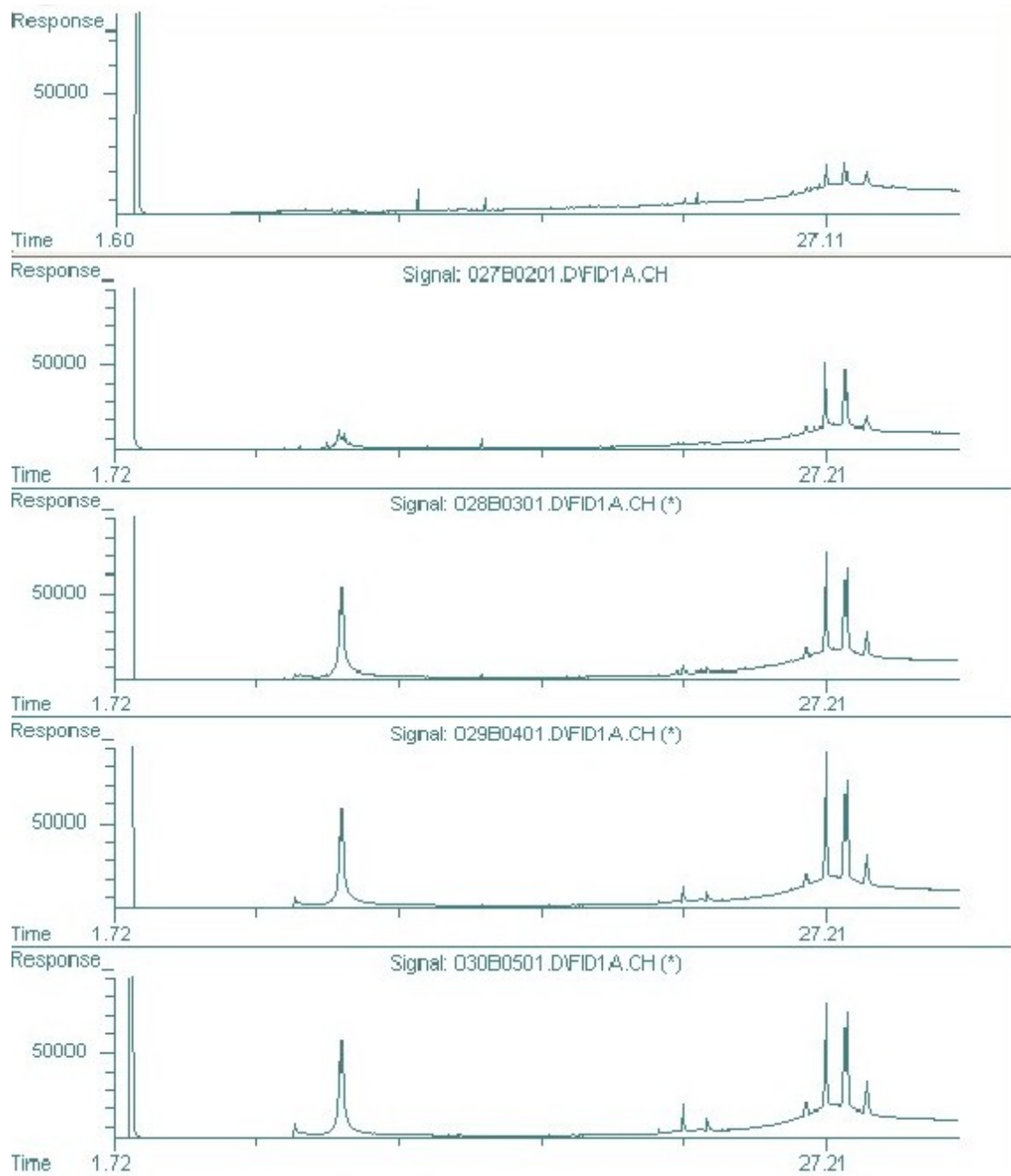


Figura 37: Cromatogramas das frações  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  do experimento 4.



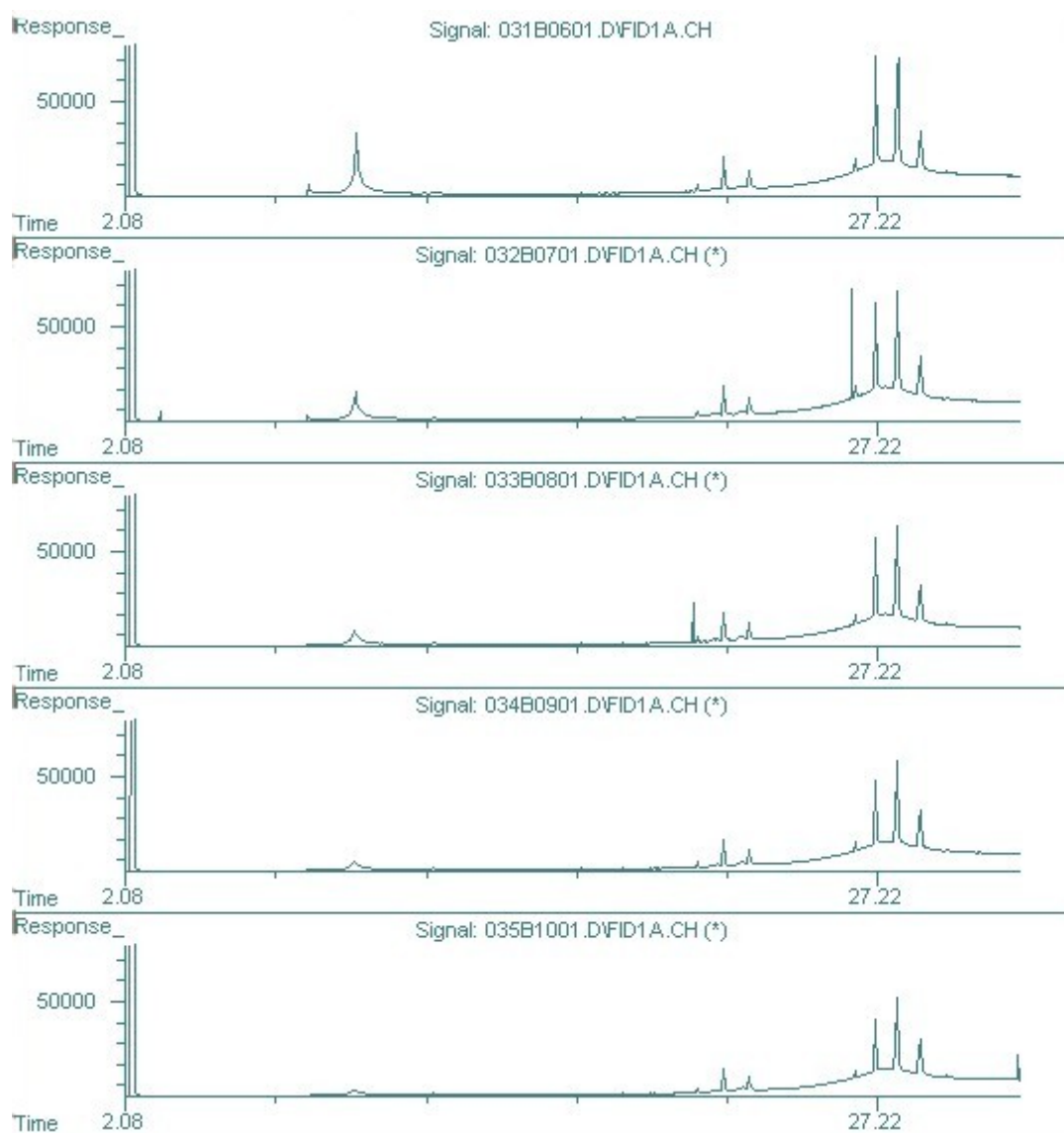


Figura 38: Cromatogramas das frações  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  do experimento 4.

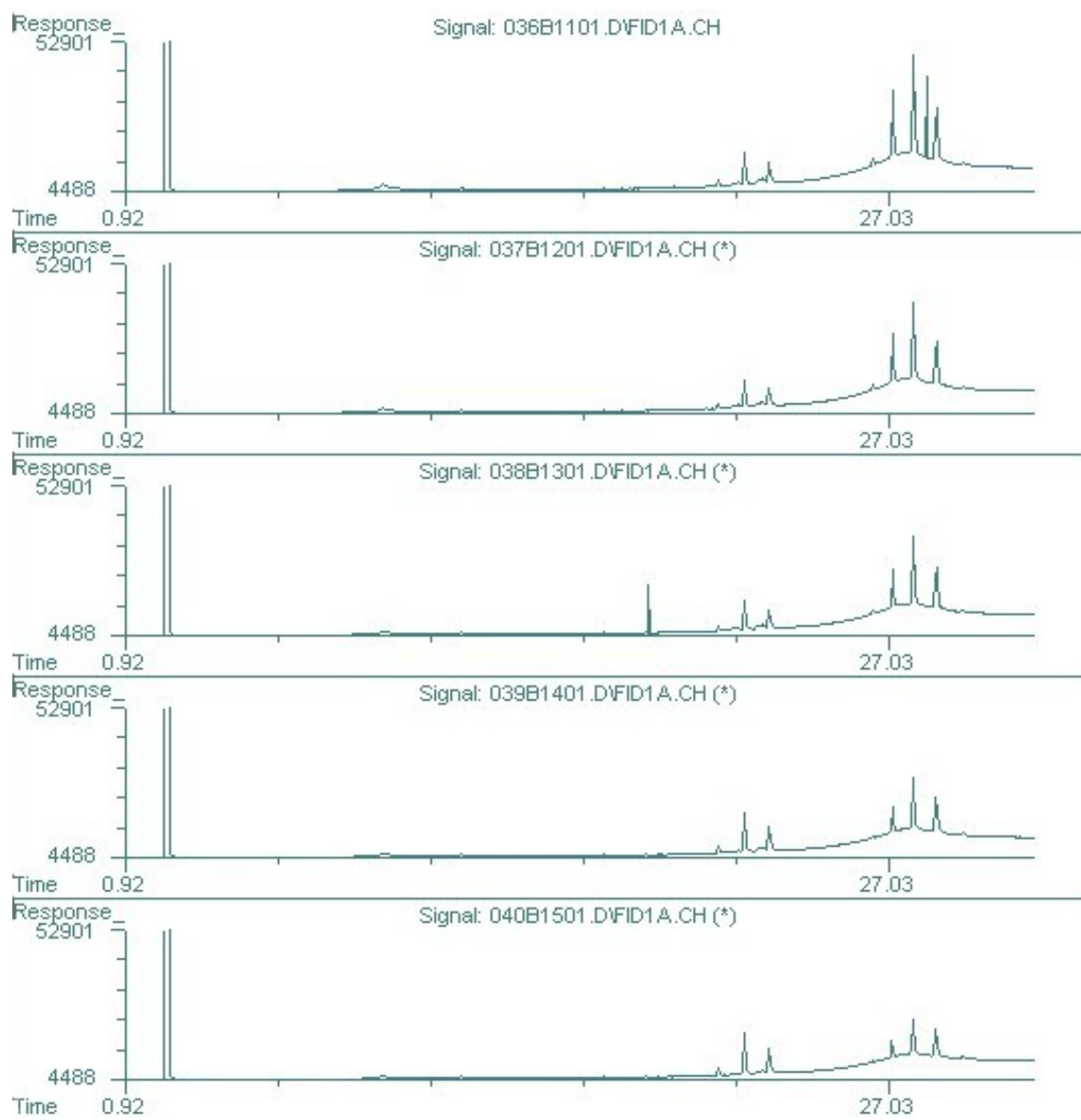


Figura 39: Cromatogramas das frações CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeCN do experimento 4.

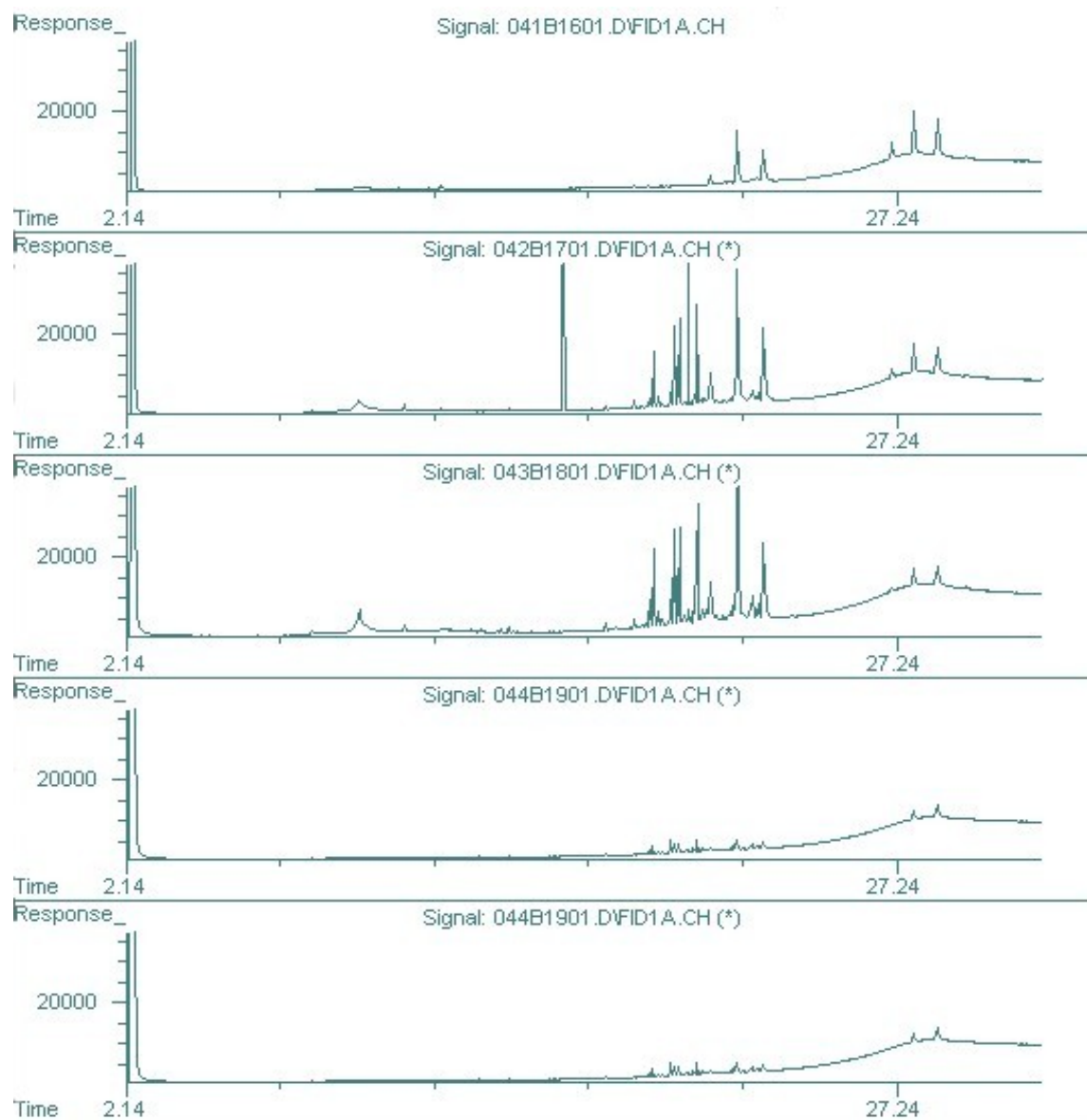


Figura 40: Cromatogramas das frações CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeCN do experimento 4.

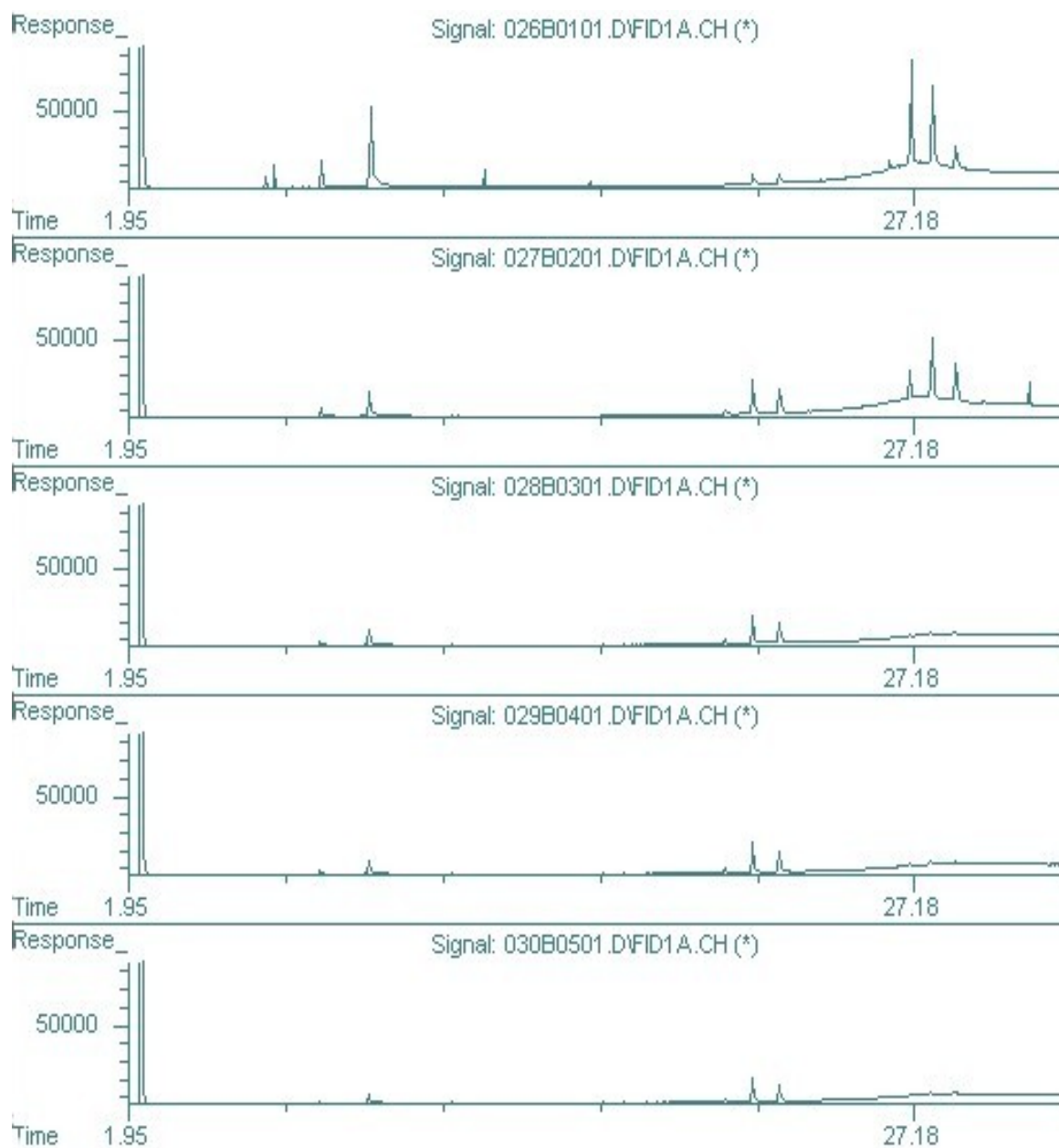


Figura 41: Cromatogramas das frações  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  do experimento 5. O primeiro cromatograma refere-se aos primeiros 10ml de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ .

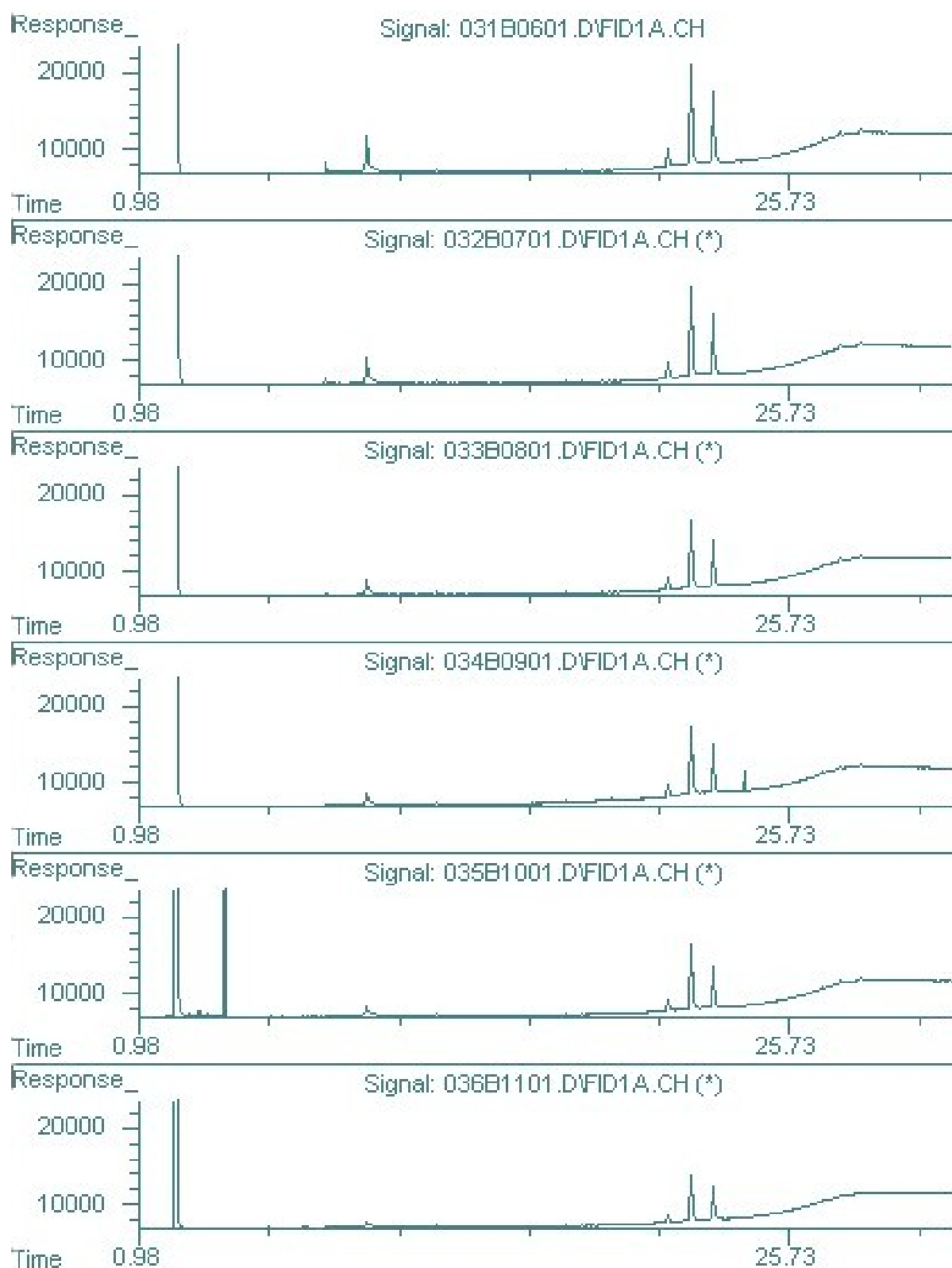


Figura 42: Cromatogramas das frações  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  do experimento 5

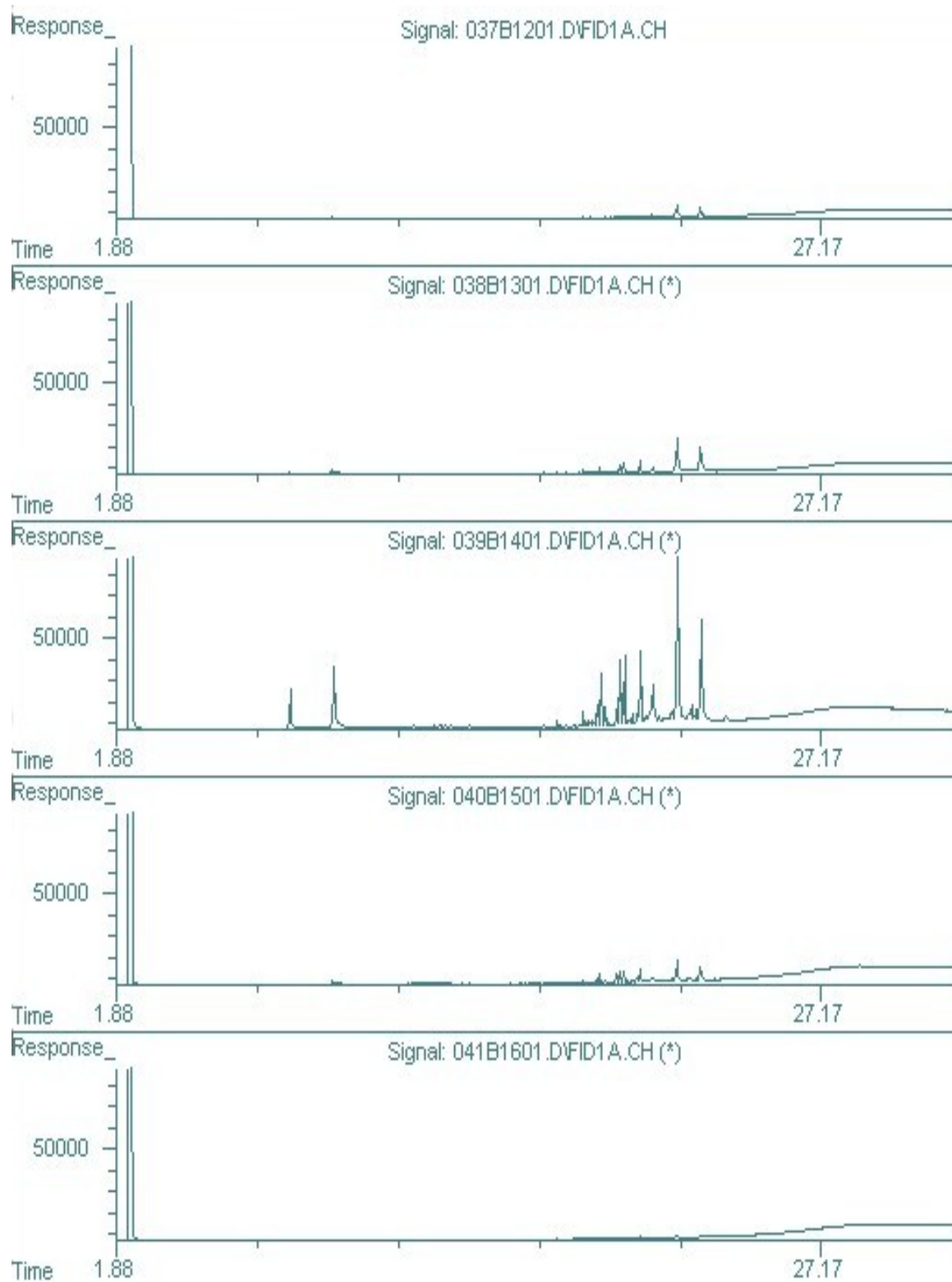


Figura 43: Cromatogramas das frações MeCN do experimento 5

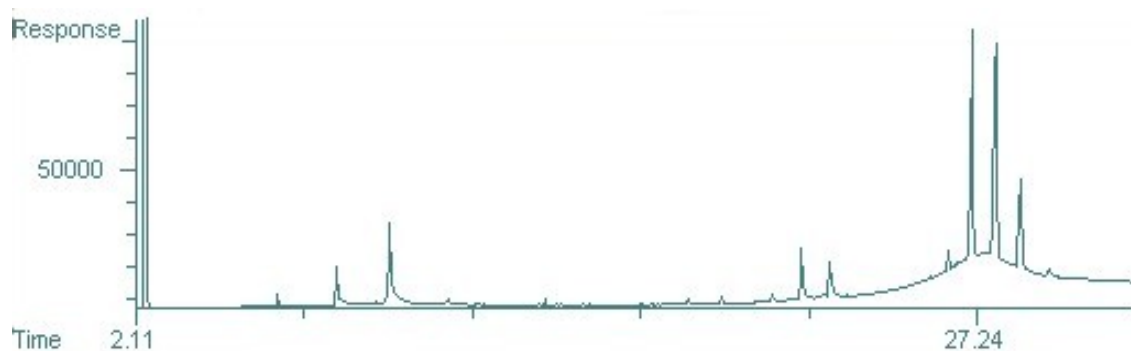


Figura 44: Cromatogramas da fração de 20ml de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  do experimento 6.

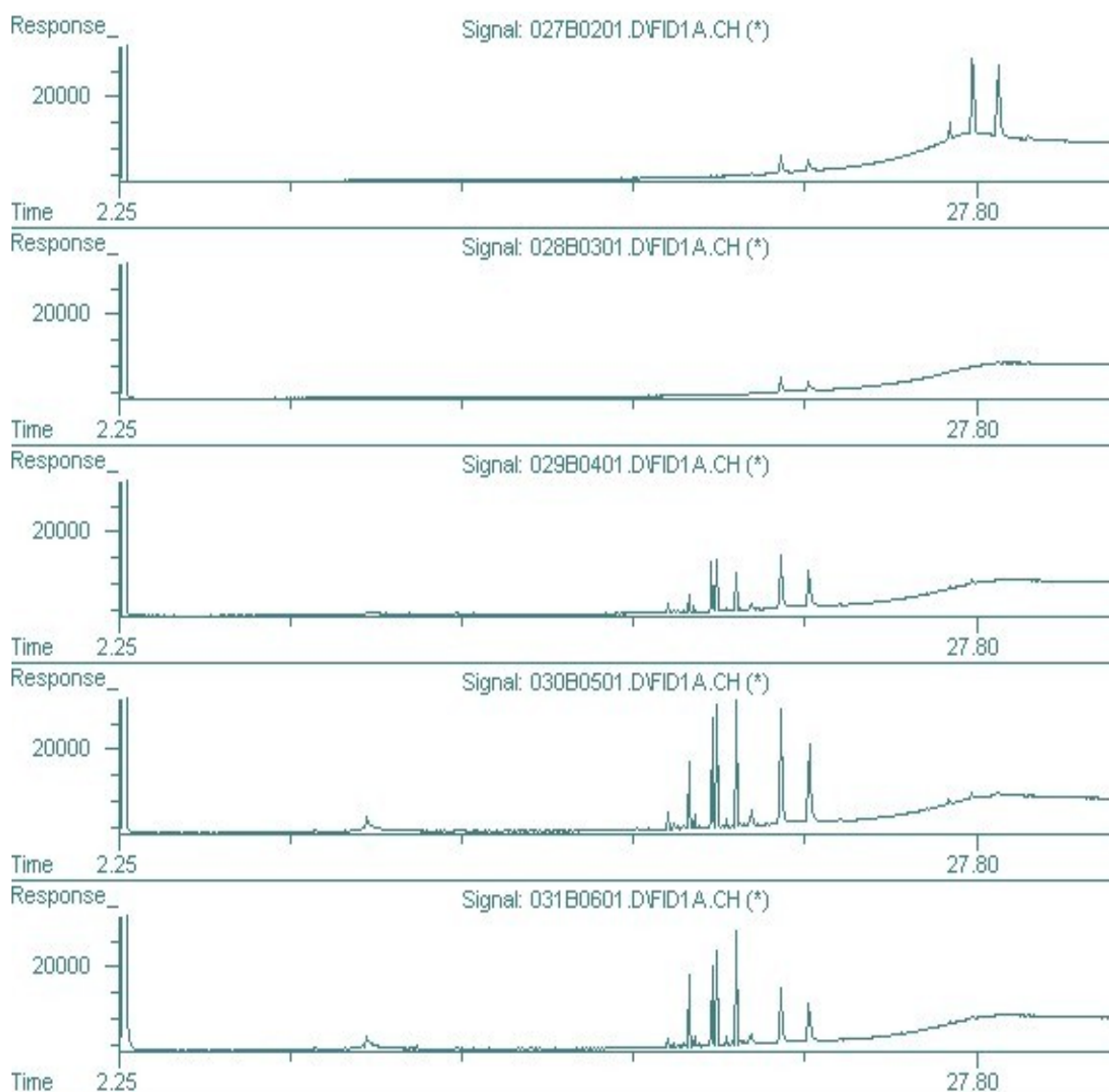


Figura 45: Cromatogramas da frações  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeCN}$  do experimento 6.

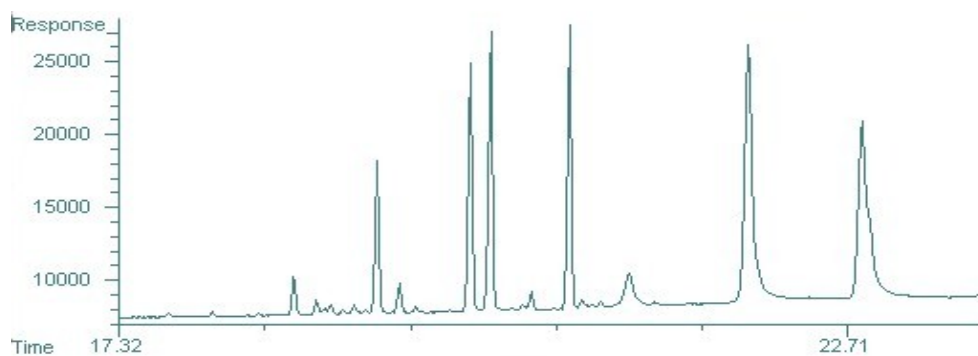


Figura 46: Detalhe de cromatograma da fração CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeCN (3) do experimento 6.

