

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

Desenvolvimento e validação de métodos analíticos para determinação do teor de atropina em folhas de *Atropa belladonna* (L.) SOLANACEAE.

MARIANA KOETZ

PORTO ALEGRE, 2017

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

Desenvolvimento e validação de métodos analíticos para determinação do teor de atropina em folhas de *Atropa belladonna* (L.) SOLANACEAE.

Dissertação apresentada por **Mariana Koetz** para obtenção do GRAU DE MESTRE em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Profa. Dr. Amélia Teresinha Henriques

PORTO ALEGRE, 2017

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Mestrado Acadêmico da Faculdade de Farmácia Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 27 de março de 2017, pela banca examinadora constituída por:

Prof. Dr. Martin Steppe

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa Dr. Renata Biegelmeier da Silva Rambo

Universidade Federal da Bahia

Dr. Luiz Carlos Klein Júnior

Universidade do Vale do Itajaí

Koetz, Mariana

Desenvolvimento e validação de métodos analíticos para determinação do teor de atropina em folhas de *Atropa belladonna* (L.) SOLANACEAE. / Mariana Koetz. - 2017. 141 f.

Orientadora: Amélia Teresinha Henriques.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, BR-RS, 2017.

1. *Atropa Belladonna* L.. 2. Atropina. 3. Controle de Qualidade. 4. Cromatografia. 5. Otimização de Extração. I. Henriques, Amélia Teresinha, orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Agradecimentos à Farmacopeia Brasileira (ANVISA) e ao Laboratório de Farmacognosia da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul que disponibilizaram os recursos, equipamentos e materiais necessários para a realização dos experimentos práticos na elaboração da presente dissertação.

Dedico este trabalho ao meu filho, Vitor Koetz
Viegas, maior presente e alegria que a vida me trouxe.

Agradecimentos

À Professora Dr^a. Amélia T. Henriques pela oportunidade, orientação, confiança, incentivo e respeito. Serei sempre muito grata.

À professora Dr^a. Miriam Appel por toda a disponibilidade e ensinamentos durante a execução deste projeto.

À colega de trabalho Maria Julia L. dos Santos por todo o apoio e incentivo para iniciar este trabalho.

Às bolsistas de iniciação científica Kathleen Austurian, Thamires Almeida e Natally Toson pelo incansável apoio as minhas ideias e execução das mesmas, obrigada pela amizade, apoio e confiança.

Às amigas Marina Scopel, Melissa Schwanz e Letícia J. Danielli pela colaboração no trabalho, troca de conhecimentos, ensinamentos e por não medirem esforços sempre que precisei. Sou muito agradecida por tê-las na minha vida.

À minha amiga, mais que especial, Marí Castro, por todo o apoio, por todas as horas incansáveis de experimentos, pela companhia e pelas risadas. Jamais esquecerei cada gesto e palavra de apoio, conforto e amizade que recebi.

A todos os colegas do laboratório, com quem convivi neste período, trocando experiências, compartilhando conhecimentos diariamente e que me apoiaram e incentivaram. Obrigada Krissie Soares, Caroline Lacerda, Paula Dias, Angélica Vestena, Andressa Reis, Elen Oliveira, Andressa Prestes, Júlia Zanotto, Renata Biegelmeyer, Douglas Rambo, Juliana Andrade, Luiz Klein, Marcos Afonso, Bruno Sleifer e Prof. Dr. José Ângelo.

À família do meu esposo, por toda torcida pelo meu sucesso. Em especial à Quélita, Luciana e Luci por tantas demonstrações de carinho e apoio nesse período.

Ao meu pai, Renê, que deixou em mim tudo que precisei para chegar aqui e ir além, e minha mãe, Irene que me ensinou e ensina a ser forte, perseverante e que é meu exemplo de dedicação. Obrigada mãe por entender minhas ausências, te amo.

Às minhas irmãs, Ana Paula e Sabrina, meus exemplos de determinação, força e coragem. Juntas somos uma só. Amo vocês.

Ao meu esposo Rodrigo, pelo amor, pela dedicação, pela presença, por não medir esforços em tudo que foi necessário para que eu concluísse este trabalho. Meu amor, meu amigo, nada disso seria possível sem ti. Juntos, eu tu e nosso filho amado Vitor, iremos ainda mais longe. Meu amor por vocês é imenso.

“Tudo é uma questão de manter: a mente quieta, a espinha ereta e o coração tranquilo.” (Walter Franco)

RESUMO

A atropina é um alcaloide conhecido pela inibição da acetilcolina e como substância antimuscarínica e está presente em folhas de algumas espécies da família Solanaceae, e, em especial, da *Atropa belladonna* L. A importância da produção de fitoterápicos na indústria farmacêutica tem impulsionado estudos científicos no sentido de desenvolver metodologias analíticas para quantificação de marcadores químicos, presentes em drogas vegetais, e que atendam os parâmetros de controle de qualidade da legislação vigente. Assim, neste trabalho, diferentes metodologias para quantificação da atropina (marcador químico predominante nas folhas de *A. belladonna*) foram desenvolvidas e validadas. Os métodos propostos por Cromatografia em Camada Delgada de Alta Eficiência (CCDAE), Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência (CLAE) e Cromatografia a Líquido de Ultra Eficiência (CLUE) foram validados comprovando ter especificidade/seletividade, linearidade, precisão, exatidão e robustez e adequando-se à legislação vigente. Além disso, diferentes métodos de extração foram propostos. Para o primeiro método de análise (CCDAE), uma extração com ácido diluído (H_2SO_4 0,5 mol/L), seguida de extração líquido-líquido foi utilizada, resultando em teor médio de 0,2913 % de atropina. Para o segundo (CLAE), uma extração com solvente apolar (metanol p.a.) foi proposta, seguida também de extração líquido-líquido e com teor médio de 0,2660 % do ativo. No terceiro (CLUE), otimização de extração foi realizada através de Desenho Fatorial Fracionado, seguido de Desenho Box-Behnken, resultando em extração realizada pela mistura de solvente apolar e água (metanol 47 %), seguido de uma extração em fase sólida (sílica) e um teor de atropina médio de 0,3343 %. Um extrato otimizado foi analisado nos três métodos, resultando em teores de atropina iguais a 0,2905, 0,3598 e 0,3343 % para CCDAE, CLAE e CLUE, respectivamente. A revisão da monografia do material vegetal, com ensaios de identificação e físico-químicos, juntamente com a metodologia de doseamento por Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência foi proposta com o objetivo de atualizar as metodologias que hoje compõe o roteiro de controle de qualidade da espécie na Farmacopeia Brasileira, que está em sua 5ª edição.

Palavras-chave: *Atropa belladonna* L.; Atropina; Controle de Qualidade; Cromatografia; Otimização.

ABSTRACT

Atropine is an alkaloid known for acetylcholine inhibition and as antimuscarinic substance and is present in leaves of some species of the family Solanaceae, and especially of *Atropa belladonna* L. The importance of the production of herbal medicines in the pharmaceutical industry has driven scientific studies to develop analytical methods for quantification of chemical markers, present in herbal drugs, and that meet the quality control parameters of the current legislation. Thus, in this work, different methodologies for quantification of atropine (chemical marker predominant in the leaves of *A. belladonna*) were developed and validated. The methods proposed by High Performance Thin-layer Chromatography (HPTLC), High Performance Liquid Chromatography (HPLC) and Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC) were validated proving to have specificity/selectivity, linearity, precision, accuracy and robustness, and conforming to legislation. In addition, different extraction methodologies were proposed. For the first method of analysis (CCDAE), extraction with dilute acid (H_2SO_4 0.5 mol/L) followed by liquid-liquid extraction was used, resulting in an average content of 0.2913% atropine. For the second (HPLC), extraction with apolar solvent (methanol p.a.) was proposed, followed also by liquid-liquid extraction and with an average content of 0.2660% of the active. In the third (CLUE), optimization of extraction was done through Fractional Factorial Design, followed by Box-Behnken Design resulting in extraction by the apolar solvent mixture and Water (47% methanol), followed by solid phase extraction (silica) and an average atropine content of 0.3343%. An optimized extract was analyzed in three methods, resulting in atropine levels equal to 0.2905, 0.3598 and 0.3334 % for HPTLC, HPLC and UPLC, respectively. The review of the monograph of the plant material, with identification and physicochemical tests, together with the methodology of determination by HPLC was proposed with the objective of updating the methodologies that today compose the roadmap of quality control of specie in Brazilian Pharmacopoeia, which is in its 5th edition.

Key-words: *Atropa belladonna* L.; Atropine; Quality control; Chromatography; Optimization.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1: Estrutura química da atropina (a) e da escopolamina (b).....	37
Figura 1.2: Características Físico-químicas dos alcaloides – solubilidade e pH.	38
Figura 2.1: Esquema de análise por CCDAE.	50
Figura 2.2: Material vegetal obtido comercialmente. (a) Catedral; (b) Phytolab	52
Figura 2.3: Preparo dos extratos para análise por CCDAE.....	54
Figura 2.4: Esquema de cores do ensaio de presença de AT. (a) antes da adição de KOH alcoólico; (b) durante a adição de KOH alcoólico; (c) após adição de KOH alcoólico.	59
Figura 2.5: Espectro de varredura no ultravioleta da solução de atropina a 600 µg/mL.	60
Figura 2.6: Densitogramas obtidos para o método desenvolvido por CCDAE.	61
Figura 2.7: Comparativo de Espectros UV da solução SQR e amostra - CCDAE.....	62
Figura 2.8: (a) Picos das bandas da amostra AB-01; (b) Picos das bandas da amostra AB-01+SQR atropina base livre - CCDAE.....	63
Figura 2.9: Gráfico da curva média de padrão de atropina obtida nos dias 1,2 e 3 da linearidade, equação da reta e coeficiente de regressão. (a) curva traçada em 2D; (b) curva em 3D.....	64
Figura 3.1: Esquema de funcionamento – CLAE. (WATERS).....	72
Figura 3.2: Material vegetal obtido comercialmente. (a) Healthy Life; (b) Martin Bauer Group	74
Figura 3.3: Preparo dos extratos para análise por CLAE.....	78
Figura 3.4: Resultado do ensaio de Identificação por CCD. (PA) – Padrão Atropina; (PE) – Padrão Bromidrato de Escopolamina; (AB-01 a AB-04): Extratos das Amostras.	82
Figura 3.5: Cromatogramas obtidos para o método desenvolvido por CLAE. (a) solução SQR; (b) amostra AB-01.....	85
Figura 3.6: Comparativo de Espectros UV: (a) amostra AB-01; (b) SQR - CLAE.	85
Figura 3.7: (a) Picos das bandas da amostra AB-01; (b) Picos das bandas da amostra	86
Figura 3.8: Gráfico da curva média de padrão de atropina obtida nos dias 1,2 e 3 da linearidade, equação da reta e coeficiente de regressão.	87
Figura 4.1: Representação de DBB com três fatores.	96
Figura 4.2: Funcionamento do CLUE. (WATERS)	97
Figura 4.3: Preparo dos extratos para análise por CLUE.....	100
Figura 4.4: Cromatogramas obtidos para o método desenvolvido por CLUE. (a) solução SQR; (b) amostra AB-01.....	105
Figura 4.5: Curva da SQR utilizada no FFD e DBB - CLUE.....	107
Figura 4.6: Gráfico de Pareto gerado no software a partir dos resultados do DFF.	108
Figura 4.7: Gráficos dos efeitos das interações dos fatores analisados no DFF.....	109
Figura 4.8: Gráfico dos efeitos individuais dos fatores analisados no DFF.	109
Figura 4.9: Gráficos de Contorno que demonstram a influência dos fatores. (A) % metanol; (B) Relação m/s e (C) N° renovações.....	111
Figura 4.10: Gráficos de Superfície de Resposta que demonstram a influência dos fatores. (A) % metanol; (B) Relação m/s e (C) N° renovações.....	111

Figura 4.11: Gráfico da resposta otimizada para extração, via Minitab 17.	112
Figura 4.12: Comparativo de Espectros UV. (a) amostra; (b) SQR – CLUE.....	114
Figura 4.13: (a) Amostra AB-01; (b) Amostra AB-01+SQR - CLUE.....	114
Figura 4.14: Gráfico da curva média de padrão de atropina obtida nos dias 1,2 e 3 da linearidade, equação da reta e coeficiente de regressão - CLUE.....	115
Figura 4.15: Gráfico da curva média de padrão de atropina obtida nos dias 1,2 e 3 da linearidade, equação da reta e coeficiente de regressão - CLUE.....	115

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1: Publicações de otimização de extração de metabólitos em material vegetal.....	40
Tabela 1.2: Monografias da <i>A. belladonna</i> em Compêndios Oficiais	44
Tabela 1.3: Quantificação de atropina e escopolamina por CLAE descritos na literatura.	45
Tabela 2.1: Publicações recentes de CCDAE em drogas vegetais.....	51
Tabela 2.2: Parâmetros desenvolvidos para análise por CCDAE.	55
Tabela 2.3: Parâmetros avaliados na etapa de robustez - CCDAE.....	58
Tabela 2.4: Resultado da determinação de água para amostra AB-01.....	60
Tabela 2.5: Dados obtidos a partir da média das áreas dos dias 1,2 e 3 da linearidade - CCDAE.....	64
Tabela 2.6: Análise de variância (ANOVA) para os dados de linearidade da curva padrão de atropina.	64
Tabela 2.7: Resultados para teor de atropina na etapa de precisão - CCDAE	65
Tabela 2.8: Resultados obtidos na etapa de exatidão - CCDAE	66
Tabela 2.9: Resultados obtidos na etapa de robustez - CCDAE.....	66
Tabela 2.10: Resultados da adequabilidade do sistema - CCDAE.	67
Tabela 3.1: Parâmetros desenvolvidos para análise por CLAE.	79
Tabela 3.2: Parâmetros avaliados na etapa de robustez - CLAE.....	81
Tabela 3.3: Resultados de matéria estranha para as amostras AB-01, AB-02, AB-03 e AB-04.	83
Tabela 3.4: Resultados de cinzas totais para as amostras AB-01, AB-02, AB-03 e AB-04.	83
Tabela 3.5: Resultados da determinação de água para as amostras AB-01, AB-02, AB-03 e AB-04.	84
Tabela 3.6: Dados obtidos a partir da média das áreas dos dias 1,2 e 3 da linearidade - CLAE.....	87
Tabela 3.7: Análise de variância (ANOVA) para os dados de linearidade da curva padrão de atropina - CLAE.....	87
Tabela 3.8: Resultados para teor de atropina na etapa de precisão - CLAE	88
Tabela 3.9: Resultado das análises Interlaboratoriais.....	89
Tabela 3.10: Resultados obtidos na etapa de exatidão - CLAE	90
Tabela 3.11: Resultados obtidos na etapa de robustez - CLAE.....	90
Tabela 3.12: Resultados da adequabilidade do sistema - CLAE.....	91
Tabela 3.13: Resultados do doseamento das amostras comerciais	91
Tabela 4.1: Parâmetros desenvolvidos para análise por CLAE.	98
Tabela 4.2: Desenho Fatorial Fracionário 2^{5-1} avaliando cinco fatores: (A) Granulometria (μm); (B) % solvente; (C) Relação droga:solvente (m/v); (D) Número de renovações e (E) Tempo (min).....	101
Tabela 4.3: Desenho Box-Behnken avaliando três fatores: (A) % solvente; (B) Relação droga:solvente (m/s); (C) Número de renovações.....	102
Tabela 4.4: Parâmetros avaliados na etapa de robustez - CLUE.....	104
Tabela 4.5: Resultados obtidos com diferentes métodos e solventes na extração.	105
Tabela 4.6: Resultado da extração realizada por SPE.....	106

Tabela 4.7: Dados obtidos no CLUE para curva de padrão de atropina.....	106
Tabela 4.8: Resposta obtida para cada experimento realizado no DFF. (A) Granulometria (μm); (B) % solvente; (C) Relação droga:solvente (m/v); (D) Número de renovações e (E) Tempo (min).	107
Tabela 4.9: Resposta obtida para cada experimento realizado no DBB. (A) % solvente; (B) Relação droga:solvente (m/s); (C) Número de renovações.	110
Tabela 4.10: Parâmetros otimizados para extração de atropina em folhas de A. belladonna	112
Tabela 4.11: Resultados obtidos na validação do DBB.	113
Tabela 4.12: Dados obtidos a partir da média das áreas dos dias 1,2 e 3 da linearidade - CLUE	115
Tabela 4.13: Análise de variância (ANOVA) para os dados de linearidade da curva padrão de atropina - CLUE	115
Tabela 4.14: Resultados para teor de atropina na etapa de precisão - CLAE	116
Tabela 4.15: Resultados obtidos na etapa de exatidão - CLAE.....	117
Tabela 4.16: Resultados obtidos na etapa de robustez - CLUE	118
Tabela 4.17: resultados da adequabilidade do sistema - CLUE.	118
Tabela 4.18: Resultado do doseamento do extrato otimizado por CCDAE, CLAE e CLUE.	119

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 2.1: Cálculo para determinação do percentual de perda de água.....	53
Equação 2.2: Cálculo para determinação do Limite de Detecção.....	56
Equação 2.3: Cálculo para determinação do Limite de Quantificação.....	56
Equação 2.4: Cálculo para determinação do teor recuperado da SQR.....	57
Equação 2.5: Cálculo para determinação do teor de atropina.....	58
Equação 2.6: Cálculo para determinação do coeficiente de variação.....	59
Equação 3.1: Cálculo para determinação de Matéria Estranha.....	76
Equação 3.2: Cálculo para determinação de Cinzas Totais.....	76
Equação 3.3: Cálculo do número de pratos teóricos (N).....	81

LISTA DE ABREVIATURAS

AT – Alcaloides Tropânicos

CCDAE – Cromatografia em Camada Delgada de Alta Eficiência

CG – Cromatografia a Gás

CLAE – Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência

CLUE - Cromatografia a Líquido de Ultra Eficiência

DBB – Desenho Box-Behnken

DF – Desenho Fatorial

DFF – Desenho Fatorial Fracionado

EFS – Extração em fase Sólida

ELL – Extração Líquido-líquido

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	27
OBJETIVOS GERAIS	31
1. REVISÃO DA LITERATURA.....	35
1.1 Aspectos Químicos e Físico-químicos	37
1.2 Métodos de Extração e Limpeza.....	38
1.3 Otimização de Extração.....	39
1.4 Desenvolvimento e Validação de Metodologias Analíticas.....	40
1.5 Análise Quantitativa de Alcaloides Tropicânicos	43
1.5.1 Compêndios Oficiais	43
1.5.2 Métodos Desenvolvidos	44
2. DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA DE ALTA EFICIÊNCIA (CCDAE).....	47
2.1 Introdução	49
2.2 Objetivo Específico.....	51
2.3 Materiais e Métodos.....	51
2.3.1 Material Vegetal, Solventes, Reagentes e Materiais.....	51
2.3.2 Ensaio de identificação para presença de Alcaloides Tropicânicos.....	52
2.3.3 Perfil ultravioleta e Determinação de água.....	53
2.3.4 Preparo dos extratos	53
2.3.5 Desenvolvimento do método	55
2.3.6 Validação	55
2.4 Resultados e Discussão.....	59
2.4.1 Ensaio de identificação para presença de Alcaloides Tropicânicos.....	59
2.4.2 Perfil ultravioleta da amostra e Determinação de água.....	59
2.4.3 Desenvolvimento do Método.....	60
2.4.4 Validação	62
2.5 Conclusão.....	68
3. REVISÃO DA MONOGRAFIA PARA A FARMACOPEIA BRASILEIRA E DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO POR CROMATOGRAFIA A LÍQUIDO DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE).....	69
3.1 Introdução	71
3.2 Objetivos Específicos.....	73
3.3 Materiais e Métodos.....	73
3.3.1 Material Vegetal, Solventes, Reagentes e Materiais.....	73
3.3.2 Ensaio de identificação para presença de Alcaloides Tropicânicos.....	74
3.3.3 Identificação por Cromatografia em Camada Delgada (CCD)	74
3.3.4 Determinação do Teor de Matéria Estranha	75
3.3.5 Determinação de Cinzas Totais	76
3.3.6 Determinação de Água.....	76
3.3.7 Preparo dos extratos	77
3.3.8 Desenvolvimento do método	78
3.3.9 Validação	79
3.3.10 Doseamento das Amostras Comerciais	82
3.4 Resultados e Discussão.....	82
3.4.1 Ensaio de identificação para presença de Alcaloides Tropicânicos.....	82

3.4.2	Identificação por Cromatografia em Camada Delgada (CCD)	82
3.4.3	Determinação do Teor de Matéria Estranha	83
3.4.4	Determinação de Cinzas Totais	83
3.4.5	Determinação de água	84
3.4.6	Desenvolvimento do Método	84
3.4.7	Validação	85
3.4.8	Doseamento das Amostras Comerciais	91
3.5	Conclusão	92
4.	OTIMIZAÇÃO DE EXTRAÇÃO, DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO POR CROMATOGRÁFIA A LÍQUIDO DE ULTRA EFICIÊNCIA (CLUE) 93	
4.1	Introdução	95
4.2	Objetivos Específicos	97
4.3	Materiais e Métodos	97
4.3.1	Material Vegetal, Solventes, Reagentes e Materiais	97
4.3.2	Desenvolvimento do Método	98
4.3.3	Preparo dos Extratos	98
4.3.4	Otimização da Extração	100
4.3.5	Validação	102
4.3.6	Análise do Extrato Otimizado por CCDAE, CLAE e CLUE	104
4.4	Resultados e Discussão	104
4.4.1	Desenvolvimento do Método	104
4.4.2	Preparo dos Extratos	105
4.4.3	Otimização da Extração	106
4.4.4	Validação	113
4.4.5	Análise do Extrato Otimizado por CCDAE, CLAE e CLUE	119
4.5	Conclusão	119
5.	CONCLUSÃO GERAL	121
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	127
	APÊNDICE A – CURVAS DE LINEARIDADE DIAS 1,2 E 3 – CCDAE	135
	APÊNDICE B – CURVAS DE LINEARIDADE DIAS 1,2 E 3 – CLAE	137
	APÊNDICE C – CURVAS DE LINEARIDADE DIAS 1,2 E 3 – CLUE	139
	APÊNDICE D – CROMATOGRAMAS E ESPECTROS DE MASSAS – CG-EM	141

Atropa belladonna L. (Solanaceae), conhecida pelo nome popular beladona, é uma planta subarborescente perene, com até 1,5 m de altura, nativa na Europa, Norte de África e Ásia Ocidental e em partes da América do Norte (TYLER, BRADY, ROBBERS, 1988; MORÁLES, 1995).

As folhas da Beladona (assim como outras partes da planta) apresentam entre seus metabólitos secundários alcaloides tropânicos (AT), com importante papel na terapêutica: a atropina e a escopolamina. A obtenção desses metabólitos, embora possa ser realizada por via sintética, ainda é realizada a partir de fontes naturais. Esses compostos caracterizam-se pela ação inibidora da acetilcolina, conhecidos como substâncias antimuscarínicas ou bloqueadores de receptores muscarínicos colinérgicos (HERNANDES, KATO, BACCHI, 2017). Toneladas de atropina e escopolamina extraídas de cultivos geneticamente modificados, são utilizadas na medicina contemporânea (GRYNKIEWICZ, GADZIKOWSKA, 2008).

A importância das matérias-primas de origem vegetal e drogas vegetais para a indústria farmacêutica, cada vez mais, tem impulsionado estudos científicos no sentido de desenvolver metodologias analíticas para quantificação de marcadores químicos, resultando em materiais de qualidade e que atendam os parâmetros de controle preconizados na legislação vigente. A FARMACOPEIA BRASILEIRA (2010), descreve controle de qualidade como o conjunto de medidas destinadas a garantir, a qualquer momento, a produção de lotes de medicamentos e demais produtos, que satisfaçam às normas de identidade, atividade, teor, pureza, eficácia e inocuidade. De acordo com a Resolução nº26/2014 (BRASIL, 2014) da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), as drogas vegetais utilizadas como matéria-prima na produção de medicamentos fitoterápicos, devem passar por análise qualitativa e quantitativa dos princípios ativos e/ou marcadores químicos, quando conhecidos. No caso de metodologias de análise desenvolvidas e utilizadas não descritas em compêndios oficiais, as mesmas devem ser validadas de acordo com o Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos da Resolução nº 899/2003 (BRASIL, 2003) e todas as etapas de validação (especificidade/seletividade, linearidade, Intervalo, Limites de Detecção (LD) e Quantificação (LQ), Precisão, Exatidão e Robustez) devem ser comprovadas.

Nesse contexto, pesquisa, desenvolvimento e investimentos tem sido crescentes na área de controle de qualidade de produtos naturais, e muitos métodos

analíticos vêm sendo desenvolvidos para auxiliar na qualificação e quantificação de tais produtos. Análises cromatográficas, por exemplo, tem sido uma ferramenta amplamente utilizada tanto para a “impressão digital” (*fingerprint*) da planta como para quantificação de seu(s) marcador(es) químico(s). Estas técnicas vêm crescendo substancialmente, com destaque para a Cromatografia a Líquido, que é a mais utilizada. O acoplamento com técnicas de detecção (arranjo de fotodiodos, espectrometria de massa e ressonância magnética nuclear) tem sido fundamentais na quantificação e elucidação de estruturas, por vezes, muito complexas. A Cromatografia a Gás (CG) também é amplamente utilizada em análises de sistemas ou complexos constituídos principalmente de espécies voláteis (VILEGAS, CARDOSO, QUEVEDO, 2016). Mais recentemente, a Cromatografia em Camada Delgada de Alta Eficiência (CCDAE) vem se mostrando uma excelente ferramenta analítica, (SRIVASTAVA, 2011), unindo em uma única técnica, a identificação e quantificação de compostos de interesse em drogas vegetais.

Ferramentas estatísticas também têm sido utilizadas em algumas etapas no controle de qualidade, como na otimização da extração dos metabólitos em plantas. As técnicas de estatística multivariada, por exemplo, auxiliam na análise da influência dos diversos fatores, em diferentes níveis, avaliando suas interações no processo de extração. Entre as mais utilizadas está a metodologia de superfície de resposta (MSR) que reúne diversas técnicas, matemáticas e estatísticas, utilizando o ajuste de uma equação polinomial para descrever o comportamento de um conjunto de dados experimentais. Dessa maneira, os diferentes níveis das variáveis analisadas são otimizados simultaneamente e o melhor desempenho do sistema é alcançado (BEZERRA et al., 2008).

OBJETIVOS GERAIS

Desenvolver e validar de acordo com critérios oficiais, diferentes métodos analíticos para a determinação quantitativa de atropina presente em folhas de *A. belladonna* (Família Solanaceae).

Revisar a monografia das folhas de *A. belladonna*, constante na Farmacopeia Brasileira 5^o Edição, propondo método de quantificação de atropina para o controle de qualidade da droga vegetal.

Otimizar o método de extração da atropina, presente no material vegetal, utilizando como ferramenta estatística o *Software Minitab*® 17.

Os objetivos específicos encontram-se descritos nos próprios capítulos.

1. REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Aspectos Químicos e Físico-químicos

As folhas de *A. belladonna* L. são caracterizadas pela presença de AT, com teor médio de 0,3 – 0,5 %, principalmente de (S)-hiosciamina transformada, em grande proporção, em atropina (HERNANDES, KATO, BACCHI, 2017; FARMACOPEIA, 2010; BRITISH, 2015; REAL, 2002; USP, 2014).

AT presentes em *A. belladonna*, apresentam em comum uma estrutura nitrogenada bicíclica denominada tropano (8-metil-8-azabicyclo[3,2,1]octano) e são ésteres do ácido trópico. A atropina (Figura 1.1 a), marcador químico majoritário nesta planta, é uma mistura racêmica de (R)-hiosciamina e (S)-hiosciamina sendo o enantiômero (S)-hiosciamina de ocorrência natural predominante. A escopolamina (Figura 1.1 b) é o estereoisômero levógeno, (S)-hioscina da mistura racêmica conhecida como atroscina. A proporção atropina:escopolamina é de, aproximadamente 20:1, ou seja, as folhas são pobres em escopolamina, o que as diferencia, por exemplo, do estramônio e do meimendo que apresentam teor maior de escopolamina (HERNANDES, KATO, BACCHI, 2017).

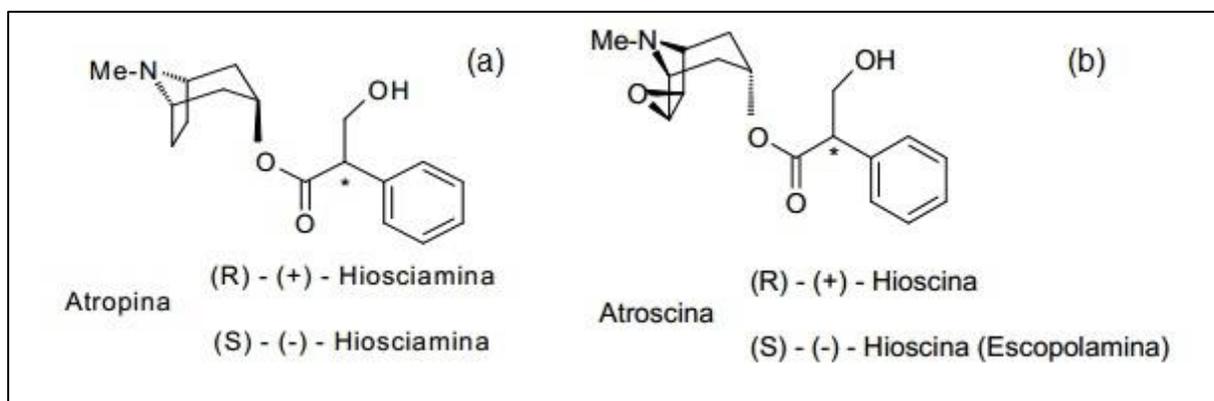


Figura 1.1: Estrutura química da atropina (a) e da escopolamina (b)

A estrutura dos AT, assim como outros alcaloides, apresenta o elemento Nitrogênio com um par de elétrons disponível/livre, o que confere basicidade e reatividade a esses compostos. A solubilidade desses metabólitos está diretamente relacionada com a forma em que se encontram e, esta forma está diretamente relacionada com o pH do meio onde se encontram. Estes compostos são solúveis em solventes apolares quando se encontram na forma de base livre em pH alcalino e em solventes polares quando se encontram na forma de sal em pH ácido (Figura 1.2).

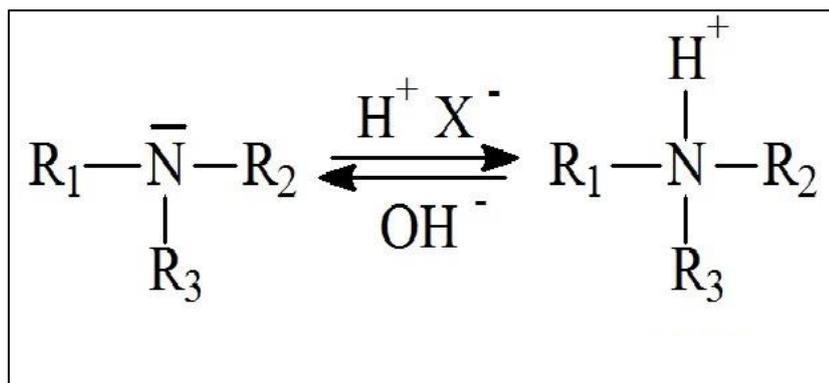


Figura 1.2: Características Físico-químicas dos alcaloides – solubilidade e pH.

1.2 Métodos de Extração e Limpeza

A preparação de amostras tem se mostrado um passo analítico importante para obtenção de metabólitos secundários em material vegetal (CASTRO, POVEDANO-DELGADO, 2014), podendo ainda ser uma ferramenta útil na limpeza dos extratos de amostras e concentração dos analitos de interesse. Para os AT presentes nas folhas de *A. belladonna* L. estas etapas se tornam importantes tendo em vista que esses analitos estão em concentração muito baixa.

Os métodos tradicionais de extração, para obtenção de extratos brutos, como maceração, infusão, soxhlet, percolação e refluxo ainda são bastante utilizados e estão descritos na maioria das monografias dos compêndios oficiais (FARMACOPEIA, 2010; BRITISH, 2015; REAL, 2002; USP, 2014). Estas metodologias empregam grandes quantidades de solventes, tempo relativamente longo e temperatura o que, em determinados casos, podem degradar os alcaloides.

Todavia, métodos alternativos visando economia de solvente e tempo vêm sendo empregados. PICÓ (2013) relatou que técnicas de extração por ultrassom tem atraído interesse nos últimos anos, por se tratar de uma técnica eficiente e rápida para extração de diversos compostos, incluindo marcadores químicos em materiais vegetais. Este método extrativo foi empregado por ASHTIANIA e SEFIDKONB (2011) em *A. belladonna* L. e por JACABOVÁ et al. (2012) em espécies de *Datura*, com sucesso.

Em geral, para obtenção dos extratos brutos, solventes como metanol, etanol, diclorometano e éter dietílico são comumente utilizados para obtenção de alcaloides na forma de base livre, enquanto que solventes polares, como ácidos diluídos são

empregados, e nesse caso, os compostos são extraídos na forma de sais (HERNANDES, KATO, BACCHI, 2017). Apesar deste tipo de extração ser relativamente seletivo, no caso de extração de alcaloides, por vezes, é necessário realizar limpeza e concentração do extrato bruto obtido, antes da análise, a fim de se obter um extrato enriquecido desses metabólitos. As técnicas mais utilizadas são a extração líquido-líquido (ELL) ou a extração em fase sólida (EFS). A primeira técnica apesar de mais utilizada, está sujeita a erros, perdas durante o processo, além de necessitar de um volume maior de solvente no processo do que a segunda (DRÄGER, 2002). KURSINSZKI et al. (2015) utilizaram extração por ultrassom em raízes de *A. belladonna* L. e *Datura innoxia* seguida por extração em fase sólida, utilizando colunas de sílica C18, para limpeza dos extratos.

KLEIN-JÚNIOR et al. (2016) na publicação “*Enlarging the bottleneck in the analysis of alkaloids: A review on sample preparation in herbal matrices*” descreveram ainda que extrações de AT em *A. belladonna* foram realizadas utilizando técnicas com fluido supercrítico e membrana líquida. Além disso, ressaltaram que extratos de AT foram purificados por EFS utilizando colunas de sílica com troca iônica. A extração de atropina e escopolamina foi realizada ainda, em plantas da família Solanaceae, utilizando método de extração assistido por microondas e limpeza dos extratos por EFS dispersiva (método QuEChERS) (CIECHOMSKA, et al., 2016).

1.3 Otimização de Extração

Muitos fatores influenciam na extração de metabólitos em materiais vegetais. Otimizá-los se torna uma etapa analítica fundamental para quantificação destes compostos (LUNDSTEDT et al., 1998). Para tal, existem métodos tradicionais de otimização que testam cada fator de forma independente, mas que possuem alguns inconvenientes, tais como desprezar possíveis interações dos fatores avaliados, e desta forma, a interferência entre processos (entre corridas) não é analisada, a menos que um número grande de experimentos seja realizado. Dificilmente por métodos deste tipo, as condições ótimas de um processo são atingidas (WEISSMAN, 2015).

Metodologias de desenho experimental vêm se tornando uma ótima ferramenta de otimização em processos químicos, na medida que utilizam análise multivariada para alcançar uma condição ótima no processo. Neste tipo de metodologia, os

diversos fatores são avaliados simultaneamente e a significância das interações pode ser analisada. Em muitos casos, inicialmente é interessante realizar uma “triagem”, através de Desenho Fatorial (DF), para avaliar os fatores com influência significativa sobre os resultados, podendo ser avaliadas uma ou mais respostas (LUNDSTEDT et al., 1998) e em seguida estes fatores são otimizados utilizando ferramentas estatísticas como Desenho de Composto Central, Desenho Box-Behnken (DBB) ou Desenho Doehlert, conhecidas como metodologias de superfície de resposta. (CARINI et al., 2013; LUNDSTEDT et al., 1998; MONTGOMERY, 2001).

Não há relatos na literatura sobre essas metodologias na extração de atropina em folhas de *A. belladonna* L., mas diversos autores utilizam planejamento fatorial e otimização para extração de metabólitos em plantas. Alguns artigos, recentemente publicados, estão descritos na Tabela 1.1.

Tabela 1.1: Publicações de otimização de extração de metabólitos em material vegetal.

Material Vegetal	Metabólito	Metodologia ¹	Autor
<i>Psychotria nemorosa</i>	Alcaloides indólicos	DFF e DCC	KLEIN-JÚNIOR, et al., 2016
<i>Epimedium brevicornum</i>	Compostos fenólicos	DCC	ZHAO, et. Al., 2014
<i>Senna alexandrina</i>	Senosídeos	DF	SEVERO, et al., 2013
<i>Uncaria tomentosa</i>	Alcaloides oxindólicos, glicosídeos do ácido quinóvico, polifenóis	DBB	KAISER, et al., 2013
Seda do milho	Polissacarídeos	DBB	MARAN, et al., 2013
<i>Boletus edulis</i>	Polissacarídeos	DBB	CHEN, et al., 2012
<i>Codonopsis pilosula</i>	Polissacarídeos	DBB	ZOU, et al., 2011
<i>Gardenia jasminoides</i>	Crocina, geniposídeos, compostos fenólicos	DCC	YANG, et al., 2009

1.4 Desenvolvimento e Validação de Metodologias Analíticas

O desenvolvimento de um método analítico é um processo que seleciona um procedimento aceitável para analisar uma determinada matéria-prima ou formulação. De acordo com o objetivo pretendido, que pode ser o de identificar, separar ou quantificar um analito, a técnica analítica a ser utilizada é definida, assim como os

¹ DF = Desenho Fatorial; DFF = Desenho Fatorial Fracionado; DCC = Desenho de Composto Central; DBB = Desenho Box-Behnken

parâmetros de análise para que este objetivo seja alcançado. Equipamentos e analistas qualificados são fundamentais para que um método seja bem desenvolvido (CHAUHAN A., MITTU, CHAUHAN P., 2015; TOOMULA et al., 2011).

Por tratar-se de matrizes mais complexas, o desenvolvimento analítico para matérias-primas vegetais, é, na grande maioria das vezes, mais complicado do que para matérias-primas sintéticas. (VILEGAS et al., 2016).

Segundo VILEGAS e colaboradores (2016), a validação de metodologias analíticas garante confiabilidade e credibilidade ao método desenvolvido e tem-se tornado requisito para novas publicações. Alguns órgãos reguladores como Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2003), International Conference on Harmonization (ICH, 2005) e United States Pharmacopeia (USP, 2015) estabelecem parâmetros para sua realização. Segundo esses órgãos, os principais parâmetros de validação são:

Especificidade/Seletividade: capacidade que o método possui de medir exatamente um composto em presença de outros tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz. Este parâmetro pode ser comprovado, em Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência com Detector de Arranjo de Diodos (CLAE/DAD), por exemplo, comparando-se os espectros de ultravioleta do marcador químico em análise, nas soluções de referência e amostra.

Linearidade: capacidade que o método possui de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado. Deve ser comprovada pela análise de 5 pontos (no mínimo), com concentração de 80 a 120 % da concentração do analito na amostra. Os resultados devem ser analisados visualmente através do traçado de gráficos e tratados estatisticamente (cálculo da regressão e o método dos mínimos quadrados e análise de variância) para comprovar a linearidade.

Intervalo: é a faixa que define os limites máximo e mínimo de quantificação do método, de acordo com análise das amostras e após comprovação da linearidade, precisão e exatidão do método.

Precisão: é a capacidade do método de reproduzir os resultados, ou seja, é a proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra. Pode ser medida em três níveis:

Repetibilidade: concordância de resultados em curto período de tempo, com mesmo analista e mesmo equipamento. É verificada pelo preparo de seis repetições de uma amostra a 100 % da concentração teórica do analito na amostra, ou em nove determinações em três concentrações diferentes (baixa, média e alta).

Intermediária: concordância dos resultados em, no mínimo, dois dias diferentes, analistas e/ou equipamentos diferentes. Verificada a variação dos resultados em mesmo laboratório.

Reprodutibilidade: concordância dos resultados, entre diferentes laboratórios em estudos colaborativos. Geralmente utilizados para inclusão de monografias em Farmacopeias.

A partir de cada série de medidas, a precisão pode ser expressa como desvio padrão relativo (DPR) ou coeficiente de variação (CV%).

Limite de detecção (sensibilidade): Menor quantidade de analito que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, em uma amostra sob as condições do método analítico estabelecido.

Limite de Quantificação: Menor quantidade de analito que pode ser quantificada em uma amostra sob as condições do método analítico estabelecido, com precisão e exatidão aceitáveis.

Ambos podem ser obtidos a partir do desvio padrão do intercepto e inclinação da reta, obtido no estudo da linearidade. Ou experimentalmente, pelo preparo de soluções com concentração decrescentes sucessivas, ou ainda, pela avaliação visual da relação sinal-ruído da linha de base no cromatograma.

Exatidão: é verificada pelo cálculo da recuperação de quantidade conhecida de um composto (substância de referência) adicionado à amostra. Esta determinação deve ser realizada pela adição de três níveis de concentração, em relação a concentração teórica da amostra (geralmente 80, 100 e 120 %).

Robustez: é verificada pela capacidade de um método analítico resistir à pequenas modificações de parâmetros, sem alterar os resultados.

Adequabilidade do Sistema: baseia-se no conceito de que o equipamento, a eletrônica, as operações analíticas e as amostras a serem analisadas constituem um sistema integral que pode ser avaliado como tal. Os parâmetros de teste de adequação do sistema a serem estabelecidos para um procedimento específico dependem do tipo de procedimento a ser validado.

1.5 Análise Quantitativa de Alcaloides Tropânicos

1.5.1 Compêndios Oficiais

A análise quantitativa de alcaloides totais, em folhas de *A. belladonna* está descrita em monografias de alguns compêndios oficiais (Tabela 1.2).

O método mais utilizado descrito em farmacopeias é o de volumetria através de titulação de retorno, onde o percentual de alcaloides totais extraídos do material vegetal é determinado e expresso em hiosciamina. Este método utiliza grande quantidade de material vegetal e tem baixa reprodutibilidade, além de demandar tempo longo para a extração e análise. Este método está descrito nas Farmacopeias Internacionais há muitos anos, e, portanto, foi desenvolvido anteriormente aos critérios de validação atualmente exigidos.

A Farmacopeia Americana é a única que descreve um método quantitativo para determinação desses marcadores químicos por Cromatografia a Gás, porém, este método preconizada a utilização de colunas com preparo diferenciado e específico, apresentando uma série de dificuldades na execução e reprodutibilidade.

Tabela 1.2: Monografias da *A. belladonna* em Compêndios Oficiais

Farmacopeia	Método	Marcadores Químicos
Brasileira 5ª Edição – Vol. 2	Volumetria (Titulometria)	% Alcaloides Totais Expressos em Hiosciamina
British Pharmacopeia 2014	Volumetria (Titulometria)	% Alcaloides Totais Expressos em Hiosciamina
Real Farmacopea Española 3ª Edição	Volumetria (Titulometria)	% Alcaloides Totais Expressos em Hiosciamina
United States Pharmacopeia 37	Cromatografia a Gás	% Alcaloides Totais Expressos em Hiosciamina

1.5.2 Métodos Desenvolvidos

Os métodos para quantificar AT em materiais vegetais por Cromatografia a Líquido de Alta e Ultra Eficiência (CLAE/CLUE) são os mais amplamente desenvolvidos e os mais recentemente publicados estão apresentados na Tabela 1.3.

Métodos envolvendo técnicas de CG são menos encontrados quando comparados aos relacionados à cromatografia a líquido. Um método para detecção de AT em *Fagopyron esculentum* L. foi desenvolvido e validado por Cailigiani e colaboradores (2001). Namera e colaboradores (2002) descreveram um método quantitativo para determinação de AT em material biológico utilizando técnica de cromatografia a gás acoplado a espectrômetro de massas (CG-EM). Além disso, atropina e escopolamina foram quantificadas por CG-EM em 2006 por método utilizando diferentes partes e estágios de desenvolvimento da *Datura stramonium* L. (Solanaceae) (IRANBAKHS et al., 2006). BAZAOUI e colaboradores (2011), identificaram nove novos AT em *Datura stramonium* L., utilizando esta mesma técnica analítica.

Métodos de quantificação de atropina e escopolamina por CCDAE possuem ainda menos publicações se comparados aos métodos anteriormente citados. Entre os estudos estão os de MROCZEK e colaboradores (2006) que descreveram um ensaio comparativo entre CLAE e CCDAE, com diferentes métodos extrativos de *Datura sp.* Mais recentemente, ONISZCZUK e colaboradores (2013) avaliaram a influência do método de preparo de amostras sobre a quantificação de AT em *Datura innoxia* Mill. Não há relatos na literatura de métodos de quantificação utilizando esta metodologia para *A. belladonna* L.

Em 2002, DRÄGER publicou no Review: “*Analysis of tropane and related alkaloids*” uma discussão, avaliando diferentes métodos de identificação e quantificação (CG, CLAE e CCD) de tropano e outros alcaloides relacionados em espécies de *Datura*, *Atropa* e *Hyoscyamus*.

Tabela 1.3: Quantificação de atropina e escopolamina por CLAE descritos na literatura.

Sistema	Coluna	Detecção ¹	Referência
Gradiente Acetonitrila Água:Ácido fórmico (0,1 %)	C18 (100 x 2,1 mm, 1,8 µm)	MS	CHEN, et al., 2017
Gradiente Água:Ácido fórmico (1%) Metanol:Ácido fórmico (1%)	C18 (50 x 2,1mm, 2,7 µm)	DAD-UV + MS	JAKABOVÁ et al. 2012
Gradiente Solução Tampão Fosfato pH 3,5 Acetonitrila	C18 (250 x 2 mm, 5 µm)	MS	TEMERDASHEV, et al., 2012.
Isocrático Acetonitrila:Tampão NaH ₂ PO ₄ 50 mM (pH=2,95 ácido ortofosfórico) (10:20)	C8 (250 x 4,6 mm, 5 µm)	UV	ASHTIANIA e SEFIDKONB, 2011
Isocrático Tampão fosfato de potássio monobásico 50 mM (pH=3,0 c/ ácido ortofosfórico): Acetonitrila (80:20)	C18 (250 x 4,6 mm, 5 µm)	DAD-UV	HOSSEINI et al., 2011.
Isocrático Acetonitrila:Metanol:Tampão 30 mM KH ₂ PO ₄ -K ₂ HPO ₄ pH 6 (815:185 g/g) (12:7,9:80,1, v/v/v)	C18 (250 x 4,6 mm, 5 µm)	DAD-UV	KURSINSZKI et al., 2005
Isocrático Acetonitrila:Acetato amônio 10 mM (pH=10,5 c/ amônia 5%) (10:90)	Fenil (150 x 2,1 mm, 5 µm)	DAD-UV	STEENKAMP et al., 2004
Isocrático Acetonitrila:Tampão fosfato 30 nM (pH 6,2):Metanol (12,2:79,7:8,1 v/v/v) e 0,1 % trietilamina	C8 (250 x 4,6 mm, 5 µm)	DAD-UV	HANK et al., 2004
Isocrático Metanol:Água:Ácido fórmico (165:35:1) (pH=8,3 c/ trietilamina)	C18 (300 x 3,9 mm, 10 µm)	DAD-UV	CEYHAN et al., 2001.
Isocrático KH ₂ PO ₄ 0,05 mol/L (pH=3): Acetonitrila (90:10)	C18 (75 x 4,6 mm, 3,5 µm)	DAD-UV	HUBER, 1998.

¹ MS = Detector Espectrômetro de Massas; UV = Detector Ultravioleta; DAD-UV = Detector de Arranjo de Diodos-Ultravioleta

2. DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA DE ALTA EFICIÊNCIA (CCDAE)

2.1 Introdução

A cromatografia em camada delgada de alta eficiência (CCDAE) é uma técnica instrumental baseada nos princípios da cromatografia em camada delgada (CCD), porém, com avanços tecnológicos que a tornam mais sofisticada e com potencial para fornecer dados qualitativos e quantitativos. Isto é possível, pois esta técnica utiliza material de revestimento otimizado em cromatoplasmas (tamanho de partícula de sílica menores), o que favorece o poder de separação dos componentes de uma mesma mistura; novos procedimentos para alimentação em fase móvel; além de aplicação de amostra melhorada (automatizada) (SRIVASTAVA, 2011).

A utilização da CCDAE vem crescendo entre as técnicas de controle de qualidade de matérias-primas vegetais, por unir metodologias de identificação (qualificação) e doseamento (quantificação) em uma única análise. Igualmente o método é capaz promover uma maior eficiência de separação, um tempo de análise mais curto (análise simultânea de diversas amostras), menores quantidades de fase móvel e uma aquisição e processamento de dados eficientes.

Os principais parâmetros que influenciam a separação dos constituintes dentro de uma mistura utilizando CCD, e que são otimizados quando se utiliza CCDAE estão citados a seguir:

Coeficiente de partição: definido como a concentração molar do analito na fase estacionária em relação à fase móvel.

Fator de retenção (R_f): valor qualitativo fundamental, é expresso como a razão entre as distâncias de migração de componentes individuais de uma mistura em relação à fase móvel.

Fator de capacidade (k): característica fundamental de uma substância que determina seu comportamento cromatográfico qualitativo. Pode ser expressa como a proporção do tempo de retenção da substância entre a fase estacionária e a fase móvel e é influenciada pela natureza química das duas fases.

Número de Separação (N): o número mais elevado possível de componentes que estão completamente separados numa mistura.

Resolução (R): eficiência da separação de dois componentes de uma mistura num cromatograma.

O alcance dos melhores resultados em CCDAE, assim como em outras técnicas analíticas, depende de algumas etapas, e neste caso, o preparo de amostras e a escolha do sistema de fase móvel adequado são fundamentais. A partir destes cuidados, as demais etapas da análise, como aplicação de amostras, eluição, detecção e documentação, podem ser realizados por instrumentos automatizados (SRIVASTAVA, 2011). Na aplicação, a amostra é contida em seringa (operada por motor) e é aplicada (na forma de ponto ou banda) com velocidade e volume controlados eletronicamente. No sistema de eluição, a cromatoplaça é presa em braço mecânico e colocada em contato com a fase móvel. A detecção pode ser realizada por densitometria. Neste caso a cromatoplaça é colocada no interior de uma câmara escura e então a leitura é realizada em cada banda, em comprimento de onda definido ou por varredura no espectro. As leituras podem ser realizadas em luz visível, ultravioleta ou ainda por fluorescência. As respostas são convertidas em densitogramas, com picos de áreas definidos para cada componente da amostra. As imagens das bandas nas cromatoplaças podem, ainda, ser registradas por imagem, através de câmera fotográfica acoplada à câmara de detecção. Existem também metodologias de CCDAE com detecção por massas (CCDAE-MS) e infravermelho (CCDAE-IR).

Um esquema para análise por CCDAE está ilustrado na Figura 2.1.

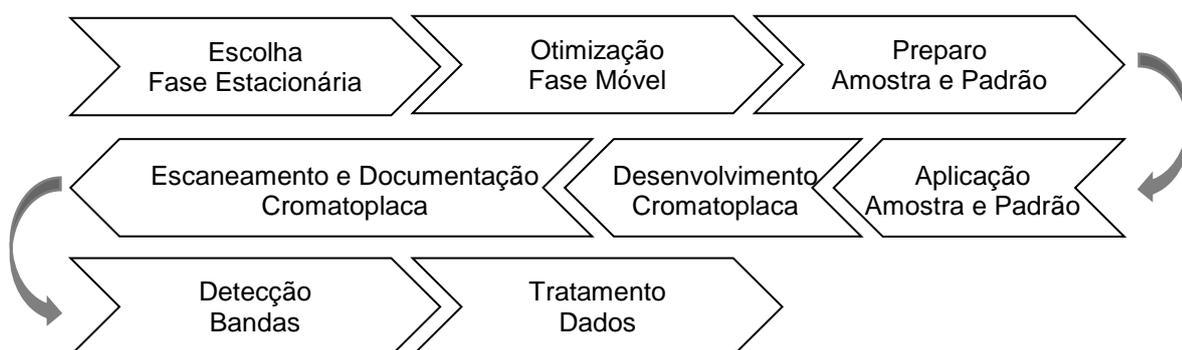


Figura 2.1: Esquema de análise por CCDAE.

São necessários, obrigatoriamente, para obtenção dos resultados, o aplicador automático e a câmara de detecção. Todavia, é possível realizar as análises através de eluição manual das cromatoplaças e sem registro fotográfico das mesmas.

Não há relatos de análise de quantificação de atropina em *A. belladonna* descritos na literatura, porém diversos autores descrevem esta técnica para outras drogas vegetais. Alguns, mais recentemente publicados, estão listados na Tabela 2.1.

Tabela 2.1: Publicações recentes de CCDAE em drogas vegetais.

Material Vegetal	Metabólito	Autor
<i>Camelia simensis</i>	Catequina e Teanina	KUMAR, et al., 2016
<i>Vitis vinifera</i>	Ácido gálico, catequina e resveratrol	PILLAI; PANDITA, 2016
<i>Rauvolfia serpentina</i> e <i>Ralvolfia tetraphylla</i>	Reserpina e ajmalicina	PANDEY, et al., 2016
<i>Matricaria recutita</i>	Apigenina-7-O-glicosídeo	GUSELMERIC, et. Al., 2015
<i>Mangifera indica</i>	Mangiferina e Lupeol	JYOTSHNA, et al., 2015
<i>Calendula officinales</i>	Rutina, Ácido cafeico e Ácido clorogênico	LOESCHER, et al., 2014
<i>Alnus nepalensis</i>	Diarilheptanóides	YADAV; GUPTA, 2014

2.2 Objetivo Específico

Desenvolver e validar método para quantificação de atropina nas folhas de *A. belladonna* L. utilizando CCDAE.

2.3 Materiais e Métodos

2.3.1 Material Vegetal, Solventes, Reagentes e Materiais

O material vegetal foi obtido, comercialmente, da Indústria Farmacêutica Catedral LTDA, com lote nº 01204/10 e da Phytolab, com lote nº 768/12/O. As amostras foram identificadas como AB-01 e AB-02, respectivamente. As folhas secas (Figura 2.2 a e b), foram recebidas embaladas em saco plástico e posteriormente transferidas para envelopes de papel pardo, revestidos externamente com saco plástico e armazenadas sob refrigeração durante sua utilização.

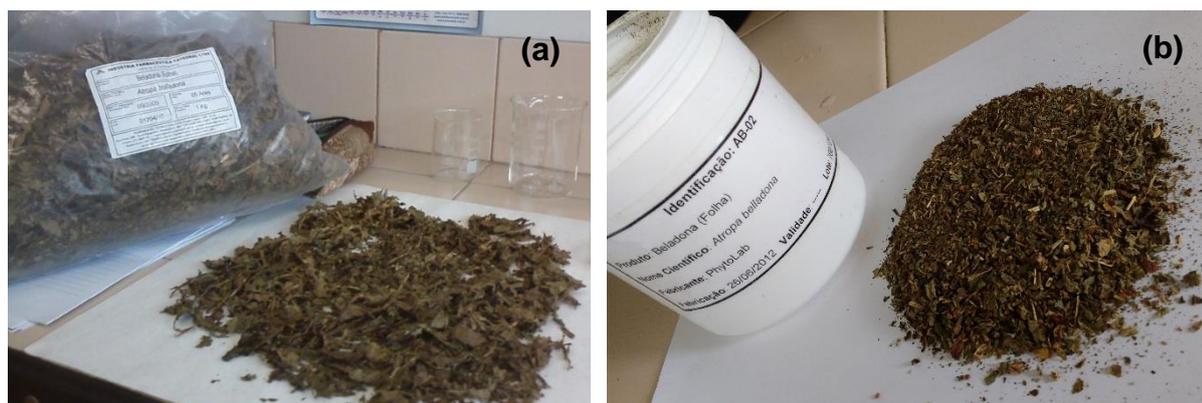


Figura 2.2: Material vegetal obtido comercialmente. (a) Catedral; (b) Phytolab

Os solventes grau HPLC utilizados foram adquiridos da marca Tedia do Brasil. Os reagentes grau analítico foram obtidos das marcas Tedia do Brasil e Sigma Aldrich. A substância química de referência (SQR) – atropina base livre – foi adquirida da marca Sigma Aldrich, lote 5LBD8308V, pureza 99%. A água ultrapura utilizada foi fornecida pela Central de água da Faculdade de Farmácia. As cromatoplaças utilizadas foram adquiridas das marcas Merck e Macherey-Nagel. As vidrarias utilizadas foram adquiridas das marcas Pyrex e Vidrolabor.

2.3.2 Ensaio de identificação para presença de Alcaloides Tropânicos

As amostras foram testadas quanto à presença de AT através de método descrito na monografia da planta na FB 5^o Edição (p.679):

“Agitar 3 g de droga pulverizada com 30 mL de ácido sulfúrico 0,05 M durante 2 minutos e filtrar. Alcalinizar o filtrado com 3 mL de hidróxido de amônio e adicionar através do filtro 15 mL de água. Transferir a solução alcalina para funil de separação e extrair sucessivamente com três alíquotas de 15 mL de clorofórmio. Reunir as fases clorofórmicas e adicionar sulfato de sódio anidro. Filtrar e dividir o filtrado em duas cápsulas de porcelana, procedendo à evaporação do solvente. Em uma das cápsulas de porcelana, adicionar 0,5 mL de ácido nítrico fumegante e evaporar à secura em banho-maria. Adicionar ao resíduo 2 mL de acetona e gotejar uma solução de hidróxido de potássio a 10% (p/v) em etanol, desenvolve-se uma coloração violeta intensa.”