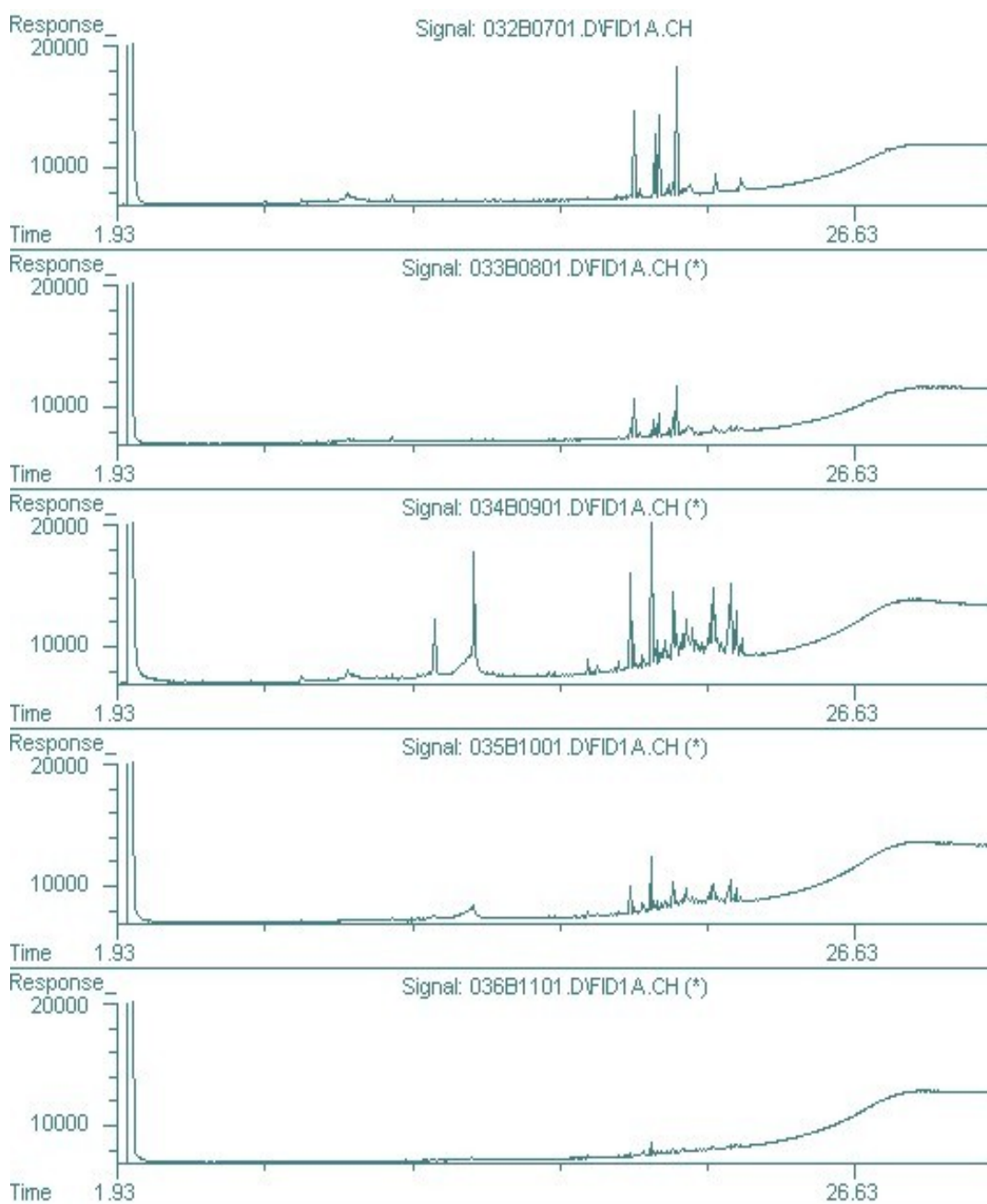


Figura 47: Cromatogramas das frações de MeCN do experimento 6.



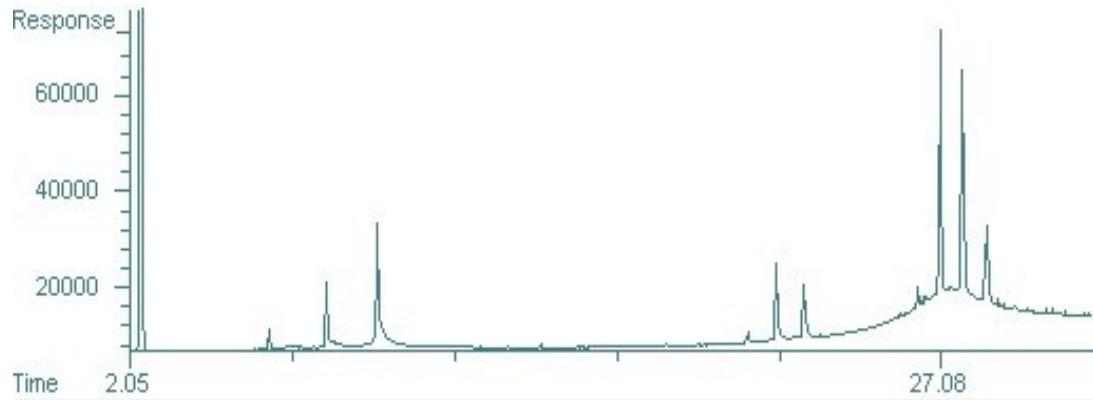


Figura 48: Cromatograma da fração CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> do experimento 7.

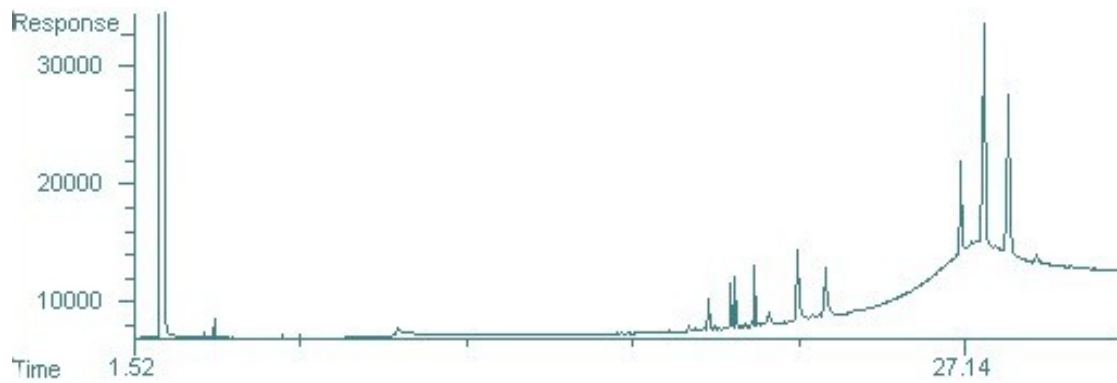


Figura 49: Cromatograma da fração CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeCN do experimento 7.

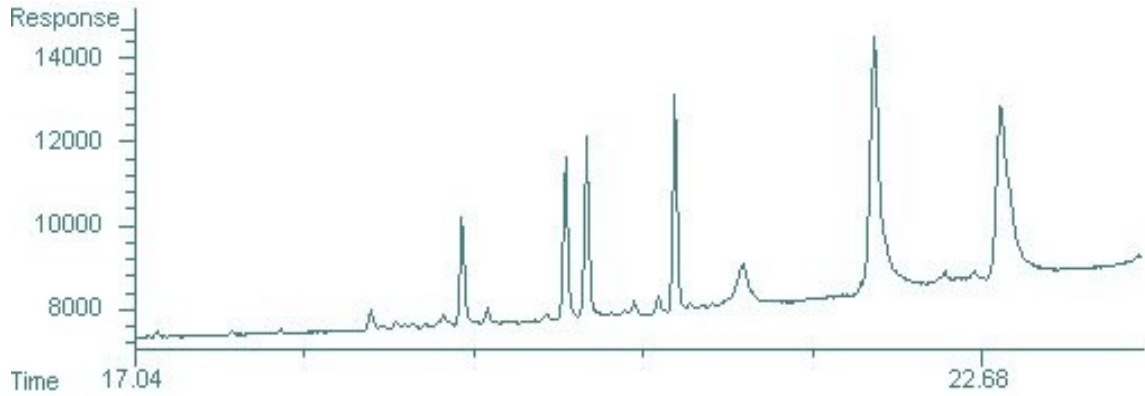


Figura 50: Detalhe do cromatograma da fração CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeCN do experimento 7.

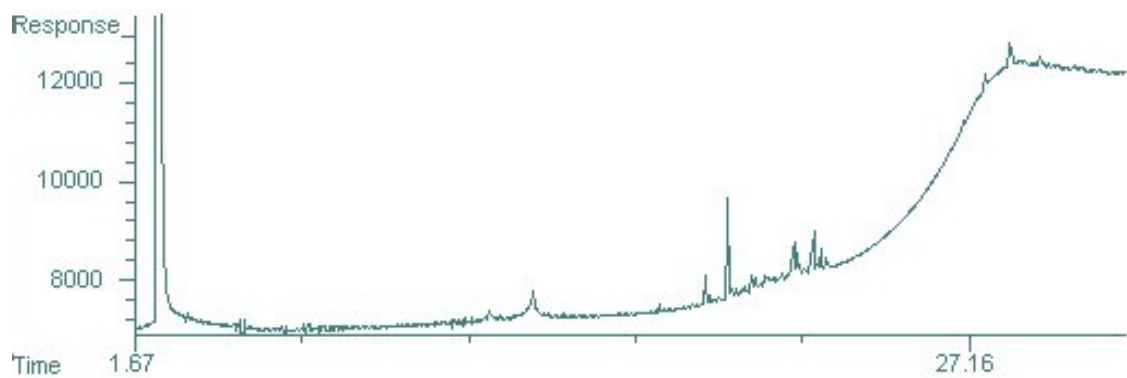


Figura 51: Cromatograma da fração MeCN do experimento 7.

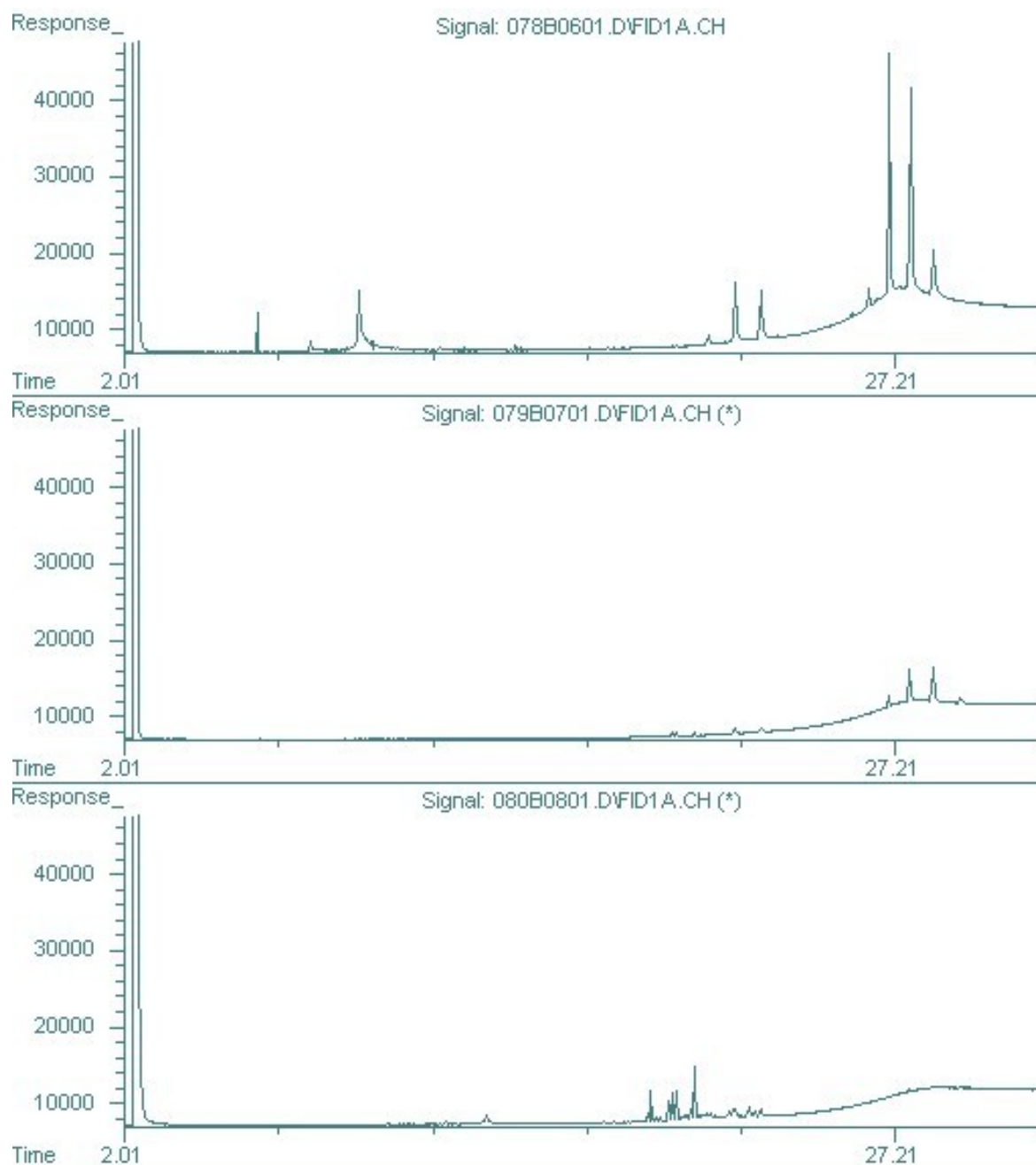


Figura 52: Cromatogramas das frações  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  [1],  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeCN}$  [2] e  $\text{MeCN}$  [3] do experimento 8.

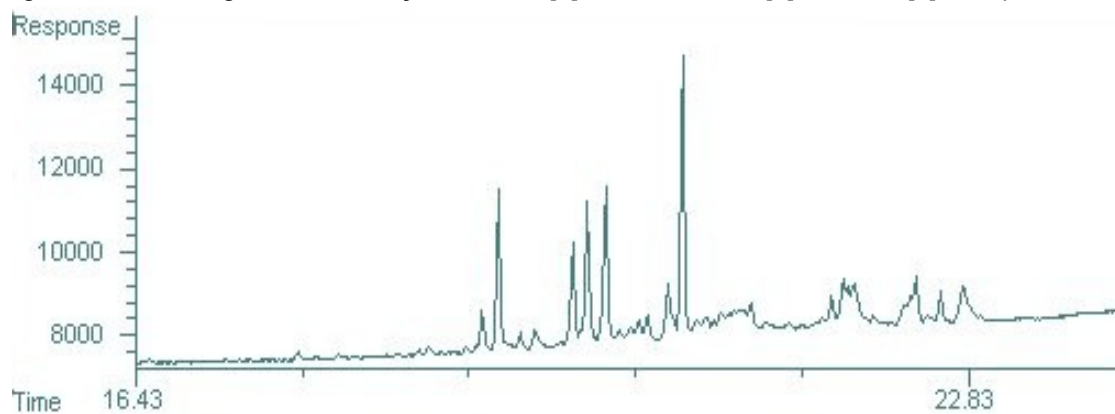
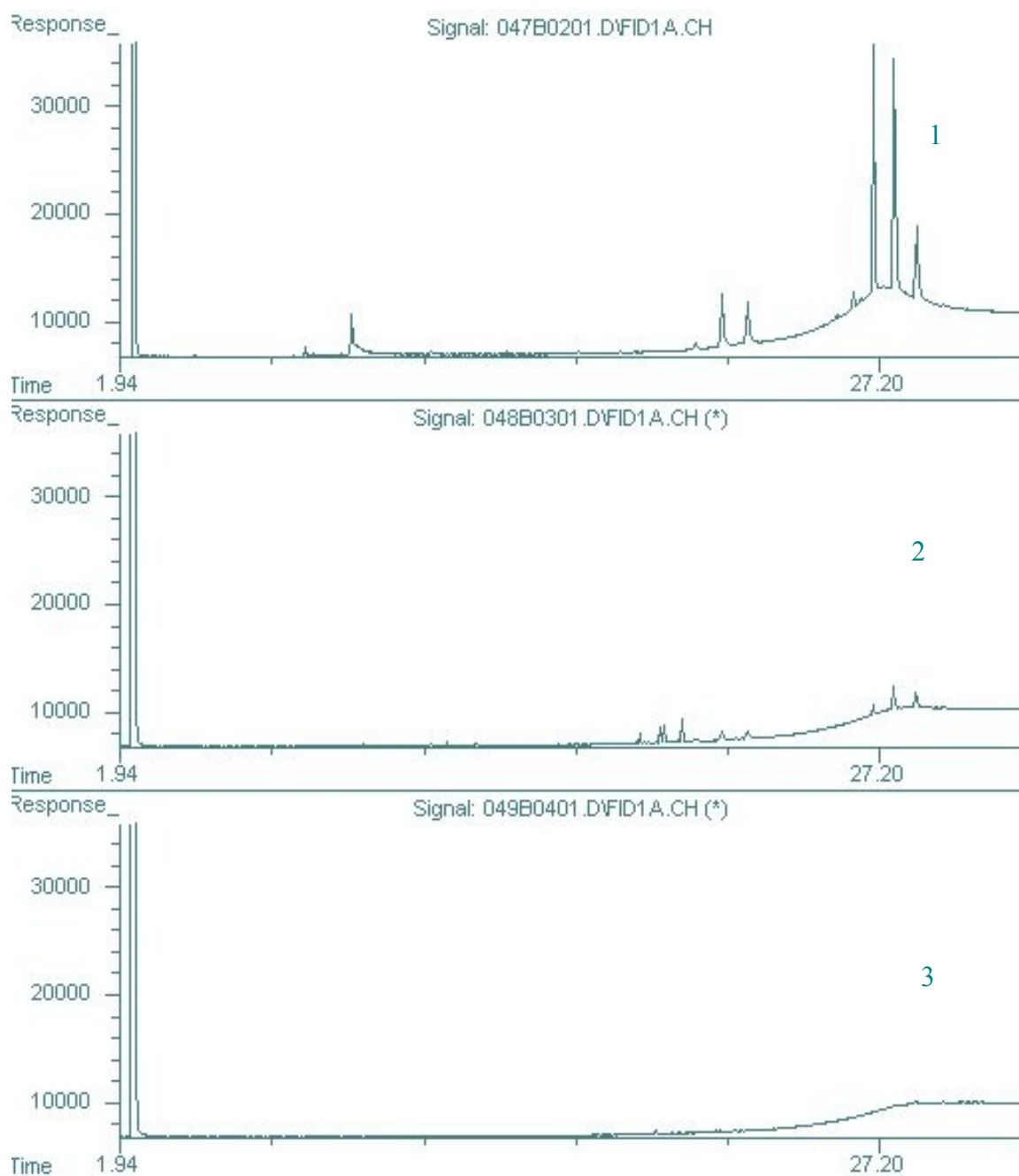
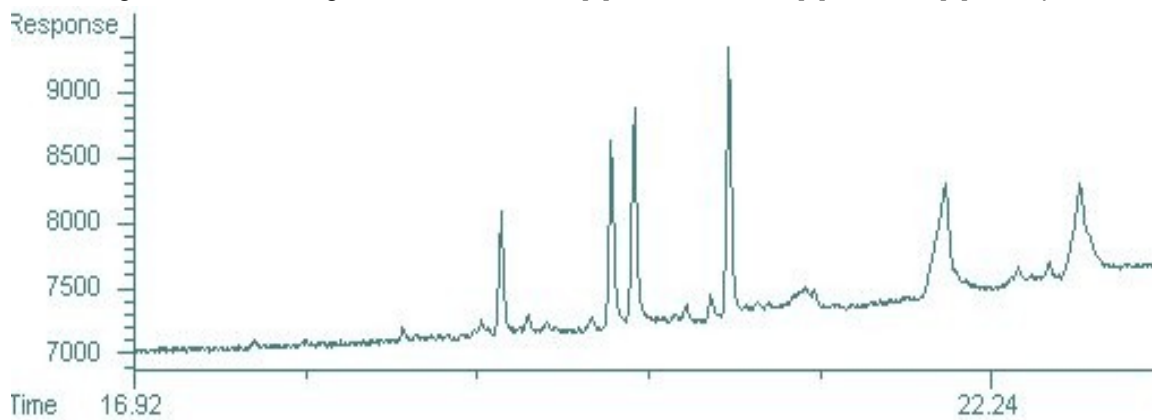


Figura 53: Detalhe do cromatograma da fração  $\text{MeCN}$  [3] do experimento 8



.Figura 54: Cromatogramas das fr. $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  [1],  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeCN}$  [2] e  $\text{MeCN}$  [3] do exp. 9



. Figura 55: Detalhe do cromatograma das frações de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeCN}$  do experimento 9.

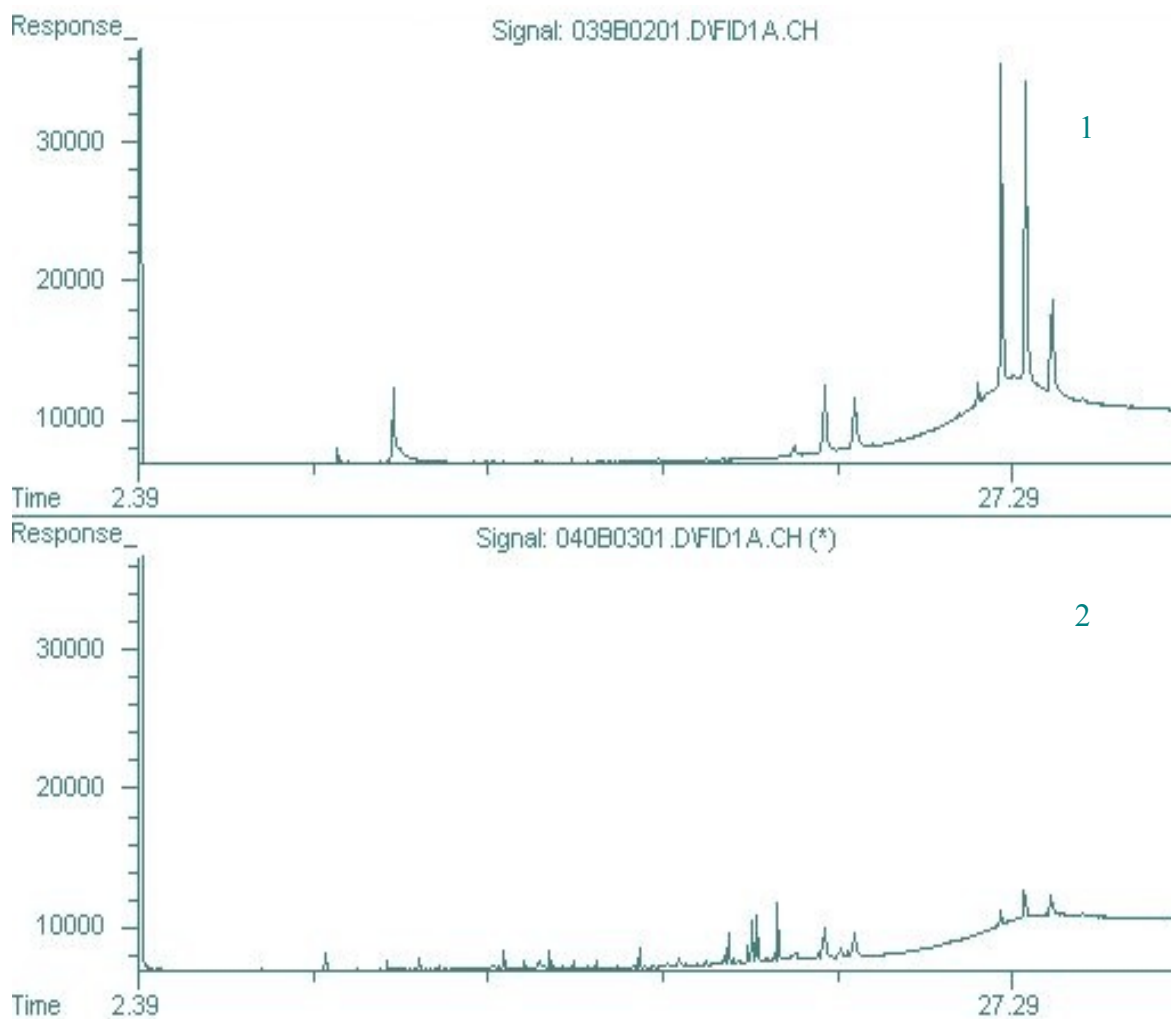


Figura 56: Cromatogramas das frações  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  [1] e MeCN [2] do experimento 10.

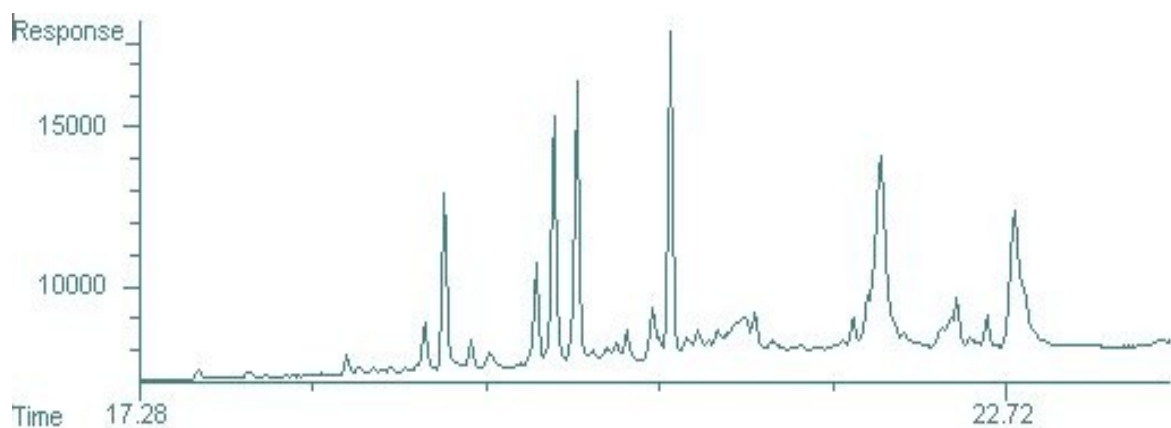


Figura 57: Detalhe do cromatograma da fração MeCN do experimento 10.

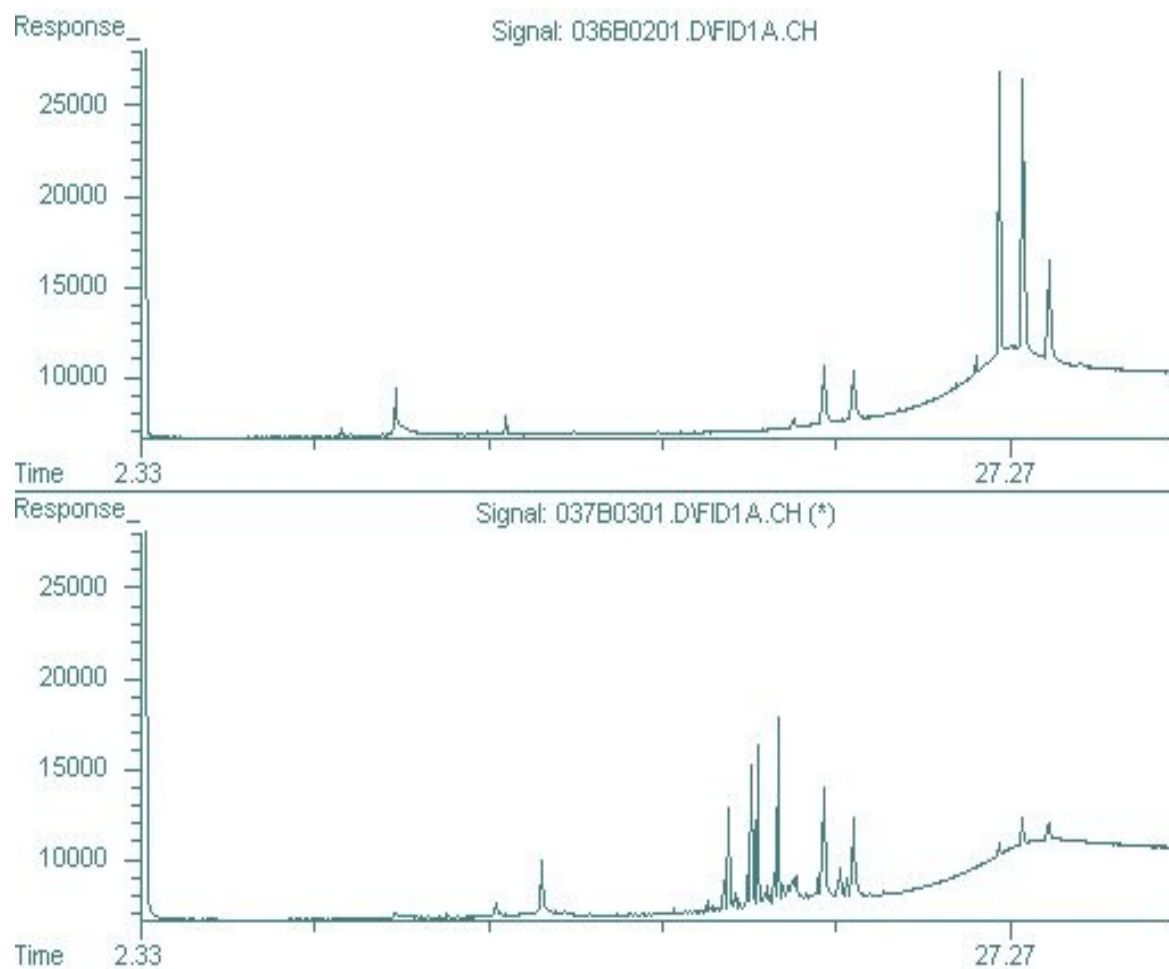


Figura 58: Cromatogramas das frações  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  [1] e MeCN [2] do experimento 11

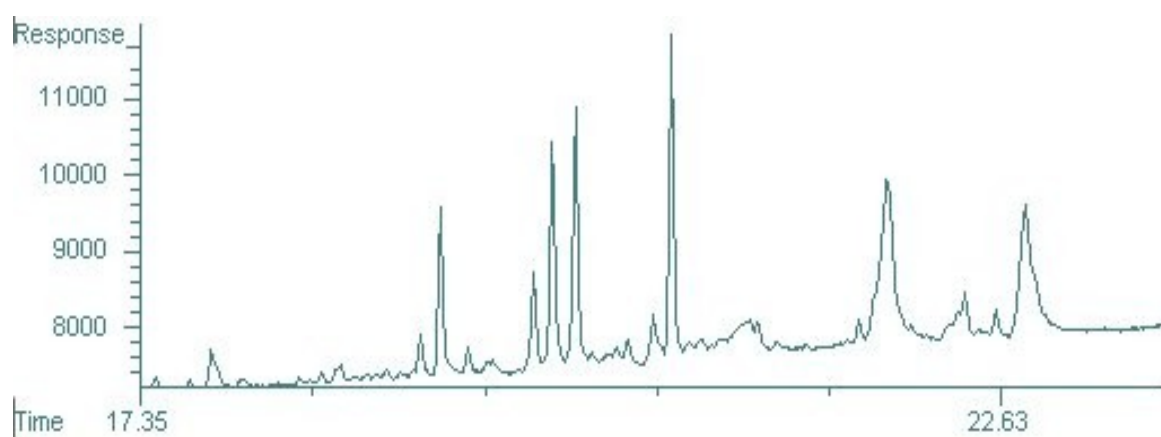
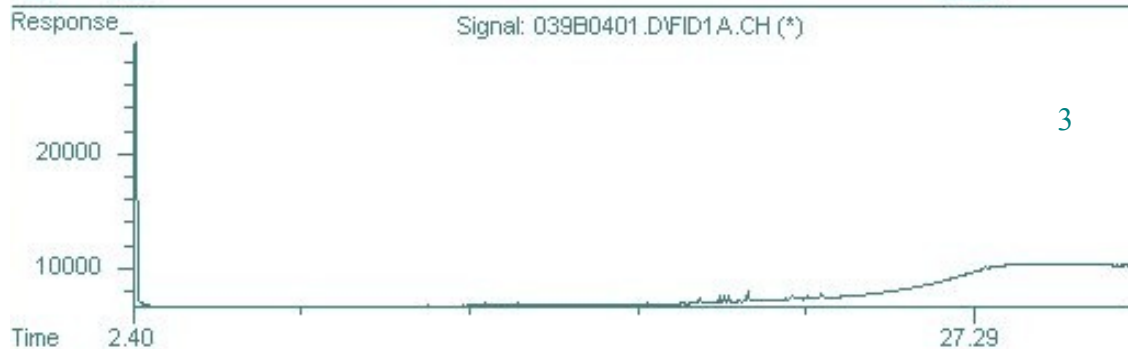
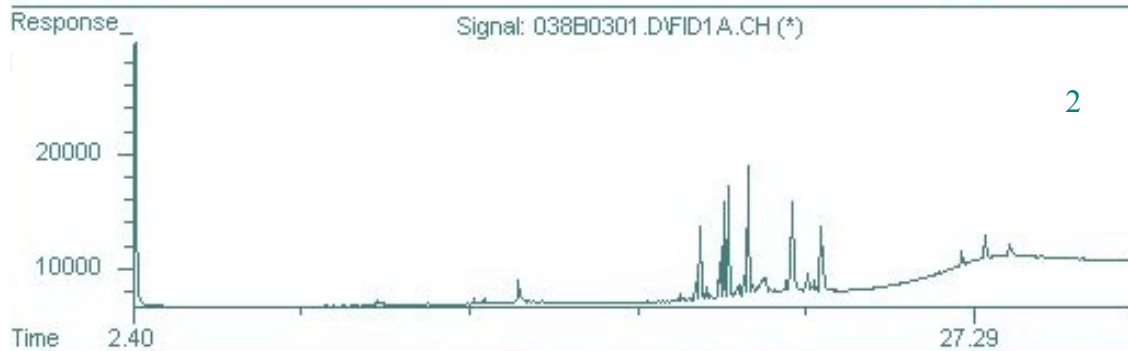
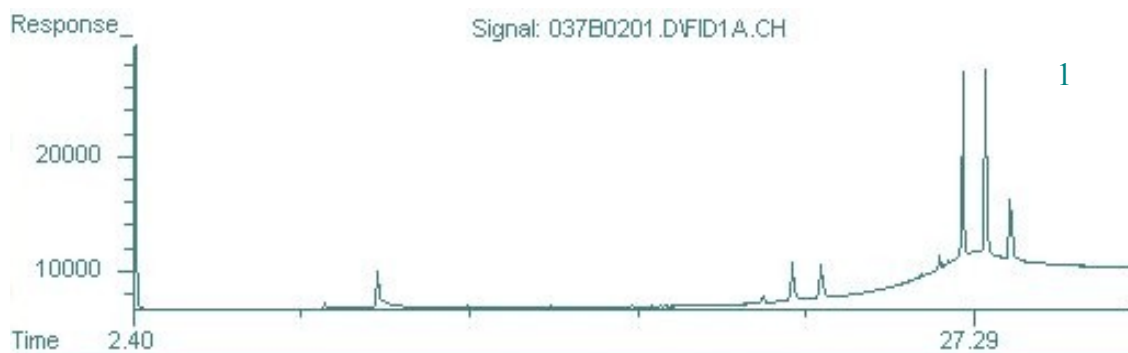


Figura 59: Detalhe dos cromatogramas da fração MeCN do experimento 11.



ura 60: Cromatogramas das fr.  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  [1],  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeCN}$  [2] e  $\text{MeCN}$  [3] do experimento 12.