2.3.3 Perfil ultravioleta e Determinação de água

O perfil ultravioleta da atropina foi obtido a partir da análise de varredura (200 – 400 nm) de uma solução da SQR atropina base livre a 600 µg/mL, utilizando Espectrofotômetro da marca Agilent e modelo 8453. Desta forma, o comprimento de onda de máxima absorção da atropina foi determinado para detecção das cromatoplacas em análise.

A análise de determinação de água foi realizada, em triplicata, conforme ensaio 5.4.2.3 - *Determinação de Água em Drogas vegetais* da FB 5^oEd, (volume 1, p. 197) descrita a seguir e o percentual de água calculado pela equação 2.1.

“Método gravimétrico: Transferir cerca de 2 a 5 g (≤ 180 µm), ou o especificado, na monografia, exatamente pesados, de amostra preparada conforme instruções anteriores, para pesa-filtro tarado, previamente dessecado nas mesmas condições a serem adotadas para a amostra, durante 30 minutos. Dessecar a amostra a 100-105 °C durante 5 horas, até peso constante. Calcular a porcentagem de água em relação à droga seca ao ar.”

Equação 2.1: Cálculo para determinação do percentual de perda de água.

$$PA(\%) = \frac{Pi - Pf}{Pa} \times 100$$

Onde:

PA = perda de água,

Pa = peso da amostra (g),

Pi = peso do pesa-filtro contendo a amostra antes da dessecação (g),

Pf = peso do pesa-filtro contendo a amostra após a dessecação (g).

2.3.4 Preparo dos extratos

A partir do estudo de diversas metodologias para o preparo de extrato de alcaloides em folhas de *A. belladonna* L., descritas na literatura, o método de extração descrito a seguir foi desenvolvido para quantificação de atropina por CCDAE:

Foram pesados, com exatidão, cerca de 1 g de amostra, com granulometria padronizada de 180 μm . À massa pesada foram adicionados 40 mL de ácido sulfúrico (H_2SO_4) 0,05 mol/L e a mistura foi submetida a extração por banho de ultrassom por 1 hora, a temperatura ambiente. Após, a mistura foi filtrada através de papel filtro para um balão volumétrico de 50 mL e o balão foi avolumado com o mesmo solvente. O Extrato aquoso foi transferido para um funil de separação de 250 mL e alcalinizado com NH_4OH concentrado (25 %) até pH 10. Em seguida os alcaloides foram extraídos com 3 alíquotas de 30 mL de diclorometano. Entre as extrações, a mistura bifásica foi centrifugada (devido a formação de emulsão intensa), em centrífuga da marca Spinlab e modelo SL-5M por 10 minutos a 3.000 rotações por minuto (rpm) em tubo falcon com tampa. As fases orgânicas foram reunidas, secas com 15 g de sulfato de sódio anidro, filtradas para cápsulas de porcelana e evaporadas até *secura* em banho d'água entre 30 - 40 $^\circ\text{C}$. O Extrato seco foi solubilizado e avolumado em balão volumétrico de 5 mL utilizando metanol Grau HPLC como solvente. O Extrato foi transferido para vial de 2 mL e aplicado nas cromatoplaças conforme descrito em 2.3.5. O esquema do preparo e análise dos extratos está ilustrado na Figura 2.3.



Figura 2.3: Preparo dos extratos para análise por CCDAE.

2.3.5 Desenvolvimento do método

Inicialmente, o método foi desenvolvido manualmente em cromatoplasmas para cromatografia em camada delgada (cromatoplasmas CCD) para escolha da melhor fase móvel e obtenção de uma boa separação dos alcaloides presentes nas folhas. Em seguida, cromatoplasmas para cromatografia em camada delgada de alta eficiência (cromatoplasmas CCDAE) foram utilizadas e as amostras foram aplicadas automaticamente utilizando-se um aplicador automático “Automatic TLC Sampler 4” da Marca CAMAG. A eluição foi realizada manualmente em cuba de vidro da marca CAMAG e dimensões 12 x 22,5 x 8 cm, preenchida com 40 mL de fase móvel. O escaneamento das placas foi realizado por densitometria, com scanner da marca CAMAG “TLC Scanner 4”. Os dados foram analisados através de *software* winCATS/CAMAG.

Os parâmetros estabelecidos para o método estão descritos na Tabela 2.2.

Tabela 2.2: Parâmetros desenvolvidos para análise por CCDAE.

Parâmetro	Especificação
Fase Móvel (v/v/v)	Tolueno : Acetato de Etila : Dietilamina (5,5 : 3,5 : 1)
Volume de amostra aplicado (µL)	20
Tamanho da Banda (nm)	6,0
Distância entre as bandas (nm)	5,0
Distância em relação ao eixo x (nm)	150
Distância em relação ao eixo y (nm)	100
Comprimento de Onda scanner (nm)	217
Abertura da fenda scanner (mm)	6,0 x 0,3

2.3.6 Validação

A método foi validado, de acordo com a Resolução nº 899/2003 e os seguintes parâmetros foram contemplados na validação:

a) Especificidade/Seletividade: realizada pela comparação dos espectros de ultravioleta, da banda referente a atropina, obtidos a partir da leitura de cromatoplasmas contendo aplicação de solução da SQR atropina base livre (600 µg/mL), e da solução

amostra, preparada conforme descrito no item 2.3.4 e pela comparação das áreas, referentes a banda da atropina, obtidas a partir da leitura de cromatoplaça contendo aplicação da solução amostra, preparada conforme descrito no item 2.3.4 e solução amostra com adição de SQR atropina base livre.

b) Linearidade: realizada através da aplicação de diferentes volumes de solução estoque da SQR atropina base livre, com concentração igual a 1068 µg/mL, em cromatoplaças. Três curvas da substância de referência foram construídas, com 6 pontos (aplicados em triplicata) correspondendo a um intervalo de concentração de atropina entre 320,4 e 813,5 µg/mL. A linearidade do método foi verificada a partir da medida da área da banda referente ao marcador químico e o coeficiente de regressão mínimo exigido pela Resolução nº 899/2003 no valor de $r^2 = 0,99$ foi verificado, o tratamento estatístico foi realizado através de método dos mínimos quadrados e análise de variância (ANOVA).

c) Limites de Detecção e Quantificação: foram calculados a partir dos dados obtidos no estudo de linearidade (curva padrão da SQR atropina base livre) e através das Equações 2.2 e 2.3

Equação 2.2: Cálculo para determinação do Limite de Detecção.

$$LD = \frac{3,3 \times S}{I}$$

Equação 2.3: Cálculo para determinação do Limite de Quantificação.

$$LQ = \frac{10 \times S}{I}$$

Onde:

LD = Limite de Detecção

LQ = Limite de Quantificação

S = desvio padrão médio do intercepto das três curvas

I = Inclinação média das três curvas

d) Precisão Repetibilidade: realizada através da análise de seis extrações, realizadas conforme descrito no item 2.3.4. Cada uma das seis soluções amostra foram aplicadas em triplicata na cromatoplaça e a área correspondente a banda do marcador químico foi avaliada. Juntamente com as soluções amostra, uma solução da SQR atropina base livre, com concentração igual a 536 µg/mL, foi aplicada também em triplicata.

e) Precisão Intermediária: realizada através da análise de três extrações, realizadas conforme descrito no item 2.3.4. Cada uma das três soluções amostra foram aplicadas em triplicata na cromatoplaça e a área correspondente a banda do marcador químico foi avaliada. Juntamente com as soluções amostra, uma solução da SQR atropina base livre, com concentração igual a 536 µg/mL, foi aplicada também em triplicata. Este procedimento foi realizado em dois dias diferentes, sendo um deles executado por um analista diferente dos demais.

f) Exatidão: realizada através da recuperação da solução da SQR atropina base livre (1038 µg/mL), adicionada em concentrações iguais a 80, 100 e 120 % em relação a extração do material vegetal, ou seja, solução amostra preparada conforme descrito no item 2.3.4, porém, partindo-se de 2,0 g de material vegetal. A recuperação foi calculada a partir da equação 2.4.

Equação 2.4: Cálculo para determinação do teor recuperado da SQR.

$$R (\%) = \frac{(CSR) - (CSA)}{CSPad} \times 100$$

Onde:

CSR = Concentração (µg/mL) da solução amostra com adição de padrão;

CSA = Concentração (µg/mL) da solução amostra;

CSPad = Concentração (µg/mL) da solução da SQR atropina base livre adicionada a solução amostra.

g) Robustez: realizada através da modificação de parâmetros da análise, estabelecidos previamente. As variações estão descritas na Tabela 2.3.

Tabela 2.3: Parâmetros avaliados na etapa de robustez - CCDAE.

Parâmetro	Normal	Alterado
Fase Móvel (v/v/v)	Tolueno : Ac. Etila : Dietilamina (5,5:3,5:1)	Tolueno : Ac. Etila : Dietilamina (5,53 : 3,52 : 1,005) (+ 0,5 %) Tolueno : Ac. Etila : Dietilamina (5,47 : 3,48 : 0,995) (- 0,5 %)
Tempo de escaneamento da cromatoplaca	Imediato (T=0 min)	T = 30 min T = 60 min T = 18 h
Comprimento de Onda scanner	$\lambda = 217 \text{ nm}$	$\lambda = 212 \text{ nm}$ $\lambda = 222 \text{ nm}$
Tempo de Saturação da Cuba	T = 30 min	T = 20 min T = 40 min
Tipo Cromatoplaca	CCDAE	CCD

h) Adequabilidade do Sistema: realizada através da aplicação de SQR a cada dia de análises. Foram monitorados os parâmetros, fator de retenção e área do pico da atropina e os coeficientes de variação foram calculados.

Os resultados da quantificação de atropina nas extrações e análises realizadas nas etapas da validação, foram expressos em % de atropina e calculados através da equação 2.5.

Equação 2.5: Cálculo para determinação do teor de atropina.

$$\% \text{ atropina} = \frac{C_p \times A_a}{A_p \times m} \times \text{FD} \times 100$$

Onde:

C_p = concentração da solução de referência de atropina em g/mL, considerando pureza do padrão (**99 %**);

A_a = área do pico correspondente à banda da atropina no cromatograma obtido com a solução amostra;

A_p = área do pico correspondente à banda da atropina no cromatograma obtido com a *solução de referência*;

m = massa da amostra, em gramas, utilizada na preparação da solução amostra considerando a perda por dessecação (**6,983 %**);

FD = Fator de diluição da amostra (**5**).

Os coeficientes de variação (CV) foram calculados através da equação 2.6.

Equação 2.6: Cálculo para determinação do coeficiente de variação.

$$CV (\%) = \frac{DP}{CMD} \times 100$$

Onde:

CV (%) = coeficiente de variação

DP = desvio padrão

CMD = concentração média determinada

2.4 Resultados e Discussão

2.4.1 Ensaio de identificação para presença de Alcaloides Tropicânicos

As amostras AB-01 e AB-02 apresentaram resultado positivo para AT. A coloração violeta intensa característica desses metabólitos foi evidenciada em ambas amostras, as imagens das cores do ensaio estão ilustradas na Figura 2.4.



Figura 2.4: Esquema de cores do ensaio de presença de AT. (a) antes da adição de KOH alcoólico; (b) durante a adição de KOH alcoólico; (c) após adição de KOH alcoólico.

2.4.2 Perfil ultravioleta da amostra e Determinação de água

A solução de referência analisada apresentou o perfil conforme demonstrado na Figura 2.5 após submetido a varredura no ultravioleta. O comprimento de onda de máxima absorção foi de 217 nm e este valor foi o utilizado para detecção das cromatoplacas durante a validação.

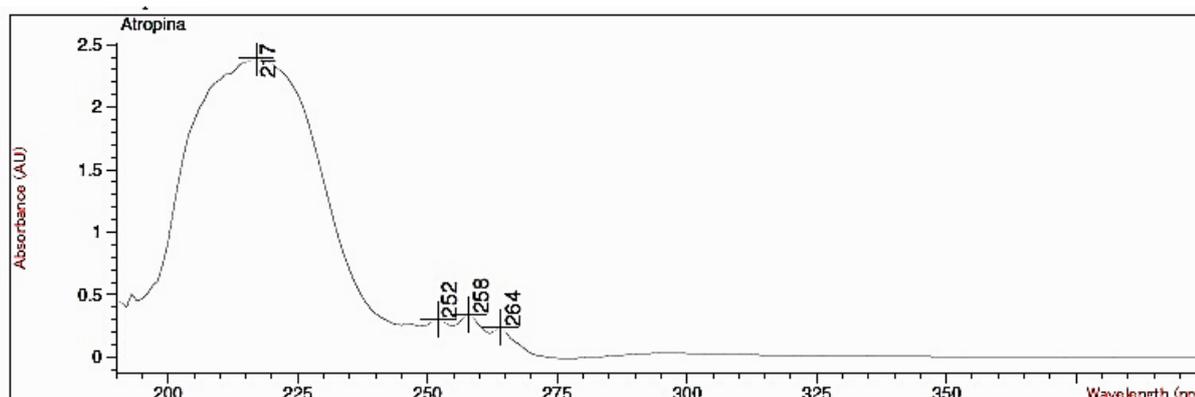


Figura 2.5: Espectro de varredura no ultravioleta da solução de atropina a 600 µg/mL.

Todos os resultados apresentados a seguir são referentes a amostra AB-01. Esta amostra foi escolhida para os demais ensaios e para a validação devido a quantidade disponível de material vegetal.

O resultado encontrado para a determinação de água foi de 6,9832 % com coeficiente de variação igual a 1,2293 % e os dados da análise estão demonstrados na Tabela 2.4. O teor médio de água encontrado no material vegetal foi descontado das massas pesadas nos ensaios de quantificação da validação.

Tabela 2.4: Resultado da determinação de água para amostra AB-01.

Replicata	Pi	Pf	Pa	PA (%)
1	58,6735	58,5355	2,0038	6,8869
2	53,6010	53,4589	2,0268	7,0111
3	51,1869	51,0438	2,0293	7,0517
Média (%)		6,9832		
Desvio Padrão		0,085842		
Coeficiente de Variação (%)		1,2293		

2.4.3 Desenvolvimento do Método

Após o desenvolvimento do método, as soluções padrão e amostra, produziram os cromatogramas ilustrados na Figura 2.6.

Na figura estão apresentados os densitogramas em duas e três dimensões (2D e 3D), referentes à banda da atropina em ambas soluções. A solução de referência e a solução amostra tiveram Rf de aproximadamente 0,36 para o marcador químico em análise.

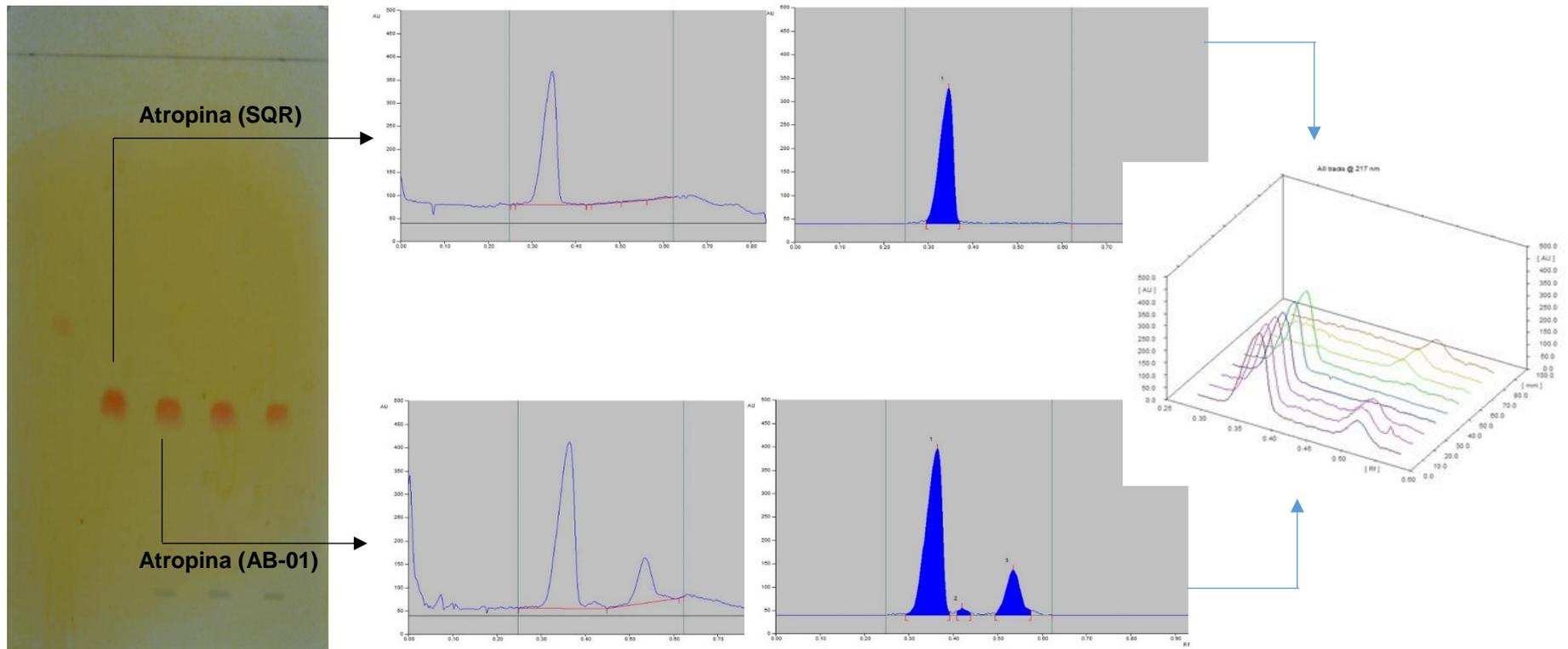


Figura 2.6: Densitogramas obtidos para o método desenvolvido por CCDAE.

2.4.4 Validação

a) Especificidade/Seletividade: após análise da cromatoplaça contendo aplicação de solução da SQR atropina base livre e da solução amostra, os espectros de ultravioleta, referentes à banda do marcador químico, foram comparados e a Figura 2.7 mostra o resultado encontrado.

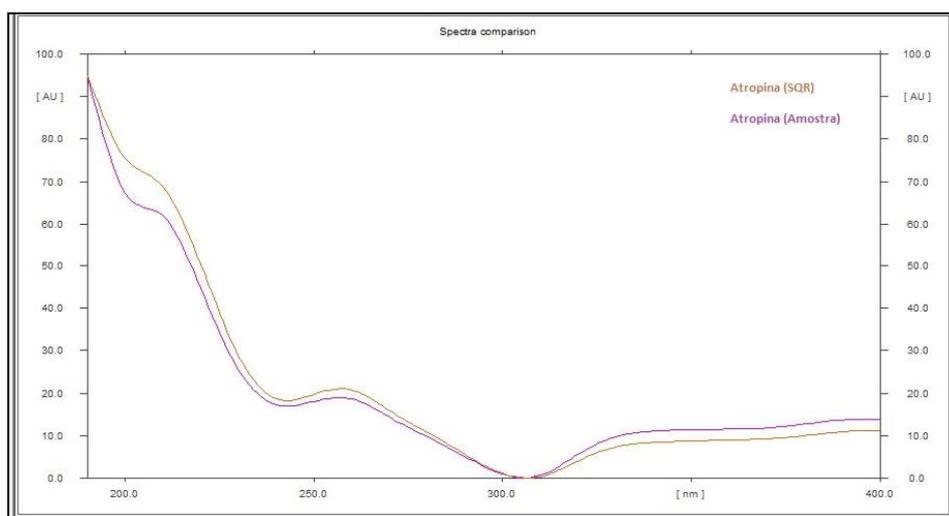


Figura 2.7: Comparativo de Espectros UV da solução SQR e amostra - CCDAE

Após análise da cromatoplaça contendo aplicação de solução amostra com e sem adição da SQR atropina base livre, as áreas, referentes à banda do marcador químico, e a área da banda mais próxima a ele, foram comparadas e a Figura 2.8 (a e b) mostra o resultado encontrado.

É possível perceber, pela análise dos cromatogramas obtidos, que a adição de SQR na solução amostra resultou em incremento apenas na área referente à banda da atropina (aumento da área de 11787,8 para 23863,9), não alterando a banda adjacente a ela.

Os resultados demonstram que o método é específico e seletivo para o marcador químico em análise.

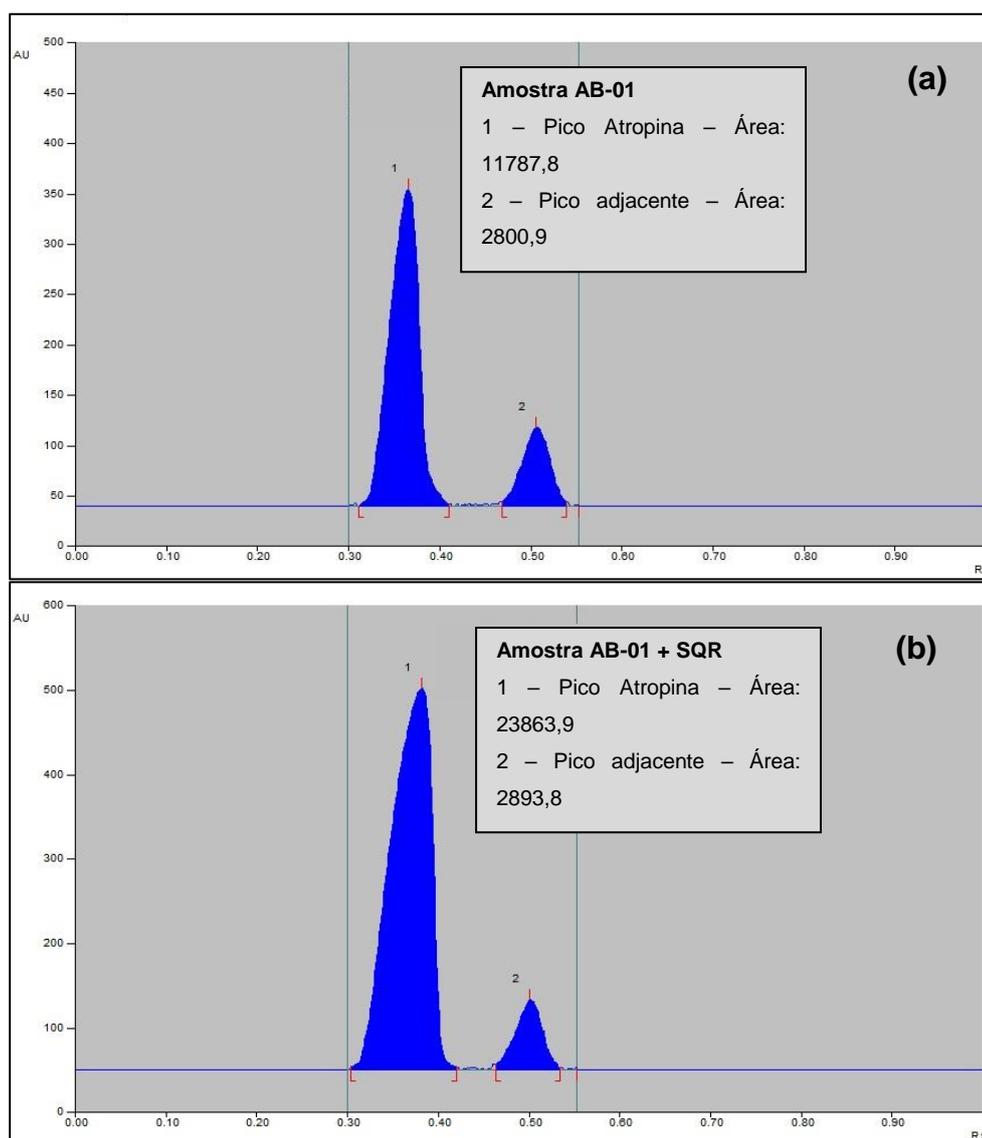


Figura 2.8: (a) Picos das bandas da amostra AB-01; (b) Picos das bandas da amostra AB-01+SQR atropina base livre - CCDAE

b) Linearidade: após aplicação e leitura das cromatoplas contendo os pontos da solução da SQR atropina base livre, o traçado e o tratamento estatístico das curvas de padrão de atropina foram realizados utilizando planilha eletrônica Microsoft Excel 2016. Os dados e gráficos das curvas dos dias 1, 2 e 3 estão apresentados no Apêndice A. Na Tabela 2.5 estão apresentadas as áreas médias, da banda referente à atropina para cada concentração aplicada nas cromatoplas. O gráfico da linearidade média, a equação da reta e o coeficiente de regressão estão ilustrados na Figura 2.9.

Tabela 2.5: Dados obtidos a partir da média das áreas dos dias 1,2 e 3 da linearidade - CCDAE

Atropina (µg/mL)	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Média	Desvio	CV (%)
320,4	4961,5	5263,1	4791,2	5005,2	238,97	4,774
427,2	6032,4	6325,0	6093,0	6150,1	154,44	2,511
534,0	7224,9	7476,9	7374,0	7358,6	126,68	1,722
641,0	8215,1	8661,6	8320,4	8399,0	233,42	2,779
747,5	9455,2	9522,6	9057	9344,9	251,60	2,692
813,5	10076	10488	10320	10294	207,41	2,015

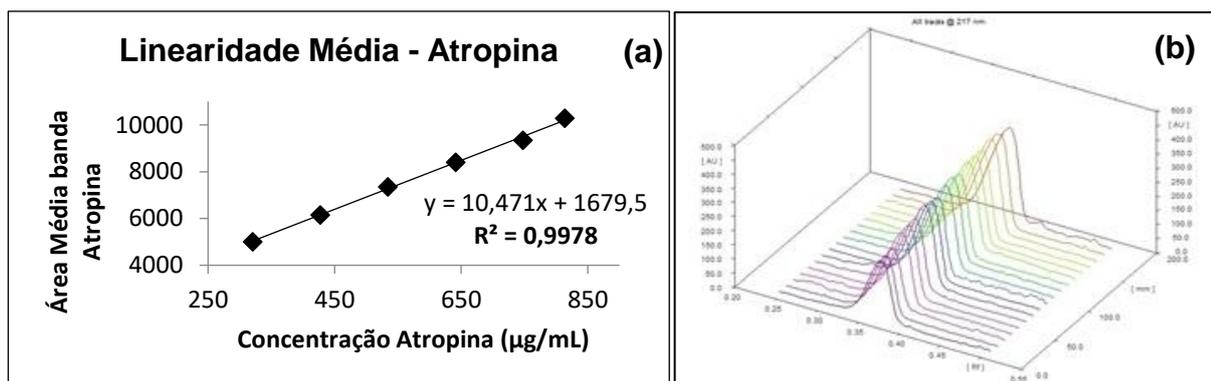


Figura 2.9: Gráfico da curva média de padrão de atropina obtida nos dias 1,2 e 3 da linearidade, equação da reta e coeficiente de regressão. (a) curva traçada em 2D; (b) curva em 3D.

Os valores obtidos na análise de variância (ANOVA) (Tabela 2.6) demonstram que há diferenças significativas entre as diferentes concentrações e respectivas áreas (valor-P < 0,05 e $F > F_{crítico}$), com intervalo de confiança de 95 % ($\alpha = 0,05$).

Tabela 2.6: Análise de variância (ANOVA) para os dados de linearidade da curva padrão de atropina.

Fonte da variação	SQ	GL	MQ	F	valor-P	F crítico
Entre grupos	154576276	1	154576276	77,81513597	4,95399E-06	4,964602744
Dentro dos grupos	19864551,3	10	1986455,13			
Total	174440827,3	11				

c) Limites de Detecção e Limite de Quantificação: os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ), para a substância de referência, de acordo com os parâmetros obtidos com a equação média da reta, foram calculados a partir da média dos coeficientes de regressão linear (10,471) e do desvio padrão médio dos interceptos (150,263).

Os resultados obtidos foram: LD = 47,358 µg/mL e LQ = 143,51 µg/mL, indicando que o método apresenta boa sensibilidade com baixos valores de LD e LQ.

d) Precisão - Repetibilidade e Intermediária: os resultados na etapa de precisão foram satisfatórios, tendo em vista que a legislação exige um máximo de 5 % nos valores de coeficiente de variação entre os resultados e isto foi observado tanto nas análises intra como nas interdias. Da mesma forma, todas as médias calculadas entre as médias das análises apresentaram coeficiente de variação inferior a 5 %. O teor médio de atropina encontrado, foi de 0,29113 %. Foi possível, dessa forma, comprovar a precisão do método e os resultados obtidos nesta etapa estão contemplados na Tabela 2.7.

Tabela 2.7: Resultados para teor de atropina na etapa de precisão - CCDAE

Precisão				
Repetibilidade		Intermediária		
Replicata	% Atropina	Replicata	% Atropina Dia 1	% Atropina Dia 2
1	0,29741	1	0,29312	0,29741
2	0,29631	2	0,28506	0,30244
3	0,30244	3	0,27696	0,29432
4	0,29432	Média	0,28505	0,29806
5	0,28135	Desvio	0,0080790	0,0041005
6	0,26981	CV (%)	2,8342	1,3758
Média	0,29027	Repetibilidade + Intermediária		
Desvio	0,012249	Média	0,29113	
CV (%)	4,2198	Desvio	0,0065454	
		CV (%)	2,2483	

e) Exatidão: a realização do teste de recuperação foi feita a partir da preparação de uma solução amostra e uma solução da SQR, com concentração em torno de 1000 µg/mL.

Cinco soluções foram preparadas simultaneamente e foram denominadas como segue:

SA = Solução amostra

SP = Solução Padrão

SR80 = Solução de recuperação 80%

SR100 = Solução de recuperação 100%

SR120 = Solução de recuperação 120%

Após o preparo, as soluções foram aplicadas em cromatoplaça, analisadas e os teores recuperados foram calculados e estão descritos na Tabela 2.8.

Tabela 2.8: Resultados obtidos na etapa de exatidão - CCDAE

Solução	Concentração Adicionada (µg/mL)	Concentração Determinada (µg/mL)	Recuperação (%)
SA	-	299,5	
SP	352,9		
SR80	282,3	582,7	100,3
SR100	352,9	638,6	96,1
SR120	415,2	694,1	95,0
		Média	97,1
		Desvio	2,79
		CV (%)	2,87

Os resultados da etapa de exatidão foram satisfatórios, uma vez que a legislação preconiza percentual de recuperação entre 95 – 105 % em relação as concentrações de SQR adicionadas a solução amostra. O teor recuperado dentro dos parâmetros estabelecidos pela legislação vigente, comprovam a exatidão do método desenvolvido.

f) Robustez: testada variando os seguintes parâmetros: composição da fase móvel de eluição das cromatoplaças (+ 0,5 % e – 0,5 %); tempo para o escaneamento (leitura) das cromatoplaças (+30 min, +60 min e +18 h); comprimento de onda da leitura (+ 5 nm e - 5 nm); tempo de saturação da cuba de eluição (- 10 min e + 10 min); troca das cromatoplaças (CCDAE por CCD).

Os resultados foram comparados aos de uma análise nas condições normais, realizada em paralelo às modificações e estão apresentados na Tabela 2.9.

Tabela 2.9: Resultados obtidos na etapa de robustez - CCDAE

Parâmetro Alterado	Teor Atropina (%)	CV (%)
Fase Móvel (+ 0,5 %)	0,31903	0,45417
Fase Móvel (- 0,5 %)	0,32546	0,95766
Tempo Saturação (30 min)	0,32221	0,24846

Tempo Saturação (60 min)	0,33194	2,3508
Tempo Saturação (18 h)	0,31289	1,8275
Comprimento de onda ($\lambda = 212$ nm)	0,32644	1,1701
Comprimento de onda ($\lambda = 222$ nm)	0,32849	1,6132
Saturação da cuba (T = 20 min)	0,22621	24,516
Saturação da cuba (T = 40 min)	0,28151	9,2877
Cromatoplaca (CCD)	0,33645	3,3047

Todos os parâmetros modificados, com exceção do tempo de saturação da cuba, produziram coeficientes de variação menores que 5 % em relação a condição normal de análise. Desta forma, foi possível comprovar que o método desenvolvido é robusto e o tempo de saturação da cuba não deve sofrer alterações para que o resultado não seja comprometido.

g) Adequabilidade do Sistema: Os resultados para cada aplicação da SQR estão descritos na Tabela 2.10.

Tabela 2.10: Resultados da adequabilidade do sistema - CCDAE.

Dia	Fator Retenção (Rf)	Área do pico
1 – Linearidade Dia 1	0,35	8591,3
2 – Linearidade Dia 2	0,36	8215,1
3 – Linearidade Dia 3	0,35	8517,1
4 – Precisão Repetibilidade	0,36	8216,6
5 – Precisão Dia 1	0,36	8534,9
6 – Precisão Dia 2	0,35	8209,6
7 – Robustez	0,36	8393,3
Média	0,355	8382,6
Desvio	0,005345	168,57
CV (%)	1,5027	2,011

Os parâmetros monitorados apresentaram CV (%) inferiores a 5 %, demonstrando adequabilidade do sistema para o método analítico desenvolvido.

2.5 Conclusão

Métodos de quantificação de atropina por CCDAE têm poucas publicações em comparação com outros como CLAE, por exemplo. Alguns autores descrevem este método para espécies de *Datura* (MROCZEK et al., 2006, ONISZCZUK et al., 2013). No entanto, não existem relatos para quantificação deste marcador em *A. belladonna*.

Desta forma, o método desenvolvido por CCDAE se mostrou eficaz na quantificação de atropina em folhas de *A. belladonna* L., uma vez que todos os parâmetros da legislação vigente, em relação a validação foram atendidos. Foi possível verificar que o método é específico e seletivo, linear, preciso, exato e robusto.

O método utilizado para a extração dos alcaloides, apesar de amplamente utilizado e descrito na literatura, apresentou formação de emulsão e houve necessidade de centrifugação para que a separação das fases fosse eficiente, este procedimento não comprometeu os resultados, mas acrescenta uma etapa a mais no método extrativo e desta forma o tempo para a completa extração se torna maior.

**3. REVISÃO DA MONOGRAFIA PARA A FARMACOPEIA BRASILEIRA E
DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO POR CROMATOGRAFIA A
LÍQUIDO DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)**

3.1 Introdução

A Farmacopeia Brasileira está na sua 5ª edição, mas constantemente seu conteúdo passa por revisão. As monografias são elaboradas por profissionais com efetiva experiência no assunto e revisadas por outros profissionais do mesmo campo de atividade. A elaboração é realizada de acordo com o “Manual para Elaboração de Monografia para a Farmacopeia Brasileira” (ANVISA, 2012) e são apresentadas com redação clara, sucinta e sem detalhes ou explicações didáticas, considerados desnecessários à Comissão Permanente de Revisão da Farmacopeia Brasileira, responsável pelo texto final das mesmas (ANVISA, 2010).

Algumas monografias possuem, principalmente, metodologias de quantificação de ativos farmacêuticos, desatualizadas, ou seja, descrevem métodos já ultrapassados ou que não foram validados, como é o caso da monografia das folhas de *A. belladonna* L., que na edição atual, descreve um método de doseamento de alcaloides totais por volumetria (ANVISA, 2010).

Técnicas modernas têm sido cada vez mais utilizadas, na indústria e na pesquisa, para o controle de qualidade de drogas vegetais, e dentre elas a que mais se destaca é a Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência (CLAE). Isso ocorre, principalmente, pela grande quantidade de amostra que pode ser analisada por esta técnica, além da variedade de detectores disponíveis como detectores por ultravioleta e arranjo de diodos (os mais utilizados), índice de refração, fluorescência dentre outros (REGINATTO, 2017).

A CLAE é uma técnica baseada em separação de componentes, de uma mistura, que ocorre a partir da interação diferencial entre analito, fase móvel e fase estacionária do sistema. Dentre os tipos a que mais se destaca ainda é a cromatografia em fase reversa, onde a fase estacionária apresenta baixa polaridade e tem ampla aplicação na análise de produtos farmacêuticos, incluindo fitoterápicos. O equipamento consiste em um ou mais reservatórios contendo fase móvel, uma bomba ou sistema de bombas que impulsionam a fase móvel, de forma controlada, pelo sistema, um injetor de amostra, uma coluna cromatográfica (existem diferentes tipos), um detector e sistema de captura de dados (*software*). Um esquema do funcionamento básico de um cromatógrafo a líquido de alta eficiência está ilustrado na Figura 3.1.

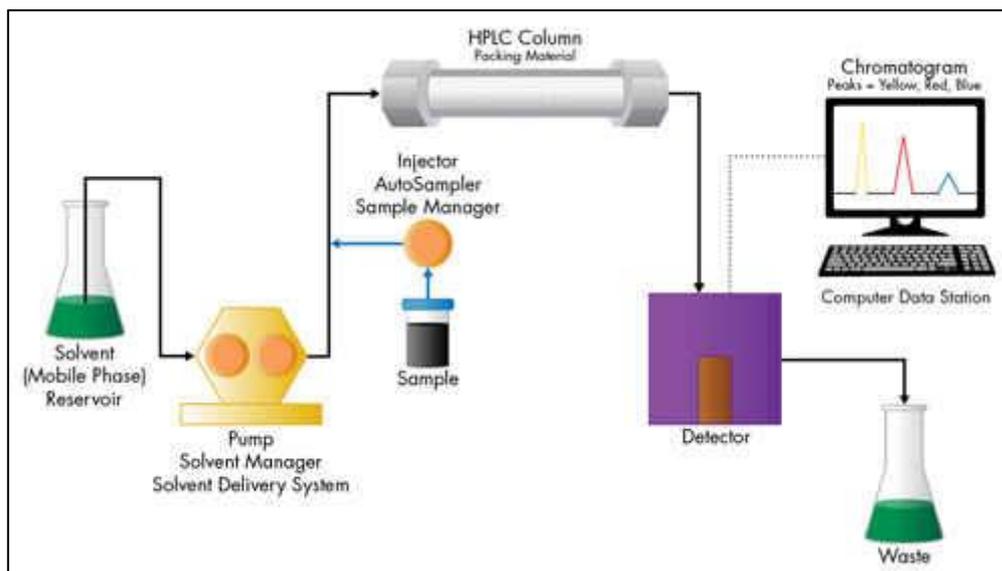


Figura 3.1: Esquema de funcionamento – CLAE. (WATERS)

Alguns parâmetros podem ser avaliados para verificar a separação dos constituintes dentro de uma mistura e estão citados a seguir:

Tempo de Retenção (T_r): característico da substância analisada, entretanto não é exclusivo.

Fator de retenção (k): é a razão entre a quantidade da substância com afinidade pela fase estacionária e a quantidade com afinidade pela fase móvel. Quanto maior a afinidade da substância pela fase estacionária maior a sua retenção.

Número de Pratos (N): é indicativo da eficiência da coluna. Pode ser expresso em números de pratos teóricos por coluna ou número de pratos teóricos por metro.

Resolução (R): eficácia da separação de dois componentes de uma mistura num cromatograma.

Assim como na CCDAE, na CLAE o preparo de amostra e escolha do sistema de fase móvel são essenciais para um bom desenvolvimento de metodologias de quantificação e influenciam diretamente os parâmetros citados acima.

As metodologias para quantificação de alcaloides totais em folhas de *A. belladonna* descritas em compêndios oficiais, bem como as publicações que descrevem métodos para quantificação de AT em CLAE foram descritas no item 1.5.2 nas Tabela 1.1 e 1.2.

3.2 Objetivos Específicos

Revisar a monografia das folhas de *A. belladonna* da Farmacopeia Brasileira 5º Edição.

Desenvolver e validar método para quantificação de atropina nas folhas de *A. belladonna* utilizando CLAE.

3.3 Materiais e Métodos

3.3.1 Material Vegetal, Solventes, Reagentes e Materiais

Além do material vegetal obtido e descrito no item 2.3.1, mais duas amostras foram obtidas, comercialmente, da empresa Healthy Life, com lote nº 1_12_4 e da Martin Bauer Group (Farmacopeia Europeia), com lote nº 1511410. As amostras foram identificadas como AB-03 e AB-04, respectivamente. As folhas secas (Figura 3.2 a e b), foram recebidas embaladas em saco plástico e posteriormente transferidas para envelopes de papel pardo, revestidos externamente com saco plástico e armazenadas sob refrigeração durante sua utilização.

Os solventes grau *HPLC* utilizados foram adquiridos da marca Tedia do Brasil e Vetec. Os reagentes grau analítico foram obtidos das marcas Tedia do Brasil e Sigma Aldrich, Dinâmica e Nuclear. A substância química de referência (SQR), atropina base livre foi adquirida da marca Sigma Aldrich, lote 5LBD8308V, pureza 99%. O bromidrato de escopolamina também foi adquirido da marca Sigma Aldrich, lote 5LBL1552V, pureza 99%. A água ultrapura utilizada foi fornecida pela Central de água da Faculdade de Farmácia. As colunas cromatográficas utilizadas foram adquiridas das marcas Kromasil e NST. A pré-coluna utilizada foi adquirida da marca Phenomenex. As vidrarias utilizadas foram adquiridas das marcas Pyrex e Vidrolabor.



Figura 3.2: Material vegetal obtido comercialmente. (a) Healthy Life; (b) Martin Bauer Group

3.3.2 Ensaio de identificação para presença de Alcaloides Tropânicos

As amostras AB-03 e AB-04 foram testadas quanto à presença de AT conforme descrito no item 2.3.2.

Os ensaios descritos nos itens a seguir, foram propostos para constar na nova monografia do material vegetal da Farmacopeia Brasileira, e as quatro amostras (AB-01, AB-02, AB-03 e AB-04) foram testadas, com exceção da Determinação de Água para AB-01 que já havia sido realizado.

3.3.3 Identificação por Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

O ensaio foi realizado seguindo item 5.2.17.1 – *Cromatografia em Camada Delgada* da FB 5 °ED (volume 1, p. 105), descrito a seguir:

Fase estacionária: sílica-gel GF₂₅₄.

Fase móvel: mistura de tolueno, acetato de Etila e dietilamina (7:2:1 v/v/v).

Solução amostra: foram pesadas, cerca de 1,5 g de amostra e adicionados 15 mL de H₂SO₄ 0,05 mol/L. A mistura foi agitada por 2 minutos em agitador magnético, filtrada por papel filtro e transferida para um funil de separação de 125 mL. Foram adicionados 7,5 mL de água destilada e o extrato foi alcalinizado com hidróxido de amônio até pH 10. Os alcaloides foram extraídos com 3 x 10 mL de diclorometano

p.a.. As fases orgânicas foram reunidas, secas com sulfato de sódio (Na₂SO₄) anidro. O extrato de alcaloides foi filtrado em papel filtro para cápsula de porcelana e o solvente foi evaporado até secar em banho d'água (sem ultrapassar 40 °C). O resíduo foi solubilizado em 0,5 mL de metanol.

Solução referência 1: preparar uma solução a 10 mg/mL de atropina base livre em metanol.

Solução referência 2: preparar uma solução a 4 mg/mL de bromidrato de escopolamina em metanol.

Revelador: Misturar volumes iguais de solução de iodeto de potássio a 40% (p/v) em água e de solução preparada dissolvendo 0,85 g de subnitrito de bismuto em mistura de 10 mL de ácido acético glacial e 40 mL de água. Diluir 1 volume dessa mistura com 2 volumes de ácido acético glacial e 10 volumes de água imediatamente antes do uso. (solução de iodeto de potássio e subnitrito de bismuto SR - Reagente de Dragendorff)

Procedimento: Aplicar na cromatoplaça, separadamente, em forma de banda, 10 µL da *Solução amostra* e das *Soluções referência (1 e 2)*. Desenvolver o cromatograma por 10 cm. Remover a cromatoplaça e deixar secar ao ar por 15 minutos e em seguida, em estufa 100-105 °C por 15 minutos. Nebulizar com o revelador. Visualizar sob luz visível.

3.3.4 Determinação do Teor de Matéria Estranha

O ensaio foi realizado seguindo item 5.4.2.2 – *Determinação de Matéria Estranha* da FB 5 °ED (volume 1, p.194), descrito a seguir:

Foram pesados, com exatidão, cerca de 50 g de amostra, colhidas, por quarteamento, e espalhadas em camada fina sobre uma superfície plana. Os materiais estranhos à droga foram separados manualmente a olho nu e, em seguida, com auxílio de lente de aumento. O material separado foi pesado e sua porcentagem

calculada, com base no peso da amostra submetida ao ensaio, através da equação 3.1.

Equação 3.1: Cálculo para determinação de Matéria Estranha.

$$ME (\%) = \frac{Pe}{Pi} \times 100$$

Onde:

Pe = Massa, em g, de matéria estranha

Pi = Massa, em g, de material vegetal inicial

3.3.5 Determinação de Cinzas Totais

O ensaio foi realizado, em triplicata, seguindo item 5.4.2.5 – *Determinação de Cinzas Totais* da FB 5° ED (volume 1, p.195), descrito a seguir:

Foram pesados, exatamente, entre 1,0-3,0 g da amostra pulverizada (180 µm), em cadinho de porcelana previamente tarado (2 h a 600 °C). A amostra foi distribuída uniformemente no cadinho e incinerada aumentando, gradativamente, a temperatura até, no máximo, 600 ± 25 °C, até que todo o carvão seja eliminado. Um gradiente de temperatura (30 minutos a 200 °C, 60 minutos a 400 °C e 90 minutos a 600 °C) foi utilizado. Os cadinhos foram resfriados em dessecador e pesados. A porcentagem de cinzas foi calculada em relação à droga seca ao ar, através da equação 3.2.

Equação 3.2: Cálculo para determinação de Cinzas Totais.

$$CT (\%) = \frac{Pf - Pcv}{Pi} \times 100$$

Onde,

Pf = massa, em g, do cadinho + amostra após a incineração

Pcv = massa, em g, do cadinho vazio antes da incineração

Pi = massa, em g, da amostra

3.3.6 Determinação de Água

O ensaio foi realizado, em triplicata, nas amostras AB-02, AB-03 e AB-04, conforme ensaio 5.4.2.3 - *Determinação de Água em Drogas vegetais* da FB 5 °Ed, (volume 1, p. 197) descrito no item 2.3.4 e calculados pela equação 2.1.

3.3.7 Preparo dos extratos

O método de extração para compor a monografia das folhas na FB levou em consideração os resultados obtidos na metodologia anteriormente desenvolvida para análise por CCDAE, o que resultou na troca do ácido sulfúrico 0,05 mol/L por metanol p.a. para eliminar a formação de emulsão, e alguns ensaios preliminares (método extrativo, relação droga:solvente, tempo) também foram realizados. A otimização da extração, proposta nos objetivos deste trabalho, foi iniciada, porém, alguns resultados demonstraram não ser o melhor método para controle de qualidade. Dessa forma, reunindo as melhores condições já conhecidas para a extração, o método de extração descrito a seguir foi desenvolvido para ser utilizado na quantificação de atropina por CLAE:

Foram pesados, com exatidão, em erlenmeyer de 50 mL, cerca de 0,25 g da droga em pó (180 µm) e adicionados 15 mL de álcool metílico p.a.. O frasco foi fechado com filme plástico e levado a banho de ultrassom por 60 minutos. O extrato bruto metanólico foi filtrado através de papel filtro para balão de fundo redondo de 50 mL. O erlenmeyer foi lavado com 2 x 1 mL de álcool metílico p.a.. O solvente foi eliminado em evaporador rotatório sem ultrapassar 40 °C. O extrato seco do balão foi transferido para funil de separação de 250 mL, utilizando 2 alíquotas de 10 mL e 1 alíquota de 5 mL de ácido clorídrico 5 % (HCl 5%), com auxílio de ultrassom para facilitar a solubilização do extrato no ácido. O extrato aquoso ácido foi extraído com 3 x 20 mL de diclorometano, usando os primeiros 20 mL para limpar o resíduo do balão de fundo redondo de 50 mL. As fases orgânicas das lavagens foram desprezadas. O extrato aquoso foi alcalinizado com Hidróxido de Amônio p.a. (NH₄OH 25 %) até pH 10. Os alcaloides foram extraídos com 5 x 20 mL de diclorometano p.a.. As fases orgânicas foram reunidas e secas com 15 g de sulfato de sódio anidro. Após, filtradas em papel filtro para uma cápsula de porcelana, o sulfato de sódio do papel filtro foi lavado com 2 mL de diclorometano p.a.. O solvente foi evaporado até *secura* em banho d'água, sem ultrapassar 40 °C. O extrato seco de alcaloides foi solubilizado com metanol (grau

HPLC) para balão volumétrico de 5 mL e filtrado por membrana 0,45 µm para vial de 2 mL e injetado em Cromatógrafo a Líquido de Alta Eficiência conforme descrito no item conforme descrito em 3.3.5. O esquema do preparo e análise dos extratos está ilustrado na Figura 3.3.

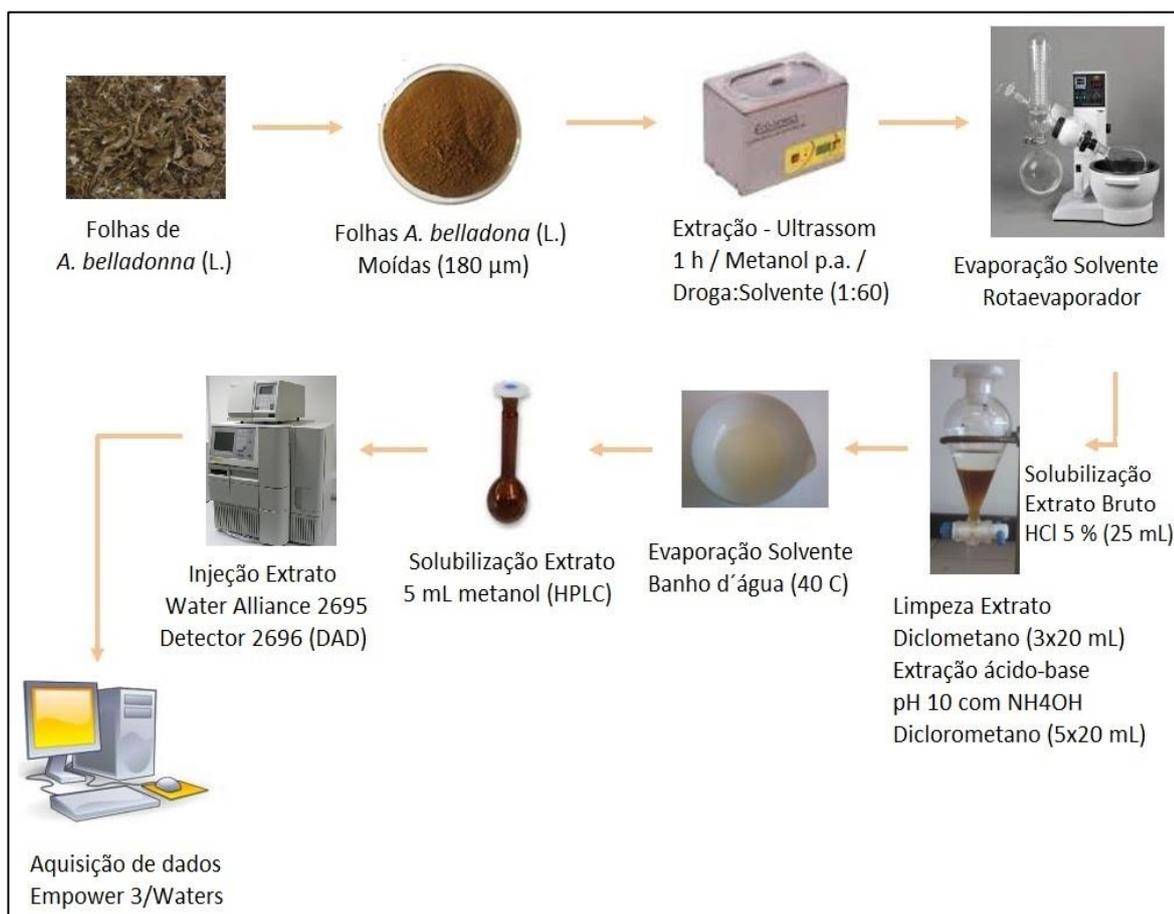


Figura 3.3: Preparo dos extratos para análise por CLAE.

3.3.8 Desenvolvimento do método

Muitos relatos da literatura descrevem metodologias de quantificação de AT utilizando Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência, porém, a quase totalidade das publicações descrevem fase móvel tampão ou com sais dissolvidos. Estas metodologias são amplamente utilizadas, mas apresentam o inconveniente de precipitação dos sais dissolvidos na fase móvel, dentro das tubulações e filtros do equipamento, caso a limpeza do sistema não seja realizada adequadamente.

Dessa forma, diferentes fases móveis foram testadas sem a utilização de sais ou tampão na composição. Foram realizados teste utilizando ácido fórmico, ácido

fosfórico e ácido trifluoracético para acidificar a fase móvel. Sistemas de eluição isocráticos e gradientes também foram testados.

O desenvolvimento do método foi realizado em Cromatógrafo a Líquido de Alta Eficiência da marca Waters, modelo Alliance 2695, equipado com detector de arranjo de diodos da marca Waters, modelo 2996. Os parâmetros estabelecidos para o método estão descritos na Tabela 3.1.

Tabela 3.1: Parâmetros desenvolvidos para análise por CLAE.

Parâmetro	Especificação		
Coluna	Kromasil C18 (150 x 4,6 mm x 5 µm)		
Pré-coluna	Phenomenex C18 (4 x 3,0 mm)		
Sistema de Eluição	Gradiente Linear (Descrito na Tabela 3.2)		
Vazão (mL/min)	0,7		
Volume de injeção (µL)	10		
Fase Móvel	A: Água Purificada : Ácido Trifluoracético (0,01 %) B: Acetonitrila : Ácido Trifluoracético (0,08 %)		
Faixa Comprimento de Onda / Detecção (nm)	190 – 400 / 210		
Gradiente			
Tempo (min)	Eluente A (%)	Eluente B (%)	Eluição
0 - 15	95 → 0	5 → 100	Gradiente linear
15-20	0	100	Isocrático

O método desenvolvido teve tempo total da corrida cromatográfica de 20 minutos, com um equilíbrio de 10 minutos entre as corridas com fase móvel A e B na proporção inicial do método de 95:5, respectivamente.

3.3.9 Validação

O método foi validado, de acordo com a Resolução nº 899/2003 e os seguintes parâmetros foram contemplados na validação:

a) Especificidade/Seletividade: realizada pela comparação dos espectros de ultravioleta, da banda referente à atropina, obtidos a partir da injeção de solução da SQR atropina base livre (125 µg/mL), e da solução amostra, preparada conforme descrito no item 3.3.7 e pela comparação das áreas, referentes à atropina, obtidas a

partir da injeção da solução amostra, preparada conforme descrito no item 3.3.7 e solução amostra com adição de SQR atropina base livre.

b) Linearidade: realizada através da injeção de diferentes diluições de uma solução estoque da SQR atropina base livre, com concentração igual a 500 µg/mL. Três curvas da substância de referência foram construídas, com 7 pontos (injetados em triplicata) correspondendo a um intervalo de concentração de atropina entre 50 e 200 µg/mL. A linearidade do método foi verificada a partir da medida da área do pico referente ao marcador químico no cromatograma. O coeficiente de regressão mínimo exigido pela Resolução nº 899/2003 no valor de $r^2 = 0,99$ foi avaliado e o tratamento estatístico foi realizado através de método dos mínimos quadrados e análise de variância (ANOVA).

c) Limites de Detecção e Quantificação: foram calculados a partir dos dados obtidos no estudo de linearidade (curva padrão da SQR atropina base livre) e através das Equações 2.2 e 2.3.

d) Precisão Repetibilidade: realizada através da análise de seis extrações, realizadas conforme descrito no item 3.3.7. Cada uma das seis soluções amostra foram injetadas em triplicata no cromatógrafo e a área correspondente ao pico do marcador químico no cromatograma foi avaliada. Juntamente com as soluções amostra, uma solução da SQR atropina base livre, com concentração igual a 125 µg/mL, foi injetada também em triplicata.

e) Precisão Intermediária: realizada através da análise de três extrações, realizadas conforme descrito no item 3.3.7. Cada uma das três soluções amostra foram injetadas em triplicata no cromatógrafo e a área correspondente ao pico do marcador químico no cromatograma foi avaliada. Juntamente com as soluções amostra, uma solução da SQR atropina base livre, com concentração igual a 125 µg/mL, foi injetada também em triplicata. Este procedimento foi realizado em três dias diferentes, sendo um deles executado por um analista diferente dos demais.

f) Reprodutibilidade Interlaboratorial: realizada em colaboração com os laboratórios de farmacognosia das Universidades Federais do Paraná (UFPR) e de

Pernambuco (UFPE). A amostra e a SQR foram enviadas para análise, juntamente com protocolo descrevendo a metodologia. As análises foram realizadas em triplicata e os resultados foram enviados, via relatório, contendo os cromatogramas obtidos e cálculos realizados. Os resultados encontrados foram comparados aos encontrados após análise de doseamento da amostra AB-01 (3.3.10) para cálculo do CV.

g) Exatidão: realizada através da recuperação da solução da SQR atropina base livre (126,5 µg/mL), adicionada em concentrações iguais a 80, 100 e 120 % em relação a extração do material vegetal, ou seja, solução amostra preparada conforme descrito no item 3.3.7. A recuperação foi calculada a partir da equação 2.4.

h) Robustez: realizada através da modificação de parâmetros da análise, estabelecidos previamente. As variações estão descritas na Tabela 3.2.