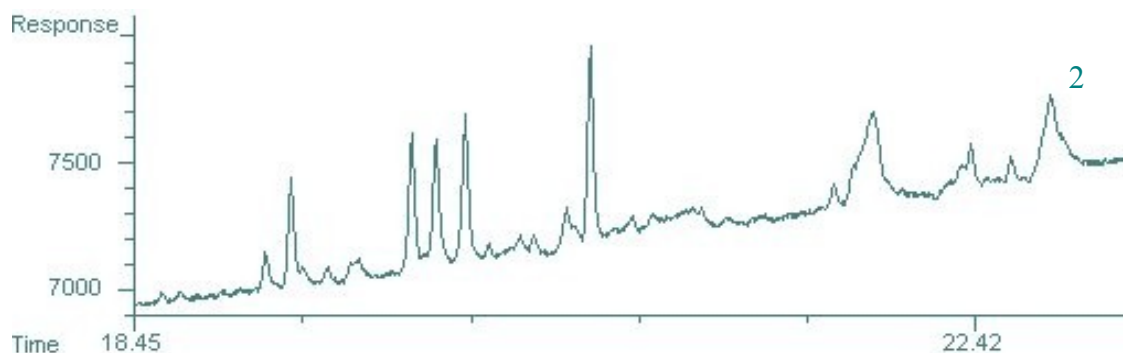
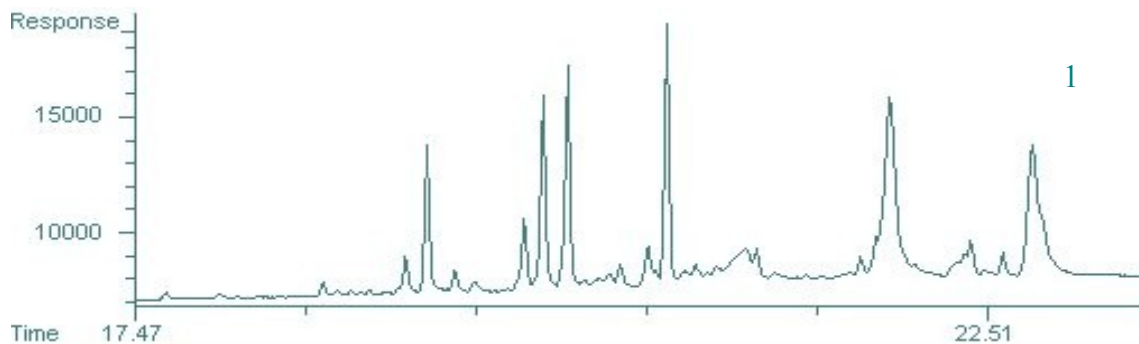


Figura 61: Cromatogramas das frações  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeCN}$  [1] e  $\text{MeCN}$  [2] do experimento 12 aprox.

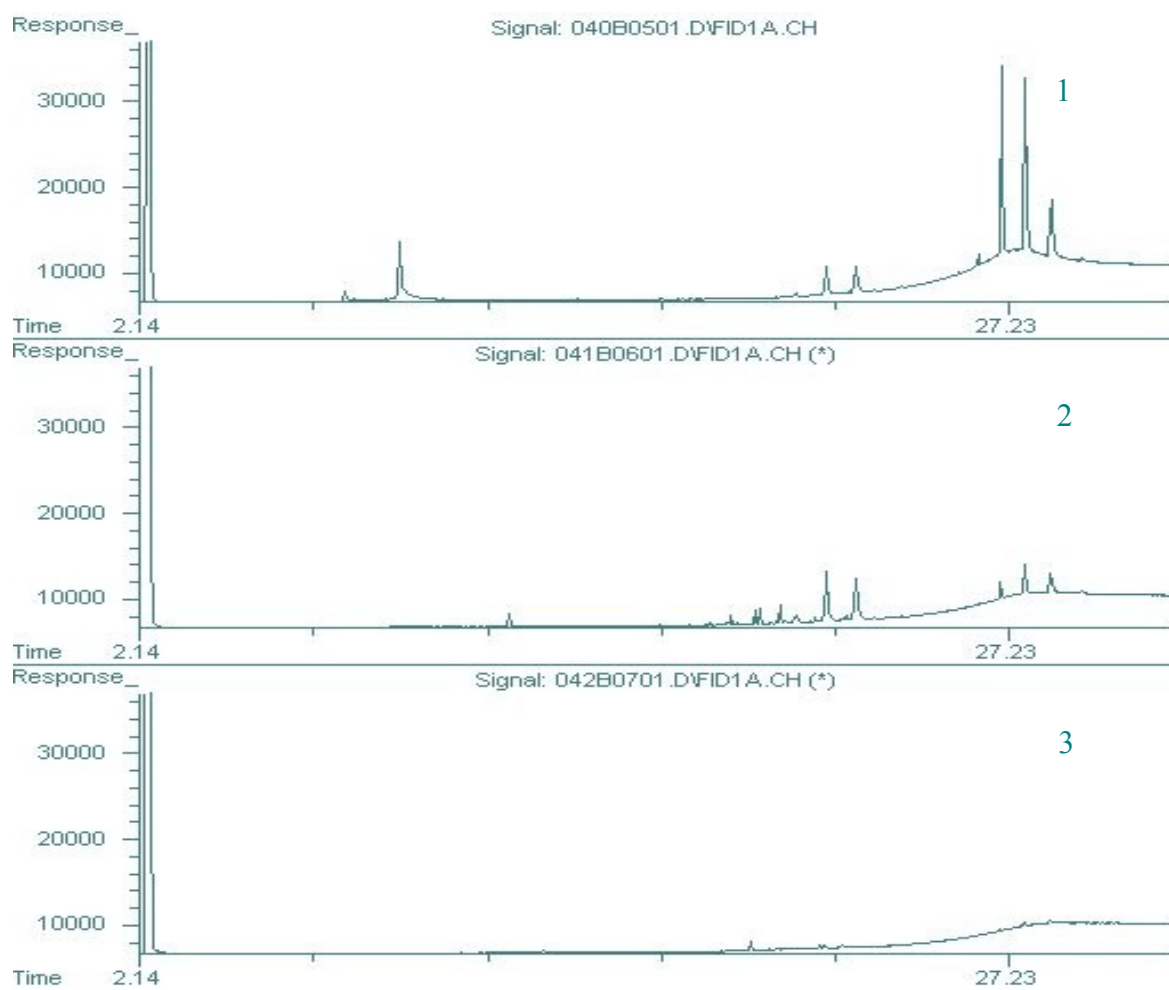


Figura 62: Cromatogramas das fr.  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  [1].  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeCN}$  [2] e  $\text{MeCN}$  [3] do experimento 13.

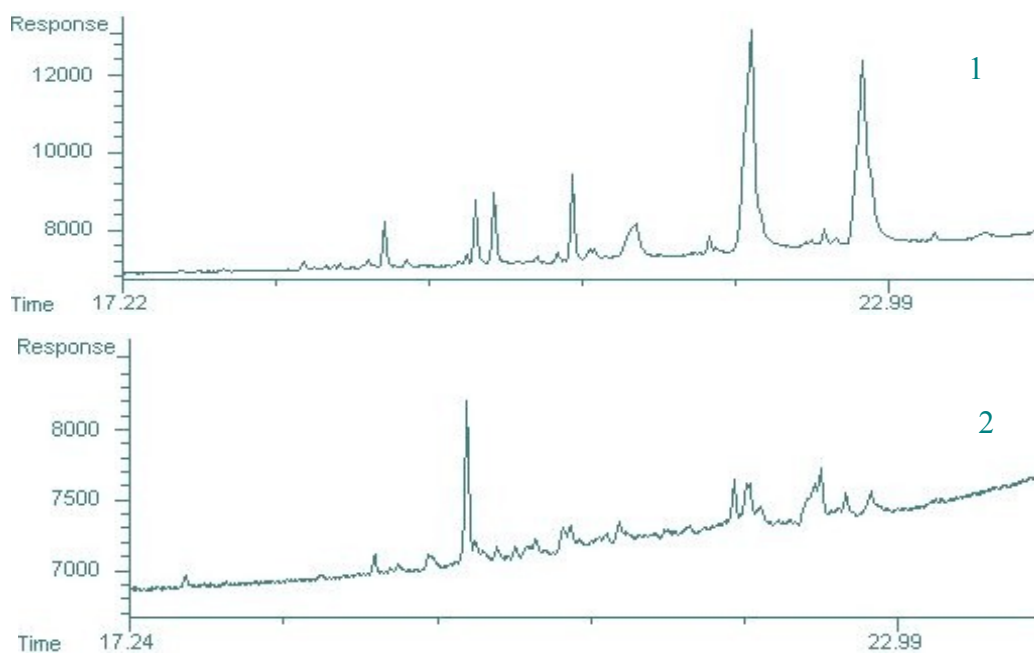


Figura 63: Detalhe dos cromatogramas das fr.  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeCN}$  [1] e  $\text{MeCN}$  [2] do experimento 13

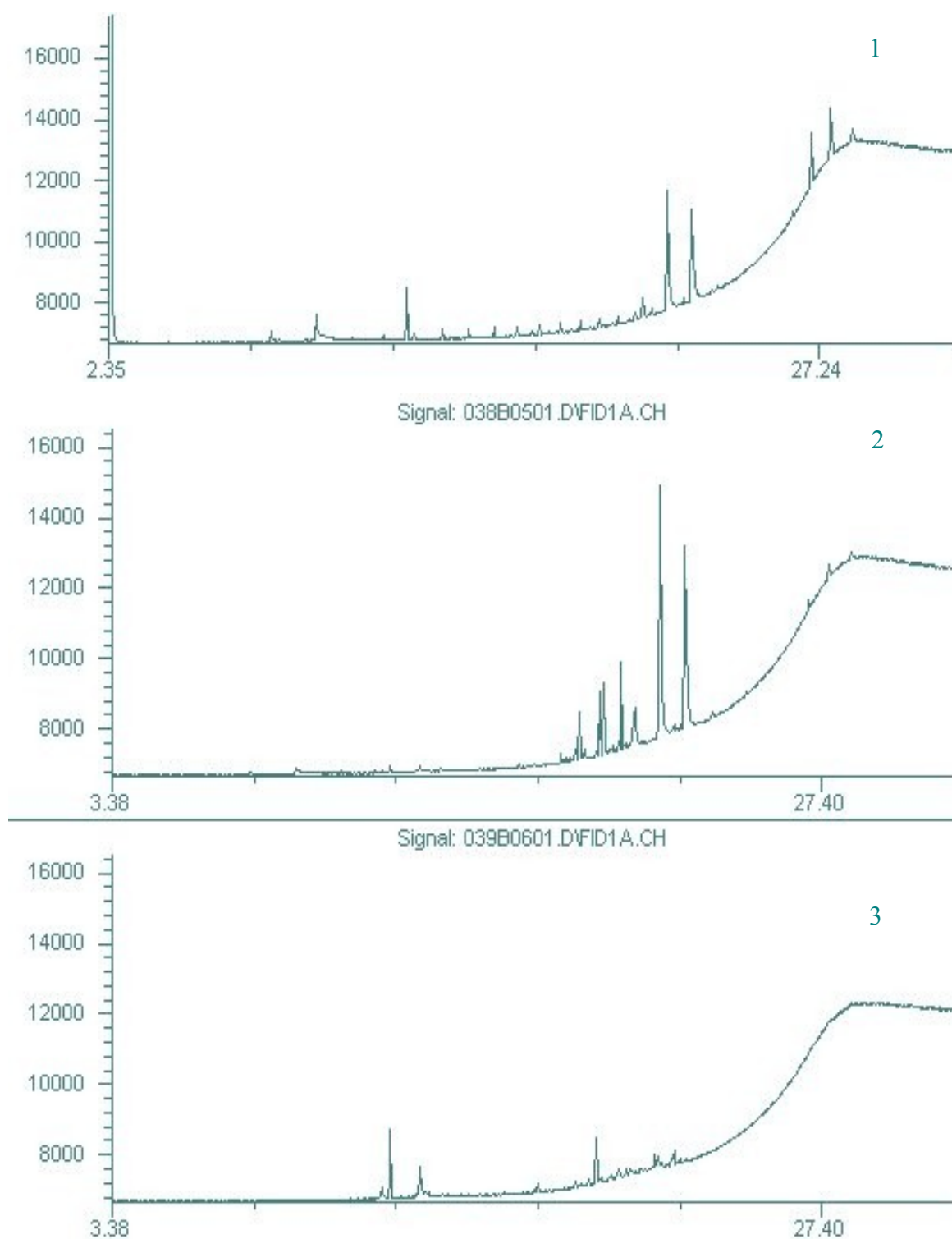


Figura 64: Cromatogramas das frações  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  [1],  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeCN}$  [2] e  $\text{MeCN}$  [3] do experimento 14



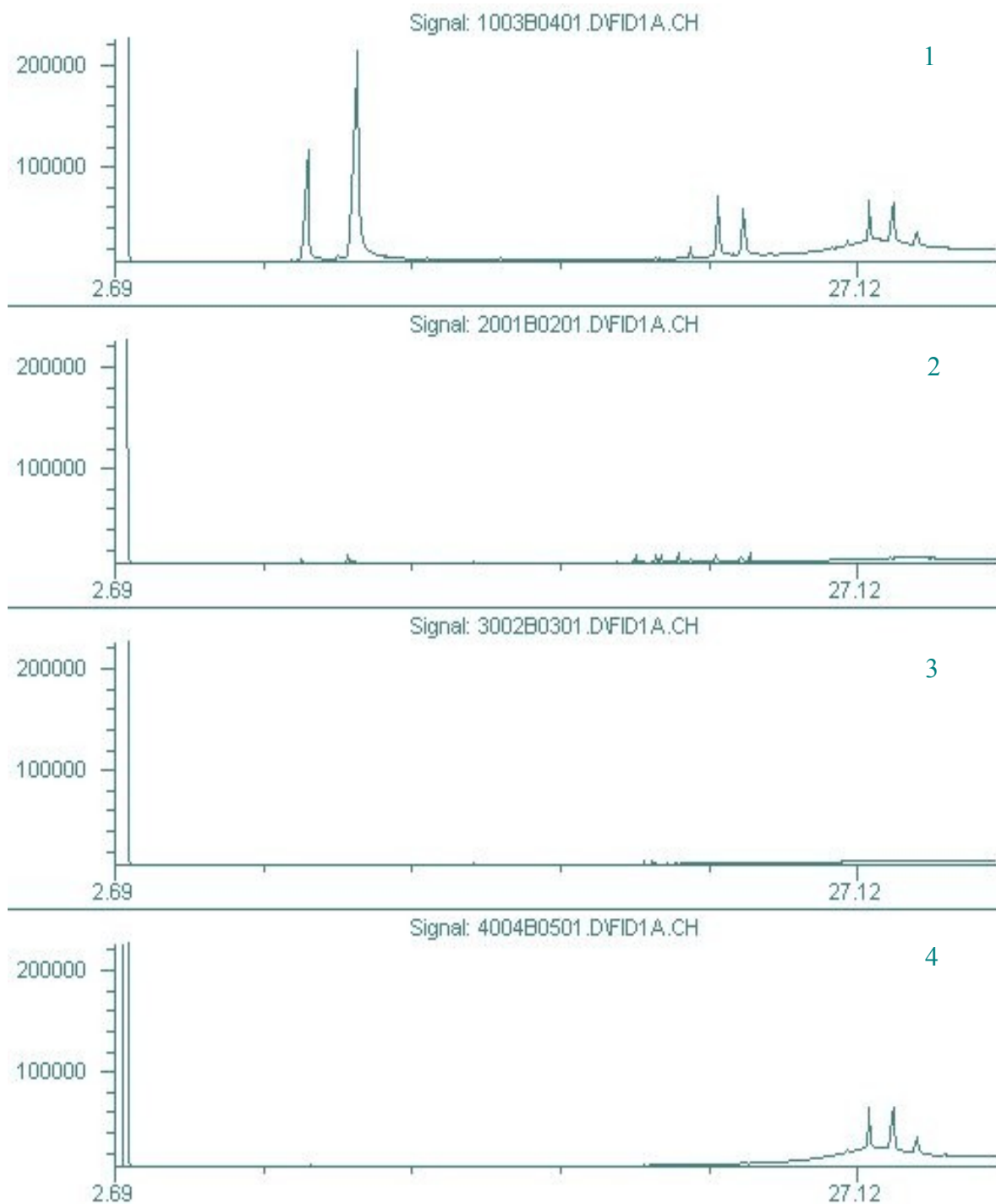


Figura 65: Cromatogramas das frações  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  [1],  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeCN}$  9/1 [2] e 8/2 (V/V) [3] e MeCN [4] do experimento 15.

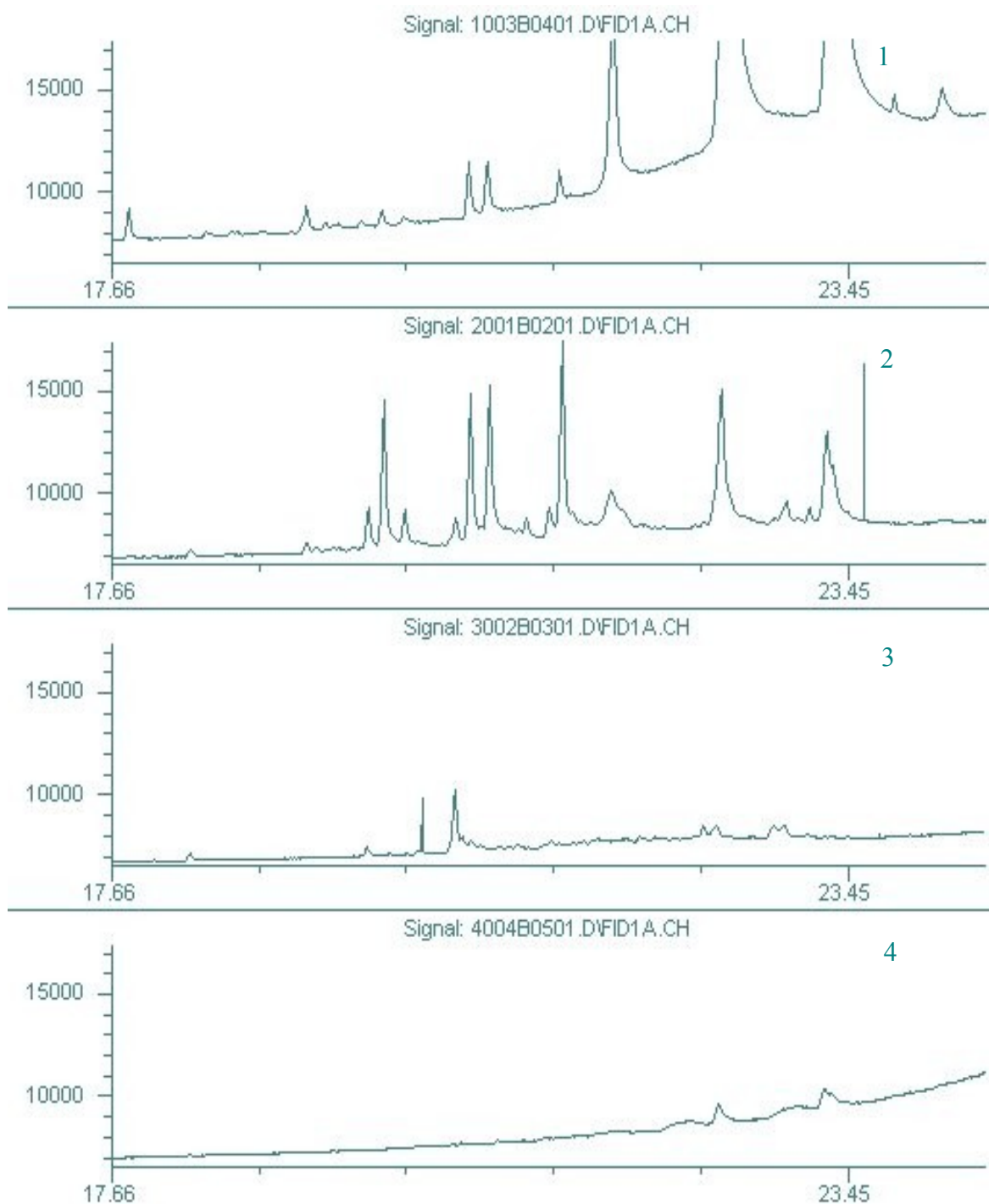


Figura 66: Cromatogramas das frações  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  [1],  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeCN}$  9/1 [2] e 8/2 (V/V) [3] e MeCN [4] do experimento 15.

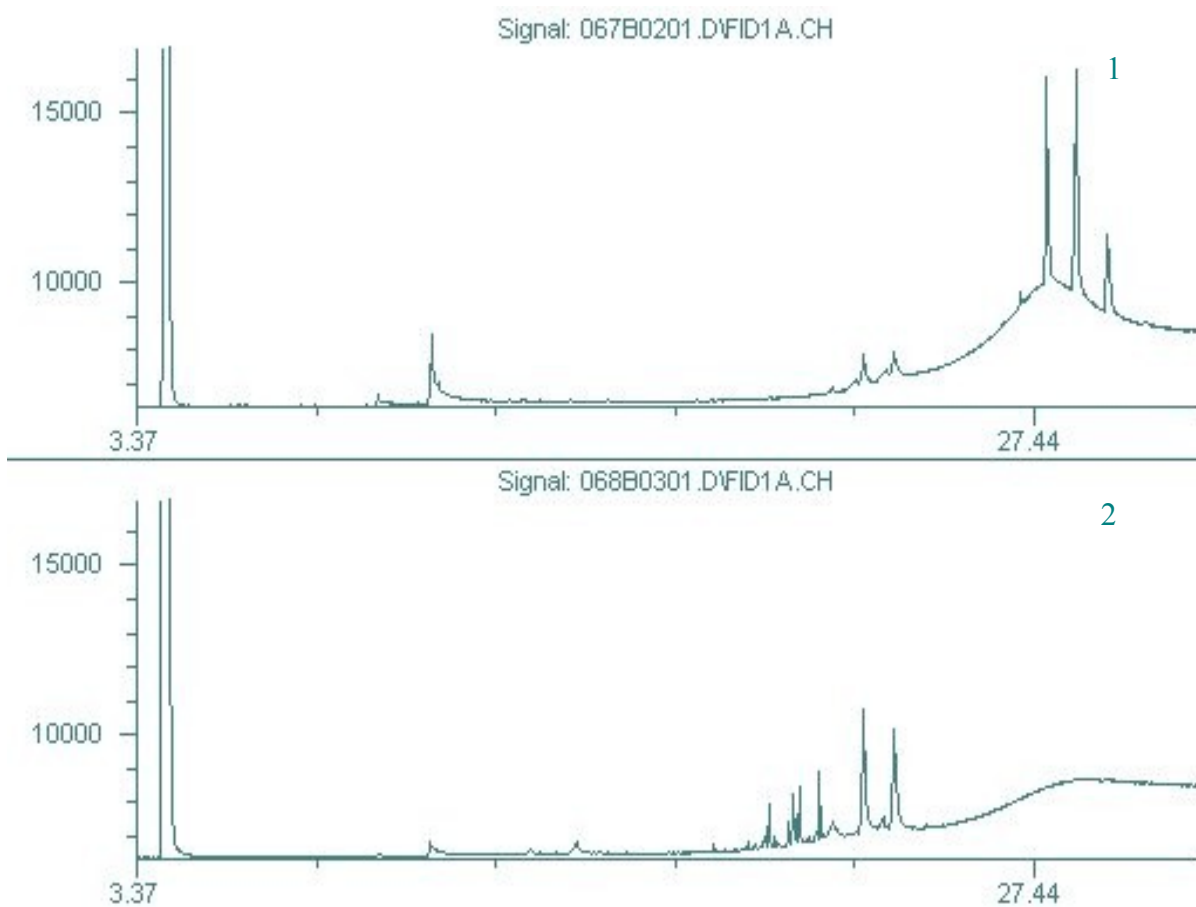


Figura 67: Cromatogramas das frações  $\text{CHCl}_3$  [1] e MeCN [2] do experimento 16.

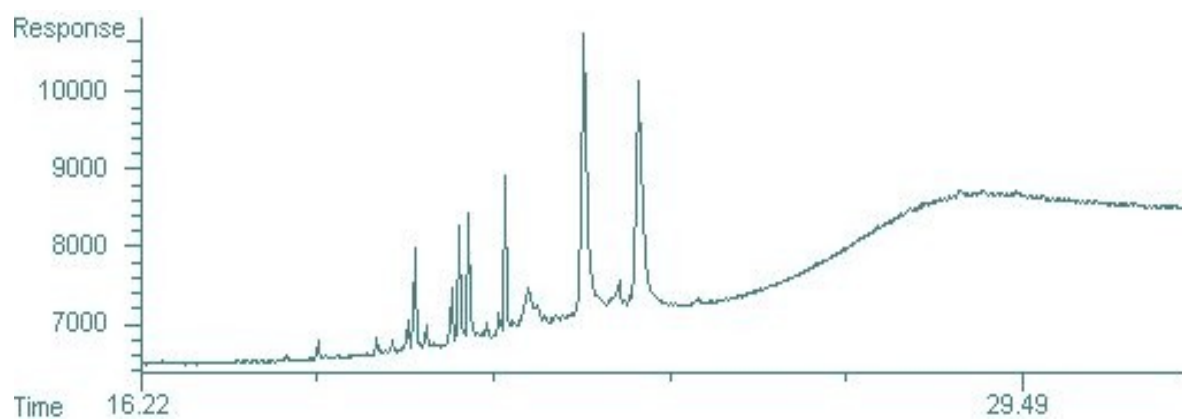


Figura 68: Detalhe do cromatograma da fração MeCN do experimento 16.

#### 4.2.2.2 Otimização por etapas da extração em fase sólida

Os resultados da otimização da extração em fase sólida estão apresentados a seguir. Os resultados dos experimentos para a otimização da etapa de eluição de componentes de baixa polaridade estão apresentados nas figuras 69, 70, 71, 72 e 73.

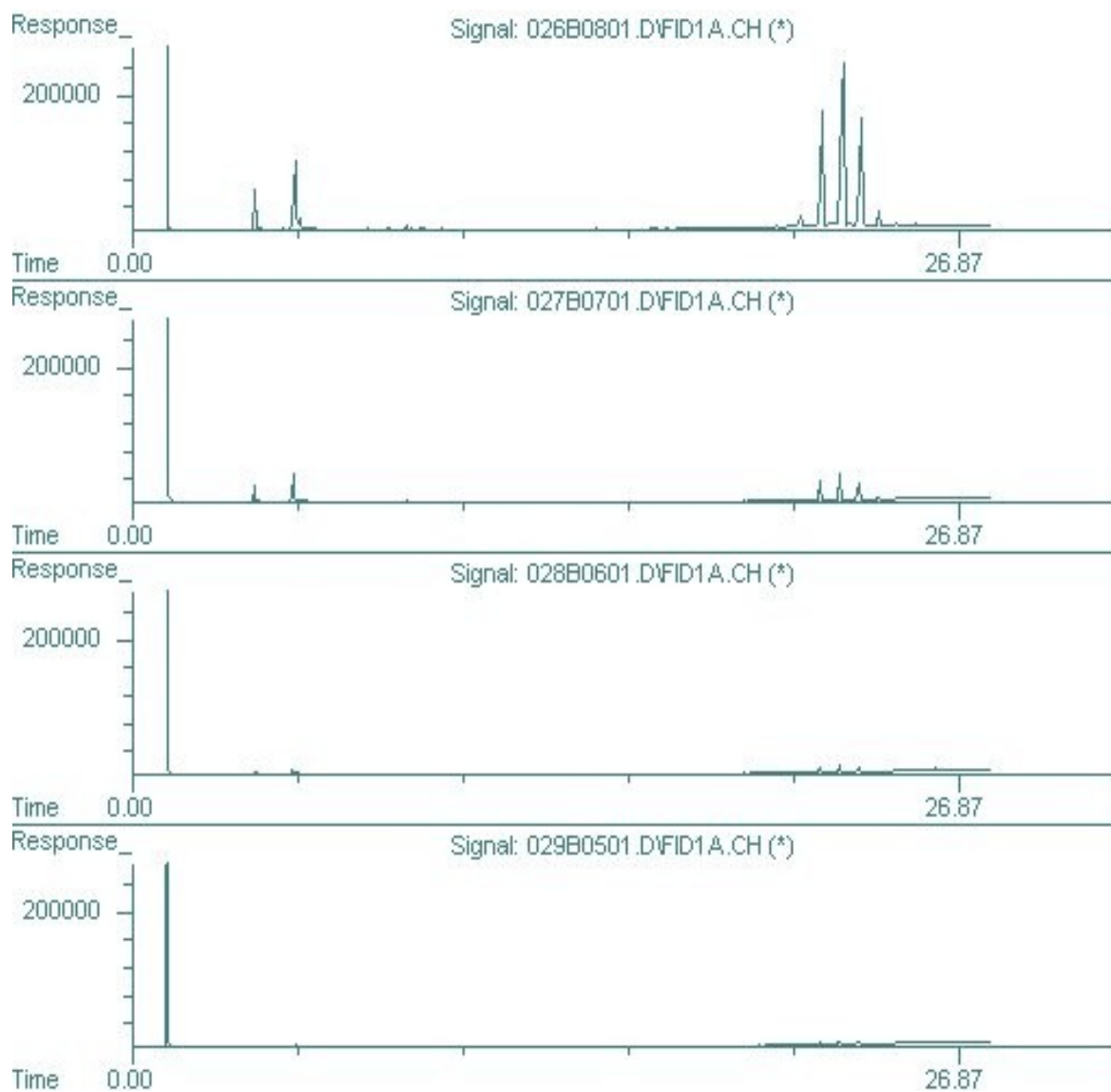


Figura 69: Cromatogramas do experimento 1 da otimização da EFS, frações  $\text{CHCl}_3$  (1, 2, 3 e 4, na ordem).

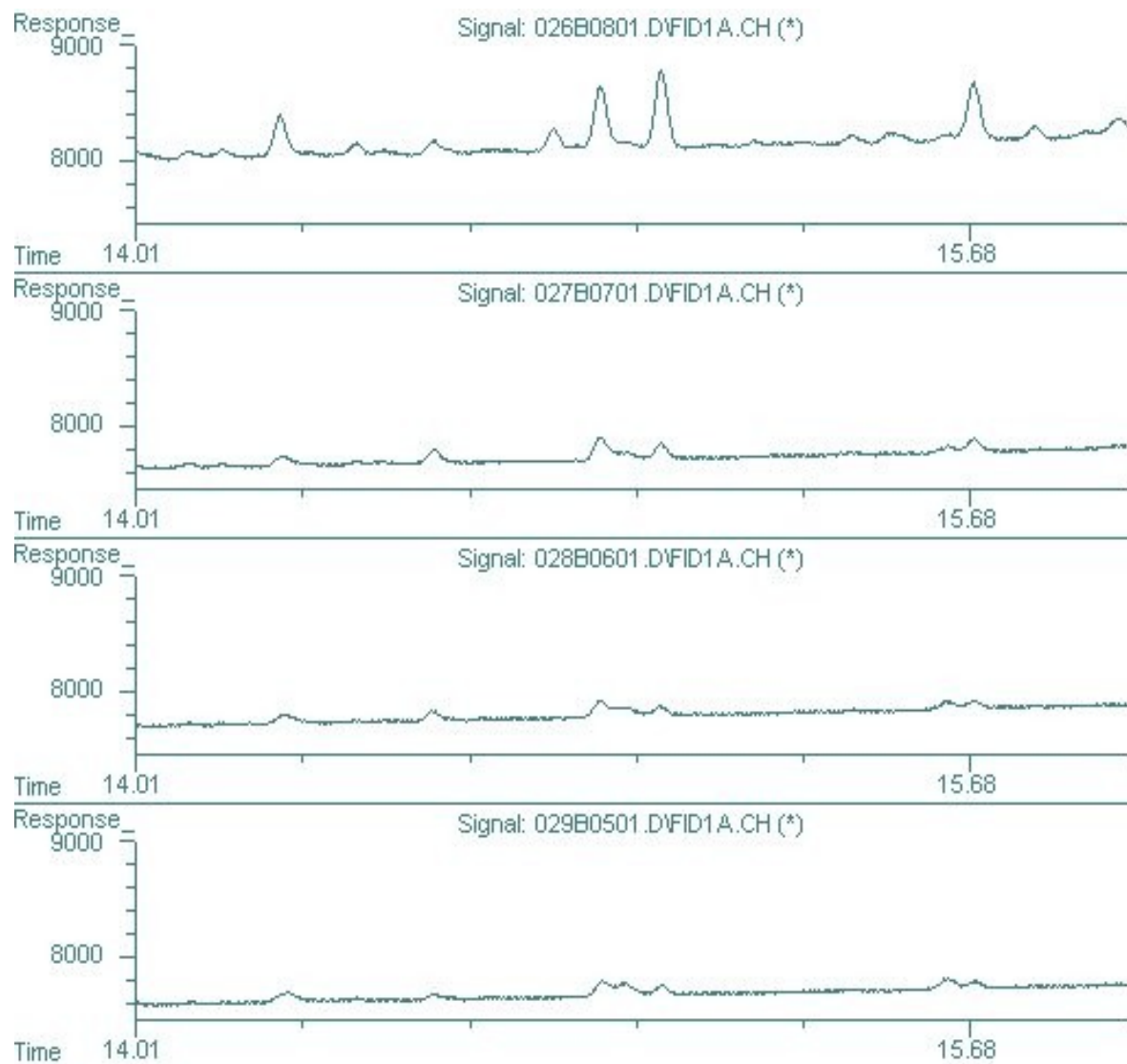


Figura 70: Cromatogramas do experimento 1 da otimização da EFS aproximados na região de TNPDS. Frações  $\text{CHCl}_3$  (1, 2, 3 e 4, na ordem).