Tabela 3.2: Parâmetros avaliados na etapa de robustez - CLAE.

Parâmetro	Normal	Alterado
Fluxo/Vazão de Fase Móvel (mL/min)	0,7	0,65 0,75
Marca Coluna	Kromasil	NST
Detecção (nm)	$\lambda = 210$	$\lambda = 205$ $\lambda = 215$

i) Adequabilidade do Sistema: realizada através da injeção de SQR a cada dia de análises. Foram monitorados os parâmetros, tempo de retenção, área do pico da atropina e eficiência da coluna através do cálculo do número de pratos teóricos (Equação 3.3) e os coeficientes de variação de cada parâmetro foram calculados.

Equação 3.3: Cálculo do número de pratos teóricos (N)

$$N = 16 \times \frac{(Tr)^2}{(W)^2}$$

Onde,

Tr = tempo de retenção (min)

W = traçado de um tangente à curva gaussiana nos seus pontos de inflexão extrapolando a linha de base até a interseção com a tangente (min).

3.3.10 Doseamento das Amostras Comerciais

As quatro amostras, obtidas comercialmente, foram preparadas e analisadas conforme itens 3.3.7 e 3.3.8, respectivamente, para avaliação do teor de atropina.

Os resultados da quantificação de atropina nas extrações e análises realizadas nas etapas da validação, e doseamento das amostras, foram expressos em % de atropina e calculados através da equação 2.5. Os coeficientes de variação foram calculados através da equação 2.6.

3.4 Resultados e Discussão

3.4.1 Ensaio de identificação para presença de Alcaloides Tropânicos

As amostras AB-03 e AB-04 apresentaram resultado positivo para AT. A coloração violeta intensa característica desses metabólitos foi evidenciada em ambas amostras, as imagens das cores do ensaio estão ilustradas na Figura 2.3.

3.4.2 Identificação por Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

A Figura 3.4 ilustra o resultado encontrado no ensaio de CCD.

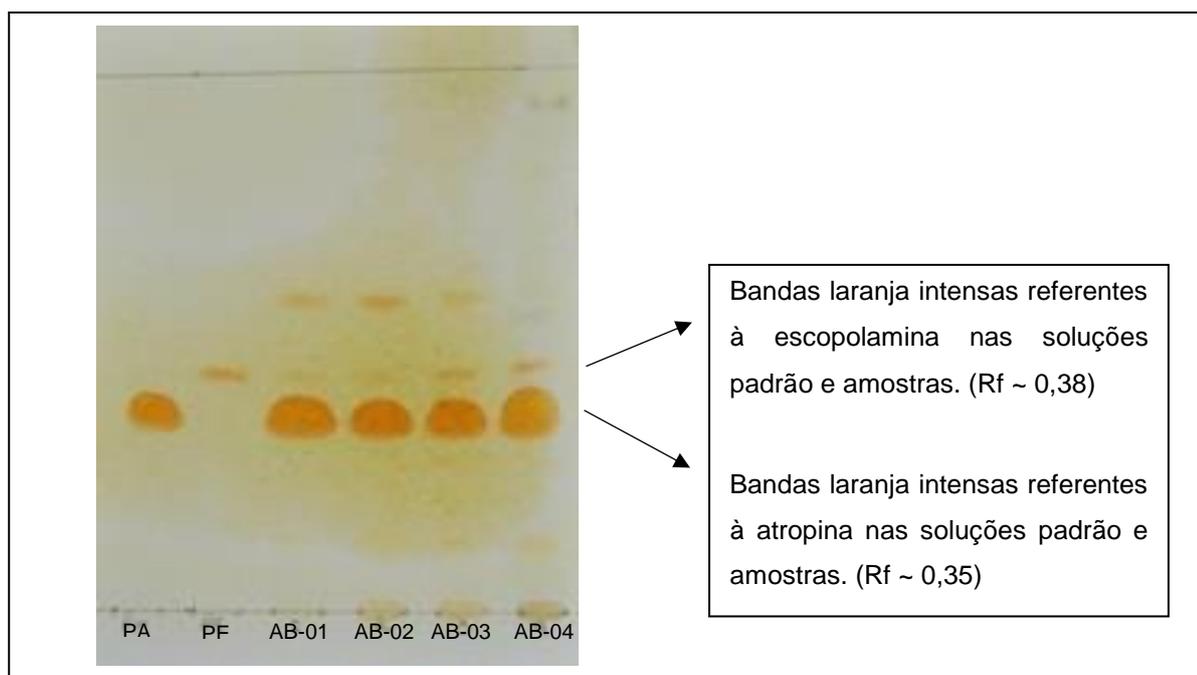


Figura 3.4: Resultado do ensaio de Identificação por CCD. (PA) – Padrão Atropina; (PE) – Padrão Bromidrato de Escopolamina; (AB-01 a AB-04): Extratos das Amostras.

O ensaio de identificação por CCD possibilitou uma fácil e correta identificação dos principais AT presentes nas amostras.

As amostras apresentaram manchas de intensidade semelhante e mesmo Rf do que aqueles produzidos pelas das soluções de referência.

3.4.3 Determinação do Teor de Matéria Estranha

Os resultados obtidos no ensaio estão apresentados na Tabela 3.3.

Tabela 3.3: Resultados de matéria estranha para as amostras AB-01, AB-02, AB-03 e AB-04.

Amostra	Pe (g)	Pi (g)	ME (%)
AB-01	1,4761	51,4732	2,87
AB-02	0,7208	50,0545	1,44
AB-03	3,4601	50,0018	6,92
AB-04	1,4912	50,3798	2.96

A FB 5 °ED especifica um máximo de 3 % de matéria estranha para as folhas de *A. belladonna*. Desta forma, apenas a amostra AB-03 teve o teor acima do preconizado. Esta amostra foi adquirida da internet, o que pode explicar o teor acima do especificado, ou seja, o material não tem origem de fonte conhecida e confiável como as demais.

3.4.4 Determinação de Cinzas Totais

Os resultados obtidos no ensaio estão apresentados na Tabela 3.4.

Tabela 3.4: Resultados de cinzas totais para as amostras AB-01, AB-02, AB-03 e AB-04.

Replicata	Cinzas Totais (%)			
	AB-01	AB-02	AB-03	AB-04
1	10,01	10,40	10,95	14,40
2	10,54	10,50	10,86	14,21
3	10,39	10,59	11,18	13,96
Média (%)	10,31	10,49	11,00	14,19
Desvio Padrão	0,2702	0,09617	0,1670	0,2212
Coeficiente de Variação (%)	2,620	0,9163	1,519	1,559

A FB 5 °ED especifica um máximo de 10 % de cinzas totais para as folhas de *A. belladonna*. Desta forma, apenas as amostras AB-01 e AB-02 apresentaram teor próximo do preconizado atualmente na monografia deste material vegetal.

3.4.5 Determinação de água

Os resultados obtidos no ensaio estão apresentados na Tabela 3.5.

Tabela 3.5: Resultados da determinação de água para as amostras AB-01, AB-02, AB-03 e AB-04.

Replicata	Água (%)			
	AB-01	AB-02	AB-03	AB-04
1	6,887	6,908	7,145	9,427
2	7,011	6,693	6,879	9,394
3	7,052	6,869	6,559	9,177
Média (%)	6,983	6,824	6,861	9,333
Desvio Padrão	0,0858	0,1144	0,2931	0,1357
Coeficiente de Variação (%)	1,229	1,676	4,272	1,454

Este ensaio não faz parte da monografia atual da FB 5 °ED. A determinação de água é apenas indicada para que o teor encontrado seja subtraído da massa inicial no ensaio de doseamento (teor de atropina é calculado em relação ao material vegetal seco).

3.4.6 Desenvolvimento do Método

Após o desenvolvimento do método, as soluções padrão e amostra, produziram os cromatogramas ilustrados na Figura 3.5 (a) e (b), respectivamente. Na figura é possível identificar o pico referente à atropina no tempo de retenção de aproximadamente 7,7 minutos e ambas soluções.

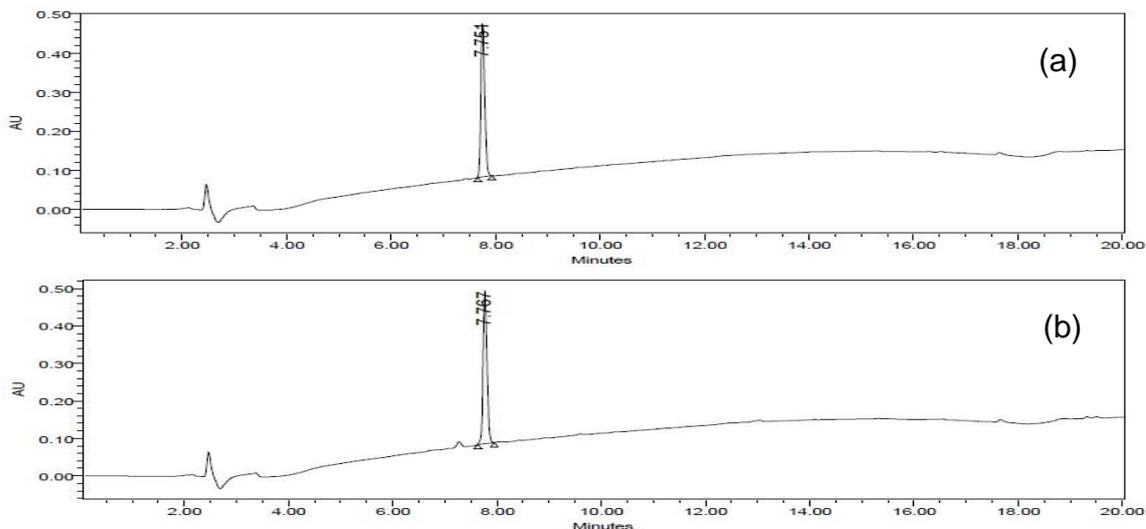


Figura 3.5: Cromatogramas obtidos para o método desenvolvido por CLAE. (a) solução SQR; (b) amostra AB-01.

3.4.7 Validação

a) Especificidade/Seletividade: após injeção de solução da SQR atropina base livre e de solução amostra, os espectros de ultravioleta, referentes à banda do marcador químico, foram comparados e a Figura 3.6 mostra o resultado encontrado, demonstrando que ambas soluções analisadas apresentam o mesmo espectro UV.

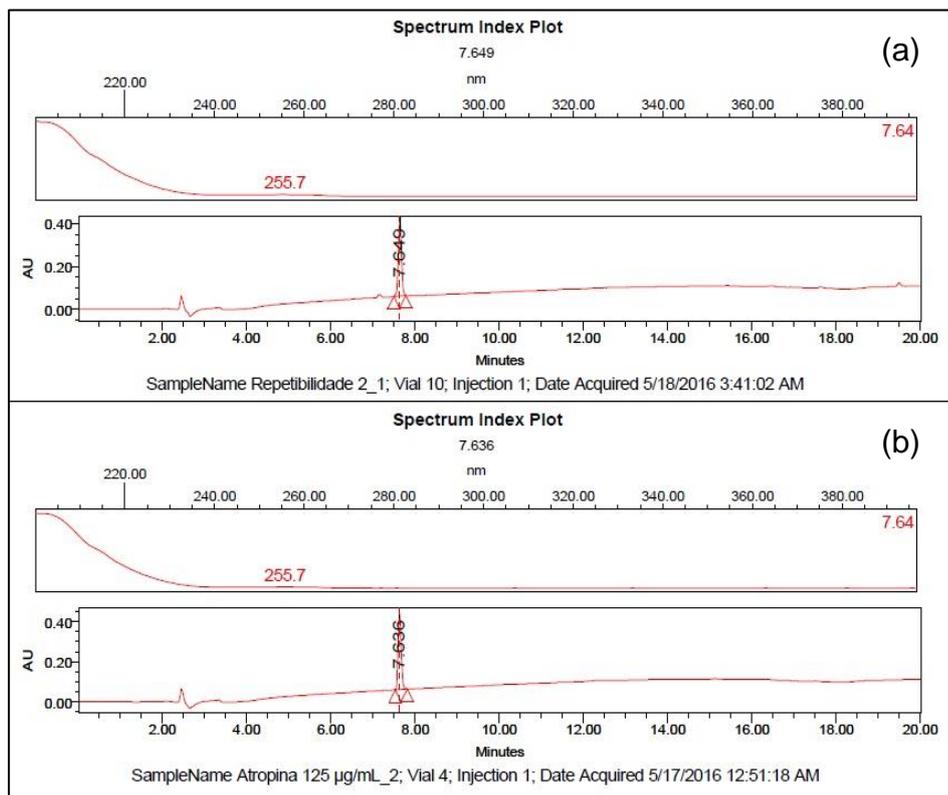


Figura 3.6: Comparativo de Espectros UV: (a) amostra AB-01; (b) SQR - CLAE.

Após a injeção de solução amostra com e sem adição da SQR atropina base livre, a área, referente ao pico do marcador químico, foi comparada nos dois cromatogramas e a Figura 3.7 (a e b) mostra o resultado encontrado. É possível perceber, pela análise dos cromatogramas obtidos, que a adição de SQR na solução amostra resultou em incremento da área referente ao pico da atropina (aumento da área de 892459 para 1964117), não alterando outras áreas do cromatograma e comprovando que o método desenvolvido é seletivo para o marcador químico em análise.

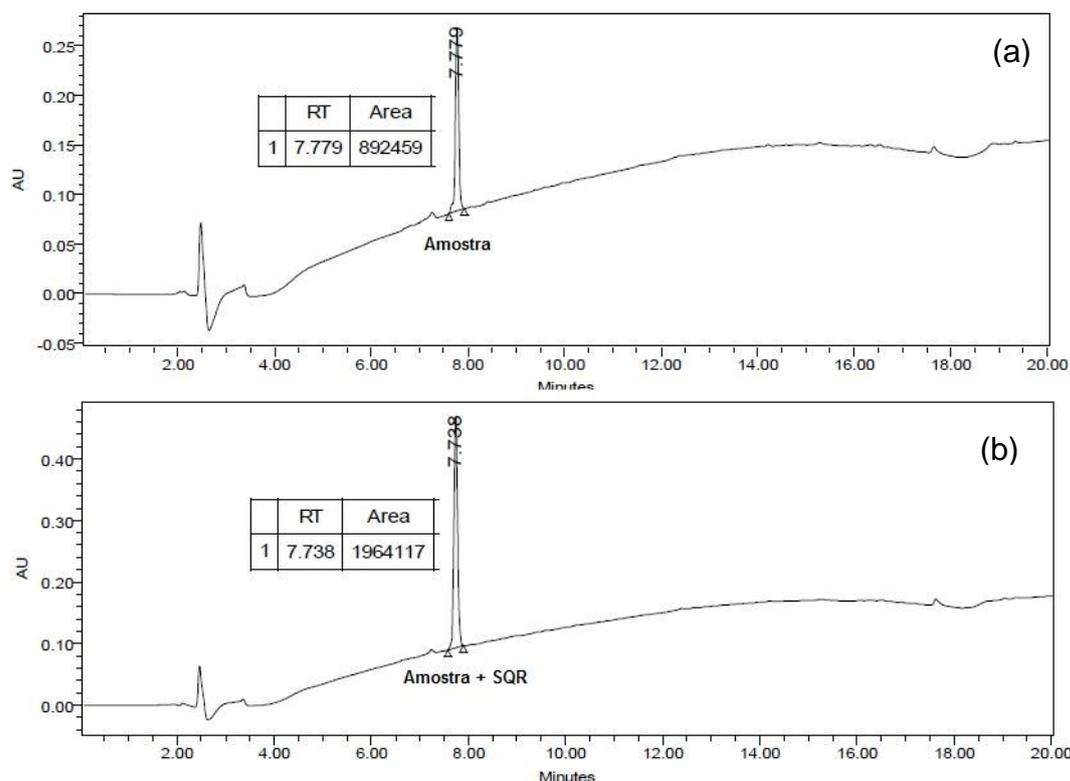


Figura 3.7: (a) Picos das bandas da amostra AB-01; (b) Picos das bandas da amostra AB-01+SQR atropina base livre - CLAE

Os resultados demonstram que o método desenvolvido é específico e seletivo para o marcador químico em análise.

b) Linearidade: após injeção e análise dos cromatogramas contendo os pontos da solução da SQR atropina base livre, o traçado e o tratamento estatístico das curvas de padrão de atropina foram realizados utilizando planilha eletrônica Microsoft Excel 2016. Os dados e gráficos das curvas dos dias 1, 2 e 3 estão apresentados no Apêndice B. Na Tabela 3.6 estão apresentadas as áreas médias, do pico referente à

atropina para cada concentração injetada no CLAE. O gráfico da linearidade média, a equação da reta e o coeficiente de regressão estão ilustrados na Figura 3.8.

Os valores obtidos na análise de variância (ANOVA) (Tabela 3.7) demonstram que há diferenças significativas entre as diferentes concentrações e respectivas áreas (valor-P < 0,05 e $F > F_{crítico}$), com intervalo de confiança de 95 % ($\alpha = 0,05$).

Tabela 3.6: Dados obtidos a partir da média das áreas dos dias 1,2 e 3 da linearidade - CLAE

Atropina ($\mu\text{g/mL}$)	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Média	Desvio	CV (%)
50	786687	749208	775969	770621	19303,57	2,505
75	1185223	1186754	1186498	1186192	763,34	0,064
100	1581279	1599277	1584150	1588236	9669,32	0,609
125	1936882	1985261	1941167	1954437	26780,58	1,370
150	2340975	2402142	2328083	2357067	39565,32	1,679
175	2708088	2753947	2676586	2712873	38902,08	1,434
200	3122871	3106470	3102647	3110662	10744,32	0,345

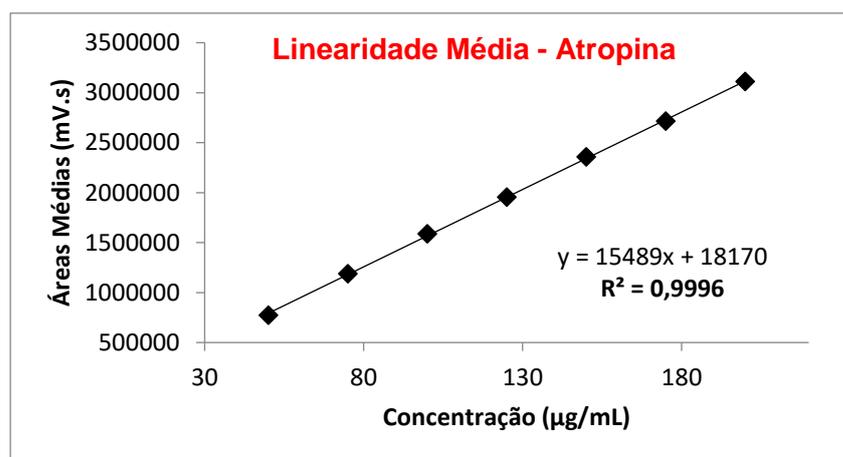


Figura 3.8: Gráfico da curva média de padrão de atropina obtida nos dias 1,2 e 3 da linearidade, equação da reta e coeficiente de regressão.

Tabela 3.7: Análise de variância (ANOVA) para os dados de linearidade da curva padrão de atropina - CLAE

Fonte da variação	SQ	GL	MQ	F	valor-P	F crítico
Entre grupos	1,33675E+13	1	1,33675E+13	38,19355569	4,72633E-05	4,747225336
Dentro dos grupos	4,19992E+12	12	3,49993E+11			
Total	1,75674E+13	13				

c) Limites de Detecção e Limite de Quantificação: os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) para a substância de referência, de acordo com os parâmetros obtidos com a equação média da reta, foram calculados a partir da média dos coeficientes de regressão linear (15489) e do desvio padrão médio dos interceptos (17589,9).

Os resultados obtidos foram: LD = 3,7466 µg/mL e LQ = 11,353 µg/mL, indicando que o método apresenta boa sensibilidade com baixos valores de LD e LQ.

d) Precisão – Repetibilidade e Intermediária: os resultados da etapa de precisão foram satisfatórios, tendo em vista que a legislação exige um máximo de 5 % nos valores de coeficiente de variação entre os resultados e isto foi observado tanto nas análises intradias como nas interdias. Da mesma forma, todas as médias calculadas entre as médias das análises apresentaram coeficiente de variação inferior a 5 %. O teor médio de atropina encontrado foi de 0,2657 %. Foi possível, dessa forma, comprovar a precisão do método e os resultados obtidos nesta etapa estão contemplados na Tabela 3.8.

Tabela 3.8: Resultados para teor de atropina na etapa de precisão - CLAE

Precisão					
Repetibilidade		Intermediária			
Replicata	% Atropina	Replicata	% Atropina Dia 1	% Atropina Dia 2	% Atropina Dia 3
1	0,2651	1	0,2725	0,2681	0,2522
2	0,2505	2	0,2760	0,2661	0,2527
3	0,2803	3	0,2733	0,2638	0,2631
4	0,2754	Média	0,2739	0,2660	0,2560
5	0,2685	Desvio	0,001826	0,002186	0,006147
6	0,2620	CV (%)	0,6666	0,8215	2,4013
Média	0,2670	Repetibilidade + Intermediária			
Desvio	0,01047	Média	0,2657		
CV (%)	3,922	Desvio	0,007377		
		CV (%)	2,7761		

e) Reprodutibilidade Interlaboratorial: os resultados obtidos nos ensaios realizados pela UFPR e UFPE, estão apresentados na Tabela 3.9.

Os resultados demonstram concordância dos resultados, entre diferentes laboratórios, apresentando CV inferior a 5 %. Desta forma, o método desenvolvido é considerado reprodutível.

Tabela 3.9: Resultado das análises Interlaboratoriais.

Replicata	UFPR	UFPE	UFRGS
1	0,2453	0,2602	0,2681
2	0,2673	0,2595	0,2662
3	0,2655	0,2606	0,2638
Média	0,2594	0,2601	0,2660
Desvio	0,0122	0,0005	0,002186
CV (%)	4,7184	0,2000	0,8215
Cálculo CV entre os resultados			
Análise	Média	Desvio	CV (%)
UFPR + UFRGS	0,2627	0,004667	1,7765
UFPE + UFRGS	0,2631	0,004172	1,5860

f) Exatidão: a realização do teste de recuperação foi feita a partir da preparação de uma solução amostra e uma solução da SQR, com concentração em torno de 55 µg/mL.

Cinco soluções foram preparadas simultaneamente e foram denominadas como segue:

SA = Solução amostra

SP = Solução Padrão

SR80 = Solução de recuperação 80%

SR100 = Solução de recuperação 100%

SR120 = Solução de recuperação 120%

Após o preparo, as soluções foram injetadas, analisadas e os teores recuperados foram calculados e estão descritos na Tabela 3.10.

Os resultados da etapa de exatidão foram satisfatórios, uma vez que a legislação preconiza percentual de recuperação entre 95 – 105 % em relação às concentrações de SQR adicionadas a solução amostra. O teor recuperado dentro dos

parâmetros estabelecidos pela legislação vigente, comprovam a exatidão do método desenvolvido.

Tabela 3.10: Resultados obtidos na etapa de exatidão - CLAE

Solução	Concentração Adicionada ($\mu\text{g/mL}$)	Concentração Determinada ($\mu\text{g/mL}$)	Recuperação (%)
SA	-	56,02	
SP	55,10		
SR80	44,80	100,7	101,4
SR100	55,10	112,9	103,3
SR120	66,12	125,0	104,4
		Média	103,0
		Desvio	1,528
		CV (%)	1,484

g) Robustez: foi testada variando-se os seguintes parâmetros: variação do fluxo/vazão de fase móvel ($\pm 0,05$ mL/min); troca da marca da coluna (Kromasil para NST); comprimento de onda da análise dos cromatogramas (± 5 nm);

Os resultados foram comparados aos de uma análise nas condições normais, realizada em paralelo às modificações. Os resultados obtidos estão na Tabela 3.11.

Tabela 3.11: Resultados obtidos na etapa de robustez - CLAE

Parâmetro Alterado	Teor Atropina (%)	CV (%)
Vazão Fase Móvel (+ 0,05 mL/min)	0,2641	3,123
Vazão Fase Móvel (- 0,05 mL/min)	0,2531	0,1125
Troca Coluna (NST)	0,2564	1,020
Comprimento de onda ($\lambda = 205$ nm)	0,2516	0,3123
Comprimento de onda ($\lambda = 215$ nm)	0,2498	0,7992

Todos os parâmetros modificados, produziram coeficientes de variação menores que 5 % em relação a condição normal de análise. Desta forma, foi possível comprovar que o método desenvolvido é robusto.

h) Adequabilidade do Sistema: os resultados obtidos através do monitoramento dos parâmetros para adequação do sistema estão apresentados na tabela 3.12.

Os parâmetros avaliados apresentam CV (%) inferiores a 5 %, demonstrando adequabilidade do sistema para o método analítico validado.

Tabela 3.12: Resultados da adequabilidade do sistema - CLAE.

Dia	Tempo de Retenção	Número Pratos	Área do Pico
1 – Linearidade Dia 1	7,630	14785,0	1971251
2 – Linearidade Dia 2	7,643	14601,8	1992226
3 – Linearidade Dia 3 e Precisão Repetibilidade	7,637	15172,7	1992306
4 – Precisão Dia 1	7,740	15214,4	1938652
5 – Precisão Dia 2	7,773	16105,2	1952888
6 – Precisão Dia 3 e Robustez	7,721	15508,3	1982688
Média	7,691	15231,2	1971669
Desvio	0,06159	536,566	21967,78
CV (%)	0,8008	3,523	1,114

3.4.8 Doseamento das Amostras Comerciais

Os resultados da análise das quatro amostras comerciais estão relacionados na Tabela 3.12.

Tabela 3.13: Resultados do doseamento das amostras comerciais

Replicata	AB-01	AB-02	AB-03	AB-04
1	0,2681	0,2051	0,1556	0,2769
2	0,2662	0,2100	0,1570	0,2705
3	0,2638	0,1931	0,1686	0,2702
Média	0,2660	0,2027	0,1604	0,2726
Desvio	0,002186	0,008713	0,007150	0,003794
CV (%)	0,8215	4,2973	4,4572	1,3918

Os resultados demonstram teores variando de 0,16 a 0,27 % de atropina, indicando variabilidade acentuada entre as diferentes amostras.

3.5 Conclusão

Os métodos relatados utilizando esta técnica demonstraram melhores resultados para *A. belladonna* utilizando fase móvel com sías dissolvidos ou sistemas tampão, o que por vezes, pode trazer prejuízos ao funcionamento do equipamento, se não forem observados os cuidados necessários na troca de sistema de fase móvel. Além disso, os melhores resultados para este material vegetal foram relatados para raízes e não para as folhas, na maioria dos casos.

Assim, o método desenvolvido por Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência se mostrou eficaz para quantificação de atropina em folhas de *A. belladonna*, uma vez que todos os parâmetros da legislação vigente, em relação a validação foram atendidos. Foi possível verificar que o método é específico e seletivo, linear, preciso, exato e robusto.

O método de extração utilizando metanol, necessita de uma etapa extra (eliminação do solvente em evaporador) em relação àquele desenvolvido por CCDAE, porém apresenta facilidade na execução pois não há formação de emulsão que ocorre quando a extração é iniciada com ácidos diluídos.

O método para compor a nova monografia do material vegetal foi escolhida, levando em consideração aspectos importantes no Controle de Qualidade como facilidade da extração, tempo de execução de uma análise completa e técnica analítica mais adequada à realidade na indústria.

Os ensaios propostos, com os respectivos resultados, para compor a revisão da monografia na FB, serão apresentados e discutidos em reunião do Comitê Técnico Temático de Farmacognosia da ANVISA, responsável pelas monografias de drogas vegetais, para aprovação.

4. OTIMIZAÇÃO DE EXTRAÇÃO, DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO POR CROMATOGRAFIA A LÍQUIDO DE ULTRA EFICIÊNCIA (CLUE)

4.1 Introdução

Muitos fatores influenciam a extração de metabólitos em plantas: o solvente e sua concentração, a granulometria do material vegetal, a relação/proporção entre droga vegetal e solvente, o tempo de extração, a temperatura e o número de extrações, são alguns exemplos. Otimizar estes fatores é fundamental para obtenção de extratos que sejam constituídos da maior quantidade possível do(s) analito(s) de interesse. Para tal, os desenhos experimentais são ferramentas utilizadas para examinar, de forma sistemática, um problema (nesse caso, otimização da extração), ou seja, são ferramentas que auxiliam no planejamento dos experimentos e na análise dos dados obtidos (LUNDSTEDT et al., 1998).

É praticamente impossível controlar e avaliar as contribuições de todos os fatores que afetam um sistema estudado, mas através de desenhos de triagem, os efeitos mais significativos das variáveis experimentais e suas interações podem ser avaliados com confiança. Esses ensaios podem ser realizados utilizando desenhos fatoriais de dois níveis, de forma total (2^k) ou fracionados (2^{k-1}) e são muito utilizados para este objetivo, principalmente porque são eficientes e econômicos (LUNDSTEDT et al., 1998).

Metodologias de Superfície de Resposta (MSR) podem ser utilizadas para atingir o valor ótimo desejado e dessa forma, os fatores mais significativos podem ser otimizados. Algumas etapas podem ser seguidas na aplicação de MSR como uma técnica de otimização: (1) seleção das variáveis com efeitos mais significativos através de estudos de rastreio e delimitação da região experimental, de acordo com o objetivo do estudo e da experiência do pesquisador; (2) escolha do desenho experimental e a realização dos experimentos de acordo com a matriz experimental selecionada; (3) tratamento estatístico-matemático dos resultados experimentais através do ajuste de uma função polinomial; (4) obtenção dos valores ótimos para cada variável avaliada (BEZERRA, et al., 2008; MINITAB 17[®]).

Dentre as matrizes de MSR mais utilizadas está o Desenho Box-Behnken (DBB) onde os pontos do experimento estão em combinações dos níveis de fatores inferiores e superiores e seus pontos médios, conforme ilustrado na Figura 4.1.

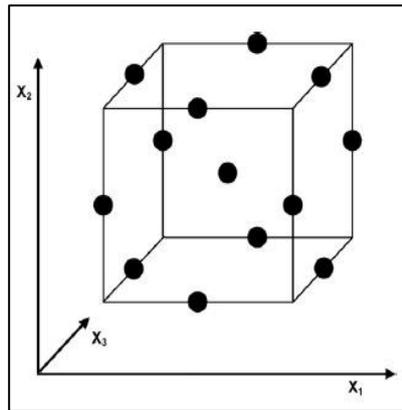


Figura 4.1: Representação de DBB com três fatores.

Os pontos no diagrama representam as corridas experimentais executadas. Esses experimentos geralmente possuem menos pontos e sua execução é menos dispendiosa do que experimentos do tipo Desenho de Composto Central com o mesmo número de fatores, por exemplo (FERREIRA, 2007; MONTGOMERY, 2001).

A análise por Cromatografia a Líquido de Ultra Eficiência (CLUE) também vêm sendo utilizada por ser uma das mais modernas técnicas de separação, baseando-se nos mesmos princípios da CLAE, porém com fases estacionárias de menor tamanho de partícula e altas velocidades lineares de fase móvel (trabalho em altas pressões), o que aumenta a resolução e detectabilidade do sistema. Metodologias desenvolvidas por CLUE são vantajosas sob o aspecto de volume de injeção e de fase móvel gastos por análise, muito inferiores quando comparados à CLAE (MALDANER, 2008). Além disso, o tempo de análise também pode ser reduzido de forma expressiva na maioria dos casos, dependendo do tipo de compostos a serem analisados.

A transferência de metodologias desenvolvidas em CLAE para CLUE também pode ser realizada de forma rápida e eficiente adaptando-se, principalmente o volume de injeção, vazão/fluxo de fase móvel e tempo, considerando fase estacionária semelhante àquela utilizada em CLAE. O funcionamento do CLUE é semelhante ao CLAE (Figura 3.1) com as diferenças apontadas na Figura 4.2.

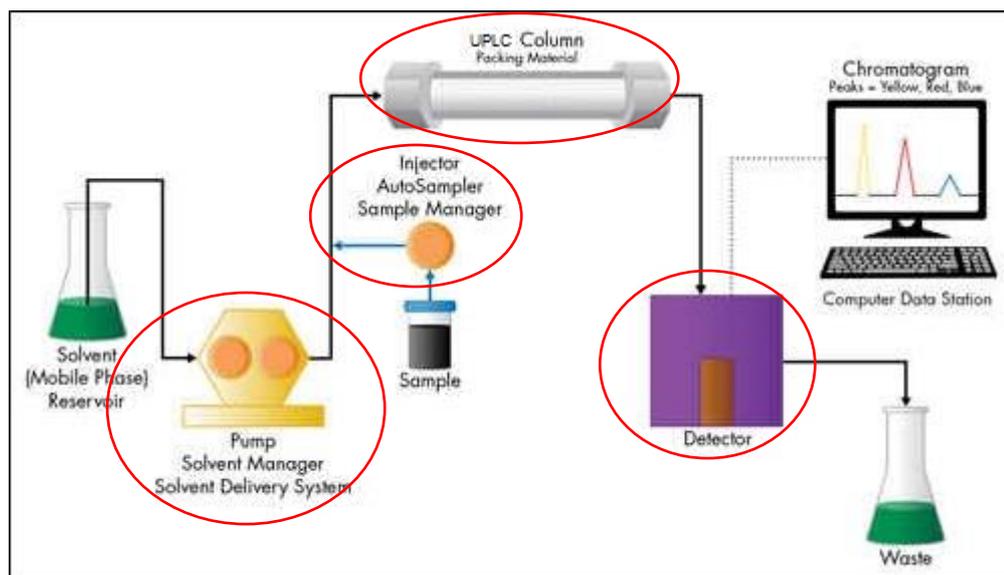


Figura 4.2: Funcionamento do CLUE. (WATERS)

4.2 Objetivos Específicos

Otimizar a extração de atropina, em folhas de *A. belladonna*, utilizando desenho fatorial fracionado e metodologia de superfície de resposta do tipo desenho Box-Behnken e *software* Minitab 17 como ferramenta estatística.

Desenvolver e validar metodologia para quantificação de atropina nas folhas de *A. belladonna* utilizando CLUE.

4.3 Materiais e Métodos

4.3.1 Material Vegetal, Solventes, Reagentes e Materiais

A amostra de material vegetal utilizado foi a AB-01, citada no item 2.3.1. Os solventes grau HPLC utilizados foram adquiridos da marca Vetec e Merck. Os reagentes grau analítico foram obtidos das marcas Sigma Aldrich, Dinâmica e Nuclear.

A substância química de referência (SQR), atropina base livre foi adquirida da marca Sigma Aldrich, lote 5LBD8308V, pureza 99%. A água ultrapura utilizada foi fornecida pela Central de água da Faculdade de Farmácia. As colunas e pré-colunas cromatográficas utilizadas foram adquiridas da marca Waters. As vidrarias utilizadas foram adquiridas das marcas Pyrex e Vidrolabor.

4.3.2 Desenvolvimento do Método

O método em CLUE foi desenvolvido a partir da metodologia desenvolvida no CLAE (Capítulo 3). O extrato utilizado para o desenvolvimento foi o mesmo descrito no item 3.3.7.

O desenvolvimento do método foi realizado em Cromatógrafo a Líquido de Ultra Eficiência da marca Waters, modelo ACQUITY, equipado com detector de arranjo de diodos. Os parâmetros estabelecidos para o método estão descritos na Tabela 4.1.

Tabela 4.1: Parâmetros desenvolvidos para análise por CLAE.

Parâmetro	Especificação
Coluna	Waters Acquity BEH C18 (50 x 2,1 mm x 1,7 µm)
Pré-coluna	Waters Acquity BEH C18 (5 x 2,1 mm x 1,7 µm)
Sistema de Eluição	Gradiente Linear
Fluxo/vazão (mL/min)	0,15
Volume de injeção (µL)	1
Fase Móvel	A: Água Purificada : Ácido Trifluoracético (0,01 %) B: Acetonitrila : Ácido Trifluoracético (0,08 %)
Faixa Comprimento de Onda / Detecção (nm)	190 – 400 / 210

Gradiente			
Tempo (min)	Eluente A (%)	Eluente B (%)	Eluição
0 – 10	95 → 0	5 → 100	Gradiente linear
10-18,5	0	100	Isocrático

O método desenvolvido teve tempo total da corrida cromatográfica de 18,5 minutos, com um equilíbrio de 10 minutos entre as corridas com fase móvel A e B na proporção inicial do método de 95:5, respectivamente.

4.3.3 Preparo dos Extratos

a) Escolha do Método e Solvente Extrator: foram testados quatro métodos de extração: maceração estática (6 dias), maceração dinâmica (6 horas), extração por homogeneizador-ultraturrax (30 minutos) e extração assistida por ultrassom (60 minutos) e dois solventes diferentes (metanol p.a. e etanol p.a.). Todas as extrações foram realizadas com 2 renovações de solvente. A relação droga:solvente utilizada foi

de 1:30, a granulometria $250 \mu\text{m}^1$ e a extração foi realizada conforme descrito no item 3.3.7. As amostras foram injetadas em triplicata e a área referente ao pico da atropina nos cromatogramas foi tomada como medida para avaliar melhor método e solvente de extração.

b) Extração em Fase Sólida: um método por EFS foi desenvolvido como proposta alternativa à ELL utilizada na escolha do método e solvente de extração, com o objetivo de diminuir erros, gastos com solventes e tempo na extração. Os cartuchos utilizados foram de sílica fase normal da marca Supelclean LC-SPE 500 mg. A extração foi realizada conforme descrição a seguir:

O extrato bruto foi obtido conforme descrito em 3.3.7. O cartucho foi equilibrado com 5 mL de metanol grau HPLC, seguidos de 10 mL de HCl 5 %. Antes de secar, a amostra (resíduo seco do extrato bruto em 800 μL HCl 5 %) foi carregada no cartucho que foi seco em seguida com auxílio de sistema de vácuo SULPECO Visiprep 24TM DL. Em seguida o cartucho foi lavado com 10 mL de diclorometano p.a.. Uma pequena fração de extrato aquoso (contendo alcaloides) foi observada no tubo coletor de descarte (formando duas fases com o diclorometano da limpeza) que foi então recarregada no cartucho antes da etapa seguinte. A extração dos alcaloides foi realizada com 4 x 5 mL de uma solução de hidróxido de amônio 5 % em diclorometano (mantida sob agitação). A fase orgânica foi recolhida em tubo de ensaio, seca com sulfato de sódio anidro (~ 2 g), filtrada por papel filtro para balão de fundo redondo de 50 mL e o solvente foi eliminado em evaporador rotatório. O extrato seco de alcaloides foi solubilizado em 5 mL de metanol grau HPLC, filtrado por membrana 0,22 μm para vial de 2 mL e injetado em CLUE conforme descrito em 4.3.2.

Uma triplicata foi analisada com objetivo de avaliar e comparar o teor de atropina encontrado por CLUE, tendo em vista que o extrato bruto foi obtido seguindo a mesma metodologia. O esquema do preparo e análise dos extratos está ilustrado na Figura 4.3.

¹ Granulometria padronizada: $\geq 250 \mu\text{m}$ e $\leq 355 \mu\text{m}$.

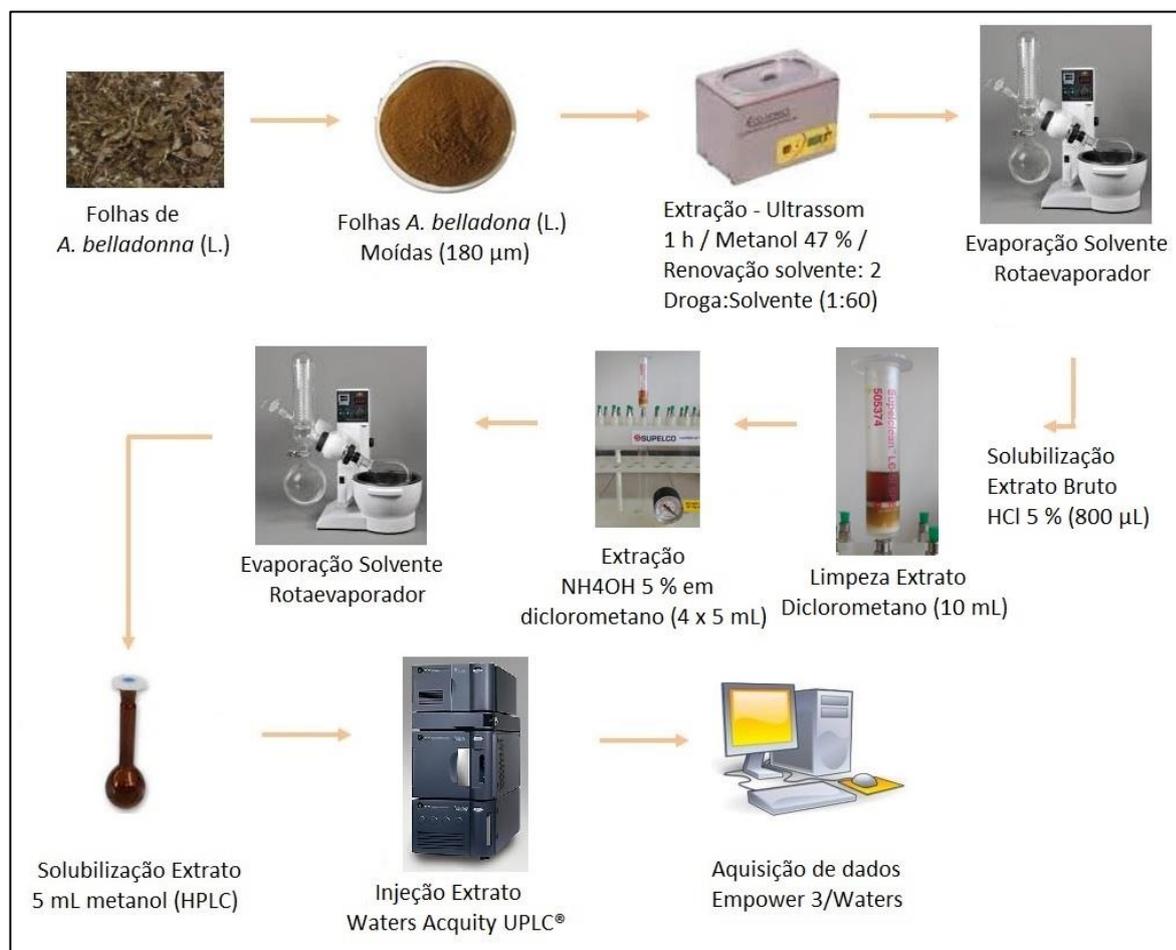


Figura 4.3: Preparo dos extratos para análise por CLUE.

4.3.4 Otimização da Extração

a) Desenho Fatorial Fracionado: um DFF 2^{5-1} foi proposto como triagem anterior à otimização. Foram escolhidos cinco fatores que avaliados em dois níveis (-1 e +1) cada: granulometria (180¹ e 710 µm²), % Solvente (50 e 100 %), Relação droga:solvente (1:20 e 1:60), Número de renovações do solvente (0 e 5 vezes) e Tempo (15 e 60 min).

Os experimentos propostos foram gerados utilizando o *software* estatístico Minitab® 17. O DFF com os dados dos 16 experimentos gerados está descrito na Tabela 4.2.

¹ Granulometria padronizada ≤ 180 µm.

² Granulometria padronizada ≥ 500 µm e ≤ 710 µm.

A resposta avaliada foi o teor de atropina nas dezesseis amostras analisadas, que foi obtida a partir de uma curva da SQR atropina base construída, com concentrações variando de 38,00 a 203,00 µg/mL.

Tabela 4.2: Desenho Fatorial Fracionário 2^{5-1} avaliando cinco fatores: (A) Granulometria (µm); (B) % solvente; (C) Relação droga:solvente (m/v); (D) Número de renovações e (E) Tempo (min).

Ordem	Fatores				
	A	B	C	D	E
1	180	50	1:20	0	60
2	710	50	1:20	0	15
3	180	100	1:20	0	15
4	710	100	1:20	0	60
5	180	50	1:60	0	15
6	710	50	1:60	0	60
7	180	100	1:60	0	60
8	710	100	1:60	0	15
9	180	50	1:20	5	15
10	710	50	1:20	5	60
11	180	100	1:20	5	60
12	710	100	1:20	5	15
13	180	50	1:60	5	60
14	710	50	1:60	5	15
15	180	100	1:60	5	15
16	710	100	1:60	5	60

Da mesma forma, o efeito produzido por cada fator e por suas interações foi avaliado utilizando também o *software* estatístico Minitab® 17.

b) Otimização via Desenho Box-Behnken: a otimização da extração foi realizada via DBB, a partir da análise dos resultados do DFF e avaliou três fatores em três níveis: % solvente (20, 50 e 80 %), Relação droga:solvente (1:40, 1:60 e 1:80) e Número de Renovações (2, 5 e 8). O DBB com os dados dos 15 experimentos gerados está na Tabela 4.3.

A resposta avaliada foi o teor de atropina nas quinze amostras analisadas, que foi obtida a partir de uma curva da SQR atropina base construída conforme descrito no item 4.3.3(c).

Os experimentos gerados e a avaliação das superfícies de resposta, produzidas pela interação dos fatores, bem como os parâmetros da extração otimizada foram realizados a partir do *software* estatístico Minitab® 17.

Tabela 4.3: Desenho Box-Behnken avaliando três fatores: (A) % solvente; (B) Relação droga:solvente (m/s); (C) Número de renovações.

Ordem	Fatores		
	A	B	C
1	20	1:40	5
2	80	1:40	5
3	20	1:80	5
4	80	1:80	5
5	20	1:60	2
6	80	1:60	2
7	20	1:60	8
8	80	1:60	8
9	50	1:40	2
10	50	1:80	2
11	50	1:40	8
12	50	1:80	8
13	50	1:60	5
14	50	1:60	5
15	50	1:60	5

A extração otimizada obtida ao término dos experimentos do item 4.3.4, foi validada pela análise de cinco extrações, e os teores encontrados foram avaliados de acordo com limites de aceitação estabelecidos pela análise no *software* e em relação ao CV (%) entre elas. Esta etapa foi realizada juntamente com a etapa descrita no item 4.3.5 (d) da validação da metodologia.

4.3.5 Validação

A metodologia foi validada, de acordo com a Resolução nº 899/2003 e os seguintes parâmetros foram contemplados na validação:

a) Especificidade/Seletividade: realizada pela comparação dos espectros de ultravioleta, da banda referente a atropina, obtidos a partir da injeção de solução da SQR atropina base livre (154,68 µg/mL), e da solução amostra, preparada conforme descrito no item 4.3.3(b) e pela comparação das áreas, referentes a atropina, obtidas a partir da injeção da solução amostra, preparada conforme descrito no item 4.3.3(b) e solução amostra com adição de SQR atropina base livre.

b) Linearidade: realizada através da injeção de diferentes diluições de uma solução estoque da SQR atropina base livre, com concentração igual a 500 µg/mL. Três curvas da substância de referência foram construídas, com 5 pontos (injetados em triplicata) correspondendo a um intervalo de concentração de atropina entre 38,00 e 203,00 µg/mL. A linearidade do método foi verificada a partir da medida da área do pico referente ao marcador químico no cromatograma. O coeficiente de regressão mínimo exigido pela Resolução nº 899/2003 no valor de $r^2 = 0,99$ foi avaliado e o tratamento estatístico foi realizado através de método dos mínimos quadrados e análise de variância (ANOVA).

c) Limites de Detecção e Quantificação: foram calculados a partir dos dados obtidos no estudo de linearidade (curva padrão da SQR atropina base livre) e através das Equações 2.2 e 2.3.

d) Precisão Repetibilidade: realizada através da análise de seis extrações, realizadas conforme descrito no item 4.3.3(b). Cada uma das seis soluções amostra foram injetadas em triplicata no cromatógrafo e a área correspondente ao pico do marcador químico no cromatograma foi avaliada. O teor de atropina nas amostras foi calculado a partir da curva média da etapa de linearidade.

e) Precisão Intermediária: realizada através da análise de três extrações, realizadas conforme descrito no item 4.3.3(b). Cada uma das três soluções amostra foram injetadas em triplicata no cromatógrafo e a área correspondente ao pico do marcador químico no cromatograma foi avaliada. O teor de atropina nas amostras foi calculado a partir da curva média da etapa de linearidade. Este procedimento foi realizado em dois dias diferentes, sendo um deles executado por um analista diferente dos demais.

g) Exatidão: realizada através da recuperação da solução da SQR atropina base livre (154,68 µg/mL), adicionada em concentrações iguais a 80, 100 e 120 % em relação a extração do material vegetal, ou seja, solução amostra preparada conforme descrito no item 4.3.3(b). A recuperação foi calculada a partir da equação 2.4.

h) Robustez: realizada através da modificação de parâmetros da análise, estabelecidos previamente. As variações estão descritas na Tabela 4.4.

Tabela 4.4: Parâmetros avaliados na etapa de robustez - CLUE.

Parâmetro	Normal	Alterado
Fluxo/Vazão de Fase Móvel (mL/min)	0,15	0,14 0,16
Lote Coluna	0226332941	0200320061
Detecção (nm)	$\lambda = 210$	$\lambda = 205$ $\lambda = 215$

i) Adequabilidade do Sistema: realizada através da injeção de SQR a cada dia de análises. Foram monitorados os parâmetros, tempo de retenção, área do pico da atropina e eficiência da coluna através do cálculo do número de pratos teóricos (Equação 3.3) e os coeficientes de variação de cada parâmetro foram calculados.

4.3.6 Análise do Extrato Otimizado por CCDAE, CLAE e CLUE

Uma análise do extrato otimizado foi realizada nos métodos anteriormente desenvolvidos e validados para que as três metodologias pudessem ser comparadas. Uma mesma amostra extraída nas condições ótimas foi injetada em CCDAE conforme item 2.3.5, em CLAE conforme item 3.3.8 e em CLUE conforme item 4.3.2.

4.4 Resultados e Discussão

4.4.1 Desenvolvimento do Método

Após o desenvolvimento do método, as soluções padrão e amostra, produziram os cromatogramas ilustrados na Figura 4.4 (a) e (b). Na figura é possível identificar o

pico referente à atropina no tempo de retenção de aproximadamente 5,1 minutos em ambas soluções.

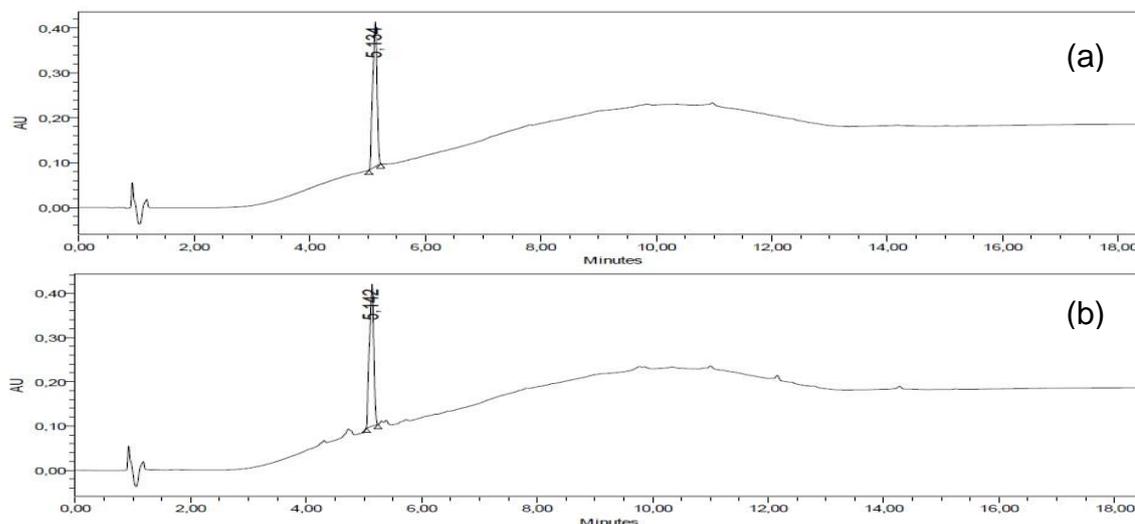


Figura 4.4: Cromatogramas obtidos para o método desenvolvido por CLUE. (a) solução SQR; (b) amostra AB-01.

4.4.2 Preparo dos Extratos

a) Escolha do Método e Solvente Extrator: após o preparo e análise dos extratos, o método escolhido foi a extração assistida por ultrassom e o metanol como solvente. Os resultados das áreas obtidas estão na Tabela 4.5.

Os resultados da extração com metanol foram superiores aos realizados com etanol em todos os métodos testados. As extrações realizadas com este solvente por maceração estática, maceração dinâmica e ultrassom apresentaram resultados melhores e bem próximos. Desta forma, a extração por ultrassom foi escolhida como melhor método devido ao menor tempo necessário para atingir o mesmo resultado que os demais.

Tabela 4.5: Resultados obtidos com diferentes métodos e solventes na extração.

Método	Solvente	Área Média (AU)
Maceração Estática	Metanol	2869408
Maceração Estática	Etanol	1320319
Maceração Dinâmica	Metanol	2817249
Maceração Dinâmica	Etanol	903186
Homogeneização-ultraturrax	Metanol	2428661
Homogeneização-ultraturrax	Etanol	980182
Ultrassom	Metanol	2729847
Ultrassom	Etanol	1064014

b) Extração em Fase Sólida: após extração em triplicata, conforme item 3.3.7 (para extrato bruto) e conforme descrito em 4.3.3(b) (EFS), o teor de atropina encontrado foi de 0,2692 %, resultado semelhante àquele encontrado na validação por CLAE (resultado do item 3.4.7(c) para amostra AB-01 igual a 0,2657 %). O CV foi de 0,9254 % entre as determinações por ELL e EFS. A tabela 4.6 mostra o resultado de cada replicata.

Tabela 4.6: Resultado da extração realizada por SPE.

Replicata	Teor Atropina (%)
1	0,2650
2	0,2637
3	0,2789
Média	0,2692
Desvio	0,008434
CV (%)	3,1329

Com os resultados semelhantes aos obtidos por ELL, a metodologia de extração dos alcaloides por SPE passou a ser utilizada por possibilitar economia de solventes e de tempo no processo.

4.4.3 Otimização da Extração

a) Desenho Fatorial Fracionado: a Tabela 4.7 mostra a área média obtida para cada concentração da SQR e a curva traçada a partir da injeção das soluções da SQR, a equação da reta e o R^2 estão ilustrados na Figura 4.5.

Tabela 4.7: Dados obtidos no CLUE para curva de padrão de atropina.

Atropina ($\mu\text{g/mL}$)	Área 1	Área 2	Área Média (AU)	Desvio	CV (%)
38,07	344257	345403	344257	810,34	0,2350
76,14	755384	706347	755384	34674,40	4,744
114,2	1146928	1166994	1146928	14188,80	1,226
152,3	1405283	1425036	1405283	13967,48	0,9870
203,0	1863003	1885628	1863003	15998,29	0,8536

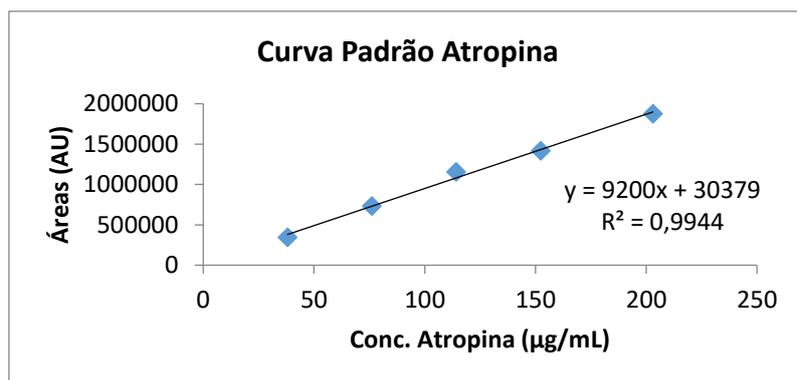


Figura 4.5: Curva da SQR utilizada no FFD e DBB - CLUE.

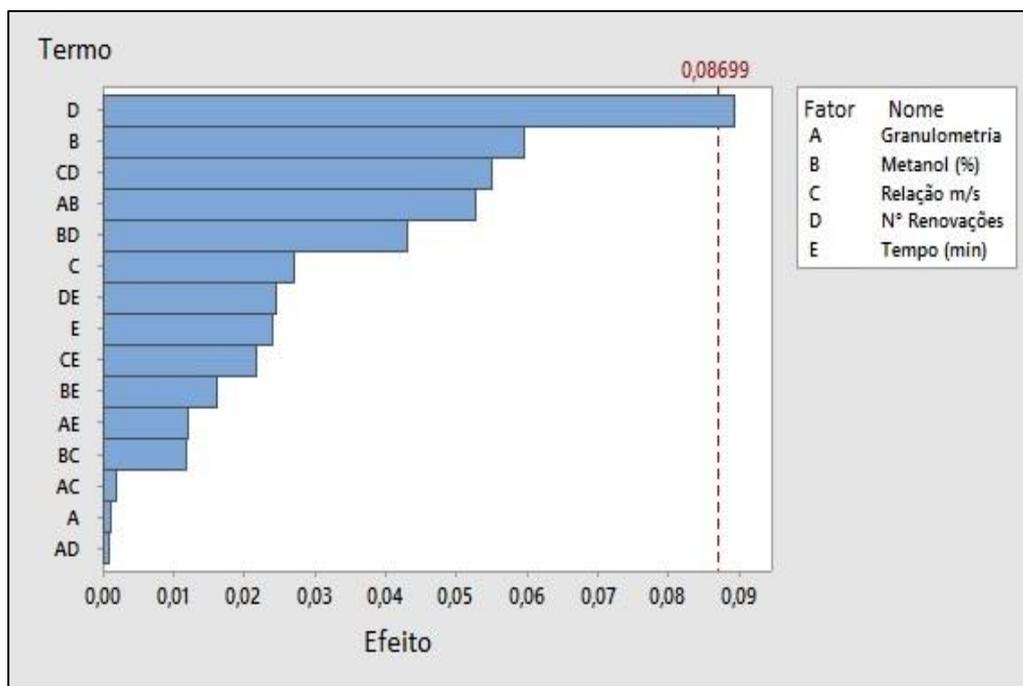
A partir da equação da reta obtida, os teores de atropina de cada experimento da Tabela 4.2 foram calculados e estão na Tabela 4.8.