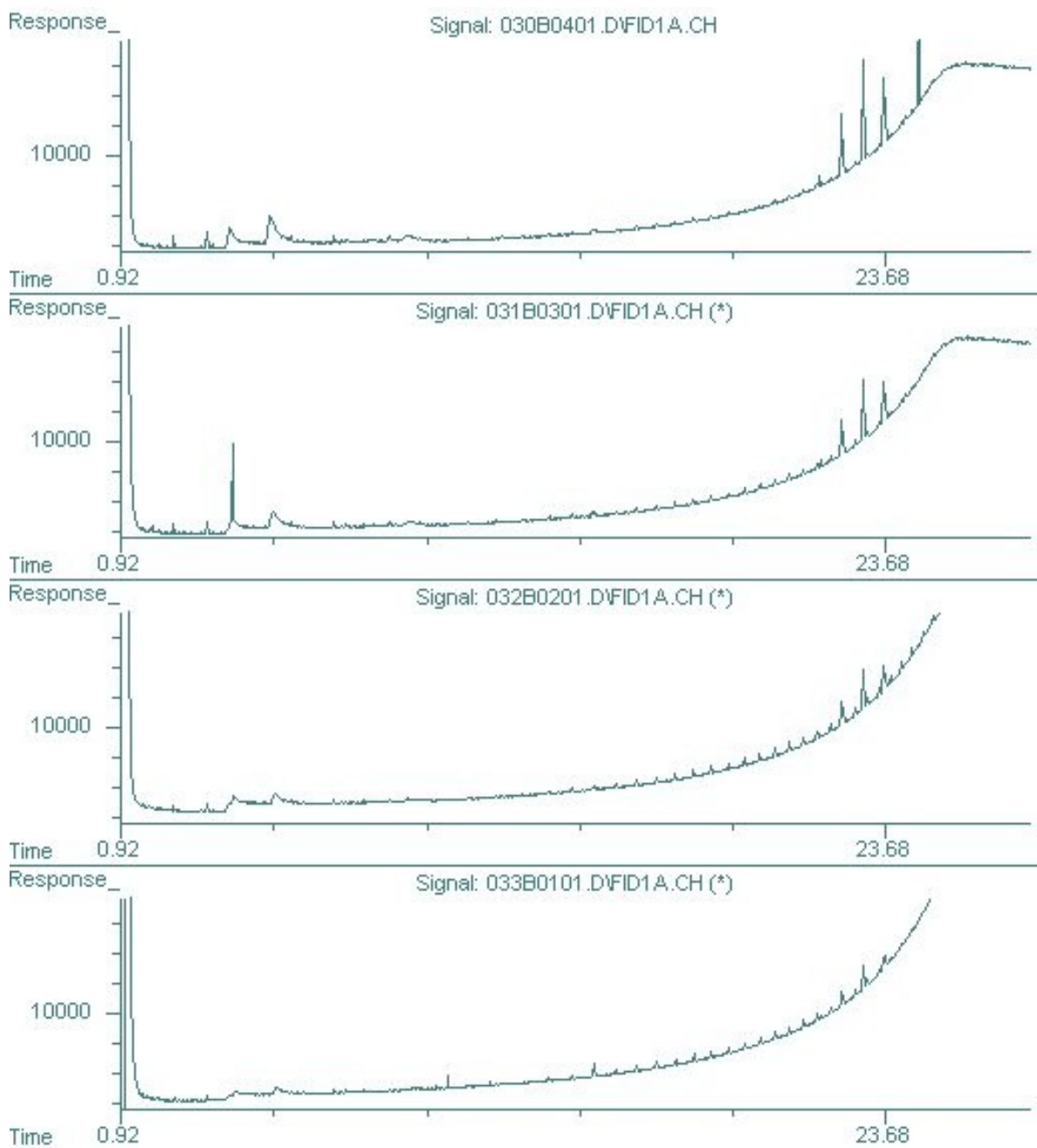


Figura 71: Cromatogramas do experimento 1 da otimização da EFS, frações  $\text{CHCl}_3$  (5, 6, 7 e 8, na ordem)

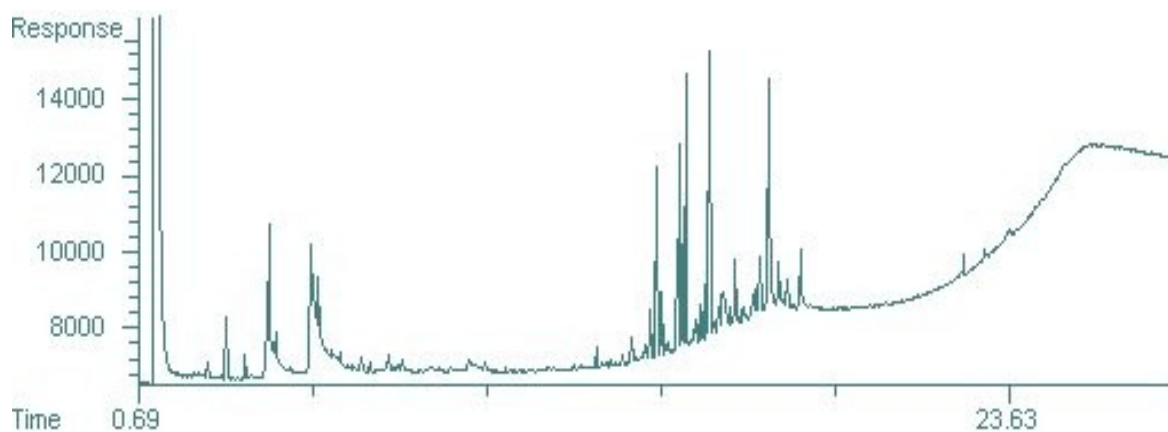


Figura 72: Cromatograma da fração MeCN do experimento 1.

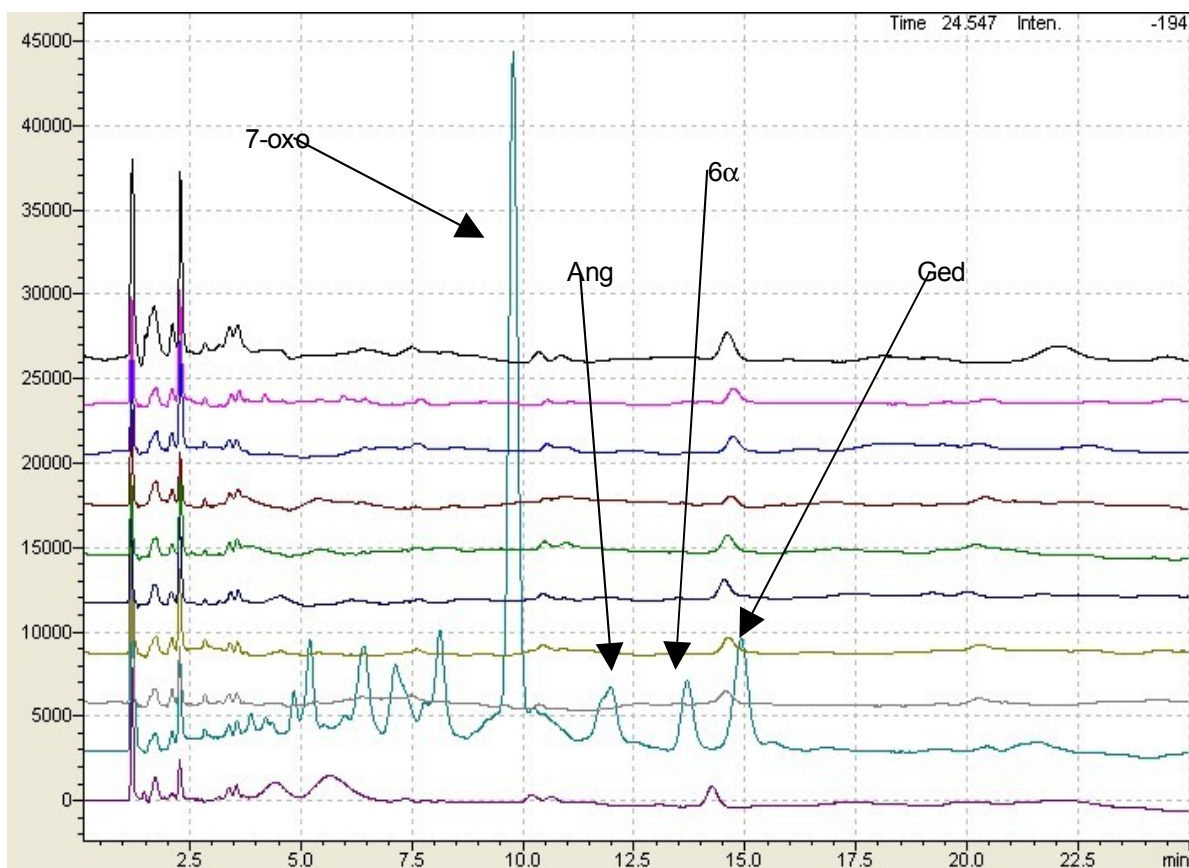


Figura 73: Superposição de cromatogramas das frações de  $\text{CHCl}_3/\text{Hexano}$  coletados no experimento 2. As frações vão do 1 ao 10, de cima para baixo. Legenda: 7-oxo: 7-desacetoxi-7-oxogedunina; Ang: angolensato de metila;  $6\alpha$ :  $6\alpha$ -acetoxi-gedunina; Ged: gedunina.

Os resultados dos experimentos para a otimização da etapa de eluição dos TNTPDs estão apresentados nas figuras 74 a 79.

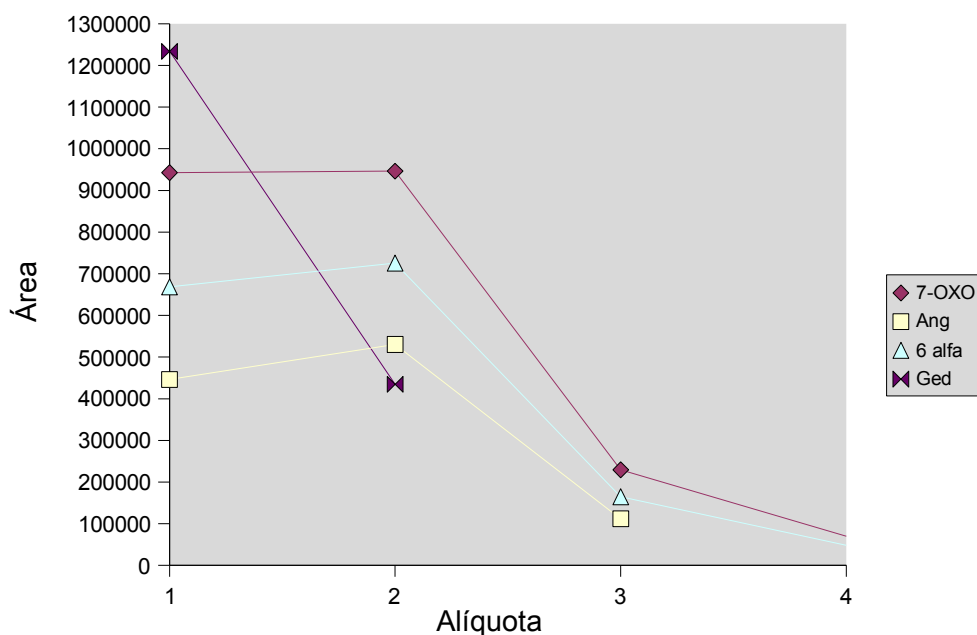


Figura 74: Gráfico de eluição de TNTPDs na fração  $\text{CHCl}_3/\text{MeCN}$  do experimento 1 de otimização

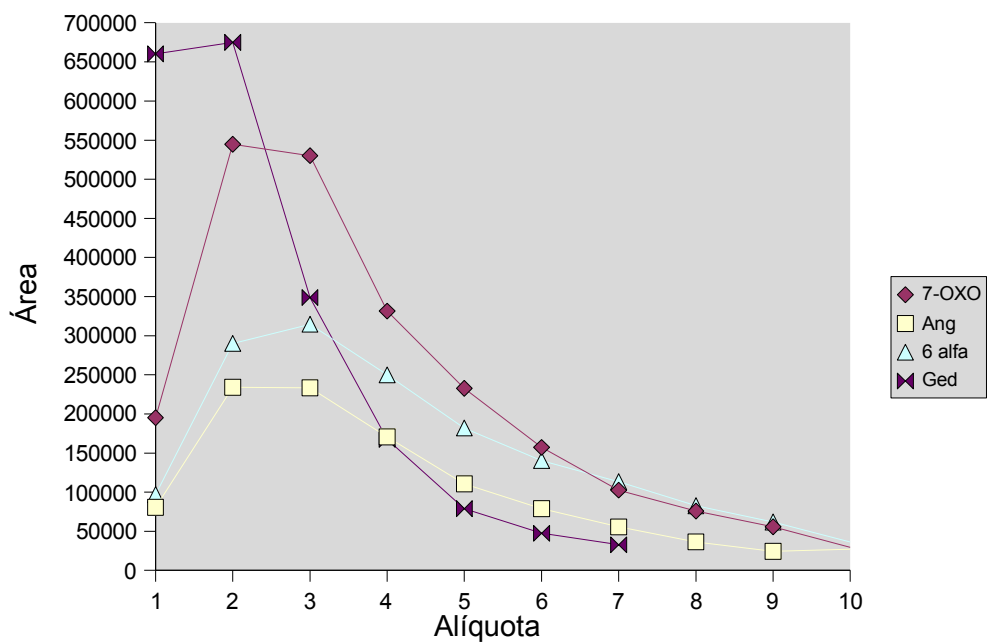


Figura 75: Gráfico de eluição de TNTPDs na fração  $\text{CHCl}_3/\text{MeCN}$  do experimento 2 de otimização.



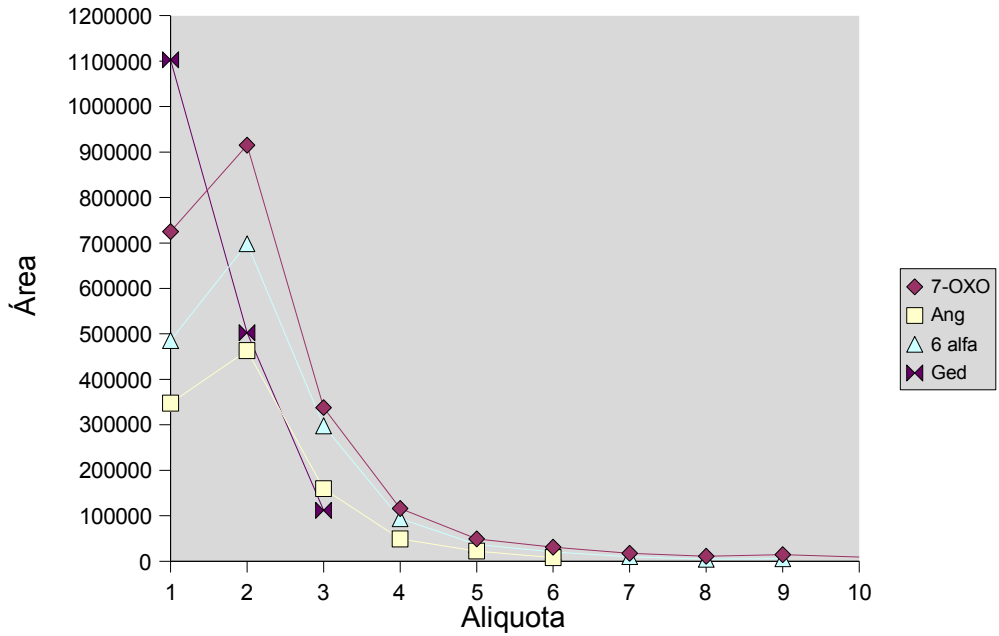


Figura 76: Gráfico de eluição de TNTPDs na fração CHCl<sub>3</sub>/acetona do experimento 3 de otimização.

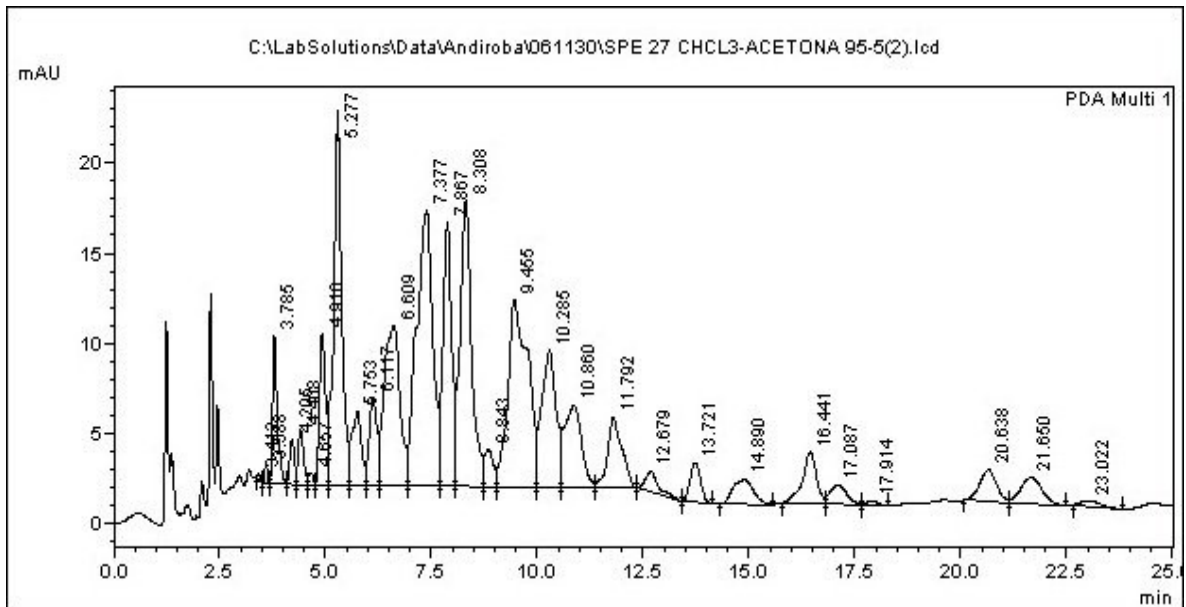


Figura 77: Cromatograma da segunda fração de CHCl<sub>3</sub>/acetona 95/5 (V/V) do experimento 4 de otimização.

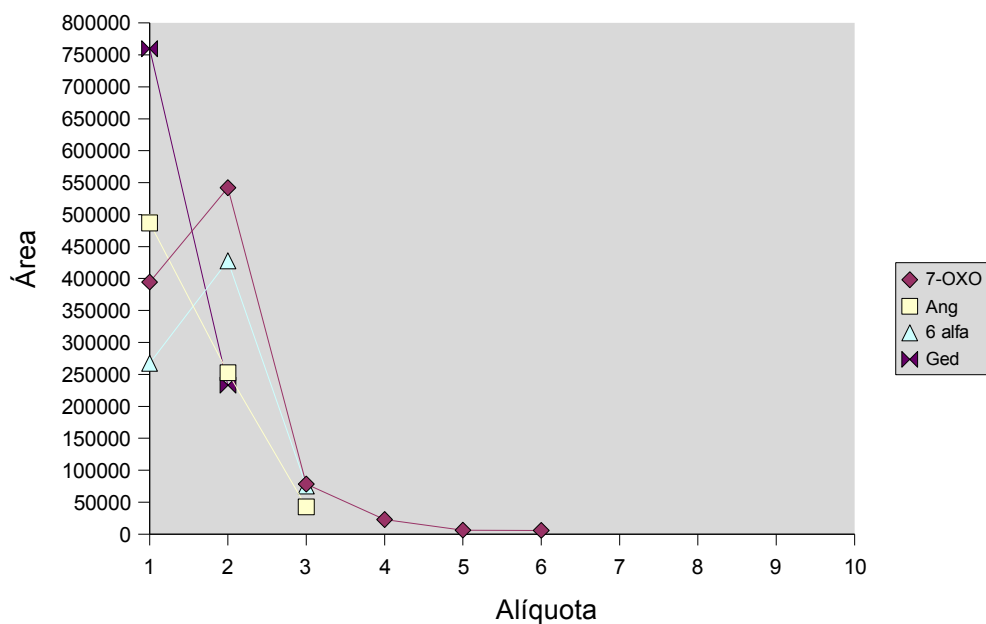


Figura 78: Gráfico de eluição de TNTPDs na fração  $\text{CHCl}_3/\text{MeCN}$  do experimento 5 de otimização.

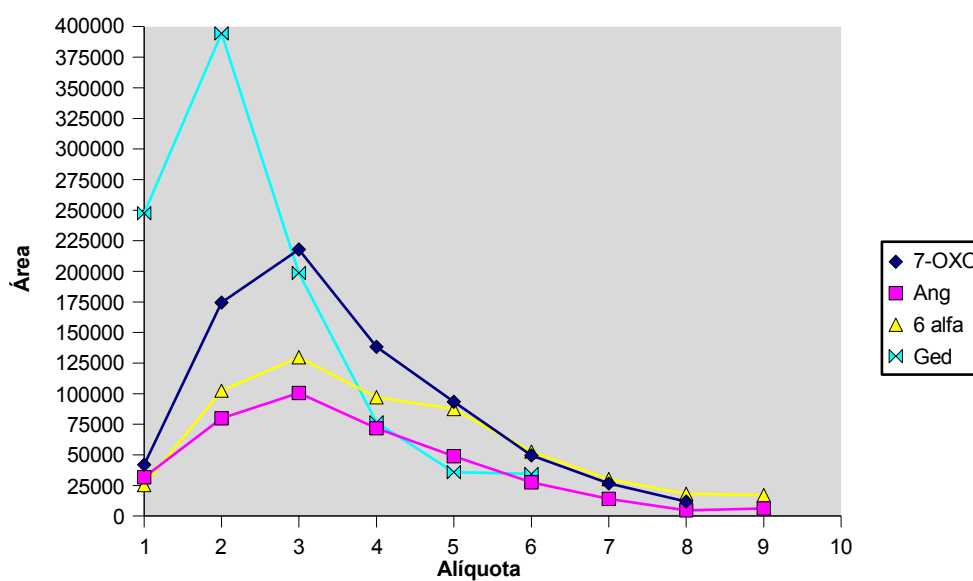


Figura 79: Gráfico de Eluição de TNTPDs na fração  $\text{CHCl}_3/\text{MeCN}$  do experimento 6 de otimização.

### 4.2.3 Recuperação

Os resultados dos ensaio de recuperação estão mostrados Tabela 30.

Tabela 30 Resultados dos estudos de recuperação

	Análise 1(%)	Análise 2(%)	Média(%)
Recuperação	90,76	90,57	90,66

## 4.3 Métodos Analíticos

### 4.3.1 Cromatografia a gás de alta resolução

Os resultados das análises para o desenvolvimento da metodologia analítica por CGAR estão apresentados abaixo, primeiramente os resultados para a coluna HP-5ms e, em seguida, os resultados para a coluna HP-5ht. A figura 80 mostra o cromatograma do óleo de “andiroba” na coluna HP-5ms no método inicial. A figura 81 e 82 mostram o cromatograma do óleo neste método.

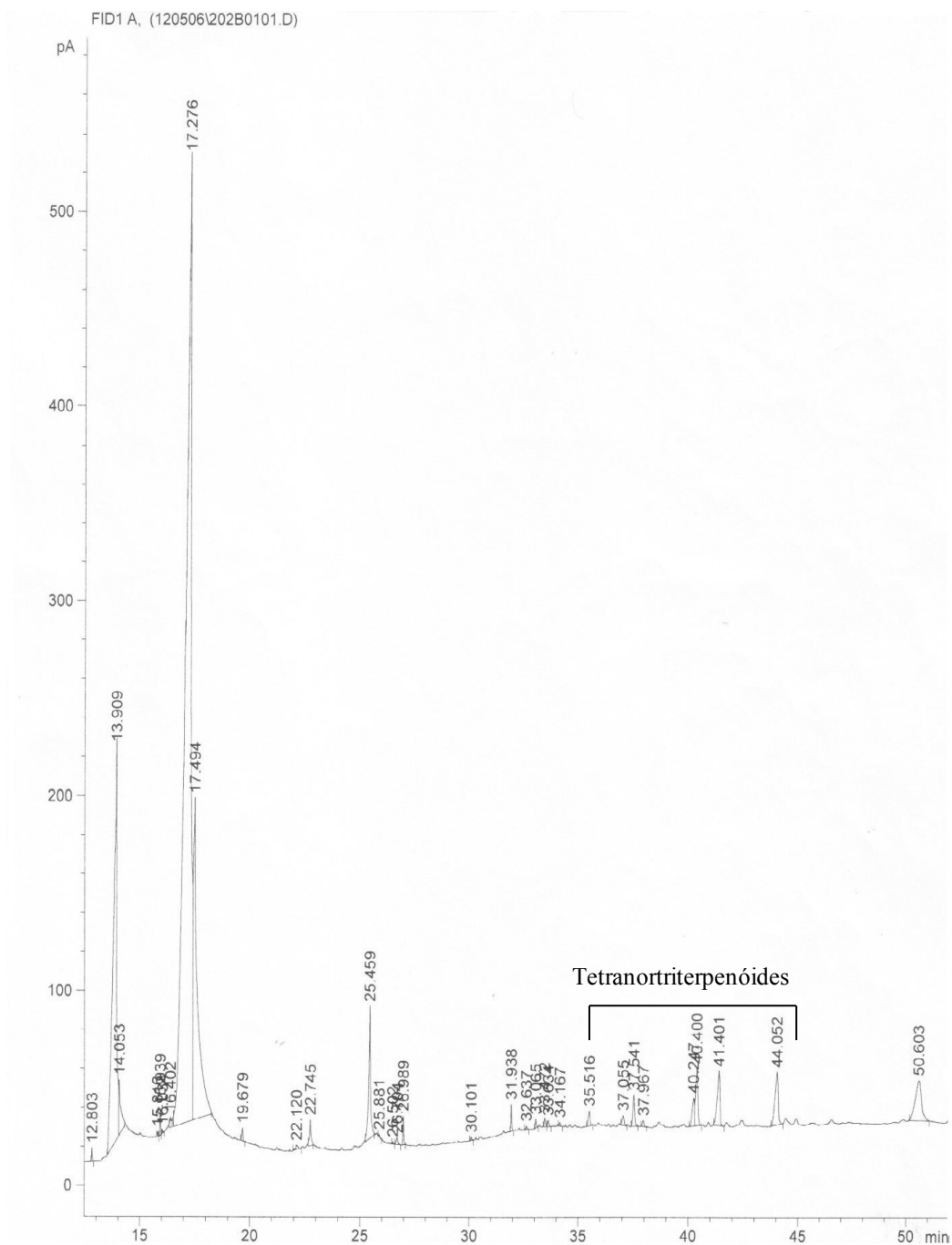


Figura 80: Cromatograma do óleo de “andiroba” no método inicial em coluna HP-5.

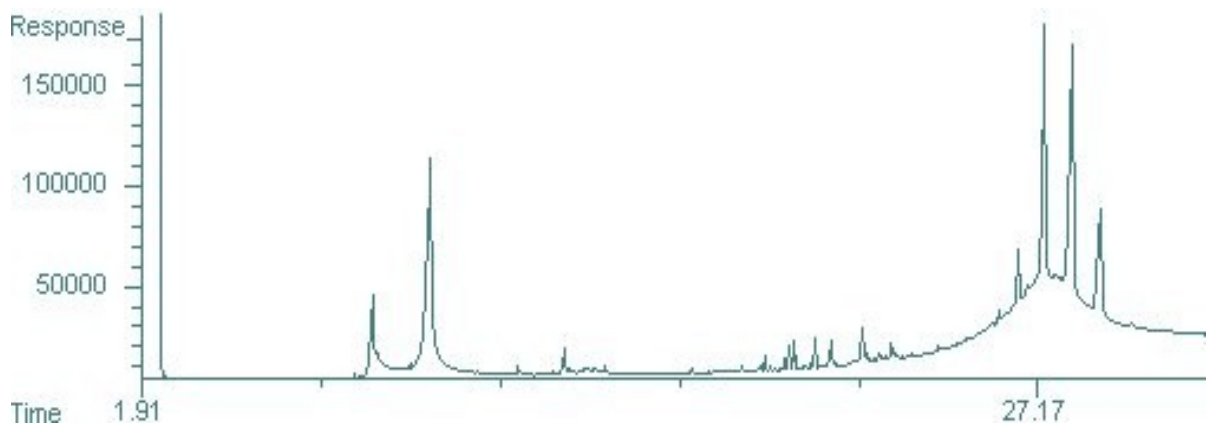


Figura 81: Cromatograma do óleo de "andiroba" no método estabelecido em coluna HP-5ht.

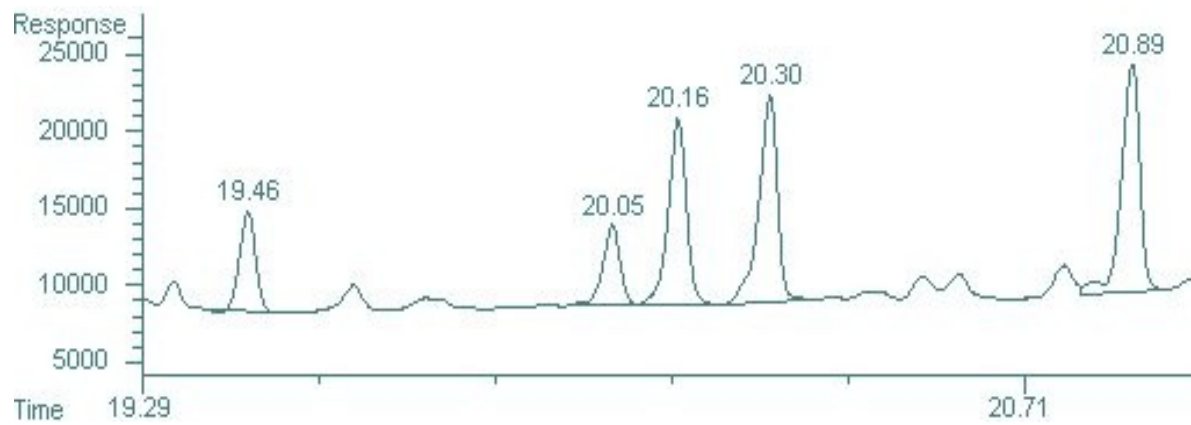


Figura 82: Detalhe do cromatograma do óleo de "andiroba" no método estabelecido em coluna HP-5ht.

O TNTPD's foram identificados por cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas. Nas figuras 83 e 84 estão apresentados os cromatogramas do óleo em CG-EM e nas figuras 85, 86, 87 e 88 estão os espectros de massas.

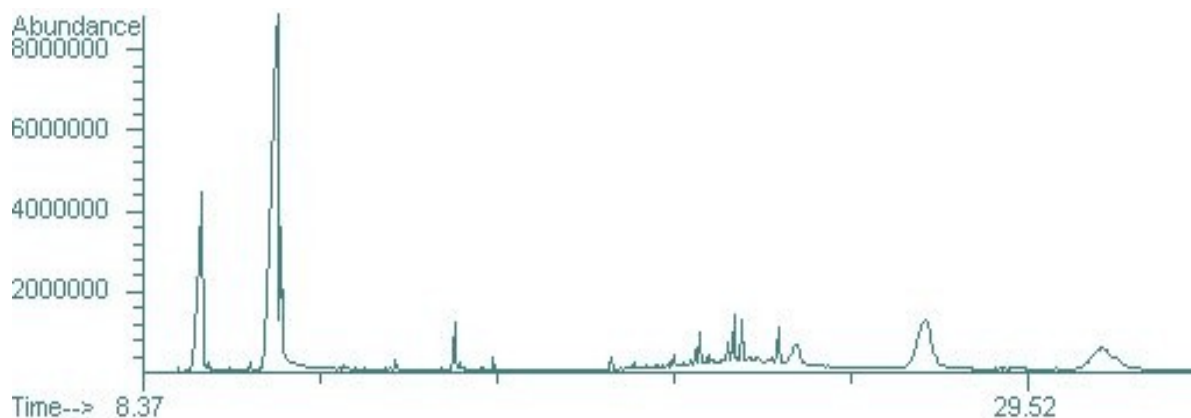


Figura 83: Cromatograma do óleo de "andiroba" no método estabelecido em CG-EM com coluna HP-5ms.