Tabela 4.8: Resposta obtida para cada experimento realizado no DFF. (A) Granulometria (μm); (B) % solvente; (C) Relação droga:solvente (m/v); (D) Número de renovações e (E) Tempo (min).

Ordem	Fatores					Teor
	A	B	C	D	E	Atropina (%)
1	180	50	1:20	0	60	0,1011
2	710	50	1:20	0	15	0,1448
3	180	100	1:20	0	15	0,0871
4	710	100	1:20	0	60	0,0788
5	180	50	1:60	0	15	0,1285
6	710	50	1:60	0	60	0,2338
7	180	100	1:60	0	60	0,2585
8	710	100	1:60	0	15	0,1183
9	180	50	1:20	5	15	0,2893
10	710	50	1:20	5	60	0,3073
11	180	100	1:20	5	60	0,2173
12	710	100	1:20	5	15	0,1744
13	180	50	1:60	5	60	0,2468
14	710	50	1:60	5	15	0,2942
15	180	100	1:60	5	15	0,1756
16	710	100	1:60	5	60	0,1602

As respostas obtidas foram analisadas pelo *software* e o efeito dos fatores e suas interações podem ser observados no Gráfico de Pareto (Figura 4.6).

Figura 4.6: Gráfico de Pareto gerado no *software* a partir dos resultados do DFF.



Pela análise dos efeitos gerados, é possível perceber que a resposta foi afetada significativamente, considerando um nível de confiança de 94 %, apenas pelo fator D (Nº de renovações do solvente). O fator B (% de metanol) e a interação dos fatores C e D (Relação m/s e Nº renovações), aparecem na sequência com maior influência nos resultados (mas sem significância estatística). Gráficos de linha demonstrando as interações de cada fator (Figura 4.7) e a interação dos fatores (Figura 4.8) foram gerados para auxiliar na análise visual dos fatores a serem otimizados, além do fator D (significativo).

A partir da análise dos três gráficos gerados, com resultado dos efeitos produzidos pelos fatores e suas interações, os parâmetros D (Nº de renovações), B (% metanol) e C (relação droga:solvente) foram levados à otimização via Desenho Box-Behnken. Na ausência de mais de um fator significativo, os demais fatores foram escolhidos por apresentarem maior efeito sobre os resultados.

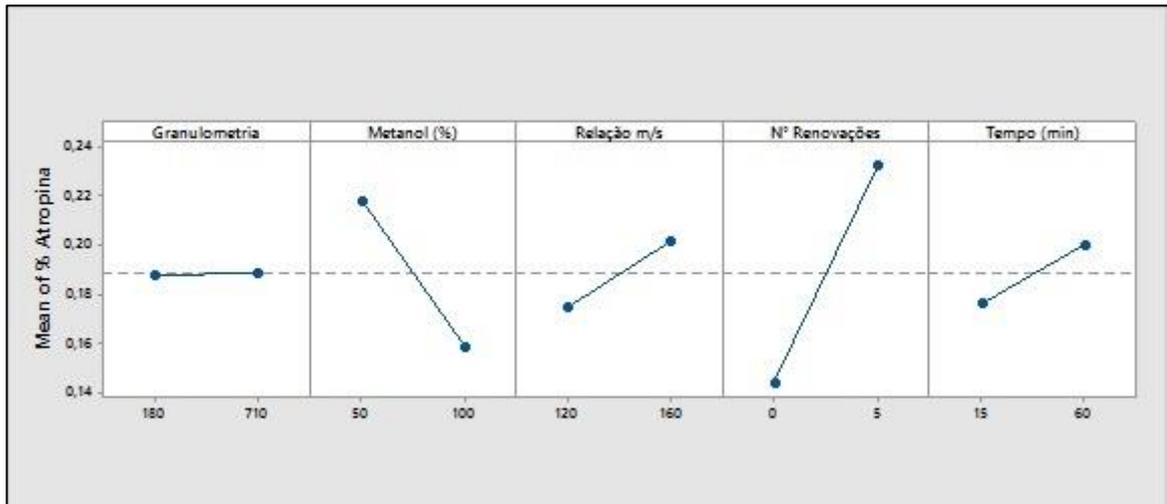


Figura 4.8: Gráfico dos efeitos individuais dos fatores analisados no DFF.

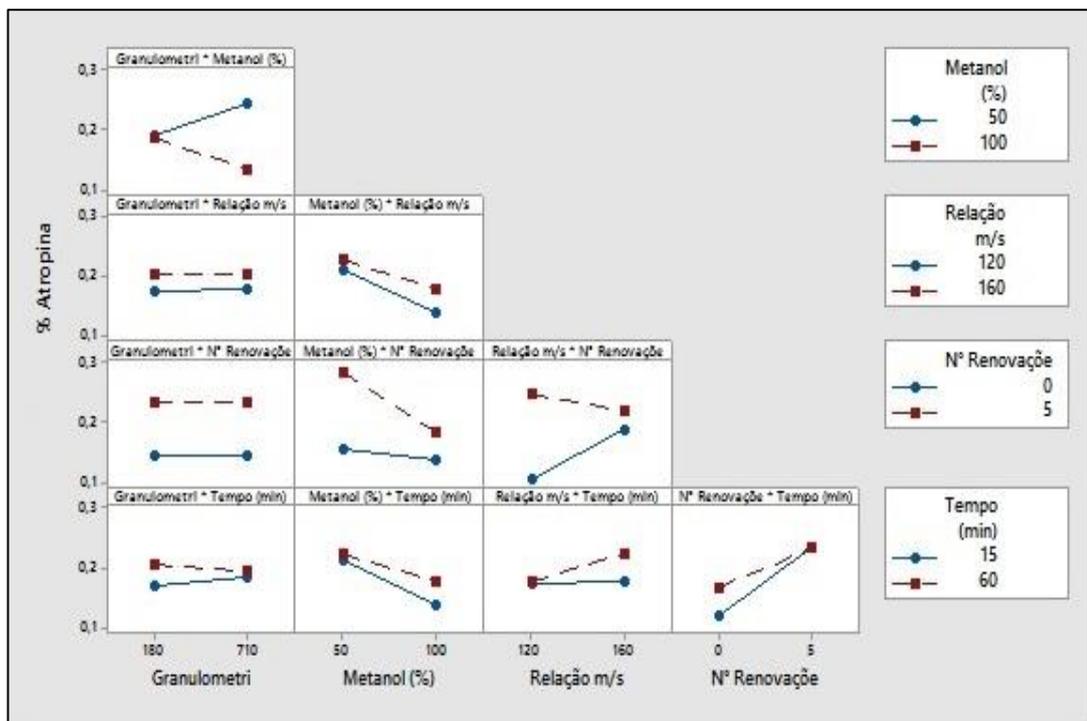


Figura 4.7: Gráficos dos efeitos das interações dos fatores analisados no DFF.

O fator A (granulometria) apresentou menor significância como efeito individual, demonstrando um melhor resultado na interação com o fator E (tempo) quando padronizada em 180 μm e com tempo em 60 minutos. Além disso, esta granulometria é descrita com maior frequência na literatura e em compêndios oficiais. O fator E (tempo), foi fixado em 60 minutos, pois a análise de seu efeito individual e na interação

com os demais fatores demonstrou que o aumento do tempo melhora a resposta obtida.

b) Otimização via Desenho Box-Behnken: o teor de atropina foi calculado, a partir da equação da reta (Figura 4.2) e os resultados para os 15 experimentos do DBB estão na Tabela 4.9.

Tabela 4.9: Resposta obtida para cada experimento realizado no DBB. (A) % solvente; (B) Relação droga:solvente (m/s); (C) Número de renovações.

Ordem	Fatores			Teor de Atropina (%)
	A	B	C	
1	20	1:40	5	0,2835
2	80	1:40	5	0,2152
3	20	1:80	5	0,2189
4	80	1:80	5	0,2158
5	20	1:60	2	0,2767
6	80	1:60	2	0,2137
7	20	1:60	8	0,2607
8	80	1:60	8	0,2078
9	50	1:40	2	0,2702
10	50	1:80	2	0,3335
11	50	1:40	8	0,2726
12	50	1:80	8	0,2735
13	50	1:60	5	0,3188
14	50	1:60	5	0,3130
15	50	1:60	5	0,3136

As respostas obtidas foram analisadas através do *software* e a equação de regressão que relaciona os fatores e suas interações em função da resposta é a seguinte:

$$\% \text{ Atropina} = - 1,30 - 0,00294A + 0,0209B + 0,0348C - 0,000086A^2 - 0,000074B^2 + 0,00020C^2 + 0,000069A*B + 0,000028A*C - 0,000260B*C$$

Os efeitos dos fatores e suas interações podem ser observadas nos Gráficos de Contorno (Figura 4.9) e de Superfície de Resposta (Figura 4.10).

As áreas mais escuras nos gráficos de contorno, representam as maiores respostas obtidas. Dessa forma, é possível observar que as interações A*C e B*C foram mais significativas pois as áreas verdes mais escuras tem uma faixa pequena, delimitando os intervalos mencionados anteriormente. Já a interação de A*B apresenta uma área ampla com maiores respostas, o que deixa o delineamento do intervalo dos parâmetros mais amplo também. Isto pode ser observado também nos gráficos de superfície de resposta (representação em três dimensões dos resultados) pelas inclinações produzidas a partir dos resultados obtidos das interações dos mesmos fatores avaliados.

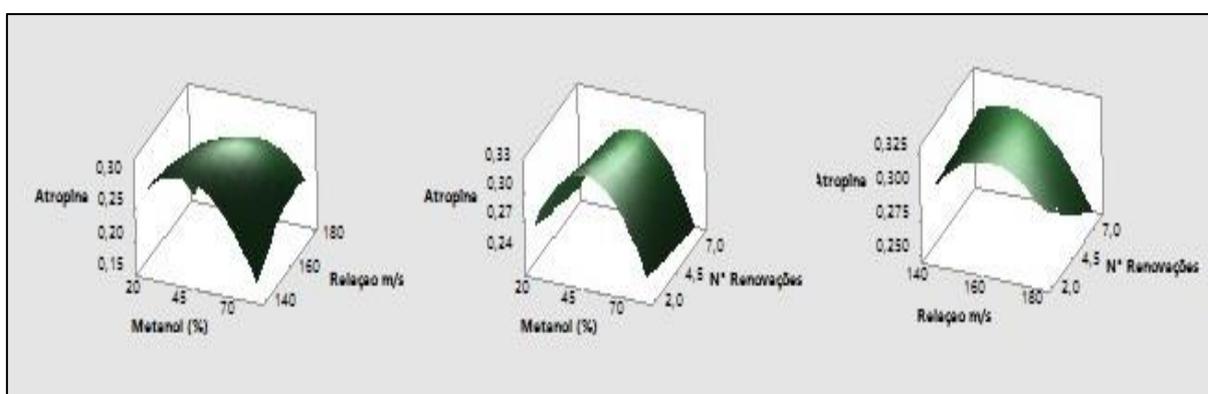


Figura 4.9: Gráficos de Contorno que demonstram a influência dos fatores. (A) % metanol; (B) Relação m/s e (C) N° renovações.

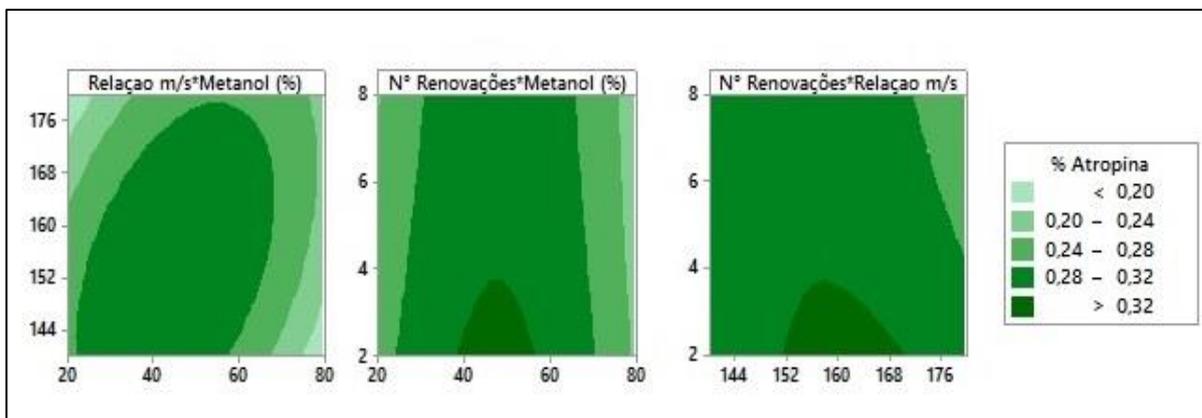


Figura 4.10: Gráficos de Superfície de Resposta que demonstram a influência dos fatores. (A) % metanol; (B) Relação m/s e (C) N° renovações.

A análise dos gráficos resulta em valores intermediários de A (% de metanol) em torno de 45-55 % e B (relação m/s) em torno de 1:55-1:65 e valores menores de N° renovações (2-3 renovações) gerando maior teor de atropina.

Através do *software* foi possível obter os parâmetros ótimos para a extração de atropina em folhas de *A. belladonna* dentro dos parâmetros analisados.

As condições ótimas podem ser visualizadas na Figura 4.11, grifadas em vermelho.

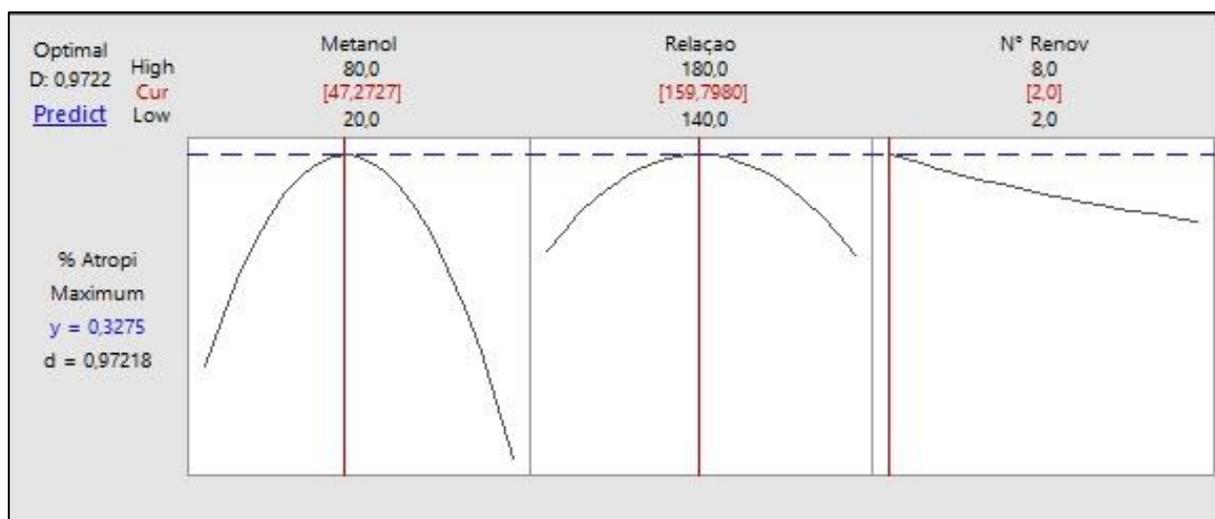


Figura 4.11: Gráfico da resposta otimizada para extração, via Minitab 17.

Para facilitar a execução da extração, os resultados otimizados de cada parâmetro foram fixados como segue (Tabela 4.10):

Tabela 4.10: Parâmetros otimizados para extração de atropina em folhas de *A. belladonna*

Parâmetro	Valor
Método	Ultrassom
Solvente	Metanol
Granulometria (μm)	180
Relação droga:solvente (m/v)	1:60
Tempo de extração (min)	60
Concentração Metanol (%)	47
N° Renovações (vezes)	2

O valor predito pelo *software* para extração nas condições otimizadas foi de 0,3275 % de atropina, com intervalo de tolerância entre 0,2577 e 0,3973 %. Estes valores são utilizados como níveis de aceitação, porém, por serem valores muito distantes, optou-se por realizar a validação do DBB levando-se em consideração também o CV (%) calculado entre as cinco determinações. Os resultados obtidos estão na Tabela 4.11.

Os valores encontrados encontram-se dentro dos limites e valores preditos pelo *software* e apresentaram CV igual a 2,0891 %. Dessa forma, a validação do DBB foi considerada satisfatória.

Tabela 4.11: Resultados obtidos na validação do DBB.

Replicata	% Atropina
1	0,3368
2	0,3363
3	0,3255
4	0,3332
5	0,3449
Média	0,3353
Desvio	0,007005
CV (%)	2,0891

Os resultados da análise estatística mostraram que os fatores otimizados não apresentaram significância (valores $p > 0,05$), sugerindo que o modelo de análise seja ajustado. Mesmo assim, foi possível perceber um aumento nas respostas quando observamos os resultados obtidos para a extração realizada conforme método por CLAE (0,2660 %) e o obtido ao término da validação do DBB (0,3353 %), o que demonstra que o processo de otimização atingiu em partes o objetivo de melhorar a resposta (% atropina) a partir do processo de extração dos alcaloides.

4.4.4 Validação

a) Especificidade/Seletividade: após injeção de solução da SQR atropina base livre e de solução amostra, os espectros de ultravioleta, referentes à banda do marcador químico, foram comparados e a Figura 4.12 mostra o resultado encontrado, demonstrando que ambas soluções analisadas apresentam o mesmo espectro UV.

Após a injeção de solução amostra com e sem adição da SQR atropina base livre, a área, referente ao pico do marcador químico, foi comparada nos dois cromatogramas e a Figura 4.13 (a e b) mostra o resultado encontrado.

É possível perceber, pela análise dos cromatogramas obtidos, que a adição de SQR na solução amostra resultou em incremento da área referente ao pico da atropina (aumento da área de 552167 para 1127017), não alterando outras áreas do cromatograma e comprovando que o método desenvolvido é seletivo para o marcador químico em análise.

Os resultados demonstram que o método desenvolvido é específico e seletivo para o marcador químico em análise.

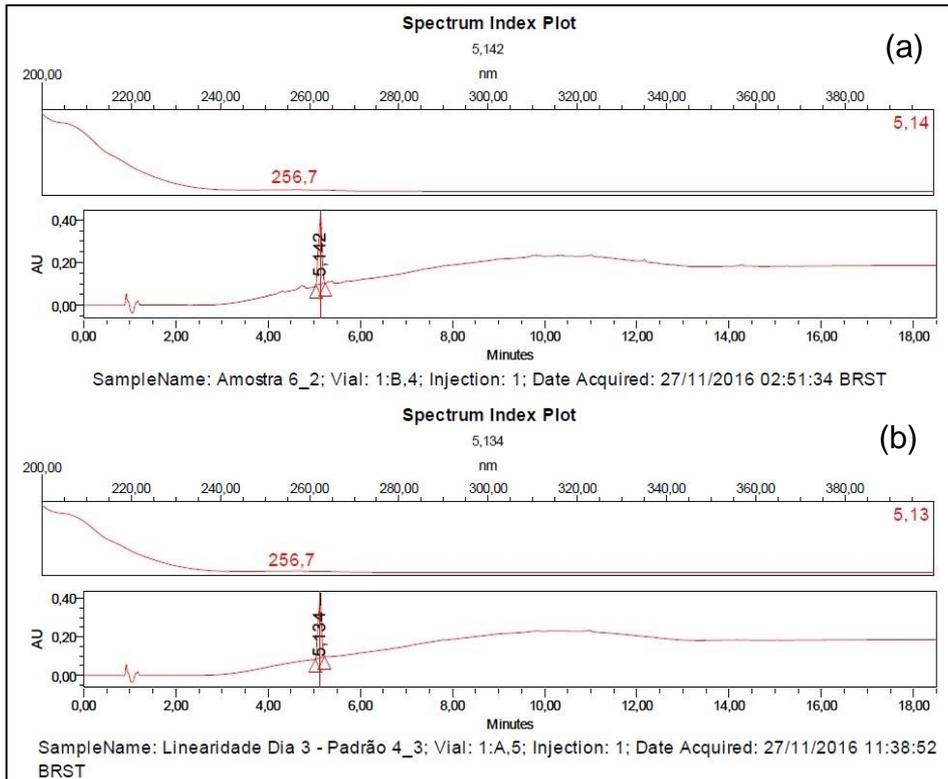


Figura 4.12: Comparativo de Espectros UV. (a) amostra; (b) SQR – CLUE

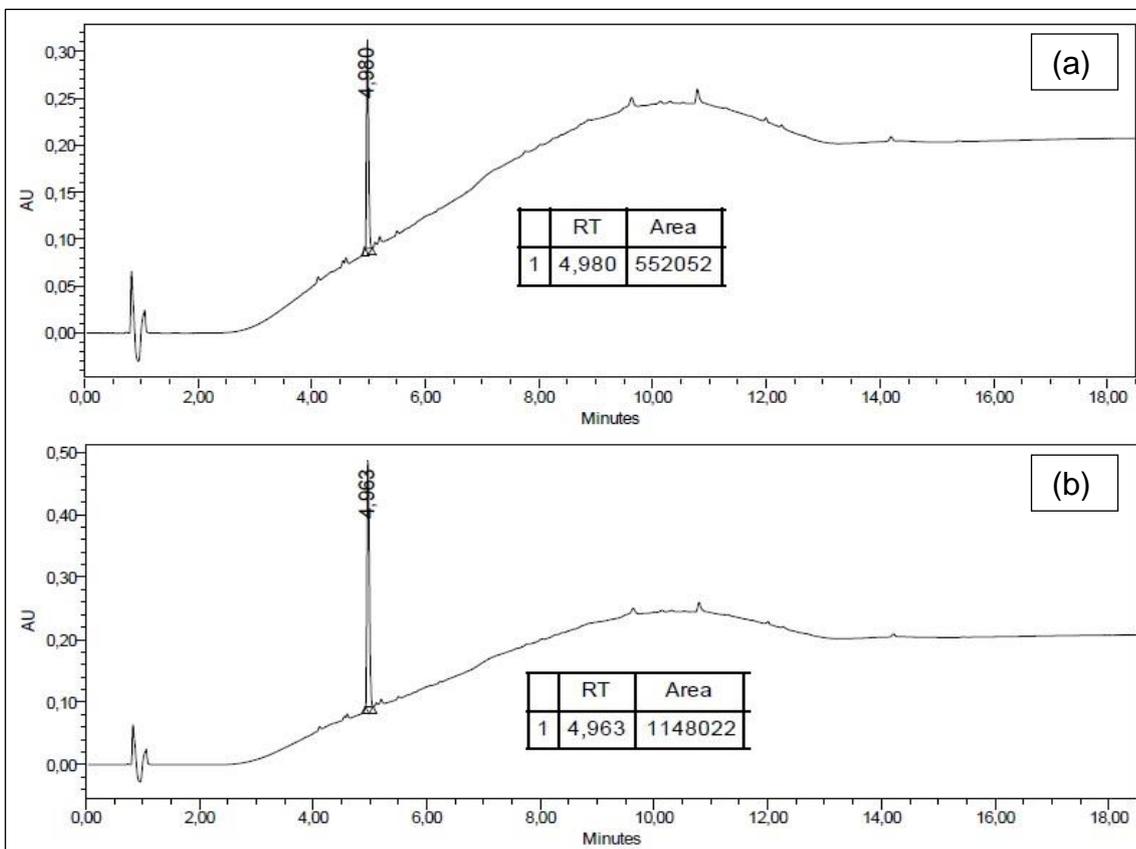


Figura 4.13: (a) Amostra AB-01; (b) Amostra AB-01+SQR - CLUE.

b) Linearidade: após injeção e análise dos cromatogramas contendo os pontos da solução da SQR atropina base livre, o traçado e o tratamento estatístico das curvas de padrão de atropina foram realizados utilizando planilha eletrônica Microsoft Excel 2016. Os dados e gráficos das curvas dos dias 1, 2 e 3 estão apresentados no Apêndice C. Na Tabela 4.12 estão apresentadas as áreas médias, do pico referente à atropina para cada concentração injetada no CLUE. O gráfico da linearidade média, a equação da reta e o coeficiente de regressão estão ilustrados na Figura 4.14.

Os valores obtidos na análise de variância (ANOVA) (Tabela 4.13) demonstram que há diferenças significativas entre as diferentes concentrações e respectivas áreas (valor-P < 0,05 e $F > F_{crítico}$), com intervalo de confiança de 95 % ($\alpha = 0,05$).

Tabela 4.12: Dados obtidos a partir da média das áreas dos dias 1,2 e 3 da linearidade - CLUE

Atropina ($\mu\text{g/mL}$)	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Média	Desvio	CV (%)
38,10	340596	344398	343507	342834	1988,48	0,5800
76,20	741043	754163	744242	746482	6840,93	0,9164
114,3	1104304	1104304	1117186	1130337	1117276	1,165
152,4	1522136	1583438	1668167	1591247	73327,88	4,608
203,2	1927854	1927755	1972490	1942700	25798,85	1,328

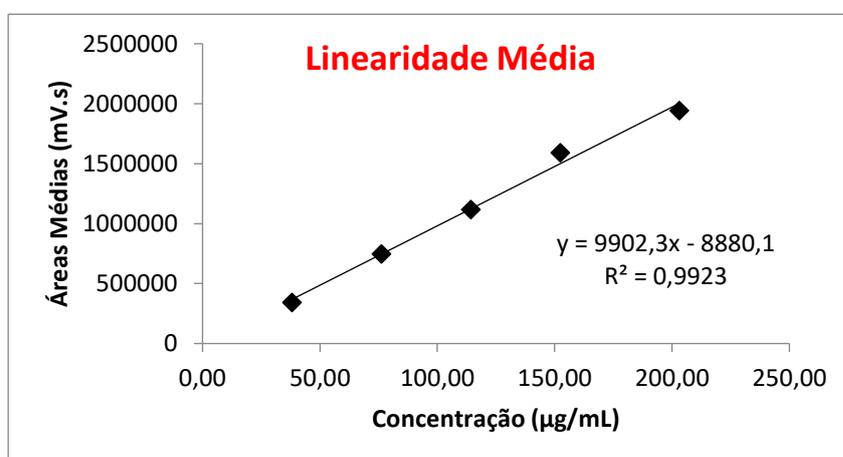


Figura 4.14: Gráfico da curva média de padrão de atropina obtida nos dias 1,2 e 3 da linearidade, equação da reta e coeficiente de regressão - CLUE

Tabela 4.13: Análise de variância (ANOVA) para os dados de linearidade da curva padrão de atropina - CLUE

Fonte da variação	SQ	GL	MQ	F	valor-P	F crítico
Entre grupos	3,29471E+12	1	3,29471E+12	16,08676537	0,003890548	5,317655063
Dentro dos grupos	1,63847E+12	8	2,04809E+11			
Total	4,93318E+12	9				

c) Limites de Detecção e Limite de Quantificação: os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) para a substância de referência, de acordo com os parâmetros obtidos com a equação média da reta, foram calculados a partir da média dos coeficientes de regressão linear (9902,33) e do desvio padrão médio dos interceptos (65660,36).

Os resultados obtidos foram: LD = 21,88 µg/mL e LQ = 66,31 µg/mL, indicando que o método apresenta boa sensibilidade com baixos valores de LD e LQ.

d) Precisão – Repetibilidade e Intermediária: os resultados da etapa de precisão foram satisfatórios, tendo em vista que a legislação exige um máximo de 5 % nos valores de coeficiente de variação entre os resultados e isto foi observado tanto nas análises intradias como nas interdias. Da mesma forma, todas as médias calculadas entre as médias das análises apresentaram coeficiente de variação inferior a 5 %. O teor médio de atropina encontrado foi de 0,3313 %. Foi possível, dessa forma, comprovar a precisão do método e os resultados obtidos nesta etapa estão contemplados na Tabela 4.14.