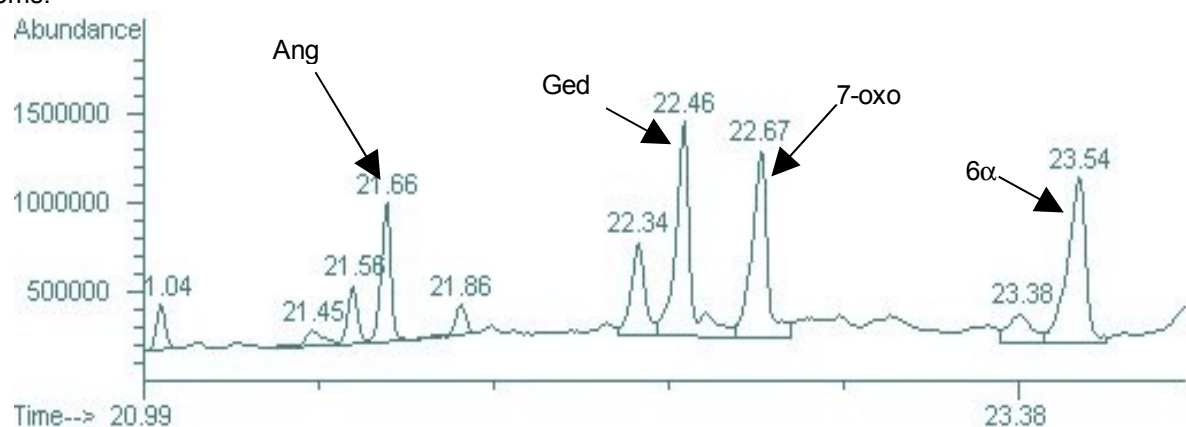


Figura 84: Detalhe do cromatograma do óleo de "andiroba" no método estabelecido em CG-EM com coluna HP-5ms. Legenda: Ang: angolensato de metila; Ged: gedunina; 7-oxo: 7-desacetoxi-7-oxogedunina; 6 $\alpha$ : 6 $\alpha$ -acetoxi-gedunina.

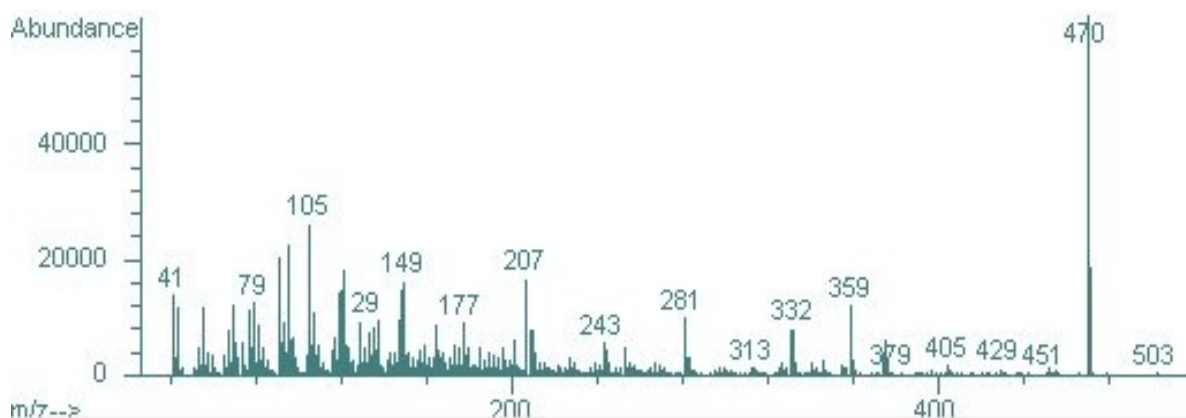


Figura 85: Espectro de massas do angolensato de metila.

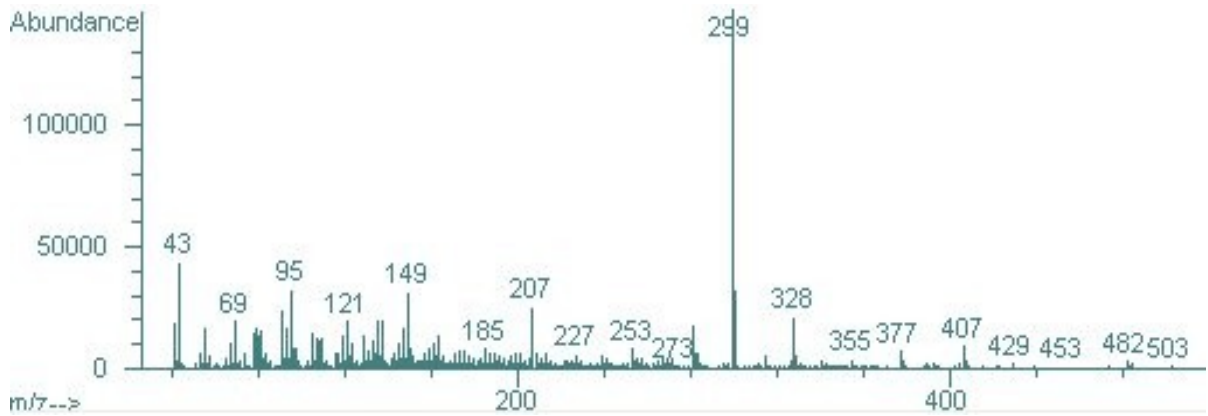


Figura 86: Espectro de massas da gedunina.

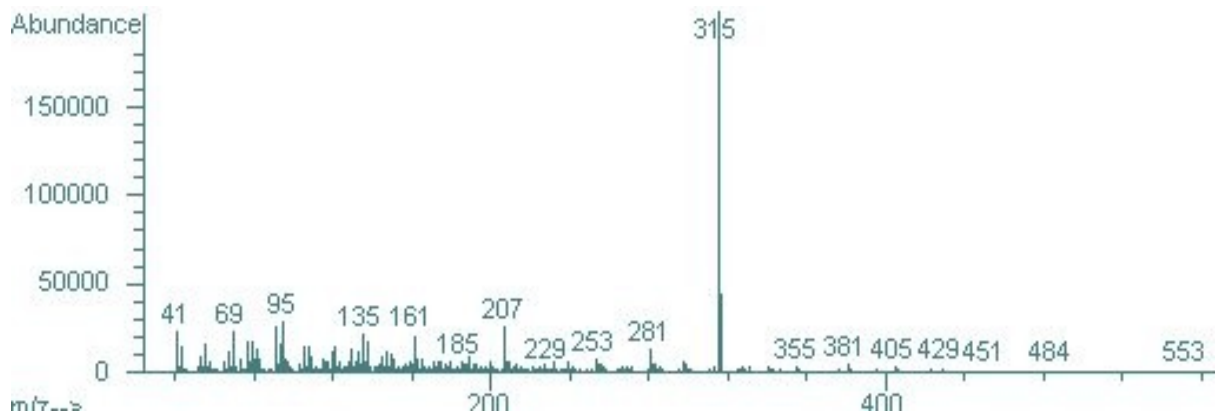


Figura 87: Espectro de massas do 7-desacetoxi-7-oxogedunina.

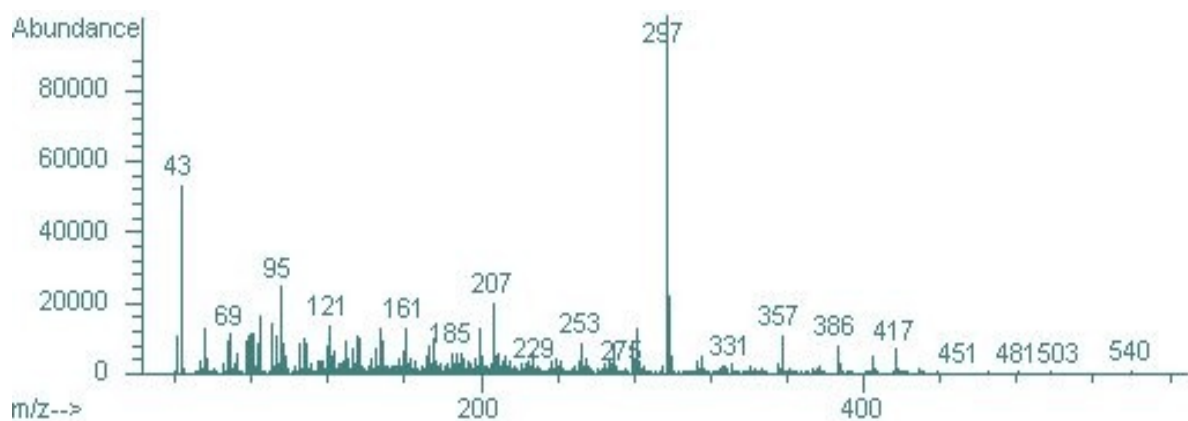


Figura 88: Espectro de massas do 6 $\alpha$ -acetoxi-gedunina

### 4.3.2 Cromatografia líquida de alta eficiência

Os resultados do desenvolvimento de CLAE com fase móvel bifásica são apresentados nas figuras abaixo. Primeiro na figura 89 é apresentado o cromatograma do precipitado de TNTPDs no método original. Na figura 90 é mostrado o cromatograma de uma amostra de óleo de “andiroba” analisada no método preliminar e, nas figuras 91, 92, 93 e 94, são apresentados os cromatogramas nos TNTPDs obtidos pelo mesmo método.

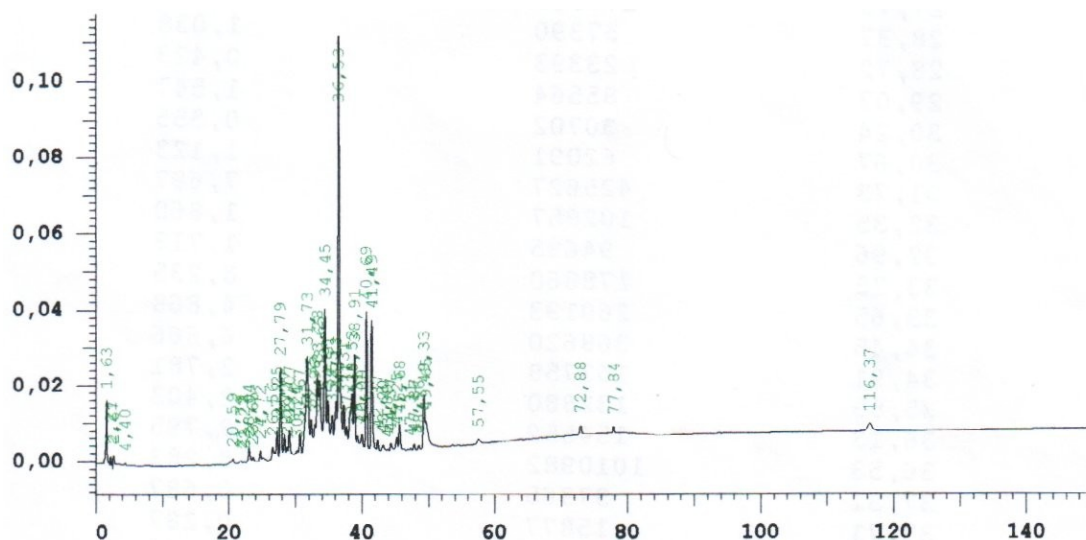


Figura 89: Cromatograma do precipitado de TNTPDs analisado no método original.

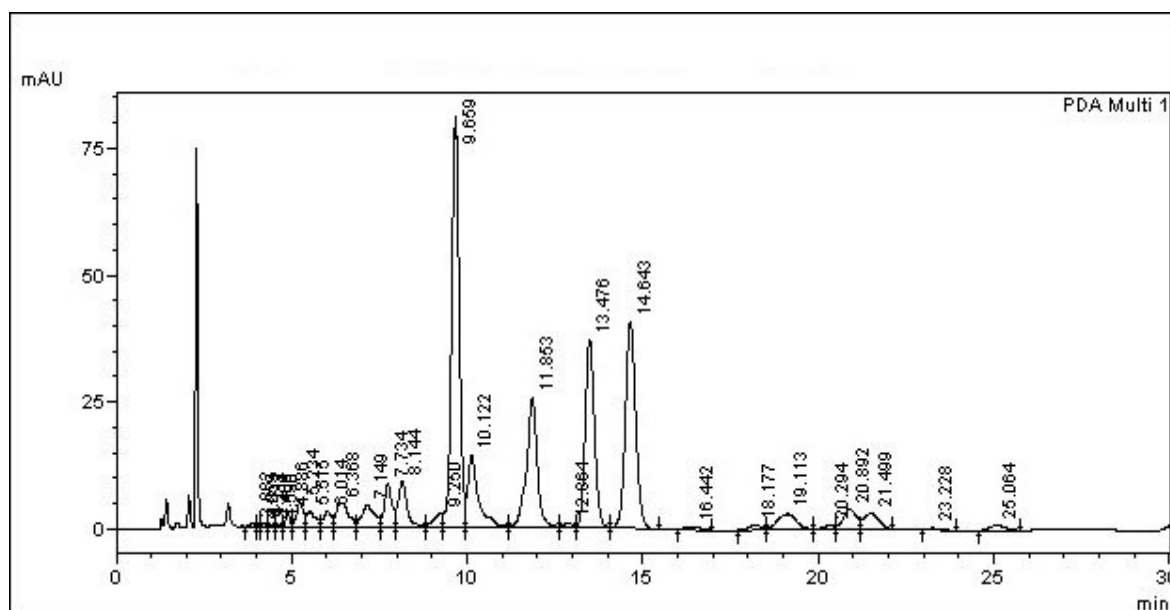


Figura 90: Cromatograma de uma amostra de óleo de “andiroba” analisada pelo método preliminar.

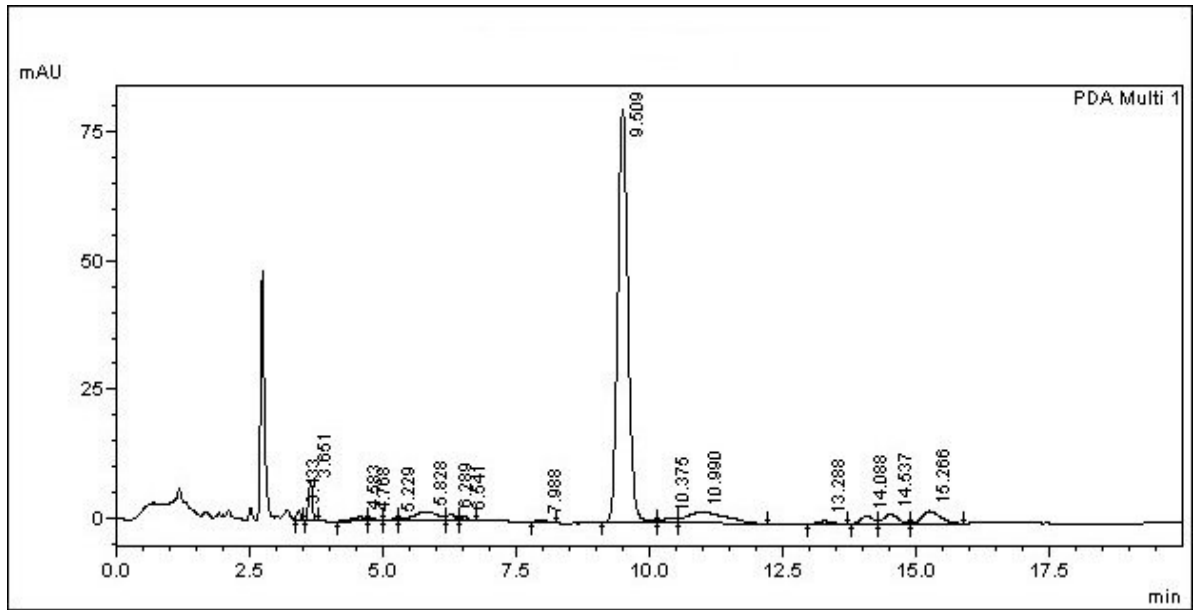


Figura 91: Cromatograma de 7-oxo analisado no método preliminar.

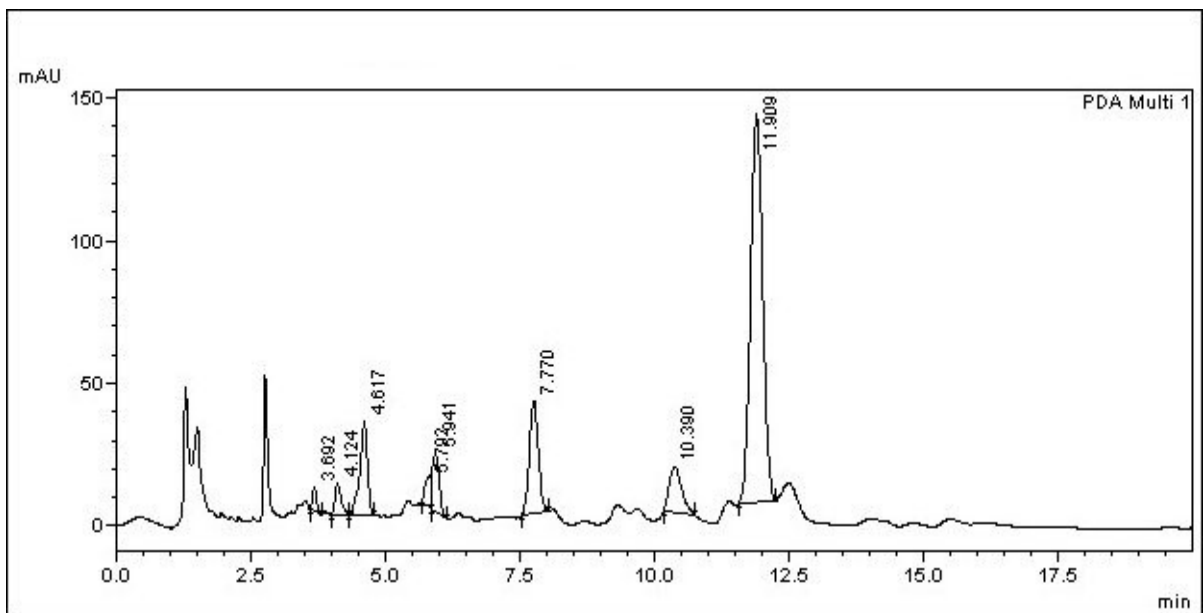


Figura 92: Cromatograma de angolensato de metila analisado no método preliminar.



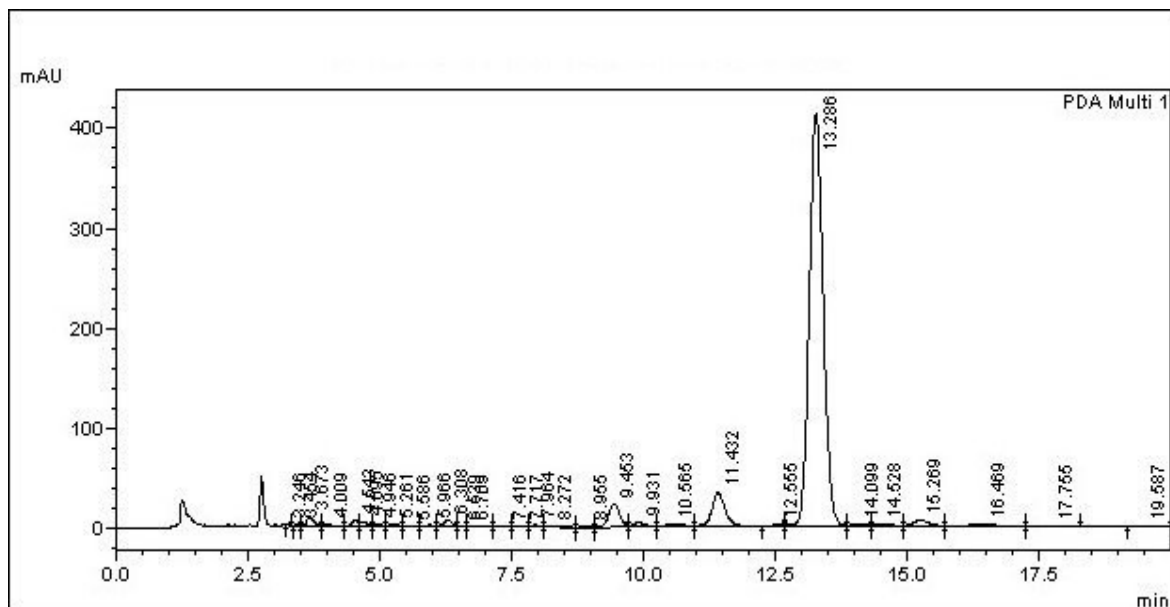


Figura 93: Cromatograma de 6 $\alpha$ -acetoxi-gedunina analisado no método preliminar.

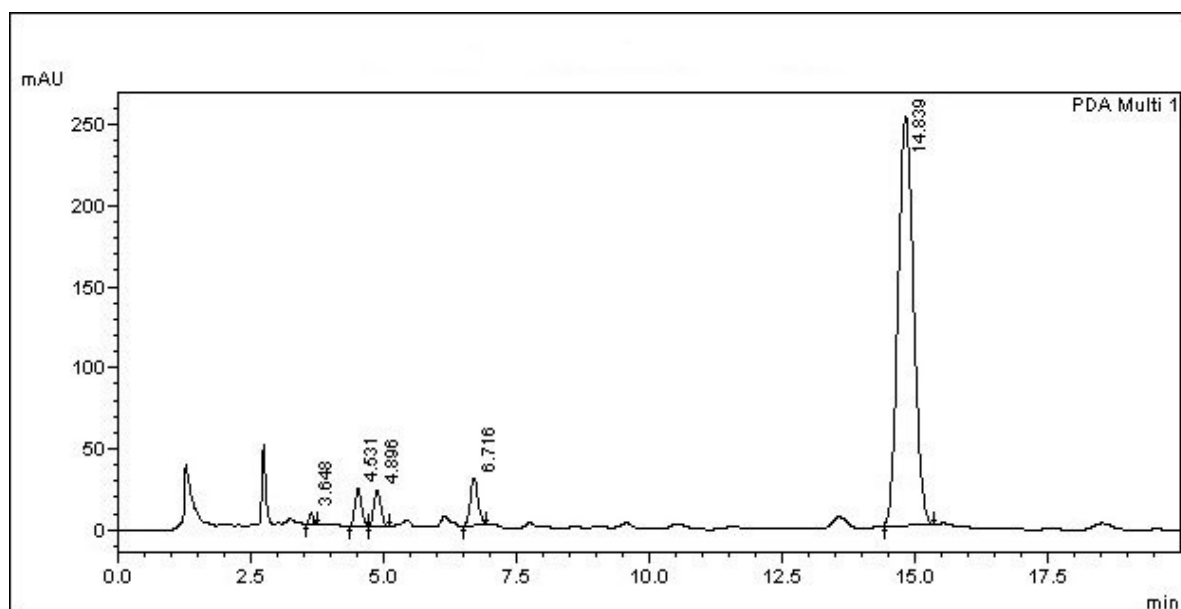


Figura 94: Cromatograma de gedunina analisado no método preliminar.

Como resultado do primeiro desenho experimental está apresentado na figura 95 o cromatograma do segundo experimento do desenho.

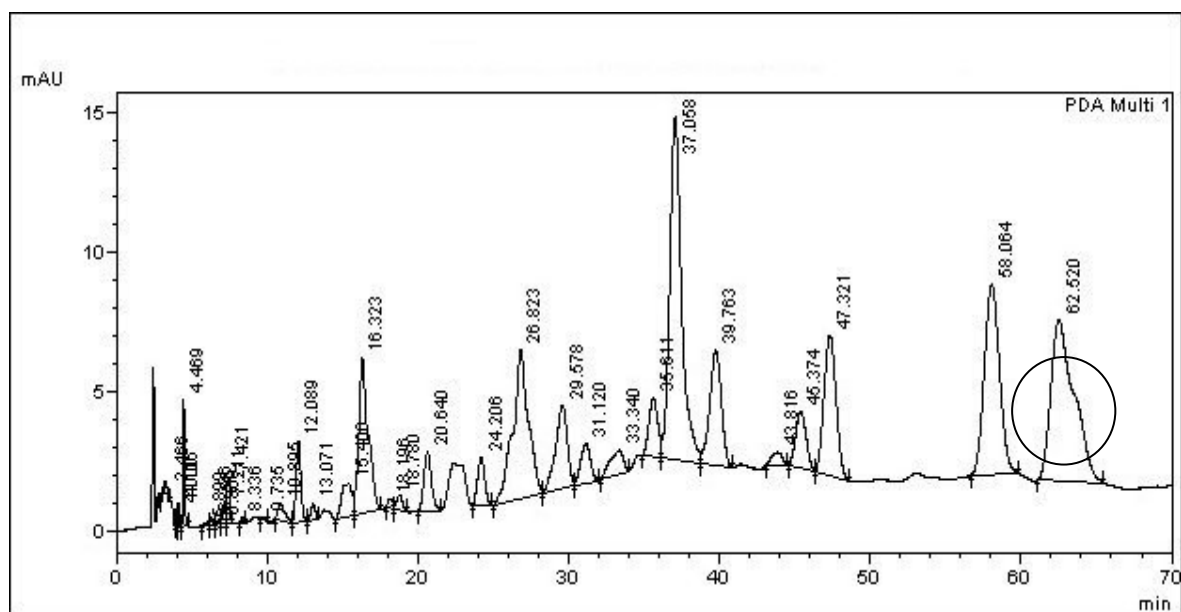


Figura 95: Cromatograma do segundo experimento do primeiro desenho experimental.

Os resultados apresentados para fase móvel trifásica são apresentados a seguir. Na figura 96 está apresentado um cromatograma de uma amostra de óleo de “andiroba” com a fase móvel MeCN/MeOH/H<sub>2</sub>O 35:30:35 (V/V/V).

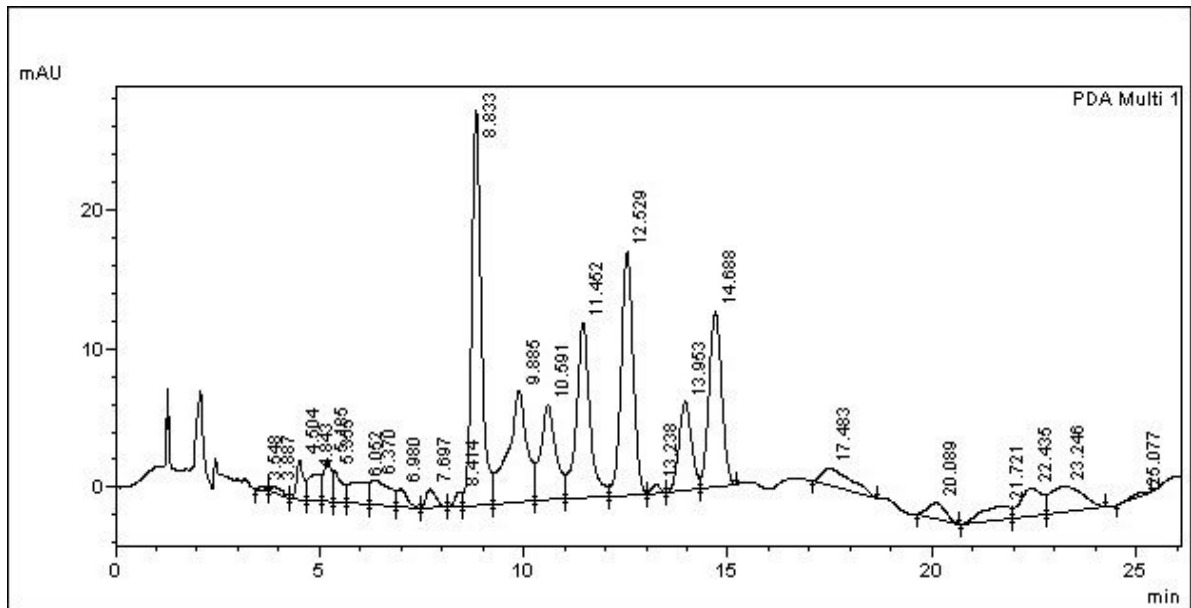


Figura 96: Cromatograma de uma amostra de óleo de andiroba a com fase móvel de MeCN/MeOH/H<sub>2</sub>O.

Os resultados referentes ao segundo desenho experimental estão presentes a seguir. A figura 97 mostra a tabela de efeitos principais do desenho. A figura 98 mostra a tabela de ANOVA do desenho. A figura 99 mostra o gráfico de *desirability* do desenho. As figuras 100 e 101 mostram os gráficos de superfície de resposta em 3D e 2D respectivamente. Finalmente, a tabela 31 mostra a metodologia otimizada resultante do desenho e a figura 102 mostra o cromatograma com esta condição.

Effect Estimates; Var.:RESANG; R-sqr=,99574; Adj: ,98935									
EXPERIM. DESIGN		3 factors, 1 Blocks, 16 Runs; MS Residual=,0101266							
DV: RESANG		Effect	Std.Err.	t(6)	p	-95.% Cnf.Limt	+95.% Cnf.Limt	Coeff.	Std.Err. Coeff.
Mean/Interc.		1,567877	,058387	26,85301	,000000	1,425008	1,710745	1,567877	,058387
(1)%ACN	(L)	2,071078	,059831	34,61531	,000000	1,924676	2,217479	1,035539	,029916
%ACN	(Q)	-,455855	,085874	-5,30841	,001815	-,665981	-,245729	-,227928	,042937
(2)FLUXO	(L)	-,408683	,059933	-6,81897	,000488	-,555335	-,262032	-,204342	,029967
FLUXO	(Q)	-,057815	,086444	-,66881	,528495	-,269336	,153707	-,028907	,043222
(3)VOLINJ	(L)	-,540844	,059661	-9,06529	,000101	-,686829	-,394858	-,270422	,029830
VOLINJ	(Q)	-,220376	,084915	-2,59526	,040922	-,428154	-,012597	-,110188	,042457
1L by 2L		-,219000	,071157	-3,07771	,021727	-,393114	-,044886	-,109500	,035578
1L by 3L		-,324500	,071157	-4,56035	,003849	-,498614	-,150386	-,162250	,035578
2L by 3L		,224500	,071157	3,15500	,019689	,050386	,398614	,112250	,035578

Figura 97: Tabela de efeitos principais do desenho experimental.

ANOVA; Var.:RESANG; R-sqr=,99542; Adj:,99019 (de3.sta)					
EXPERIM. DESIGN	3 factors, 1 Blocks, 16 Runs; MS Pure Error=,0001125 DV: RESANG				
Factor	SS	df	MS	F	p
(1)%ACN (L)	12,13382	1	12,13382	107856,2	,001938
%ACN (Q)	,28569	1	,28569	2539,5	,012631
(2)FLUXO (L)	,47087	1	,47087	4185,5	,009839
(3)VOLINJ (L)	,83220	1	,83220	7397,3	,007402
VOLINJ (Q)	,06808	1	,06808	605,1	,025865
1L by 2L	,09592	1	,09592	852,6	,021794
1L by 3L	,21060	1	,21060	1872,0	,014711
2L by 3L	,10080	1	,10080	896,0	,021260
Lack of Fit	,06518	6	,01086	96,6	,077742
Pure Error	,00011	1	,00011		
Total SS	14,26274	15			

Figura 98: Tabela de ANOVA do desenho experimental.

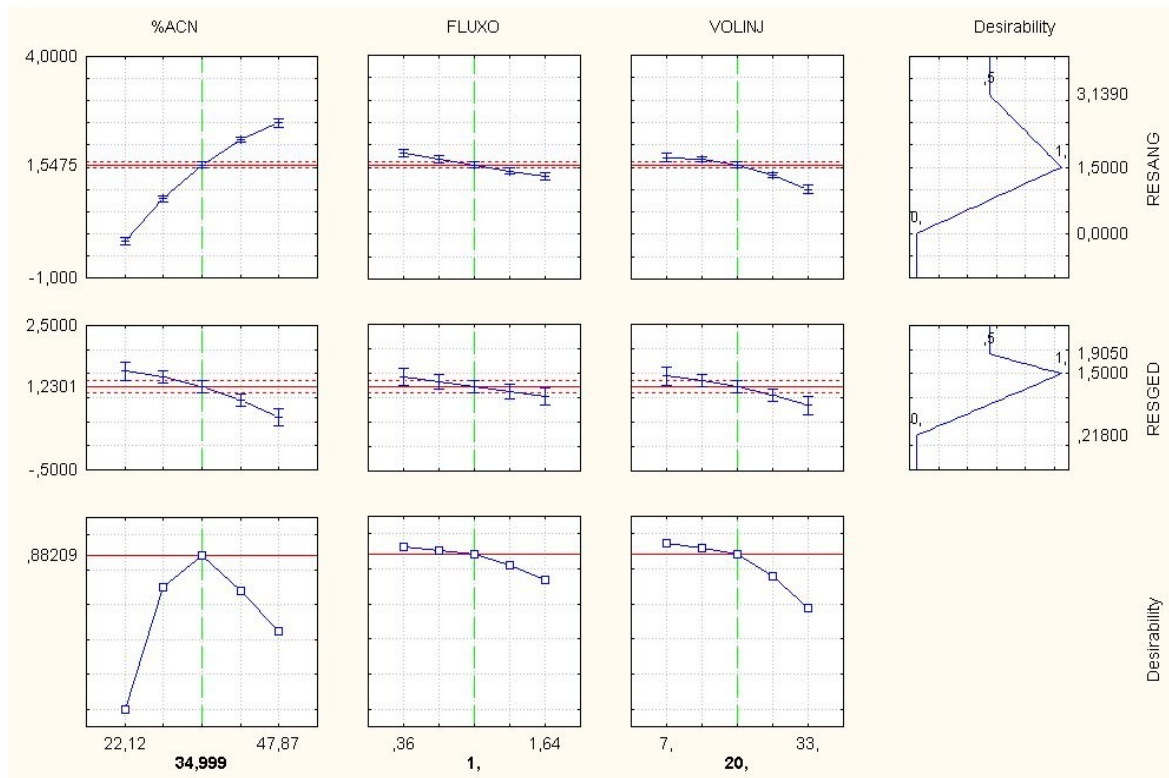


Figura 99: Gráfico de *desirability* do desenho experimental.

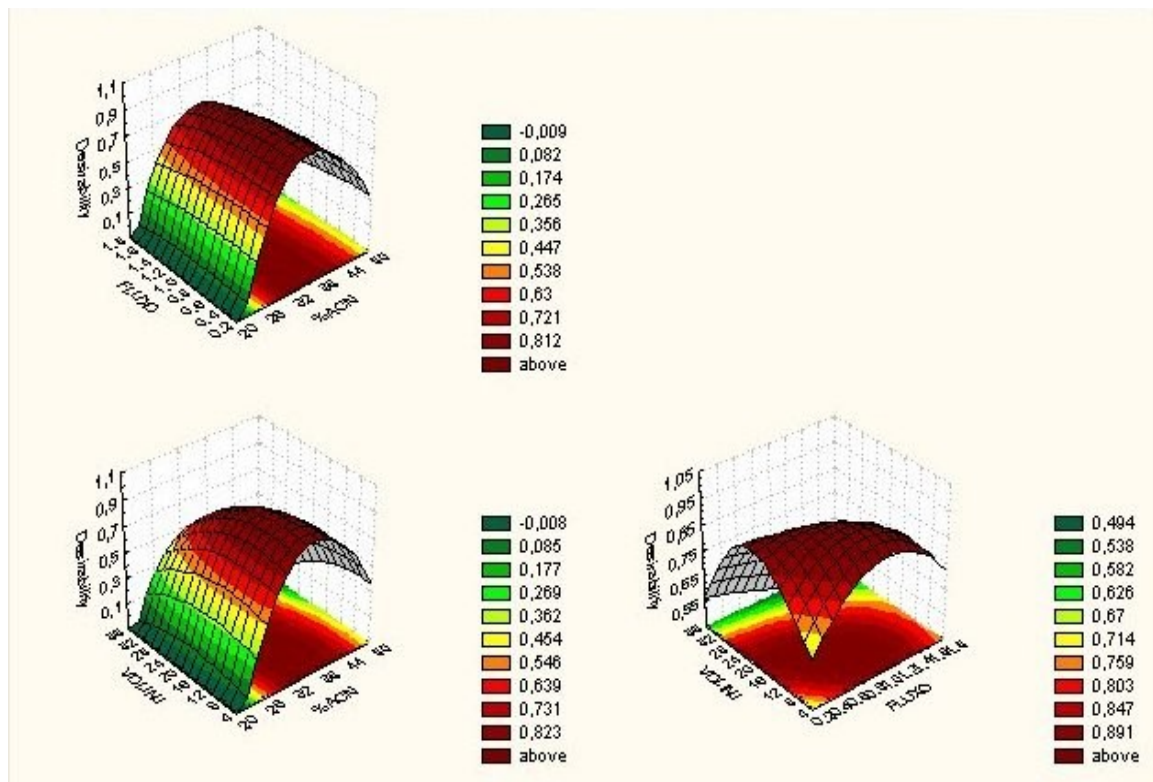


Figura 100: Gráfico de superfície de resposta do desenho experimental em 3D.

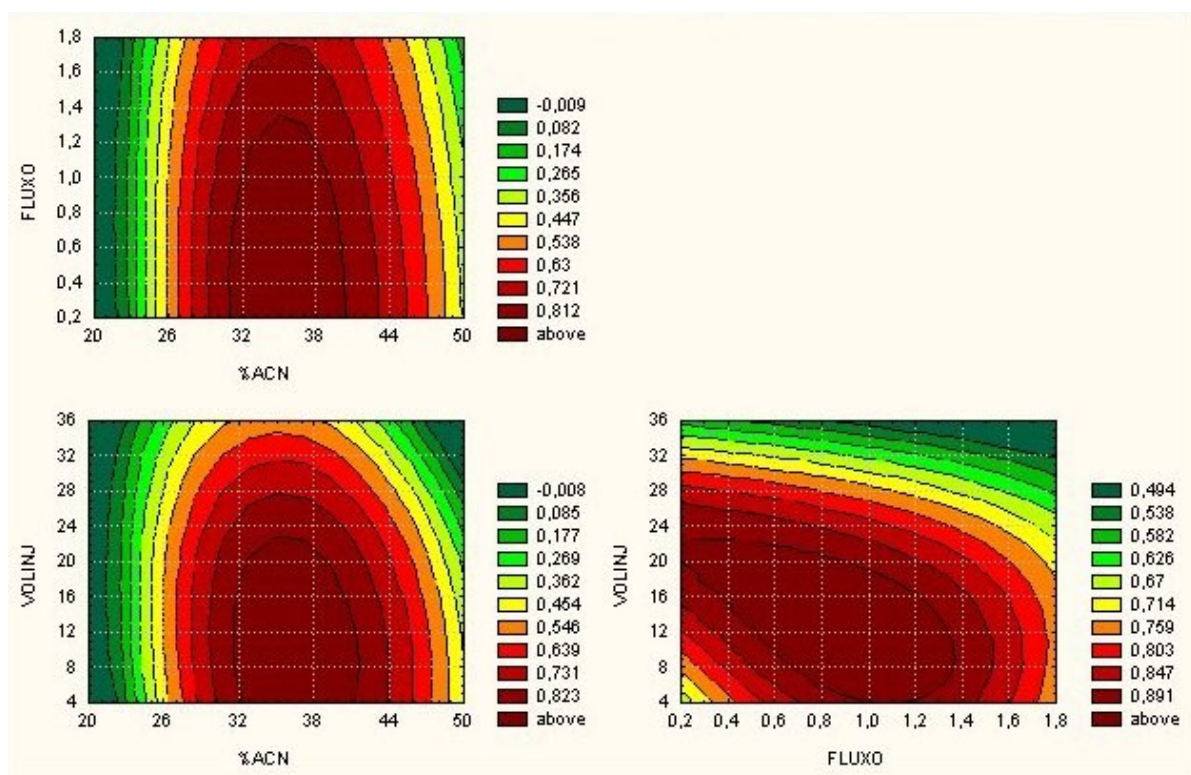


Figura 101: Gráfico de superfície de resposta do desenho experimental em 2D.

Tabela 31: Método otimizado de CLAE.

Método de análise
➤ Coluna: C18 (250 x 4,5mm, 5µm de tamanho de partícula).
➤ Fase móvel: MeCN/H <sub>2</sub> O/MeOH (35:35:30, V/V/V).
➤ Fluxo: 0,9ml/min.
➤ Detector: UV (PDA) em varredura de 190-400nm.
➤ Comprimento de onda: 210nm.
➤ Volume injetado: 20µl.

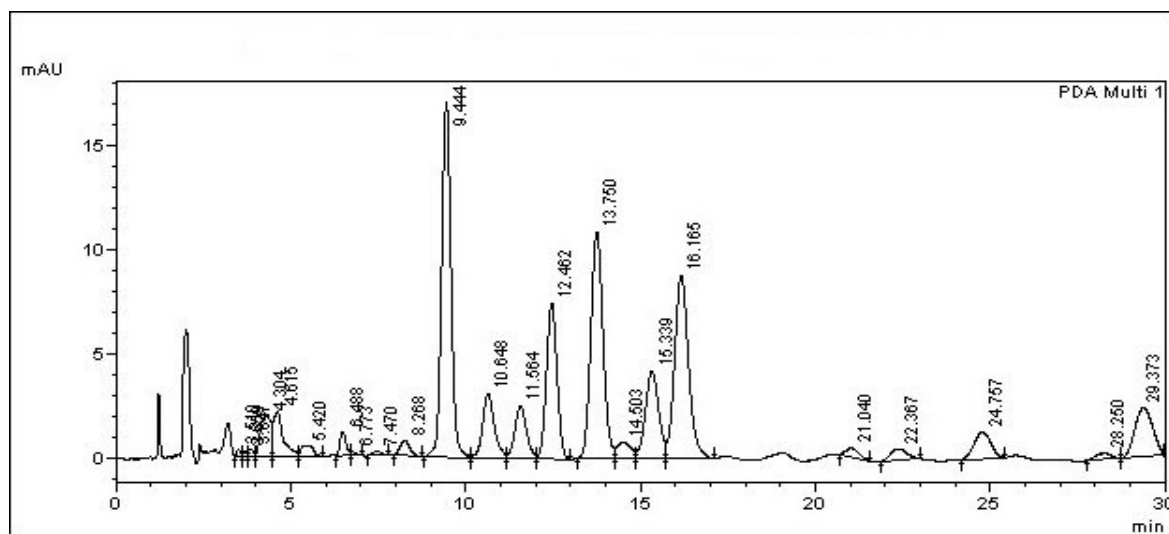


Figura 102: Cromatograma do óleo de “andiroba” pelo método otimizado pelo desenho experimental



#### 4.4 Pré-validação

Os resultados das pré-validações estão apresentados abaixo.

##### 4.4.1 Linearidade

Nas figuras 103 e 104 estão apresentados os resultados da regressão linear do método de CLAE e de CGAR.

Multiple Regression Results			
Dep. Var. : AREA	Multiple R : ,99989247	F = 102280,9	
	R²: ,99978495	df = 1,22	
No. of cases: 24	adjusted R²: ,99977518	p = ,000000	
	Standard error of estimate: 8070,2410708		
Intercept: -1216,252621	Std.Error: 2962,585	t( 22) = -,4105	p < ,6854
CONCCOR beta=1,00			
(significant beta's are highlighted)			

Figura 103: Regressão linear do método de CLAE.

Multiple Regression Results			
Dep. Var. : AREA	Multiple R : ,99977009	F = 47827,69	
	R²: ,99954023	df = 1,22	
No. of cases: 24	adjusted R²: ,99951933	p = ,000000	
	Standard error of estimate: 2,677271821		
Intercept: -,416396265	Std.Error: ,9828264	t( 22) = -,4237	p < ,6759
CONCCOR beta=1,00			
(significant beta's are highlighted)			

Figura 104: Regressão linear do método de CG.

Nas figuras 105 e 106 estão apresentados os gráficos de preditos x resíduos dos dois métodos.

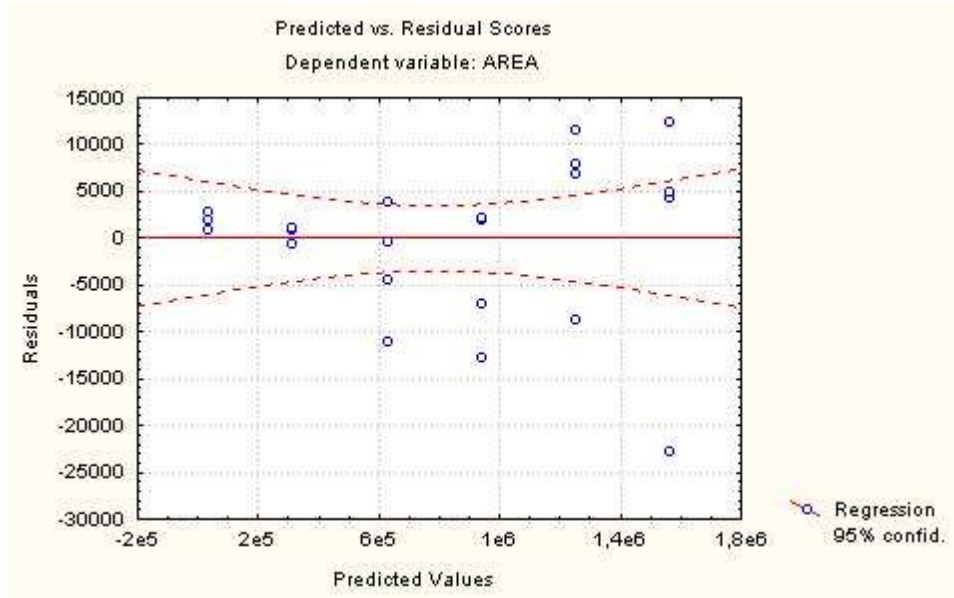


Figura 105: Gráfico de preditos x resíduos do método de CLAE.

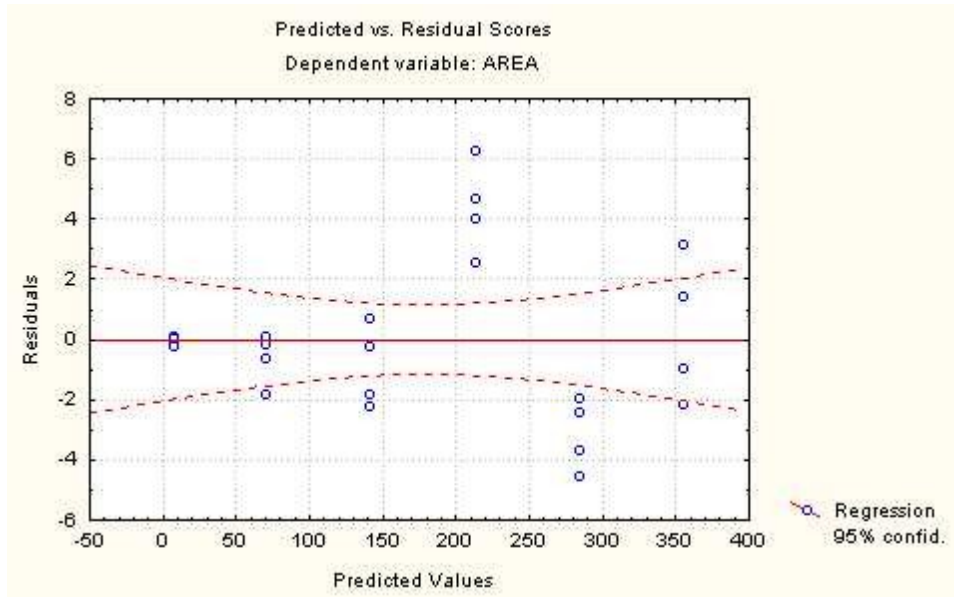


Figura 106: Gráfico de preditos x resíduos do método de CG.



Nas figuras 107 e 108 Estão apresentados os gráficos de dispersão com os respectivos modelos.

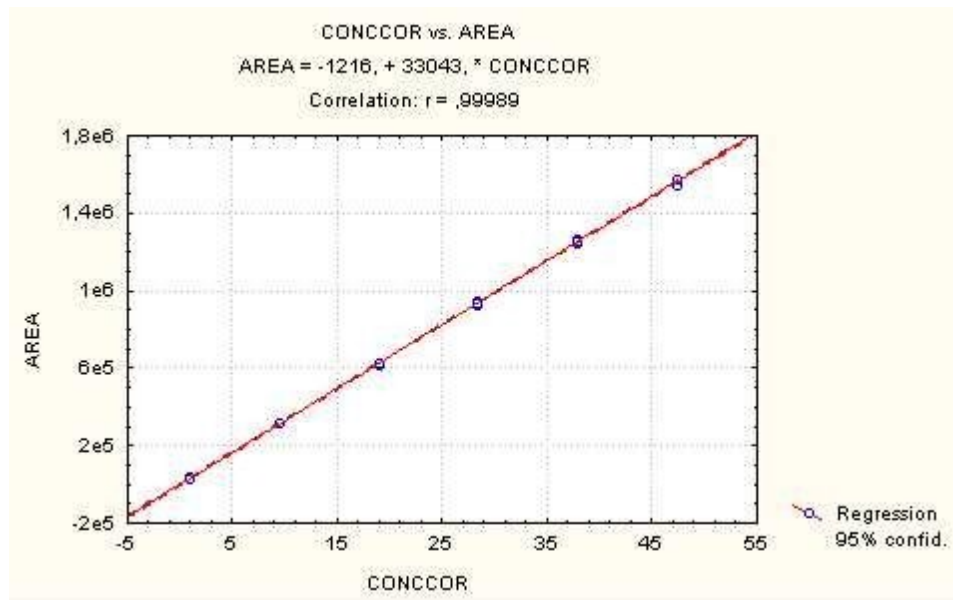


Figura 107: Gráfico de dispersão com modelo de CLAE.

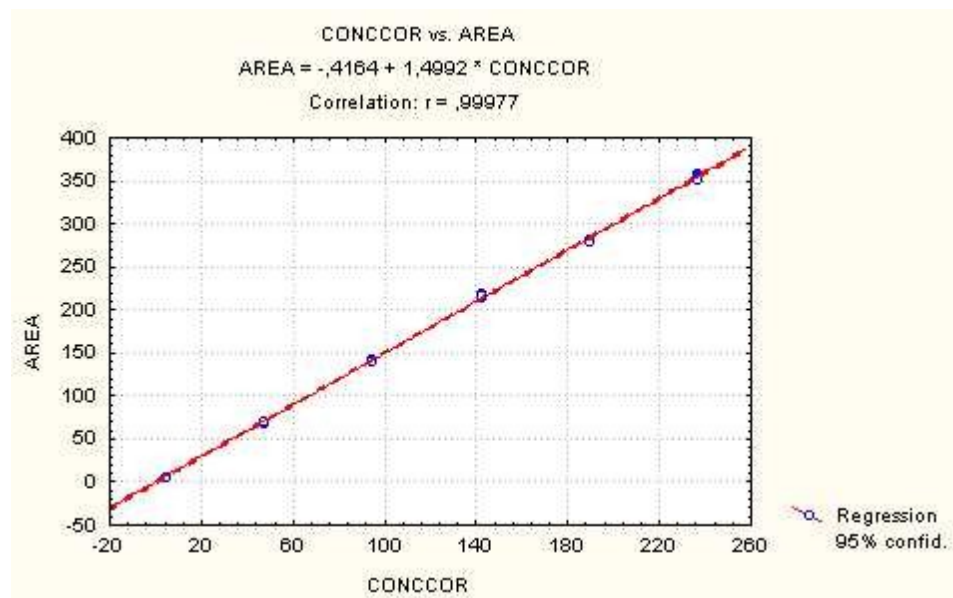


Figura 108: Gráfico de dispersão com modelo de CG.

#### 4.4.2 Precisão

Nas tabelas 32 e 33 estão apresentados os resultados de repetitividade dos métodos de CLAE e CG.

Tabela 32: Repetitividade do método de CLAE.

Concentração ( $\mu\text{g/ml}$ )	Áreas	Desvio Padrão	Coefficiente de Variação
0,9	31042 32143 32937 31978	777,64	2,4
9,5	312577 311210 312876 312907	802,25	0,3
18,9	624247 628462 613544 620233	6347,17	1,0
28,4	939444 939633 924740 930595	7258,99	0,8
37,9	1257307 1262080 1241865 1258320	8924,75	0,7
47,4	1567741 1575817 1540612 1568418	15462,25	1,0

Tabela 33: Repetitividade do método CGAR.

Concentração ( $\mu\text{g/ml}$ )	Áreas	Desvio Padrão	Coefficiente de Variação (%)
4,7	6,76652 6,74082 6,49786 6,44000	0,17	2,52
47,4	68,73673 70,65929 69,65026 70,37845	0,85	1,21
94,7	141,30093 142,23317 139,73640 139,34067	1,35	0,96
142,05	218,82699 216,53166 215,08067 217,22176	1,56	0,72
189,4	279,86670 281,12103 281,58972 278,96367	1,19	0,43
236,75	357,68256 355,94138 353,54581 352,39432	2,38	0,67

### 4.4.3 Seletividade

Os resultados de seletividade estão apresentados abaixo. Na figura 109 estão os espectros no UV e pureza de sinal dos picos dos TNTPDs.

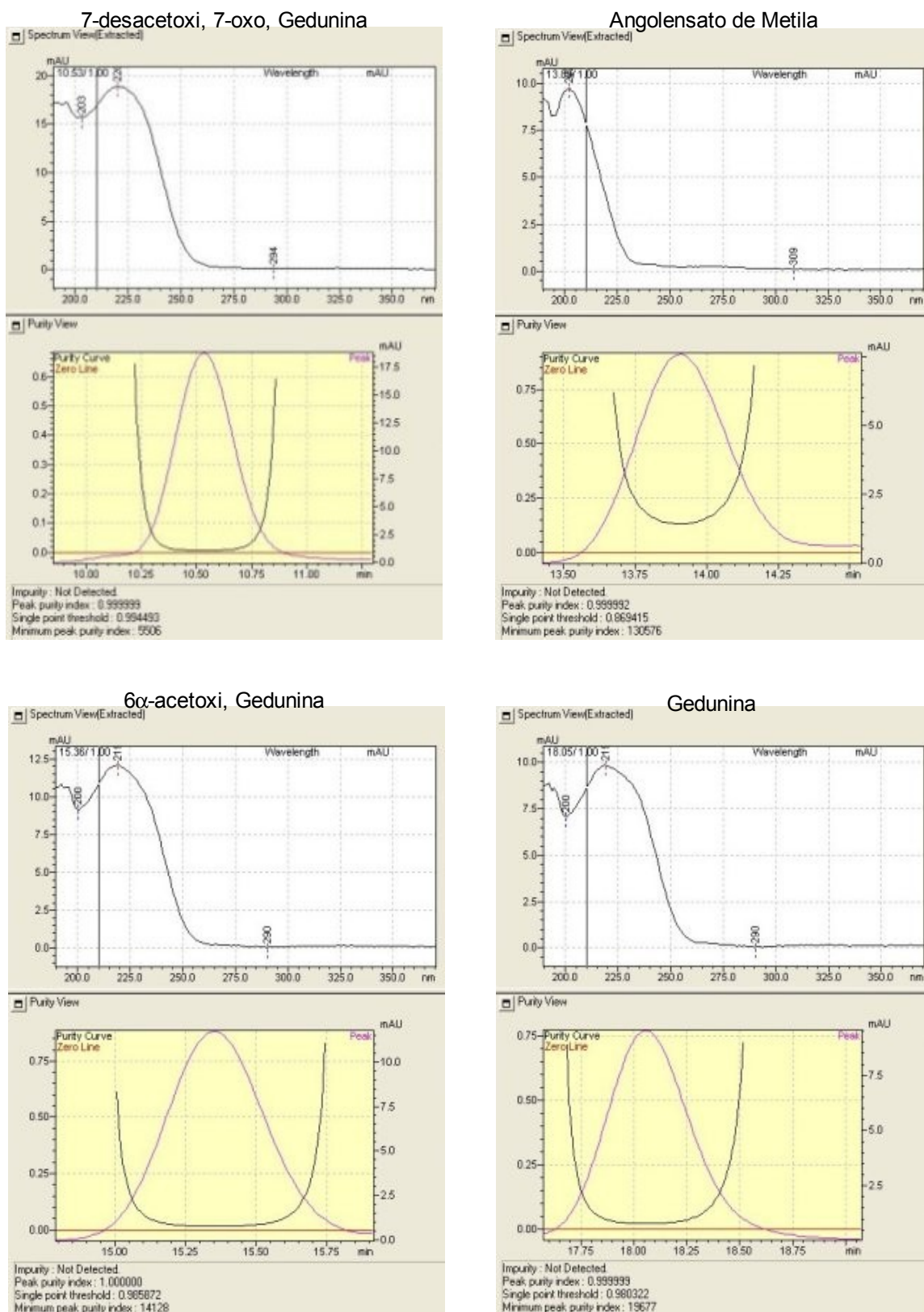


Figura 109: Espectros de UV e pureza dos tetranortriterpenóides

#### 4.4.4 Limite de detecção

Os limites de detecção calculados estão apresentados na tabela 34.

Tabela 34: Limites de Detecção dos métodos de CLAE e CG.

Método Cromatográfico	CLAE( $\mu\text{g/ml}$ )	CGAR( $\mu\text{g/ml}$ )
LD	0,07	0,33

#### 4.4.5 Limite de Quantificação

Os limites de quantificação calculados estão apresentados na tabela 35.

Tabela 35: Limites de Quantificação dos métodos de CLAE e CG.

Método Cromatográfico	CLAE( $\mu\text{g/ml}$ )	CGAR( $\mu\text{g/ml}$ )
LQ	0,24	1,11

#### 4.5 Quantificação dos tetranortriterpenóides

Os resultados da quantificação dos TTPD estão apresentados na tabela 36.

Tabela 36: Resultado da quantificação dos tetranortriterpenóides.

Unidade	7-desacetóxi-7-oxo-gedunina		angolensato de metila		6 $\alpha$ -acetóxi-gedunina		gedunina		Total
mg/g	2,47	2,5	1,15	1,15	1,79	1,84	1,62	1,62	
	2,48		1,15		1,82		1,62		7,07
%(m/m)	0,25	0,25	0,12	0,11	0,18	0,18	0,16	0,16	
	0,25		0,12		0,18		0,16		0,71

## **5.0 Discussão**

Para se atingir o principal objetivo deste trabalho, que é a quantificação de tetranortriterpenóides (TNTPDs) em óleo de “andiroba” de forma confiável e robusta, foi necessário que algumas etapas fossem realizadas.

A primeira delas trata da referência a ser utilizada na quantificação, essencial para o uso de técnicas cromatográficas. A ausência de padrões de TNTPDs disponíveis exigiu a produção de uma quantidade mínima de um dos TNTPDs. A etapa seguinte trata do preparo da amostra para a análise. O óleo de “andiroba” é uma matriz complexa, composta de ácidos graxos e glicerídeos, contendo apenas pequenas quantidades de TNTPD, além de outras substâncias minoritárias. Desta forma, para uma análise quantitativa dos TNTPDs com um bom grau de confiança, foi necessária a obtenção de alíquotas menos complexas que a matriz, assim como um conseqüente aumento da concentração dos TNTPDs. A terceira etapa se refere ao método de análise em si, que deve ser desenvolvido visando uma boa seletividade para as substâncias em estudo, com boa precisão, exatidão e robustez e que suportem sua confiabilidade e adequação. Estes parâmetros são justamente a última questão abordada para a quantificação dos TNTPDs, chamada de validação. Esta validação consiste em um estudo científico de parâmetros do método, alguns já mencionados, verificando se eles estão dentro de limites convencionados comprovando, portanto, sua aplicabilidade.

Todas essas quatro etapas foram abordadas no curso deste trabalho e foram, a princípio, realizadas nesta ordem. Porém, como elas estão intimamente ligadas, algumas etapas foram realizadas de forma concomitante e, em alguns casos, uma etapa foi refeita após a obtenção de alguns resultados da etapa subsequente.

### **5.1 Desenvolvimento de Método de Análise por CGAR**

O trabalho foi iniciado com a análise do óleo e do precipitado de TNTPDs em cromatografia a gás de alta resolução (CGAR). A figura 81 na página 93 traz o cromatograma do óleo de “andiroba” analisado pelo método inicial para CGAR. Alguns aspectos chamam a atenção: o longo tempo de análise, a larga diferença em termos de área entre os sinais dos ácido graxos (13,309; 17,276; 17,494 min), entre os sinais dos TNTPDs (37,541; 40,400; 41,401; 44,052 min) e os ácidos, a baixa resolução do sinal correspondente à gedunina (40,400 min) e a ausência de sinais referentes aos glicerídeos.

Algumas variações dos parâmetros de análise foram realizadas (tabela 13, página 41) envolvendo, principalmente, os aumentos da taxa de aquecimento, do fluxo linear do gás de arraste e da temperatura inicial; porém, não foram obtidos bons resultados. O principal problema era a eluição dos glicerídeos, que eluem em temperaturas acima de 350 °C, acima da temperatura máxima suportada pela coluna HP-5, que é de 325 °C. Assim, os glicerídeos permaneciam na coluna, afetando as análises seguintes. Por esse motivo substituiu-se a coluna pela HP-5ht capaz de alcançar temperaturas de 400 °C.

A figura 82 na página 94 mostra o cromatograma do óleo de “andiroba” analisado na coluna HP-5ht após a otimização com variação dos parâmetros, apresentados na tabela 15 e 16, das páginas 42 e 43 respectivamente. Assim como para a coluna HP-5 estas variações foram, principalmente, o aumento de temperatura final, aumento de taxa de aquecimento e aumento do fluxo. Nota-se no cromatograma uma diminuição do tempo de corrida, o aparecimento dos sinais referentes aos glicerídeos e, na figura 83 também da página 94, o detalhe do mesmo cromatograma na região de TNTPDs com os sinais bem resolvidos. O método otimizado está apresentado na tabela 37. O óleo foi injetado em CG-EM para caracterização dos sinais de TNTPDs no mesmo método, substituindo a coluna HP-5ht por outra HP-5ms e com temperatura final de 325°C. O resultado é mostrado nas figuras 84 e 85 da página 95, que trazem o cromatograma e o detalhe da região de TNTPDs.

Tabela 37: Metodologia de CGAR otimizada.

---

#### Cromatografia a gás de alta resolução

---

Coluna DB-5HT de 30 m de comprimento 250 µm de diâmetro interno e 0,1 µm de espessura de filme. 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 min. Injetor *split/splitless* com *split* de 1/20 a 270 °C. Detector de ionização em chama a 300 °C.

---

Como previsto, os picos dos glicerídeos não aparecem por não se alcançar uma temperatura maior de 350 °C; no entanto, observa-se uma boa separação dos sinais, fato não observado anteriormente neste modelo de coluna e que foi, provavelmente, devido ao tempo de uso e estado geral da unidade utilizada. Na Figura 85 (página 95) estão indicados os sinais dos quatro TNTPDs identificados por



comparação de seus espectros de massa com a literatura (Pereira, 1998). Nas figuras 86 da página 95 e 86, 87 e 88 da página 96, estão apresentados os espectros de massas obtidos para cada sinal. Desta forma, foi desenvolvido um método para a análise de TNTPDs por CGAR com uma boa resolução entre os sinais e com tempo de corrida menor do que o método anterior. Além disso, o método com coluna HP5-HT permite a visualização dos glicerídeos, impedindo que estes afetem as análises posteriores.

## **5.2 Preparo de amostra por Extração em Fase Sólida**

Com os resultados obtidos no desenvolvimento da metodologia de análise ficou clara a necessidade do tratamento prévio da amostra, uma vez que a baixa quantidade de TNTPDs poderia acarretar problemas na confiabilidade do método. Como o maior grupo de componentes do óleo era o dos glicerídeos e por ser este um grupo não passível de análise na coluna comum HP-5, o desenvolvimento do método principal exigiu sua eliminação. Uma busca na literatura revelou alguns estudos voltados para o enriquecimento de TNTPDs por extração líquido-líquido (Isman, 1990; Barrek, 2004) e por extração em fase sólida, utilizando carvão grafitizado (Ramesh 1999). Por se tratar de uma técnica mais moderna, com a possibilidade de um controle mais fino sobre a extração, optou-se pela segunda. A extração em fase sólida (EFS) foi desenvolvida para aplicação a substâncias orgânicas e metais pesados, a partir de matrizes aquosas (Fritz, 2000).

### **5.2.1 Seleção do solvente e da fase**

No caso do presente estudo, a matriz não é aquosa mas sim oleosa. Tendo isso em vista, e a não disponibilidade de carvão grafitizado, optou-se pelo estudo em gel de sílica como fase sólida de extração, realizado em cromatografia de camada fina (CCF) testando-se a eluição do precipitado de TNTPDs e o óleo de “andiroba” para diferentes solventes. Nos resultados apresentados na figura 29 da página 57 pode ser visto que o diclorometano elui muito pouco o precipitado de TNTPDs e elui parcialmente o óleo. O uso posterior de acetonitrila (MeCN) como eluente resulta na eluição das substâncias retidas na placa, eluídas com diclorometano. Estes resultados apontaram para a utilização do diclorometano na etapa de eluição dos glicerídeos e da acetonitrila como solvente para retirar os TNTPDs retidos na sílica.

Outros solventes foram testados mas retinham igualmente ou eluam

igualmente todos os componentes. A MeCN foi escolhida a princípio, pois se tratava de um dos solventes utilizados em CLAE de fase reversa, uma das técnicas cromatográficas que seriam utilizadas posteriormente. Um placa de C-18 também foi testada, resultando claramente numa eluição gradual de todos os componentes do precipitado de TNTPD. Em conjunto, estes resultados indicaram a adequação da sílica como fase sólida e o uso de diclorometano e acetonitrila como eluentes em duas etapas subseqüentes da extração.

### **5.2.2 Ensaio das condições de extração em fase sólida**

Procedeu-se então ao estudo de EFS, cujo processo pode ser dividido em quatro etapas (Poole, 2000): (i) o condicionamento da fase com solvente que melhora a reprodutibilidade da retenção dos analitos; (ii) a aplicação da amostra com a passagem desta dissolvida; (iii) a eluição de substâncias indesejáveis retidas na matriz; e (iv) a eluição das substâncias de interesse. Baseado nestas etapas foram iniciados os estudos para esta extração.

#### **5.2.2.1 Estudos preliminares de extração em fase sólida**

A primeira etapa do ensaio das condições de extração em fase sólida consistiu em uma série de estudos preliminares nos quais pode ser avaliada a eluição dos componentes do óleo frente a diferentes condições. Como mostram as tabelas 7 e 8 nas páginas 36 e 37 respectivamente, foram utilizados 5ml de hexano na etapa inicial de condicionamento pois, a princípio, isso facilitaria a retenção dos TNTPDs. Para a retirada dos glicerídeos foi utilizado  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . Os TNTPDs foram eluídos com MeCN e uma limpeza final da fase foi realizada com MeOH. O primeiro experimento mostrado na figura 31 da página 59 confirmou a expectativa de que o diclorometano eluiria os glicerídeos mas não os TNTPDs, que eluíram com MeCN. No entanto, os glicerídeos residuais ainda saíram juntamente com os TNTPDs, o que induziu a modulação da massa de óleo aplicada e do volume dos solventes, para se atingir a separação ideal, obtida no experimento 5 e apresentada nas figuras 42, 43, e 44 das páginas 70, 71 e 72 respectivamente. No experimento 6 tentou-se eliminar os resíduos de ácidos graxos, aumentando-se a polaridade de forma mais gradual com a passagem de 5ml de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeCN}$  9:1 (V/V). Porém, nesta fração, ocorreu a eluição seletiva dos quatro TNTPDs identificados, como pode ser visto na figura 47 da página 74. Como estes ainda compunham os resíduos na fração MeCN,

aumentou-se o volume de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeCN}$  9:1 (V/V) e obteve-se o mesmo resultado em relação aos TNTPDs – todos foram concentrados nesta fração, porém contaminados ainda com glicerídeos (experimento 7, figura 50, página 75).

A partir do experimento 8 passou-se a trabalhar com uma seringa de 5ml, buscando-se aumentar a coluna de sílica e assim obter um possível aumento do número de pratos teóricos. Ao mesmo tempo, foi ensaiada uma diminuição nas fases, passando-se a utilizar metade da massa de fase e a aplicar a metade da massa de óleo. Os experimentos 8 e 9 tentaram reproduzir a eluição seletiva dos TNTPDs com a seringa de 5ml. O experimento 9 funcionou, o que não ocorreu com o experimento 8 (figuras 53 e 54 na página 76 e 55 e 56 na página 77). A principal diferença entre estes dois ensaios foi que no experimento 8 os solventes foram passados enchendo a seringa (cerca de 5ml de cada vez) enquanto que no experimento 9 os solventes foram adicionados como vinham sendo, de 1 em 1ml, portanto em um fluxo bem menor. Estes resultados levantaram dúvidas em relação ao condicionamento da fase. Nos experimentos 10 a 12 procurou-se formar uma base de comparação com os resultados obtidos no experimento 5 com a seringa de 10ml, utilizando a seringa de 5ml. Os resultados não foram muito satisfatórios (figuras 57 a 62 nas páginas 78, 79 e 80 respectivamente), obtendo-se a fração de eluição de TNTPDs sempre com resíduos de glicerídeos. Uma vez que os resultados dos experimentos 8 a 12 mostraram que este sistema com a seringa de 5ml não estava sendo capaz de eluir corretamente os glicerídeos com o  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , estudou-se então o condicionamento da fase de EFS, já que este pode levar a variações nos resultados, principalmente em sistemas que se prepara o próprio cartucho. Nestes sistemas podem se formar canalículos por onde passa o solvente, num fenômeno que faz com que o solvente não esteja em contato com toda a fase e, portanto, com todo o material retido. Para contornar este problema, nos experimentos 13 e 14 substituiu-se o hexano por  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  como solvente de condicionamento, antes de aplicar a amostra. Os resultados foram bastante satisfatórios, como pode ser visto nas figuras 63 a 65, das páginas 81 e 82 respectivamente, que mostram a obtenção de amostras de TNTPDs com a presença residual de glicerídeos. No experimento 15, após o condicionamento com  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , passou-se uma mistura de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeCN}$  9:1 (V/V), seguida da mesma mistura 8:2. A principal mudança, entretanto, foi a aplicação de pressão em todas as etapas, buscando melhorar a resolução. Contudo, os resultados (figuras 66 e 67 nas páginas 83 e 84) apontaram

a presença dos TNTPD em todas as frações, exceto a MeCN final. Além disso, nesta mesma fração, apareceram glicerídeos depois de todos os demais já terem saído. Estes resultados indicam que a pressão durante todo o ensaio favoreceu a formação de canalículos e estes glicerídeos só apareceram porque a fase foi seca no final.

No experimento 16 repetiu-se o experimento 10 com duas variações, ou seja, a substituição de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  por  $\text{CHCl}_3$  e o condicionamento sendo realizado sob pressão. Apesar da pressão aplicada durante todo o experimento não ter se mostrado eficaz, seu uso durante o condicionamento da fase o é, pois conduziu a uma fase mais homogênea e livre de bolhas, o que pode favorecer a eficiência e reprodutibilidade do procedimento. O clorofórmio foi testado, na tentativa de superar a eficiência do  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  em retirar totalmente os glicerídeos. Os resultados demonstraram realmente uma melhora, apesar de ainda sobrar resíduo de glicerídeos (figura 68 e 69 na página 85).

Todos esses ensaios preliminares demonstraram que é possível o uso da sílica como fase de extração, e que são extraído seletivamente os TNTPDs da fase quando eluídos com uma mistura de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  e MeCN, nela restando outros resíduos minoritários. Também o condicionamento com o mesmo solvente de eluição dos glicerídeos e o uso de pressão permitiram um empacotamento mais uniforme e a perspectiva de maior reprodutibilidade. Os ensaios preliminares forneceram uma série de informações sobre esta metodologia, mas ficou claro que uma abordagem mais sistemática era necessária. Assim, passou-se a estudar cada etapa da extração separadamente.

### **5.2.2.2 Otimização por etapas da extração em fase sólida**

A primeira etapa estudada foi a eluição de glicerídeos. Com base no resultado do experimento preliminar 16, utilizou-se  $\text{CHCl}_3$  para ensaiar o volume ideal de solvente (mililitros) para eliminar completamente os glicerídeos, sem retirar os TNTPDs. O resultado mostrou que são necessários 40ml de  $\text{CHCl}_3$  para a retirada total dos glicerídeos; porém, os primeiros 5ml de  $\text{CHCl}_3$  já continham TNTPDs, provavelmente devido a um excesso de material, uma vez que foram aplicados 150 mg de óleo. O resultado está na figura 71 da página 87. Passou-se a então à segunda etapa foram estudadas a composição e o volume necessário para extrair os TNTPDs da fase. Optou-se por aplicar, inicialmente, 50mg de óleo para evitar perda por excesso e por utilizar  $\text{CHCl}_3/\text{MeCN}$  95:5 ao invés de 9:1, pois resultados do

experimento preliminar 6 mostravam que a fração ainda se mostrava muito complexa. Os resultados dos primeiros ensaios, mostrados na figura 75 na página 90, não foram promissores pois apesar da seletividade da mistura  $\text{CHCl}_3/\text{MeCN}$  para os TNTPDs, a extração foi lenta, exigindo vários mililitros para se retirar todos os TNTPDs. A proporção de 97,5/2,5 foi testada, mas a extração se mostrou mais lenta ainda (Figura 76, página 90). Substituiu-se então a MeCN por acetona, um solvente com a constante dielétrica e o momento dipolar menores que os da MeCN para, eventualmente, acelerar a eliminação dos TNTPDs. Foram testadas as proporções de 5% e 2,5% em  $\text{CHCl}_3$ . Os resultados mostraram que não houve extração seletiva de TNTPDs com a proporção de 5% como mostra a figura 78 na página 91; já os resultados da proporção de 2,5% foram similares aos de 5% de MeCN (Figura 77, página 91). Outro problema surgiu: a análise da alíquota de  $\text{CHCl}_3$  do teste com  $\text{CHCl}_3/\text{acetona}$  97,5/2,5 demonstrou a presença de 7-oxo. Aparentemente, a simples redução da massa aplicada não foi suficiente para impedir a passagem de TNTPDs na fração de  $\text{CHCl}_3$ . Um novo teste, utilizando  $\text{CHCl}_3/\text{hexano}$  95/5 em vez de  $\text{CHCl}_3$  puro, foi realizado. O resultado, cujos cromatogramas estão na figura 74 da página 89, demonstraram que apenas a nona alíquota, correspondente a 45 ml, apresenta os TNTPDs. Deste modo, esta solução foi utilizada nos estudos seguintes para a retirada de glicérides. Foram então realizados mais dois testes com  $\text{CHCl}_3/\text{MeCN}$  95/5 e 97,5/2,5. Os resultados, apresentados nas figuras 79 e 80 ambos na página 92, mostraram uma saída muito mais rápida dos TNTPDs. No caso da solução a 2,5% foram necessários 45 ml, mas todos foram eluídos. Já nos resultados a 5% na fração 15 terminaram de sair todos os TNTPDs, com exceção do 7-oxo. Para esta substância foram necessários 30 ml para retirada total, porém com 15 ml mais de 90% já haviam sido eluídos. Deste modo, optou-se por realizar a eluição dos TNTPDs com 15 ml e realizar um teste de recuperação.

### **5.2.3 Estudo de recuperação**

Os resultados do teste de recuperação podem ser vistos na tabela 30 da página 92. A recuperação foi de cerca de 90%, considerada bastante adequada, levando-se em conta que, a princípio, os demais TNTPDs já teriam eluído. Desta forma, uma metodologia de extração em fase sólida para o preparo de amostra de óleo de “andiroba” foi desenvolvida. No entanto, não pode ser considerada definitiva, pois ainda havia que se testar a recuperação dos demais TNTPDs, etapa para a

qual seria necessário uma referência. Havia também que ser realizar testes de recuperação com adição de padrões a uma matriz similar ao óleo de “andiroba”, no sentido de verificar o efeito da matriz sobre a recuperação. Por fim, seria interessante analisar outros óleos de “andiroba” para determinar se o método tem aplicabilidade geral, já que matérias-primas de origem vegetal costumam apresentar variações em suas composições químicas devido a fatores bióticos e abióticos.

### **5.3 Isolamento e purificação de referência**

Concomitante ao desenvolvimento da metodologia de preparo de amostra, foi isolada e caracterizada uma porção de 7-oxo a partir do precipitado de TNTPDs para uso como referência, tanto para a quantificação dos TNTPDs como no desenvolvimento da metodologia de extração. A princípio, tentou-se evitar o uso de colunas cromatográficas devido ao baixo rendimento na obtenção de substâncias por esta técnica, iniciando-se o trabalho com o experimento 1 descrito nos fluxogramas e realizando o procedimento de obtenção de fração enriquecida de 7-oxo descrito no item 3.1.1 na página 16.

#### **5.3.1 Obtenção de fração enriquecida de 7-oxo**

Este procedimento originalmente era a etapa preparativa para tratamento da amostra de precipitado por cromatografia contracorrente para se avaliar a partição da amostra nas duas fases. Claramente, envolve a solubilidade diferencial do precipitado de TNTPDs na fase de cromatografia contra corrente. O resultado está na tabela 27 da página 50. O experimento 1 forneceu uma amostra com cerca de 78,8% de pureza cromatográfica de 7-oxo com uma rendimento de 10%. Assim, este procedimento se mostrou promissor e serviu como ponto de partida. Em todos os oito experimentos esta foi a técnica aplicada inicialmente. Porém, como indica a tabela 27, nem o rendimento nem a concentração de 7-oxo se mantiveram constantes. O experimento 2 foi realizado tal qual o experimento 1, porém a concentração de 7-oxo foi inferior à obtida no experimento 1, apesar de produzir um maior rendimento em massa (cerca de 14%).

Em outros experimentos foram feitas modificações do procedimento. No experimento 3, o becher que continha os resíduos sem dissolver nas fases foi levado ao banho ultrassônico com  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  no lugar de  $\text{CHCl}_3$  como solvente de lavagem. Estas modificações implicaram em um aumento de rendimento, porém a

concentração de 7-oxo caiu para cerca de 40% devido, provavelmente, a uma maior solubilidade do precipitado em  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ .

O experimento 4 foi realizado sem modificações e levou a resultados similares aos do experimento 2, tanto em rendimento como em concentração de 7-oxo. A partir do experimento 5, o precipitado não foi mais lavado com hexano previamente, pois isto era feito para retirar resíduos de glicérides, mas estes não foram encontrados em análises cromatográficas; e esta foi a única modificação neste experimento, que teve o maior rendimento (32,2%) e a segunda maior pureza (77,5%). Aparentemente, a lavagem prévia com hexano estava de alguma forma prejudicando o resultado. Devido à alta variabilidade de resultados e por considerar a etapa de filtração a mais propensa a variações, nos três últimos experimentos o sistema de filtração com algodão em seringas foi substituído por um sistema de filtração mais constante, com papel de filtro e um funil de buchner. Outras duas modificações foram realizadas: a massa inicial de precipitado foi reduzida (sem implicação técnica, apenas economia de material) e o becher foi substituído por um balão pera com tampa. Como recipiente para dissolver o precipitado, o balão pera tem a vantagem de poder ser agitado de forma vigorosa, sem perda de líquido e, quando deixado repousar, permite decantar o líquido com mais facilidade. Os resultados destas modificações foram variados, apesar dos experimentos 6 e 7 apresentarem concentrações similares de 7-oxo, os rendimentos atingiram valores bem diferentes, chegando a quase 100% a diferença entre eles. O último experimento foi o que forneceu a maior concentração de 7-oxo, porém o menor rendimento. Apesar de não se definir exatamente uma metodologia para esta etapa, foi possível obter material suficiente para a seqüência do trabalho, com o isolamento do grupo de TNTPD.

### **5.3.2 Isolamento do grupo de tetranortriterpenóides**

A descoberta de eluição específica de TNTPDs em um sistema de extração em fase sólida feita durante o desenvolvimento da técnica de preparo da amostra levou a ensaiar o uso desta técnica para a purificação de 7-oxo. Pelos estudos de preparo de amostra ficou claro que havia nas amostras outro “grupo” de substâncias com uma polaridade maior que os TNTPDs, como mostra a figura 24 na página 52, que poderiam permanecer no precipitado. Estudou-se, então, a aplicação da EFS para a “limpeza” das frações obtidas na etapa anterior. O procedimento foi

executado conforme vinha sendo aplicado no preparo de amostra, com mais eluente de baixa polaridade, visando a retirada de glicérides do óleo e menos de TNTPDs (experimentos 2 e 3). Este raciocínio provou ser incorreto, pois o precipitado não continha quantidades significativas de glicérides, mas sim de TNTPDs. Portanto, o volume de eluição de baixa polaridade foi reduzido para apenas 10ml e o de eluição de TNTPDs aumentado para 40ml e depois 50ml (experimentos 1+2, 3, 4 e 5). Os resultados mostraram que os TNTPDs eluíam com os primeiros 20 mL e com o restante eluíam os resíduos minoritários. Dessa forma, obteve-se um material com aspecto cristalino e mais de 80% de pureza cromatográfica.

### **5.3.3 Purificação de 7-oxo**

Para tentar a obtenção do 7-oxo mais puro, procedeu-se a uma cristalização descrita por Pereira (1998), mas adicionando um pequeno volume de MeOH ao material obtido por EFS. O resultado foi a obtenção de um sólido branco no fundo do frasco, cuja decantação e análise posterior por CG-EM mostrou que se tratava de 7-oxo e, no sobrenadante, encontraram-se os demais TNTPDs, além de 7-oxo residual. Aparentemente, os TNTPDs possuem baixa solubilidade em pequenos volumes de MeOH e como o 7-oxo é o maior componente desta fração, uma boa parte desta substância permanece insolúvel, permitindo uma via para sua obtenção com alto grau de pureza a partir do tratamento de frações enriquecidas com MeOH. O resultado deste processo pode ser visto na figura 24 da página 52.

Nos experimentos 7 e 8 tentou-se então tratar com MeOH a fração originária do procedimento de concentração, cujo êxito eximiria os experimentos de EFS. No entanto, os resultados não foram bons e a pureza das amostras não aumentou, gerando produtos escuros que tiveram que ser submetidos à EFS para retirar as substâncias minoritárias. Ficou evidente então que, para o isolamento de 7-oxo a partir do precipitado de TNTPDs eram necessários três passos: (i) a obtenção de uma amostra mais concentrada em 7-oxo, realizada através do procedimento descrito no item 3.1.1; (ii) a retirada das substâncias minoritárias mais polares, realizada com a aplicação de uma extração em fase sólida; e (iii) o tratamento da amostra resultante com pequenos volumes de MeOH que conduz à purificação da 7-oxo. Este protocolo foi reproduzido inteiramente no experimento 8 e o resultado levou à obtenção de 27,1mg de 7-oxo com 95,2% de pureza cromatográfica, a partir de 807,4 mg de massa inicial (fluxograma 3.11, página 30).



Durante todo este estudo para o isolamento de um TNTPD específico foram obtidas frações resultantes de EFS que não tinham muita massa mas possuíam quantidades significativas de 7-oxo. Para se aproveitar este material estas frações foram reunidas e tratadas com MeOH. No final, as frações tratadas provenientes de todos os experimentos foram unidas para se obter uma amostra uniforme. As massas de cada fração e a massa total reunida estão apresentadas na tabela 26 da página 50.

#### **5.3.4 Caracterização da amostra**

A amostra reunida foi analisada por CG-EM e ressonância magnética nuclear para caracterização química e por Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC) para determinação de grau de pureza. As figuras 26 e 27, na página 54, mostram o cromatograma e o espectro de massas da amostra reunida respectivamente. As tabelas 28 e 29, nas páginas 54 e 55 respectivamente, mostram a comparação entre os deslocamentos químicos da literatura e os obtidos. Na figura 28, da página 56, podem ser vistos os resultados da análise por DSC. No espectro de massas observamos fragmentos característicos como o sinal a  $m/z$  315 majoritário e o íon molecular de  $m/z$  438. A comparação dos deslocamentos químicos do RMN também indica coerência com a literatura. Estes resultados corroboram que a substância isolada é o 7-desacetoxi-7-oxogedunina. O resultado da calorimetria diferencial exploratória indica que a pureza do material é de 94,7% e confirma a identificação com o ponto de fusão semelhante ao obtido na literatura (Pereira, 1998).

#### **5.4 Desenvolvimento da Método de Análise por CLAE**

Da mesma maneira que para a análise em cromatografia em fase gasosa, já existia na literatura a descrição de uma metodologia para análise dos TNTPDs em CLAE apresentado na tabela 17 da página 44. No entanto, trata-se de um procedimento que, além de longo, utiliza um sistema de gradiente de solventes. Assim, o objetivo principal desta parte do trabalho foi desenvolver uma metodologia que fosse mais rápida e, de preferência, em modo isocrático, já que as metodologias baseadas em sistemas de gradiente tendem a dificultar a constância do equilíbrio no sistema e, portanto, podem comprometer a etapa subsequente do desenvolvimento, que consiste na validação do método.

#### **5.4.1 Fase móvel binária**

Inicialmente utilizou-se a metodologia descrita na tabela 17 (Pereira, 1998), que se baseia na em uma injeção inicial do conjunto de precipitado de TNTPDs nas condições mencionadas. O ponto central da região de eluição dos TNTPDs no cromatograma obtido nestas condições correspondia a 56% de acetonitrila em água. Então, uma amostra preparada por EFS foi injetada utilizando uma corrida isocrática nesta proporção. O resultado foi bastante promissor (Figura 91, página 97). Foram injetadas amostras ricas em cada um dos quatro TNTPDs com o intuito de identificar os sinais (Figuras 92, 93, 94 e 95). Para a otimização deste método foi elaborado um desenho experimental do tipo composto central.

A amostra utilizada neste desenho foi preparada por uma metodologia preliminar de EFS (Tabela 19 na página 45), pois utilizou o resultado de um procedimento em desenvolvimento. Todas as 17 injeções foram efetuadas segundo o desenho. No entanto, este modelo de fase binária acarretou invariavelmente a co-eluição do sinal da gedunina com outra substância, como mostra a figura 96 na página 100. Portanto, não se investiu na análise do atual desenho, passando-se para o estudo de fase móvel ternária para a separação dos TNTPDs. Por outro lado, este fato evidenciou a alta complexidade da composição da amostra, induzindo a um estudo mais aprofundado sobre a EFS. Este estudo foi realizado e os resultados estão discutidos anteriormente, no item 5.2.

#### **5.4.2 Fase móvel ternária**

Com definição da metodologia de EFS mais adequada, passou-se a ensaiar as variações grosseiras da fase móvel ternária, como objetivo de se atingir um ponto de partida para um novo desenho. Este ponto foi representado pela composição MeCN/MeOH/H<sub>2</sub>O 35:30:35 (V/V/V), que gerou o cromatograma apresentado na figura 97 da página 101. Foi realizado então um novo desenho de composto central, utilizando-se os mesmos fatores estudados no desenho anterior, como a composição de fase móvel, o fluxo e o volume de injeção. Para a composição de fase móvel, foi fixada a proporção de H<sub>2</sub>O em 35%. Os valores mostrados no desenho correspondem sempre à porcentagem de MeCN, com o restante, em cada caso, representado pelo MeOH. Quanto aos demais fatores, foram escolhidos valores bem extremos, com o objetivo de detectar qualquer significância em sua variação. O efeito medido foi a resolução entre os sinais correspondentes ao

angolensato de metila e à gedunina, que possuem sinais adjacentes com tendência à co-eluição.

A avaliação dos resultados foi realizada considerando-se o grau de resolução de ambas as respostas ao mesmo tempo já que as duas deveriam apresentar boa resolução. Na figura 98, também na página 101, está apresentada a tabela de efeitos, mostrando que os todos os fatores principais, menos o fluxo em regressão quadrático, foram significativos assim como as interações de segunda ordem. No entanto, o parâmetro com efeito mais significativo foi a porcentagem de MeCN na composição. A figura 99, da página 102, mostra a análise de variância, comparando o erro puro obtido com as repetições no ponto central com a variância dos fatores. O resultado mostra que a variância residual é significativamente maior que o erro puro.

A figura 100, também na página 102, mostra o gráfico de *desirability* para os três fatores e as duas respostas. Estas foram definidas como 1,5, pois é a resolução adequada para a maioria das análises cromatográficas. Como está explícito na tabela de efeitos, o fator que determina o ponto ótimo é a porcentagem de MeCN, já que as respostas em separado são opostas. Os gráficos de superfície para a resposta resultante, nas figuras 101 e 102, ambas na página 103, evidenciam que a *desirability* ótima (1,0) não é alcançada, mas ultrapassa o valor de 0,8. Considerando-se os gráficos de superfície de resposta e de *desirability*, a porcentagem de MeCN foi fixada em 35%. Então, foram realizadas injeções com fluxo variando entre 0,8 e 1,2mL/min., para se determinar o fluxo ideal. A melhor condição encontrada foi 0,9 mL/min., que não era muito diferente da resposta a 1,0mL/min; todavia, apresentava a possibilidade de se utilizar menos fase móvel. Por fim, o volume injetado foi fixado em 20 µL por ser o volume máximo admitido para o fluxo de 0,9mL/min. O comprimento de onda foi mantido em 210nm pois, como mostra a figura 109 na página 110, o angolensato de metila tem um máximo de absorção próximo a 200nm, caindo a partir daí. Portanto, a escolha de maiores comprimentos de onda (como, por exemplo, correspondente ao máximo das demais substâncias) prejudicaria muito o sinal do angolensato de metila.

Dessa maneira, foi desenvolvido um método para a análise de TNTPDs por CLAE utilizando-se um desenho experimental de composto central. Esta metodologia permitiu que fossem avaliados os parâmetros que influenciam o método, permitindo determinar as condições ótimas. O cromatograma do método está apresentado na figura 103 e o método na tabela 31 ambos na página 104. Além

disso, a aplicação da metodologia de desenho experimental permitiu detectar a co-eluição no sinal da gedunina, sendo pertinente mencionar que, quando o primeiro desenho foi realizado, a análise do espectro de varredura no UV do sinal correspondente a esta substância a indicava como pura. Assim, o desenho experimental mostrou-se uma ferramenta importante no desenvolvimento desta metodologia analítica.

## **5.5 Pré-validação**

As duas metodologias desenvolvidas para a quantificação de TNTPDs foram submetidas a uma pré-validação. Esta é uma etapa importante e permite, pela realização de alguns experimentos preliminares, uma avaliação da adequação do método. Os resultados foram divididos nos diferentes testes realizados, descritos na tabela 23 da página 48. Cabe ressaltar que esta é apenas uma pré-validação e que a validação dos dois métodos é necessária para uma avaliação completa dos mesmos.

### **5.5.1 Linearidade**

Os dois resultados, de CLAE e de CGAR, foram analisados por uma regressão linear e os resultados estão apresentados nas figuras 103 e 104 da página 105 e se mostraram similares. Os coeficientes de correlação indicam a correlação linear da área e a concentração de ambos acima de 0,999. Os coeficientes de determinação indicam a predominância da variância linear, com 99,97% no caso do CLAE e 99,95% no caso do CG; ambos os resultados foram confirmados por seus respectivos coeficientes de determinação ajustados. A adequação do modelo linear também foi confirmada pelo teste de variância nos dois casos altamente significativos. Por último, temos o teste  $t$  para a diferença do intercepto de zero e o resultado não foi significativo nos dois casos. Este é um dado importante, que indica não haver diferença significativa entre o intercepto e zero e permite que sejam realizadas quantificações utilizando apenas uma concentração de referência na rotina – sempre dentro da faixa de concentração estudada. A linearidade ainda foi confirmada pelo gráfico dos preditos x resíduos, apresentados nas figuras 105 e 106 da página 106, mostrando uma distribuição aleatória dos dados. Nas figuras 107 e 108 da página 107 estão apresentados os gráficos de dispersão dos dados, com os respectivos modelos lineares determinados.

### **5.5.2 Repetitividade**

A precisão foi avaliada apenas no nível da precisão intra-corrída ou repetitividade. Tanto para CGAR como para CLAE, os valores foram satisfatórios, estando abaixo de 2% - à exceção nos dois casos da menor concentração, que apresentaram os maiores coeficientes de variação (acima de 2%). No entanto, levando-se em conta que estes são o limite inferior da curva em uma concentração bem reduzida, os valores são aceitáveis. Os demais valores estão todos abaixo de 2%, indicando uma boa repetitividade do método. Os resultados estão apresentados nas tabelas 32 e 33 das página 108 e 109.

### **5.5.3 Seletividade**

A seletividade foi determinada de duas formas: pelo desenho experimental, como já discutido, e pela análise do conjunto de sinais do espectro. Este resultado está apresentado na figura 109 da página 110 e confirma a pureza do sinal de cada TNTPD. A seletividade só foi estudada para o método de CLAE.

### **5.5.4 Limite de Detecção e Quantificação**

Os limites de detecção e quantificação foram calculados a partir do desvio padrão da menor concentração. Normalmente, estes limites são estimados a partir do desvio padrão do intercepto de várias curvas ou calculados diretamente após realizar uma série de análises em branco para determinar o desvio padrão do ruído da linha de base. Nos dois casos, o objetivo é determinar qual é o valor máximo em área que o ruído da linha de base pode assumir. Neste estudo de pré-validação, apenas uma curva foi elaborada e as análises do branco não forneceram qualquer sinal quantificável. Deste modo, utilizou-se o desvio padrão do menor nível da curva, por apresentar a maior proporção, além de ser o ponto mais próximo à linha de base. Os valores calculados estão apresentados nas tabelas 34 e 35 ambos na página 111.

## 5.6 Quantificação dos tetranortriterpenóides

O resultado da quantificação está apresentado na tabela 36 da página 112. A quantificação dos TNTPDs foi realizada utilizando-se o 7-oxo como referência. Na sua quantificação, aplicou-se o fator de correção levando-se em conta o resultado do teste de recuperação. Os demais TNTPDs também foram quantificados, utilizando-se a área do pico de 7-oxo como referência com o objetivo de estimar as quantidades dos outros três TNTPDs presentes já que, para estes, não há padrões disponíveis. A quantificação de substâncias pertencentes a um mesmo grupo em matrizes vegetais, referenciada a uma substância deste grupo, é uma ferramenta comum e alguns trabalhos já foram publicados neste sentido (Tappin et al., 2004). Por outro lado, além da similaridade das moléculas, também os espectros no ultravioleta da gedunina e da  $6\alpha$ -acetoxigedunina são muito parecidos com o espectro do 7-oxo e, provavelmente, as quantidades calculadas estão bem próximas aos valores reais. Quanto ao angolensato de metila, este apresenta um espectro de ultravioleta bem distinto dos demais (Figura 109), apresentando um máximo de absorção em cerca de 200nm e, à medida que o comprimento de onda aumenta, cai a sua absorção. É provável que o valor calculado seja inferior ao valor real, o que permite assegurar apenas a quantidade mínima desta substância presente na amostra. O fator de recuperação não foi aplicado aos demais TNTPDs pois os experimentos de preparo de amostra indicam que eles, a princípio, eluem nos primeiros 15 mL com o uso de  $\text{CHCl}_3/\text{MeCN}$ . A quantificação foi realizada apenas por CLAE, e portanto é interessante que para uma melhor comparação entre os métodos cromatográficos se quantifiquem os tetranortriterpenóides por CGAR.

## 6.0 Conclusão

Neste trabalho foi isolado e caracterizado um tetranortriterpenóide presente em óleo de “andiroba” a partir de precipitado de tetranortriterpenóides. Para seu isolamento, utilizaram-se diferentes técnicas. Contudo, não foi possível determinar uma metodologia ótima para o isolamento desta substância, mas o desenvolvimento dos procedimentos aqui aplicados é potencialmente aplicável para a obtenção não só de 7-desacetóxi-7-oxogedunina, assim como para o isolamento dos demais tetranortriterpenóides.

O procedimento de preparo de amostra baseado em uma extração em fase sólida foi desenvolvido e testado, fornecendo uma boa recuperação de material 90% para o 7-oxo e 100% para os demais. Este procedimento permitiu a análise de uma amostra mais simples e com maiores concentrações de TNTPDs. No entanto, ainda cabem alguns estudos como a recuperação dos demais TNTPDs e o estudo do efeito da matriz.

Duas metodologias analíticas para a determinação de tetranortriterpenóides foram desenvolvidas e pré-validadas. Ambas apresentaram resultados bem similares e demonstram que podem ser potencialmente utilizadas na quantificação destas substâncias. Contudo, para isso é necessário que seja realizada uma validação completa para confirmação dos resultados.

Os tetranortriterpenóides em óleo de “andiroba” foram quantificados por CLAE, resultando em cerca de 0,7% da massa do óleo total.

A metodologia analítica desenvolvida, com método de preparo de amostra e método de análise cromatográfica pode ser aplicada no controle da qualidade de óleo de “andiroba” quando este é utilizado com fins terapêuticos, ou ainda quando for insumo para medicamentos cuja ação terapêutica está baseada nas ações farmacológicas nos tetranortriterpenóides presentes no óleo de “andiroba”.

Os métodos analíticos também podem ser considerados como ponto de partida para o controle da qualidade de velas repelentes fabricadas a partir do bagaço de “andiroba”, bastando para isso que se desenvolva o método de preparo de amostra a partir deste produto, neste caso ainda, assim como para o óleo, o método de preparo de amostra pode estar baseado em uma extração em fase sólida.

Como não há metodologia analítica oficial para o controle destes produtos, esta é uma ferramenta importante na vigilância sanitária deste mercado, inclusive

para a detecção de adulterações.

Por outro lado este trabalho indica o uso de um tetranortriterpenóide como referência para o controle da qualidade mencionado e sugere uma metodologia para produção desta substância com pureza suficiente para ser utilizada como referência.

Como desdobramentos deste trabalho estão o estudo do 7-desacetoxi-7oxogedunina como SQR e a validação completa das metodologias desenvolvidas inclusive com estudo interlaboratorial, sendo possível sua inclusão como metodologia oficial. Por fim, com estas ferramentas mencionadas, realizar um estudo sobre a qualidade do óleo de “andiroba” à venda no mercado, detectando adulterações e garantindo a qualidade do produto.



## 7.0 Referências Bibliográficas

1)Abreu, F.R. et al. Utilization of metal complexes as catalysts in the transesterification of Brazilian vegetable oils with different alcohols. **Journal of Molecular Catalysis A**, v. 209, p. 29-33, 2004.

2)Albrasil

<http://www.001shop.com.br/lojas/albrasil.com.br/produtos.asp?produto=7&categoria=1&a2=Pernilongos%2FMoscas%2F+Mosquitos+&a1=Localize+por+categoria&inf=1>

Acessado dia 05/04/2007

3)Ambrozin, A.R.P. 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, 2006.

4)Araujo, P.W.; Brereton, R.G. Experimental Design I. Screening. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 15, n. 1, p. 26-31, 1996.

5)Araujo, P.W.; Brereton, R.G. Experimental Design II. Optimization. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 15, n. 2, p. 63-70, 1996.

6)Azam, M.M.; Waris, A.; Nahar, N.M. Prospects and potentials of fatty acid methyl esters of some non-traditional seed oils for use as biodiesel in India. **Biomass and Bioenergy**, v. 29, p. 293-302, 2005.

7)Barrek, S.; Paise, O.; Grenier-Loustalot, M.F. Analysis of neem oils by LC-MS and degradation kinetics of Azadirachtin-A in a controlled environment. Characterization of degradation products by HPLC-MS-MS. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 378, p. 753-763, 2004.

8)Bauch, J.; Dünisch, O. Comparison of growth dynamics and wood characteristics of plantation-grown and primary forest *Carapa guianensis* in Central Amazonia. **IAWA Journal**, v. 21, n. 3, p. 321-333, 2000.

9)Brasil. Resolução - RDC n° 136 de 29 de maio de 2003. Dispõe sobre o registro de medicamento novo. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Brasília, DF.

Disponível em:

<http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=79148word=>

Acessado em 05/03/2007.

10)Brasil. Resolução - RDC n° 210 de 04 de agosto de 2003. Determina a todos os estabelecimentos fabricantes de medicamentos, o cumprimento das diretrizes estabelecidas no Regulamento Técnico das Boas Práticas para a Fabricação de Medicamentos, conforme ao Anexo I da presente Resolução. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Brasília, DF.

Disponível em:

<http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=223218word=>

Acessado em 05/03/2007.

11)Brasil. Resolução - RDC n° 48 de 16 de março de 2004. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Brasília, DF. Disponível em:

<http://e->

[legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=102308word=Farmacovigilância](http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=102308word=Farmacovigilância)

Acessado em 05/03/2007.

12)Cloutier, D. et al. Chloroplast DNA variation of *Carapa guianensis* in the Amazon basin. **SILVAE GENETICA**, v. 54, n. 6, p. 270-274, 2005.

13)Cloutier, D. et al. Impact os selective logging on inbreeding and gene dispersal in an Amazonian tree population of *Carapa guianensis* Aubl. **Molecular Ecology**, v. 16, p. 797-809, 2007.

14)Connolly, J.D. et al. Tetranortriterpenoids-II Heartwood constituents of *Carapa guianensis* Aubl. **Tetrahedron**, v. 22, n. 3, p. 891-896, 1966.

- 15)Costa-Silva, J.H. et al. A toxicological evaluation of the effect of *Carapa guianensis Aublet* on pregnancy in Wistar rats. **Journal of Ethnopharmacology**, doi:10.1016/j.jep. 2007.02.004, 2007.
- 16)Costa, S.G.V.A.O. et al. Production of *Pseudomonas aeruginosa* LBI rhamnolipids following growth on Brazilian native oils. **Process Biochemistry**, v. 41 p. 483-488, 2006.
- 17)Dayanandan, S. et al. Population structure delineated with microsatellite markers in fragmented population of a tropical tree, *Carapa guianensis* (Meliaceae). **Molecular Ecology**, v. 8, p. 1585-1592, 1999.
- 18)DE CASTRO DEL CASTILHO M I. **Shampoo composition – contains ammonium lauryl sulphate, coconut amido propyl betaine, andiroba (sic) oil, hydroxyethyl cellulose and triethanolamine**. BR9301949-A, 20 may 1993, 28 sep 1993.
- 19)DE CASTRO DEL CASTILLO M I. **Hair conditioning cream – contains cetyl alcohol or lanolin, cationic surfactant, oil of andiroba (sic) and water**. BR9302004-A, 20 may 1993, 28 sep 1993.
- 20)DE CASTRO DEL CASTILLO M I. **Skin moistening cream – contains vegetable wax, urea. Propylene glycol, andiroba (sic) oil, etc**. BR9302006-A, 20 may 1993, 28 sep 1993.
- 21)DE CASTRO DEL CASTILLO M I. **Toilet soap composition – contains coconut oil, andiroba (sic) oil soda and water**. BR9302005-A, 20 may 1993, 28 sep 1993.
- 22)Duminil, J. et al. Blind population genetics survey of tropical rainforest trees. **Molecular Ecology**, v. 15, p. 3505-3513, 2006.
- 23)Dünisch, O.; Erbreich, M.; Eilers, T. Water balance and water potentials of a monoculture and enrichment plantation os *Carapa guianensis Aubl.* in the Central Amazon. **Forest Ecology and Management**, v. 172, p. 355-367, 2003.

24)Dünisch, O.; Schwarz, T.; Neves, E.J.M. Nutrient fluxes and growth of *Carapa guianensis Aubl.* in two plantation systems in the central Amazon. **Forest Ecology and Management**, v. 166, p. 55-68, 2002.

25)FIOCRUZ. Gilbert et al. **Inhibitor of the action of mosquito and other related insects – consists of volatile of guiana crabwood seed and fruit extract.** BR9800437-A, 22 jan 1998, 11 apr 2000.

26)FIOCRUZ. Henriques, M.D.G.M. et al. **Pharmaceutical compositions useful for treating allergic conditions, comprises oil extracted from seeds of *Carapa guianensis Aublet* and/or of tetranortriterpenoids, and vehicles.** WO2006007680-A1; BR200402875-A, 21 jul 2005, 26 jan 2006.

27)Fritz,J.S.; Macka, M. Solid-phase trapping of solutes for further chromatographic or electrophoretic analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 902, p. 137-166, 2000.

28)GEROLANO D Q. Gerolano D.Q. Gimenes, J.Q. **Andiroba cream for skin application – contains andiroba oil, beeswax and hydrogenated animal fat.** BR8605739-A, 21 nov 1986, 28 jun 1988.

29)Grdinić,V.; Vuković, J. Prevalidation in Pharmaceutical analysis Part I. Fundamentals and critical discussion. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 35, p. 489-512, 2004.

30)Hall, P.; Orrell, L.C.; Bawa, K.S. Genetic diversity and mating system in a tropical tree, *Carapa guianensis* (Meliaceae). **American Journal Botany**, v. 81, n. 9, p. 1104-1111, sept 1994.

31)Hallur,G.; Sivramakrishnan,A.; Bhat, S.V. Three New Tetranortriterpenoids from Neem Seed Oil. **Journal of Natural Products**, v. 65, p. 1177-1179, 2002.

- 32) Hammer, M.L.A.; Johns, E.A. Tapping an Amazonian plethora: four medicinal plants of Marajó Island, Pará (Brazil). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 40, p. 53-75, 1993.
- 33) Isman, M.B. et al. Insecticidal and Antifeedant Bioactivities of Neem Oils and Their Relationship to Azadirachtin Contents. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 38, p. 1406-1411, 1990.
- 34) Johnson, E.S.; Morgan, D. Comparison of chromatography systems for triterpenoids from Neem (*Azadirachta indica*) seeds. **Journal of Chromatography A**, v. 761, p. 53-63, 1997.
- 35) Kumar, J.; Parmar, B.S. Physicochemical and Chemical Variation in Neem Oils and Some Bioactivity Leads against *Spodoptera litura* F. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 44, p. 2137-2143, 1996.
- 36) LAB BIOLOGIE VEGETALE ROCHER YVES. Rolland, Y. Robin, J.R. **Cosmetic composition for treatment of cellulite comprises hydroalcoholic extracts of guarana, ginseng and a lipidic extract of andiroba**. FR2838054-A1, 04 apr 2002, 10 oct 2003.
- 37) LAB BIOLOGIE VEGETALE ROCHER YVES. Rouillard F. Crepin J. Saintigny G. **Use of lipidic extract of Andiroba as glucose-6-phosphate dehydrogenase inhibitor - applied topically to prevent formation of cellulite**. EP872244-A; EP872244-A1; FR2761888-A1; NO9801657-A; JP10287546-A; CA2235057-A; US5958421-A; MX9802863-A1; EP872244-B1; DE69824910-E; DE69824910-T2. 14 apr 1997, 16 oct 1998.
- 38) Lavie, D.; Levy, E.C.; Zelnik, R. The constituents of *Carapa guianensis* Aubl. and their biogenetic relationship. **Bioorganic Chemistry**, v. 2 n. 1, p. 59-64, september 1972.

- 39)LION CORP. **External compositions contains plant extract(s) of *Manikara*, *Simarouba*, *Alexa*, *Astronium*, *Vochysia*, *Tachigalia*, *Holopyxidium spp.*, and/or *Carapa guianensis*, for cosmetics, and improving body functions.** JP2001151634-A, 25 nov 1999, 05 jun 2001.
- 40)LION CORP. **White hair preventing and improving agent for use as cosmetics such as cream, lotion, emulsion, liniment, hair tonic, comprises, plants e.g. *Urtica*, *Rosa*, multi-flora, *Valeriana*, *Camellia*, and/or plant extracts.** JP2002020243-A, 06 jul 2000, 23 jan 2002.
- 41)MACHADO O F. Machado, O. F. **Insect repellent and natural aromatization unit for volatilisation in electrical apparatus involves electrical heating of cellulose pastille impregnated with oil of andiroba, oil of eucalyptus and solvent.** BR200103768-A, 14 aug 2001, 05 aug 2003.
- 42)Marcelle, G.B.; Mootoo, B.S. Tetranortriterpenoids from the heart wood of *Carapa guianensis*. **Phytochemistry**, v. 14, n. 12, p.2717-2718, december, 1975.
- 43)Mendonça, F.A.C. et al. Activities of some Brazilian plants against larvae of the mosquito *Aedes Aegypti*. **Fitoterapia**, v. 76, p. 629-636, 2005.
- 44)Miot, H.A. et al. Comparative study of the topical effectiveness of the andiroba oil (*Carapa guianensis*) and DEET 50% as repellent for *Aedes sp.* **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 46, n. 5, p. 253-256, september-october, 2004.
- 45)Mohanty,S.; Patra, A.K.; Chhonkar,P.K. Neem (*Azadirachta indica*) seed kernel powder retards urease and nitrification activities in different soils at contrasting moisture and temperature regimes. **Bioresource Technology**, doi:10.1016/j.biortech.2007.01.006, 2007.
- 46)MOREIRA M C. Moreira M.C. **Cream for vitiligo treatments consists of a urea oil sorbitol and acid based blend destroyng melanocytes.** BR9802636-A, 23 jul 1998, 21 mar 2000.

- 47)Nanang, D.M. Suitability of the Normal, Log-normal and Weibull distributions for fitting diameter distributions of neem plantations in Northern Ghana. **Forest Ecology and Management**, v. 103, p. 1-7, 1998.
- 48)Nathan, S.S. et al. The toxicity and behavioural effects of neem limonoids on *Cnaphalocrocis medinalis* (Guenée), the rice leaffolder. **Chemosphere**, v. 62, p. 1381-1387, 2006.
- 49)Ollis, W.D. et al. Andirobin. **Tetrahedron**, v. 26, n. 7, p. 1637-1645, 1970.
- 50)Orsa Florestal,  
<http://www.orsaflorestal.com.br/web/pt/produtos/naomadeireiros/oleoandiroba.htm>  
Acessado dia 05/04/2007.
- 51)Patra,A.K. et al. Effects of partial replacement of dietary protein by a leaf meal mixture on nutrient utilization by goats in pre- and late gestation. **Small Ruminant Research**, v. 63, p. 66-74, 2006.
- 52)Penido, C. et al. Anti-allergic effects of natural tetranortriterpenoids isolated from *Carapa guianensis Aublet* on allergen-induced vascular permeability and hyperalgesia. **Inflammation Research**. v. 54, p. 295-303, 2005.
- 53)\_\_\_\_\_ et al. Inhibition of allergen-induced eosinophil recruitment by natural tetranortriterpenoids is mediated by the suppression of IL-5, CCL11/eotaxin and NF $\kappa$ B activation. **International Immunopharmacology**, v. 6, p.109-121, 2006. (a)
- 54)\_\_\_\_\_ et al. Antiinflammatory effects of natural tetranortriterpenoids isolated from *Carapa guianensis Aublet* on zymosan-induced arthritis in mice. **Inflammation Research**. v. 55, p. 457-464, 2006. (b)
- 55)Pereira, J.F.G. **Estudo químico e biológico de *Carapa guianensis* Aubl.** Rio de Janeiro: UFRJ, 1998. 262p. il. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Química, Rio de Janeiro.

- 56)Poole,F.C.; Gunatilleka, A.D.; Sethuraman, R. Contributions of theory to method development in solid-phase extraction. **Journal of Chromatography A**, v. 885, p. 17-39, 2000.
- 57)Prakash,G.; Srivastava, A.K. Azadirachtin production in stirred tank reactors by *Azadirachta indica* suspension culture. **Process Biochemistry**, v. 42, p. 93-97, 2007.
- 58)Prakash,G.; Srivastava, A.K. Modeling of Azadirachtin production by *Azadirachta indica* and its use for feed forward optimization studies. **Biochemical Engineering Journal**, n. 29 p. 62-68, 2006.
- 59)Qi, S. H. et al. A novel flavane from *Carapa guianensis*. **Acta Botanica Sinica**, v. 45, n. 9, p.1129-1133, sept 2003.
- 60)Qi, S. H. et al. Constituents of *Carapa guianensis Aubl.* (Meliaceae). **Pharmazie**, v. 59, n. 6, p.488-490, jun 2004.
- 61)Ramesh, A.; Balasubramanian, M. Rapid preconcentration method for the determination of azadirachtin-A and -B, nimbin, salannin in neem oil samples by using graphitised carbon solid phase extraction. **The Analyst**, v, 124, p. 19-21, 1999.
- 62)Ribani, M. et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Quimica Nova**, v. 27 , n. 5, p. 771-780, 2004.
- 63)Rocha Junior, L.C.; Ferreira, M.S.; Ramos, A.C.S. Inhibition of asphaltene precipitation in Brazilian crude oils using new oil soluble amphiphiles. **Journal of Petroleum Science and Engineering**, v. 51 p. 26-36, 2006.
- 64)Satdive,R.K.; Fulzele,D.P.; Eapen,S. Enhanced production of Azadirachtin by hairy root cultures of *Azadirachta indica* A. Juss by elicitation and media optimization. **Journal of Biotechnology**. v. 128, p.281-289, 2007.



- 65) Scarano, F.R.; Pereira, T.S. Rôças, G. Seed germination during floatation and seedling growth of *Carapa guianensis*, a tree from flood-prone forest of the Amazon. **Plant Ecology**, v. 168, p. 291-296, 2003.
- 66) Sharma, S. et al. An Efficient Method for the Purification and Characterization of Nematicidal Azadirachtins A, B, and H, using MPLC and ESIMS. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 51, p. 3966-3972, 2003.
- 67) Silva, H.; Crill, P.; Keller, M. CO<sub>2</sub> flux from coarse woody debris from a tropical forest at the FLONA Tapajos, Brazil. American Geophysical Union. In. **Fall Meeting 2004**, abstract #B43A-0138.
- 68) Silva, O. S. et al. Larvicidal effect of andiroba oil, *Carapa guianensis* (Meliaceae), against *Aedes Aegypti*. **Journal American Mosquito Control Association**, v. 22, n. 4, p. 699-701, dec 2006.
- 69) Silva, O. S. et al. The use of andiroba *Carapa guianensis* as larvicide against *Aedes albopictus*. **Journal American Mosquito Control Association**, v. 20, n. 4, p. 456-457, dec 2004.
- 70) Simões, C.M.O. et al. **Farmacognosia da Planta ao Medicamento**. 3 ed. Editora da Universidade Federal de Santa Catarina; Editora da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, p. 760, 2001. 833p.
- 71) Tappin, M.R.R. et al. Análise química quantitativa para a padronização do óleo de Copaíba por cromatografia em fase gasosa de alta resolução. **Química Nova**, v. 27, n. 2, p.236-240, 2004.
- 72) Taverniers, I.; De Loose, M. Van Bockstaele, E. Trends in quality in the analytical laboratory. II. Analytical method validation and quality assurance. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 23, n. 8, p. 535-552, 2004.

73)Teófilo, R.F. Ferreira, M.M.C. Quimiometria II: Planilhas eletrônicas para cálculos de planejamentos experimentais, um tutorial. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 338-350, mar/abr 2006.

74)Tewari,V.P.; Kumar,V.S.K. Development of top height model and site index curves for *Azadirachta indica* A. juss. **Forest Ecology and Management**, v. 65, p. 67-73, 2002.

75)Tonini, H.; Arcoverde, M.F. Morfologia da copa para avaliar o espaço vital de quatro espécies nativas da Amazônia. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 40, n. 7, p. 633-638, jul. 2005.

76)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>**

## Anexo I

# Espectros de Ressonância Magnética Nuclear de Próton e Carbono 13

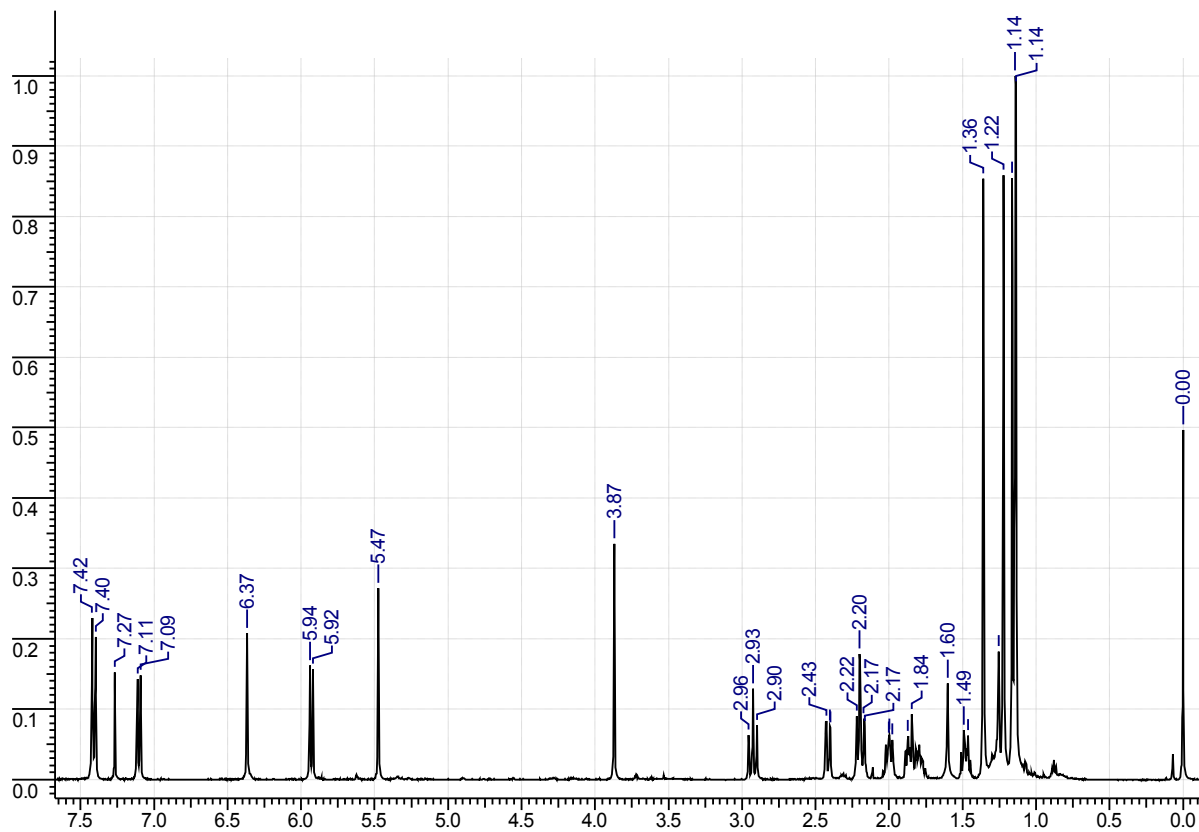


Figura A1: Espectro de próton do padrão de 7-desacetoxi-7-oxogedunina.

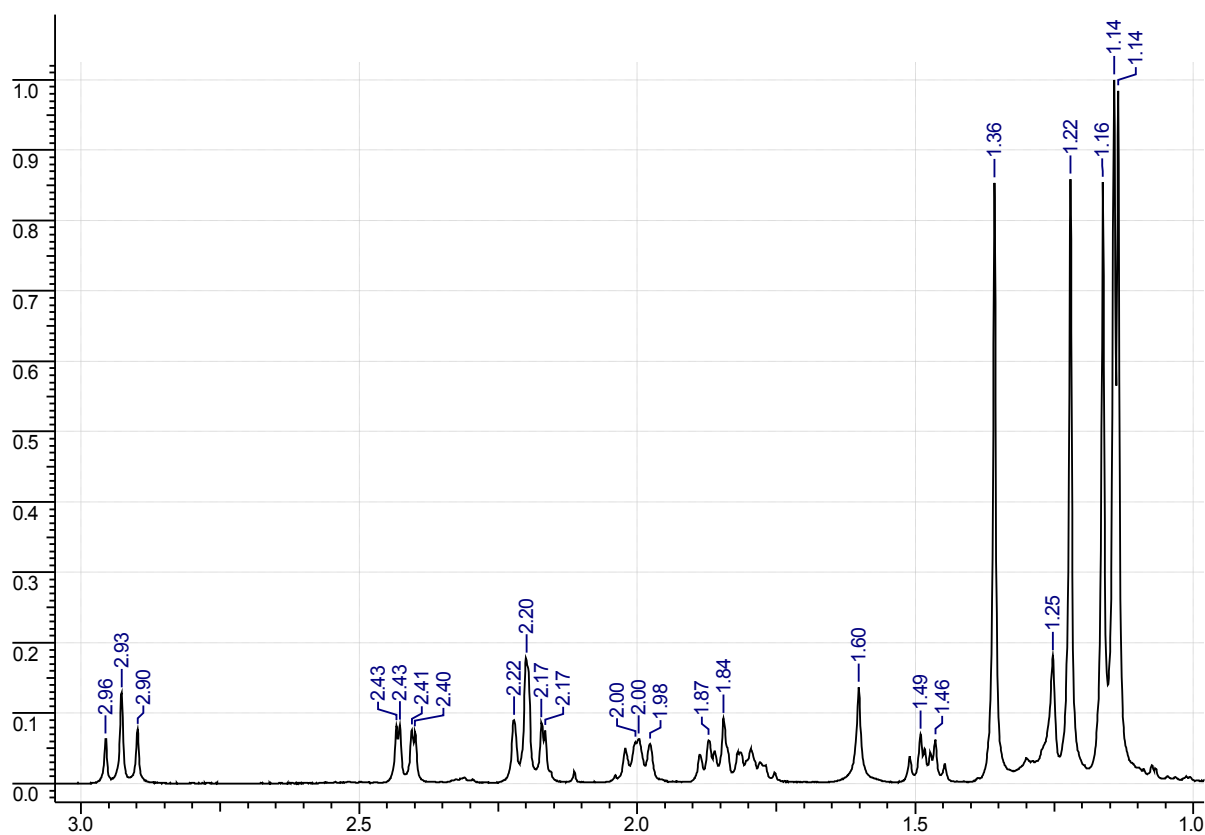


Figura A2: Detalhe do espectro de próton do padrão de 7-desacetoxi-7-oxogedunina

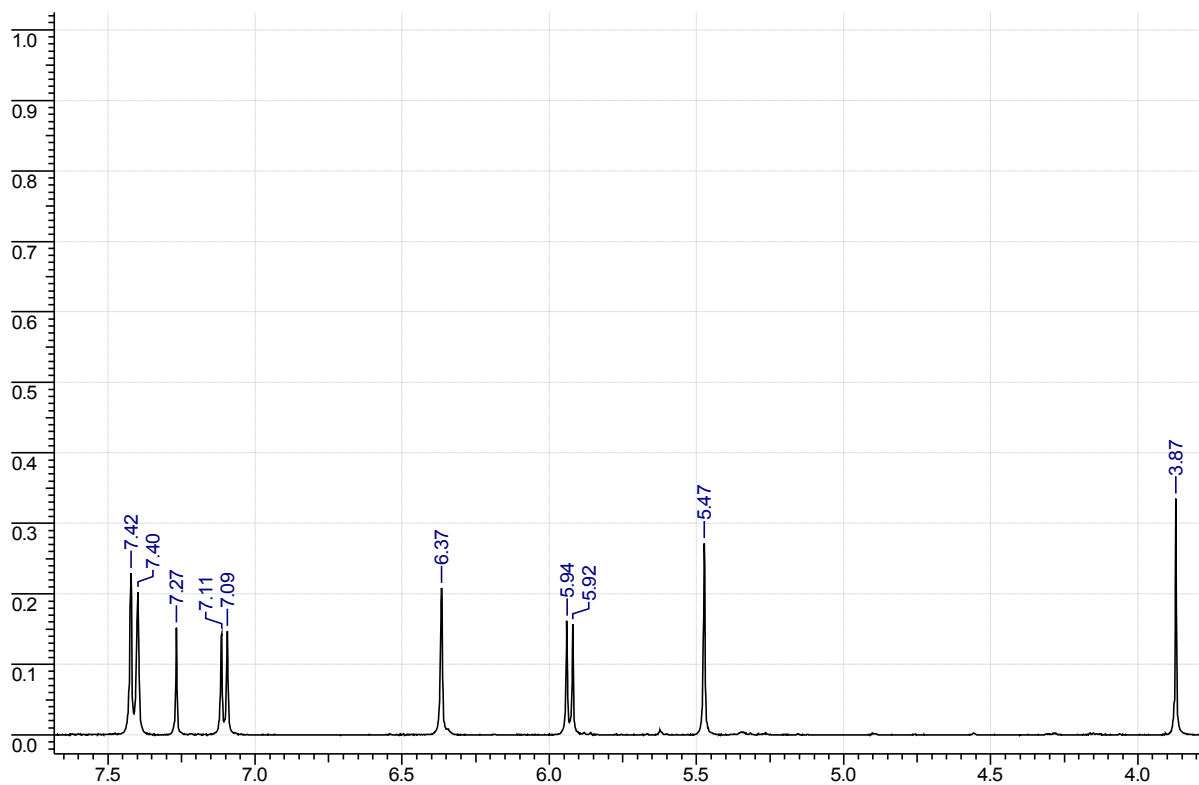


Figura A3: Detalhe do espectro de próton do padrão de 7-desacetoxi-7-oxogedunina

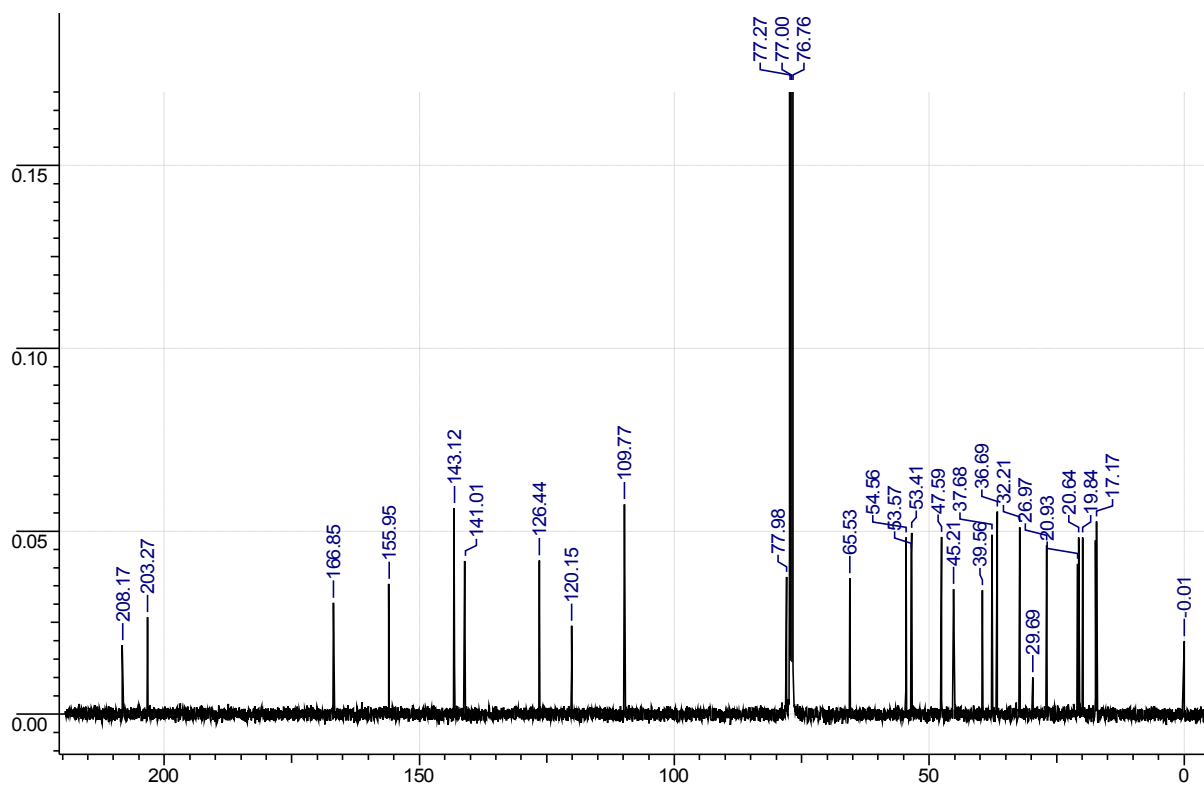


Figura A4 Espectro de Carbono 13 do padrão de 7-desacetoxi-7-oxogedunina.

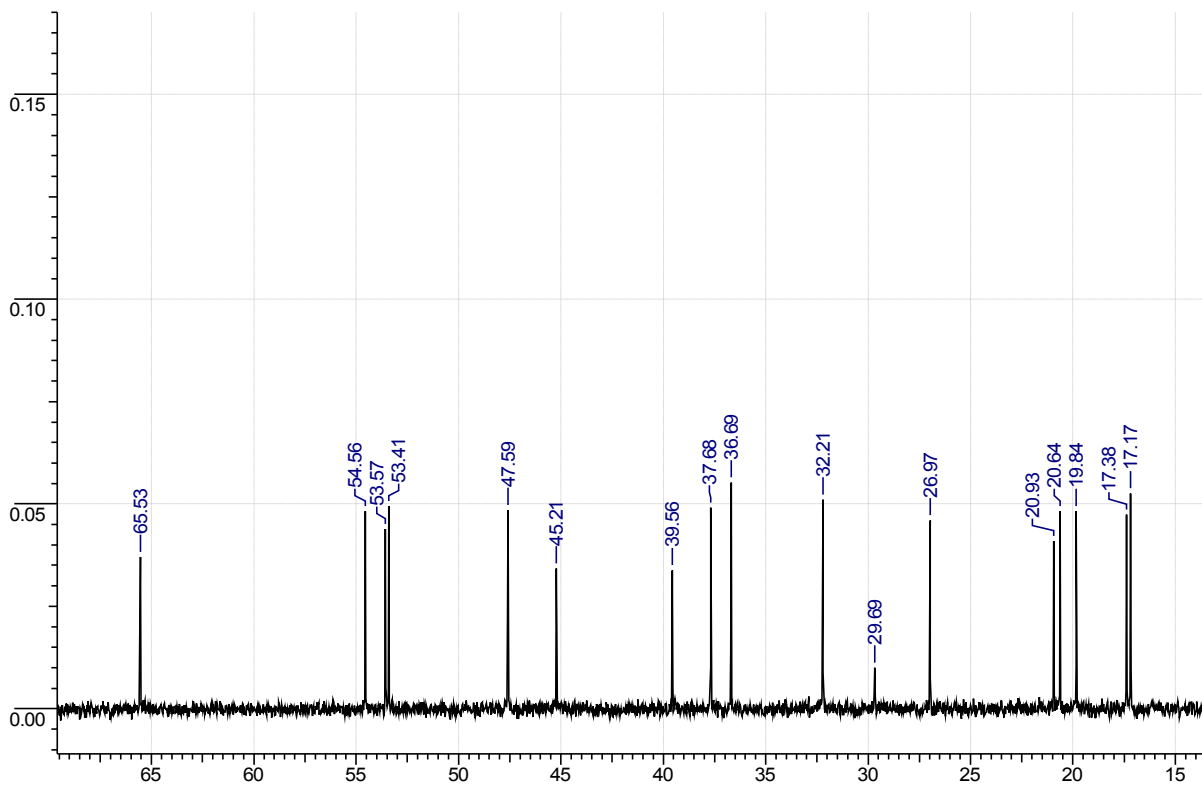


Figura A5: Detalhe do espectro de Carbono 13 do padrão de 7-desacetoxi-7-oxogedunina.

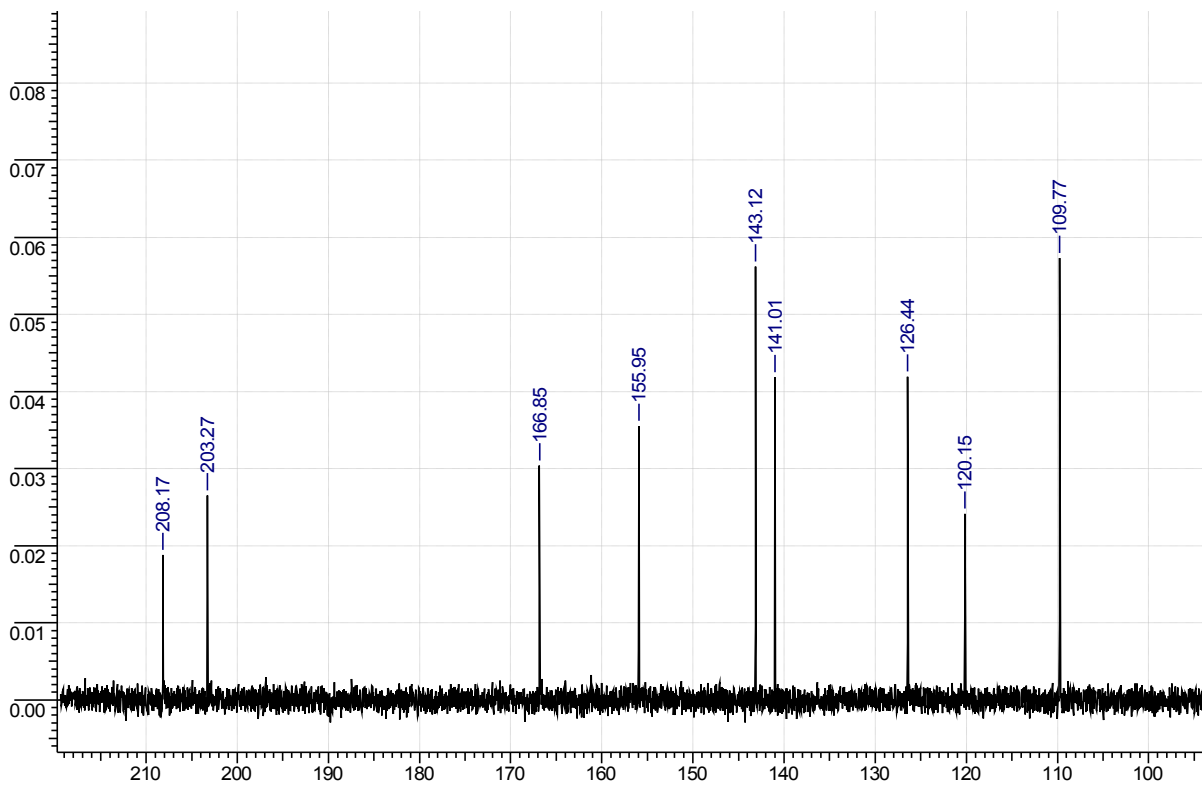


Figura A6: Detalhe do espectro de Carbono 13 do padrão de 7-desacetoxi-7-oxogedunina.