Tabela 4.14: Resultados para teor de atropina na etapa de precisão - CLAE

Precisão				
Repetibilidade		Intermediária		
Replicata	% Atropina	Replicata	% Atropina Dia 1	% Atropina Dia 2
1	0,3368	1	0,3388	0,3318
2	0,3363	2	0,3386	0,3211
3	0,3255	3	0,3246	0,3523
4	0,3332	Média	0,3340	0,3351
5	0,3449	Desvio	0,008135	0,01586
6	0,3268	CV (%)	2,4357	4,7330
Média	0,3339	Repetibilidade + Intermediária		
Desvio	0,007173	Média	0,3343	
CV (%)	2,1481	Desvio	0,000644	
		CV (%)	0,1925	

f) Exatidão: a realização do teste de recuperação foi feita a partir da preparação de uma solução amostra e uma solução da SQR, com concentração de 61,25 µg/mL (isso foi possível pela determinação da linearidade e quantificação da amostra realizadas em etapas anteriores a esta).

Cinco soluções foram preparadas simultaneamente e foram denominadas como segue:

SA = Solução amostra

SP = Solução Padrão

SR80 = Solução de recuperação 80%

SR100 = Solução de recuperação 100%

SR120 = Solução de recuperação 120%

Após o preparo, as soluções foram injetadas, analisadas e os teores recuperados foram calculados e estão descritos na Tabela 4.15.

Tabela 4.15: Resultados obtidos na etapa de exatidão - CLAE

Solução	Concentração Adicionada (µg/mL)	Concentração Determinada (µg/mL)	Recuperação (%)
SA	-	59,49	
SP	61,25		
SR80	49,00	106,3	95,5
SR100	61,25	121,4	101,1
SR120	73,50	130,2	96,2
		Média	97,6
		Desvio	3,036
		CV (%)	3,110

Os resultados da etapa de exatidão foram satisfatórios, uma vez que a legislação preconiza percentual de recuperação entre 95 – 105 % em relação as concentrações de SQR adicionadas a solução amostra. O teor recuperado dentro dos parâmetros estabelecidos pela legislação vigente, comprovam a exatidão do método desenvolvido.

g) Robustez: foi testada variando-se os seguintes parâmetros: variação do fluxo/vazão de fase móvel ($\pm 0,05$ mL/min); troca do lote da coluna; comprimento de onda da análise dos cromatogramas (± 5 nm); Os resultados foram comparados aos

de uma análise nas condições normais, realizada em paralelo às modificações. Os resultados obtidos estão na Tabela 4.16.

Tabela 4.16: Resultados obtidos na etapa de robustez - CLUE

Parâmetro Alterado	Teor Atropina (%)	CV (%)
Fluxo Fase Móvel (+ 0,05 mL/min)	0,3400	0,6737
Fluxo Fase Móvel (- 0,05 mL/min)	0,3206	3,4838
Troca lote (0200320061)	0,3190	3,824
Comprimento de onda ($\lambda = 205$ nm)	0,3012	4,062
Comprimento de onda ($\lambda = 215$ nm)	0,2992	4,5296

Todos os parâmetros modificados, produziram coeficientes de variação menores que 5 % em relação a condição normal de análise. Desta forma, foi possível comprovar que o método desenvolvido é robusto.

h) Adequabilidade do Sistema: os resultados obtidos através do monitoramento dos parâmetros para adequação do sistema estão apresentados na tabela 4.17.

Os parâmetros avaliados apresentam CV (%) inferiores a 5 %, demonstrando adequabilidade do sistema para o método analítico validado.

Tabela 4.17: resultados da adequabilidade do sistema - CLUE.

Dia	Tempo de Retenção	Número Pratos	Área do Pico
1 – Linearidade Dia 1	5,126	10723,8	1577824
2 – Linearidade Dia 2	5,123	10498,1	1585457
3 – Linearidade Dia 3 e Precisão Repetibilidade	5,125	11400,0	1587032
4 – Precisão Dia 1	5,132	10327,4	1665574
5 – Precisão Dia 2	5,134	10649,4	1669477
6 – Precisão Dia 3 e Robustez	5,134	10233,9	1669450
Média	5,129	10638,75	1625802
Desvio	0,004899	416,5409	46534,26
CV (%)	0,09552	3,915	2,862

4.4.5 Análise do Extrato Otimizado por CCDAE, CLAE e CLUE

Os resultados obtidos da análise nos diferentes métodos desenvolvidos, utilizando amostra extraída nas condições otimizadas estão na Tabela 4.18.

Tabela 4.18: Resultado do doseamento do extrato otimizado por CCDAE, CLAE e CLUE.

Método	Teor de Atropina (%)
CCDAE	0,2905
CLUE	0,3343
CLAE	0,3598

O extrato otimizado analisado nos diferentes métodos desenvolvidos resultou em diferentes teores de atropina. O maior teor foi encontrado no método por CLAE, seguido da CLUE e por último CCDAE. A análise dos LDs dos diferentes métodos, demonstrou que o método por CLAE apresentou maior sensibilidade (3,75 µg/mL), o que pode explicar o maior teor encontrado neste método.

O resultado encontrado por CCDAE manteve-se igual em relação a extração utilizada no desenvolvimento deste método. Isto pode ser explicado, pois a extração com ácido diluído produz resultados superiores quando comparados àqueles realizados com solventes apolares. Porém este não foi utilizado devida à formação de emulsão muito forte formada na extração com este material vegetal.

O método por CLUE foi o que apresentou sensibilidade intermediária e da mesma forma resultou em teor também intermediário quando comparado aos demais.

4.5 Conclusão

A otimização da extração de atropina nas folhas de *A. belladonna* resultou em um aumento no teor extraído de 0,2657 % em relação ao encontrado pelo método desenvolvido por CLAE. Apesar de os fatores otimizados por DBB não terem produzido resultados estatísticos significantes, o aumento na resposta demonstrou melhora nos resultados.

O método desenvolvido para extração dos alcaloides por SPE foi eficiente, pois produziu os mesmos resultados que os anteriormente validados por CLAE e o desenvolvimento da metodologia por CLUE se mostrou eficaz para quantificação de

atropina em folhas de *A. belladonna*, uma vez que todos os parâmetros da legislação vigente, em relação a validação foram atendidos. Foi possível verificar que o método é específico e seletivo, linear, preciso, exato e robusto.

Não foi possível reduzir o tempo de análise neste método, em relação ao desenvolvido por CLAE, devido ao tempo de retenção da atropina que é muito baixo. Todas as tentativas de redução do tempo abaixo dos 18,5 min, produziram resultados piores em relação a simetria do pico. Mesmo assim, o gasto com solventes foi bastante reduzido pois o fluxo foi diminuído de 0,7 mL/min para 0,15 mL/min, o que já representa uma grande vantagem em relação ao CLAE.

5. CONCLUSÃO GERAL

Os diferentes métodos propostos para quantificação de atropina em folhas de *A. belladonna* foram desenvolvidos e validados de acordo com a legislação vigente e baseando-se na literatura (publicações mais recentes) e compêndios oficiais. Para os três métodos desenvolvidos - CCDAE, CLAE e CLUE - foi possível comprovar os parâmetros de validação, e os métodos se mostraram eficazes para o objetivo proposto. Foi possível verificar, em todos os casos a Especificidade/Seletividade, linearidade, precisão, exatidão e robustez e adequabilidade do sistema.

Cada método foi desenvolvido com as etapas de extração (extrato bruto e extrato rico em alcaloides), apresentando particularidades:

- O método utilizado para a extração dos alcaloides para CCDAE, diretamente com ácido diluído, apesar de tradicionalmente utilizado, para este caso, apresentou formação de emulsão e conseqüentemente, uma etapa de centrifugação foi necessária para uma eficiente separação das fases. A média dos teores de atropina encontrada foi de 0,2913 %.

- Na extração utilizada para análise por CLAE esta etapa foi eliminada e metanol p.a. foi utilizado. Este método de extração, apesar da necessidade de eliminação do solvente antes da extração dos alcaloides, se mostrou mais rápido e fácil sem a formação de emulsão do método anterior. A média dos teores de atropina encontrada foi de 0,2660 %.

- O método de extração para análise por CLUE foi realizado após delineamento experimental por DFF e posterior otimização via DBB. A extração ótima foi obtida e validada e apesar de os resultados não produzirem significância estatística adequada (indicando necessidade de ajuste no modelo utilizado), foram relevantes para o teor de atropina encontrado de 0,3343 % (26 % maior que na análise por CLAE). Esta metodologia de extração apresenta certa dificuldade na etapa de evaporação do solvente por apresentar teor de água elevado, pois a concentração do metanol na extração é de 47 %.

- Nas duas primeiras metodologias, a extração dos alcaloides foi realizada por ELL, produzindo bons resultados e confirmando ser uma técnica útil e com boa reprodutibilidade dos resultados, porém com gasto de solventes e tempo bem elevados.

- Para minimizar os fatores negativos da ELL, um método de EFS foi desenvolvido com sucesso para as análises do terceiro método e dessa forma o processo foi realizado com mais rapidez e economia.

- Da mesma forma, a massa de material vegetal utilizada nos dois últimos métodos foi de 1/4 em relação àquela utilizada no primeiro (CCDAE = 1,0 g e CLAE e CLUE = 0,25 g)

A metodologia por CLAE foi escolhida para compor a proposta da nova monografia do material vegetal, por apresentar as melhores condições, levando em consideração aspectos importantes no Controle de Qualidade como facilidade da extração, tempo de execução de uma análise completa e técnicas analíticas (de extração e análise) mais adequadas e difundidas na realidade da indústria.

Além da quantificação, ensaios para o controle físico-químico das folhas foram desenvolvidos e/ou testados e propostos da mesma forma, para compor nova monografia do material vegetal:

- A identificação dos principais alcaloides foi possível a partir do desenvolvimento de método de identificação por CCD;

- As amostras comerciais foram submetidas aos ensaios de Determinação de Teor de Matéria Estranha, Cinzas Totais e Água apresentando resultados satisfatórios quando comparados aos parâmetros existentes atualmente.

Diferentes teores foram encontrados para as quatro amostras comerciais analisadas por CLAE, e apenas a amostra AB-03 apresentou teor bem inferior as demais. Por outro lado, não foram analisadas amostras coletadas,

A análise do extrato otimizado nos diferentes métodos desenvolvidos demonstrou que o método por CLAE resulta em maior teor de atropina, o que pode ser explicado pela sensibilidade dos mesmos (CLAE 3,75 µg/mL, CLUE 21,88 µg/mL e CCDAE 47,36 µg/mL).

Os objetivos deste projeto foram atingidos, com o desenvolvimento e validação de três métodos analíticos, além de três diferentes métodos de extração eficientes para a quantificação de atropina em folhas de *Atropa belladonna* L:

- CCDAE como uma técnica inovadora que une identificação e quantificação de marcadores químicos em uma única análise;

- CLAE como proposta para uma técnica, já amplamente utilizada na indústria, mas ainda não desenvolvida para esta planta em compêndios oficiais;

- CLUE como técnica analítica moderna, com economia, neste caso, principalmente de solventes, diminuindo os custos com materiais e reagentes.

- ELL e EFS como métodos de extração de alcaloides mostrando resultados eficientes e confiáveis tendo em vista os resultados obtidos nas validações utilizando estas técnicas.

Uma metodologia por Cromatografia a Gás com detector de massas (CG/MS) foi pensada e iniciada. Entretanto, em testes iniciais foi identificada a degradação da atropina em apoatropina, que ocorre pela perda de uma molécula de água na estrutura da atropina. Isto, provavelmente se deve ao fato de o método testado (como a maioria dos métodos por CG/MS) evoluir em uma rampa de aquecimento com valor máximo atingido de 300 °C. Muitos alcaloides são termolábeis (sofrem alterações na sua estrutura quando submetidos à temperatura). Dessa forma, esta metodologia não foi desenvolvida em sua totalidade. Os cromatogramas e espectros de massas da análise da SQR e amostra estão apresentados no Apêndice D.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASHTIANIA, F., SEFIDKONB, F. Tropane Alkaloids of *Atropa Belladonna* L. and *Atropa acuminata* Royle ex Miers plants. **Journal of Medicinal Plants Research**. v. 5, n. 29, p. 6515-6522, 2011.

BAZAOUI, A., BELLIMAN, M.A., SOULAYMANI, A. Nine new tropane alkaloids from *Datura stramonium* L. identified by GC/MS. **Fitoterapia**. v. 82, p. 193-197, 2011.

BEZERRA, M.A., et al. Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. **Talanta**. v.76, p. 965-977, 2008.

BRASIL. **Manual para a Elaboração de Monografias para a Farmacopeia Brasileira**. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 1ed. Brasília 2012. P 77-93.

_____. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RE nº. 899 de 29 de maio de 2003**. In: Diário Oficial da União, Brasília, 02 jun. 2003.

_____. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC nº. 14 de 31 de março de 2010**. In: Diário Oficial da União, Brasília, 05 abr. 2010.

BRITISH Pharmacopea. **Herbal Drugs**. Volume IV. 2014. p. 86-88.

CALIGIANI, A. et al. A validated GC–MS method for the detection of tropane alkaloids in buckwheat (*Fagopyron esculentum* L.) fruits, flours and commercial foods. **Food Chemistry**, v.127, p. 204–209, 2011.

CARINI, J.P., et al. Development, Optimisation and Validation of a Stability-Indicating HPLC Method of Achyrobichalcone Quantification using Experimental Designs. **Phytochemical Analysis**. v. 24, p. 193-200, 2013.

CASTRO, M.D.L.; POVEDANO-DELGADO, M.M. Ultrasound: a subexploited tool for sample preparation in metabolomics, **Analytical Chimica Acta** 806 (2014) 74–84

CIEMSHOMSKA, M., et al. Development of a Microwave-Assisted Extraction of Atropine and Scopolamine From Solanaceae family Plants Followed by a QuEChERS Clean-Up Procedure. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**. V. 11, p. 538-548. 2016.

CHAUHAN A.; MITTU B.; CHAUHAN P. Analytical Method Development and Validation: A Concise Review. **Journal of Analytical and Bioanalytical Techniques**. v. 6, 5 p., 2015.

CHEM, H. et al., Simultaneous determination of atropine and scopolamine in buckwheat and related products using modified QuEChERS and liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Food Chemistry**. v. 218, p. 173-180, 2017.

CEYHAN, T. et al. LC determination of atropine sulfate and scopolamine hydrobromide in pharmaceuticals. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical analysis**, n. 25, p. 399-406, 2001.

CRQ. Conselho Regional de Química. 4° Região. **Princípios e Aplicações da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)**. Mini Curso. 2012. Disponível em http://www.crq4.org.br/sms/files/file/hplc_araraquara_2012_site.pdf. Acesso em mar 2014.

DRÄGER, B. Analysis of tropane and related alkaloids. **Journal of Chromatography A**, v. 978, p. 1–35, 2002.

FARMACOPEIA Brasileira. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. 5ed. Volume 1. Brasília 2010. 545p.

_____. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. 5ed. Volume 2. Brasília 2010. P 679-682.

FERREIRA, S.L.C, et al. Box-Behnken design: An alternative for the optimization of analytical methods. **Analytica Chimica Acta**. v. 597, 2007, p.179–186.

GRYNKIEWICZ, G.; GADZIKOWSKA, M. Review of Tropane alkaloids as medicinally useful natural products and their synthetic derivatives as new drugs. **Pharmacological Reports**. V. 60, p. 439-463, 2008.

GUZELMERIC, E., et al. Development and validation of an HPTLC method for apigenin7-O-glucoside in chamomile flowers and its application for fingerprint discrimination of chamomile-like materials. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v. 107, p. 108-118, 2015.

HANK, H. et al. Investigation of Tropane Alkaloids in Genetically Tranformed *Atropa Belladonna* L. Cultures. **Chromatographia**, n. 60, p. 55-59, 2004.

HERNANDES, L.S., KATO, E.T.M., BACCHI, E.M. Alcaloides Tropânicos. In: SIMÕES, C. M. O., et al. **Farmacognosia: do produto natural ao medicamento**. 1.ed. Porto Alegre: Ed. Artimed, 2017. p. 349-365.

HOSSEINI, N. et al. Simultaneous determination of atropine and scopolamine in different parts of *Hyoscyamus arachnoideus* Pojark plants by high-performance liquid chromatography (HPLC). **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 5, n. 15, p. 3552-3557, 2011.

HUBER, U. Analysis of Atropine in Belladonna Extract (*Atropa Belladonna*) by HPLC. **Agilent Technologies**. 1998.

ICH. International Conference of Harmonization of Technical Requeriments for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. **Validation of Analytcal Procedures: Text and Methodoly. Q2(R1)**. 2005, 12 p.

IRANBAKHS, A.; OSHAGHI M. A.; MAJD A. Distribution of Atropine and Scopolamine in Different Organs and Stages of Development in *Datura Stramonium* L. (Solanaceae). Structure and ultrastructure of Biosynthesizing Cells. **Acta Biologica Cracoviensia**, Series Botanica v. 48, n. 1, p. 13–18, 2006.

JAKABOVÁ, S. et al. Determination of tropane alkaloids atropine and scopolamine by liquid chromatography-mass spectrometry in plants organs of *Datura* species. **Journal of Chromatography A**, v. 1232, p. 295-301, 2012.

JYOTSHNA, et al. Uni-dimensional double development HPTLC-densitometry method for simultaneous analysis of mangiferin and lupeol content in mango (*Mangifera indica*) pulp and peel during storage. **Food Chemistry**. v. 176, p. 91-98, 2015.

KAISER, S. et al., Extraction optimization of polyphenols, oxindole alkaloids and quinovic acid glycosides from cat's claw bark by Box-Behnken design. **Industrial Crops and Products**. v. 48, p. 153-161, 2013.

KLEIN-JÚNIOR, L.C., HEYDEN, I.V, HENRIQUES, A.T.H. Enlarging the bottleneck in the analysis of alkaloids: A review on sample preparation in herbal matrices. **Trends and Analytical Chemistry**. V. 80, p. 66-82, 2016.

_____, et al. The use of chemometrics to study multifunctional indole alkaloids from *Psychotria nemorosa* (*Palicourea comb. nov.*). Part I: Extraction and fractionation optimization based on metabolic profiling. **Journal of Chromatography A**. v. 1463, p. 60-10, 2016.

KUMAR, D., et al. Determination of Theanine and Catechin in *Camellia sinensis* (Kangra Tea) Leaves by HPTLC and NMR Techniques. **Food Analytical Methods**. v. 9, p. 1666-1674, 2016.

KURSINSZKI, L. et al. Simultaneous analysis of hyosciamine, scopolamine, 6 β -hydroxyhyosciamine and apoatropine in Solanaceous hairy roots by reversed-phase high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, n. 1091, p. 32-39, 2005.

LOESCHER, C. M., et al. High performance thin layer chromatography (HPTLC) and high performance liquid chromatography (HPLC) for the qualitative and quantitative analysis of *Calendula officinalis* - Advantages and limitations. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v. 98, p. 52-59, 2014.

LUNDSTEDT, T., et al., Experimental design and optimization. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**. v. 42, p. 3-40. 1998.

MALDANER, L.; JARDIM, I.C.S.F. O estado da arte da cromatografia líquida de ultra eficiência. **Química Nova**. v. 32, p. 214-222. 2009.

MARAN, J.P., et al., Box-Behnken design based statistical modeling for ultrasound-assisted extraction of corn silk polysaccharide. **Carbohydrate Polimers**. v. 92, p. 604-611, 2013.

MINITAB. **Experimentos Fatoriais**. Disponível em <http://support.minitab.com/pt-br/minitab/17>. Acesso em jul 2016.

_____. **Experimentos de Superfície de resposta.** Disponível em <http://support.minitab.com/pt-br/minitab/17>. Acesso em jul 2016.

MONTGOMERY, D.C. **Design na Analysis of Experiments.** Wiley. 5 Ed. 2001.

MORALES, R. Plantas y Cultura Popular: La Etnobotánica em España. **Quercus.** Abril 1995. p. 7-8.

MROCZEK, T.; GLOWNIAK K.; KOWALSKA, J. Solid-liquid extraction and cation-exchange solid-phase extraction using a mixed-mode polymeric sorbent of *Datura* and related alkaloids. **Journal of Chromatography A**, v. 1107, p. 9-18, 2006.

NAMERA, A. et al. Quantitative analysis of tropane alkaloids in biological materials by gas chromatography-mass spectrometry. **Forensic Science International**, n. 130, p. 34-43. 2002.

ONISZCZUK, A. et al. Influence of Sample Preparation Methods on the Quantitation of Selected Tropane Alkaloids from Herb of *Datura innoxia* Mill. by HPTLC. **Acta Chromatographica**, v. 3, n. 25, p. 545-554, 2013.

PANDEY, D. K., et al. A validated and densitometric HPTLC method for the simultaneous quantification of reserpine and ajmalicine in *Rauvolfia serpentina* and *Rauvolfia tetraphylla*. **Brazilian Journal Pharmacognosy.** v. 26, p. 553-557, 2016.

PICÓ, Y. Ultrasound-assisted extraction for food and environmental samples. **Trends and Analytical Chemical.** v. 43, p. 84-99, 2013.

PILLAI, D.; PANDITA, N. Validated high performance thin layer chromatography method for the quantification of bioactive marker compounds in Draksharishta, an ayurvedic polyherbal formulation. **Brazilian Journal Pharmacognosy.** v. 26, p. 558-563, 2016.

REAL **Pharmacopea Española.** 2e d. 2002. p.805-806.

REGINATTO, F. H. Introdução à análise fitoquímica. In: SIMÕES, C. M. O., et al. **Farmacognosia: do produto natural ao medicamento.** 1.ed. Porto Alegre: Ed. Artimed, 2017, p. 69-81.

SEVERO, A.A.L., et al., Otimização das condições de extração de senosídeos por soluções hidroetanólicas das folhas de *Senna alexandrina* MILL empregando planejamento fatorial. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada.** v. 34, p. 603-609, 2013.

SHEN, W. et al., Optimization of ultrasonic-assisted extraction of water-soluble polysaccharides from *Boletus edulis* mycelia using response surface methodology. **Carbohydrate Polimers.** v. 87, p. 614-619, 2012.

SRIVASTAVA, M.M., **HPTLC: High-Performance Thin-Layer Chromatography.** Ed. Springer, 2011.

STEENKAMP, P.A. et al. Fatal *Datura* Ipoisoning: identification of atropine and scopolamine by high performance liquid chromatography/photodiode array/mass spectrometry. **Forensic Science International**, v.145, p. 31-39, 2004.

TEMERDASHEV, A. Z.; KOLYCHEV, I. A.; KISELEVA, N. V. Chromatographic determination of some tropane alkaloids in *Datura metel*. **Journal of analytical chemistry**. V. 67. N.12, p. 960 -966, 2012.

TOOMULA, N. et al. Development and Validation of Analytical Methods for Pharmaceuticals. **Journal of Analytical and Bioanalytical Techniques**. v. 2, p. 4, 2011.

TYLER, V.E.; BRADY, L.R.; ROBBERS, J.E. **Pharmacognosy**. Lea and Febiger, 9th ed. Philadelphia. 1988.

USP. **The United State Pharmacopeia**. NF 37. 33. ed. Rockville: Estados Unidos Pharmacopeial Convention, 2014. p. 1921-1923.

USP. **The United State Pharmacopeia**. NF 38. 34. ed. Rockville: Estados Unidos Pharmacopeial Convention, 2015. p. 1445-1451.

VILEGAS, W., CARDOSO, C.A.L., QUEVEDO, A.E.P., Controle Químico de Qualidade de Fitoterápicos e Plantas Medicinais. In: YUNES, R.A., FILHO, V.C., (Orgs.). **Química de Produtos Naturais: novos fármacos e a moderna farmacognosia**. 5.ed. Itajaí: Ed. Univali, 2016. p.185-214.

WAGNER, H.; BLADT S.. Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas. Springer, 1996. p. 48-49

WATERS. Fundamentals of Solid-Phase Extraction (SPE): Principles and Practical Tips for Developing Sample Preparation Methods. Disponível em http://www.waters.com/webassets/cms/events/docs/FundamentalsofSPEPart1_2013_Final_2_26_13.pdf. Acesso em fev 2017.

_____. Disponível em http://www.waters.com/webassets/cms/category/media/primers/primer_uplc_03.jpg. Acesso em fev 2017.

WEISSMAN, S. Design of Experiments (DoE) and Process Optimization. A Review of Recent Publications. **Organic Process Research & Development**. V. 19, p. 1605-1633, 2015.

YADAV, D.; GUPTA, M. M.. Simultaneous Quantification of Diarylheptanoids in *Alnus bepalensis* Using a Validated HPTLC Method. **Journal of Chromatographic Science**. v. 52, p. 905-910, 2014.

YANG, B., LIU, X., GAO, Y. Extraction optimization of bioactive compounds (crocin, geniposide and total phenolic compounds) from Gardenia (*Gardenia jasminoides* Ellis) fruits with response surface methodology. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**. v. 10, p. 610-615, 2009.

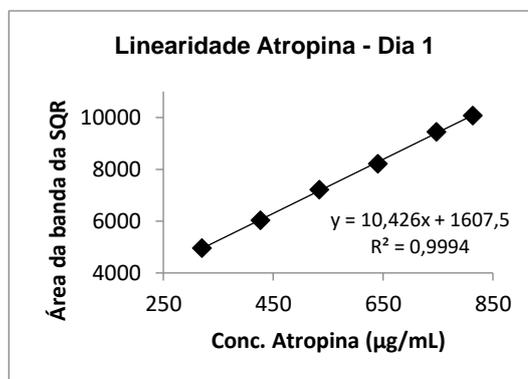
ZHAO, Y., et al. Optimization of Ultrasonic Extraction of Phenolic Compounds from *Epimedium brevicornum* Maxim Using Response Surface Methodology and Evaluation of Its Antioxidant Activities In Vitro. **Journal of Analytical Methods in Chemistry**. v. 2014, 7 p., 2014.

ZOU, Y., et al. Response surface methodology for optimization of the ultrasonic extraction of polysaccharides from *Codonopsis pilosula* Nannf.var.modesta L.T.Shen. **Carbohydrate Polimers**. v. 84, p. 503-508, 2011.

APÊNDICE A – CURVAS DE LINEARIDADE DIAS 1,2 E 3 – CCDAE

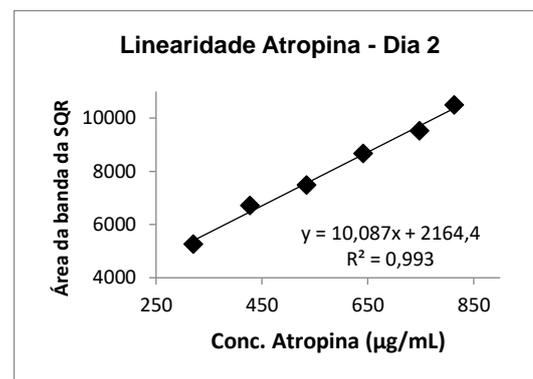
Dados da curva de linearidade da atropina – Dia 1

$\mu\text{g/mL}$	Área 1	Área2	Área3	Média	Desvio	CV (%)
320,4	5022,0	4901,0	5292,8	4961,5	85,56	1,7245
427,2	6092,2	5972,6	6424,0	6032,4	84,57	1,4019
534,0	7313,4	7136,4	7739,8	7224,9	125,16	1,7323
641,0	8143,4	8239,5	8262,3	8215,1	63,103	0,76814
747,5	9418,5	9491,8	10448	9455,2	51,831	0,54818
813,5	10139	10012	9048,3	10076	90,156	0,89480



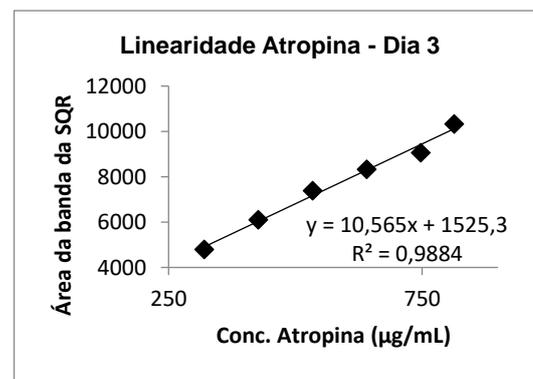
Dados da curva de linearidade da atropina – Dia 2

$\mu\text{g/mL}$	Área 1	Área2	Área3	Média	Desvio	CV (%)
320,4	5797,4	5197,2	5328,9	5263,1	93,126	1,7694
427,2	6725,9	6703,9	7120,7	6714,9	15,56	0,2317
534,0	8260,7	7661,7	7292,0	7476,9	261,42	3,4964
641,0	8602,7	8720,5	8228,0	8661,6	83,30	0,9617
747,5	9596,0	9449,1	9207,1	9522,6	103,87	1,0908
813,5	10330	10496	10639	10488	154,60	1,4741



Dados da curva de linearidade da atropina – Dia 3

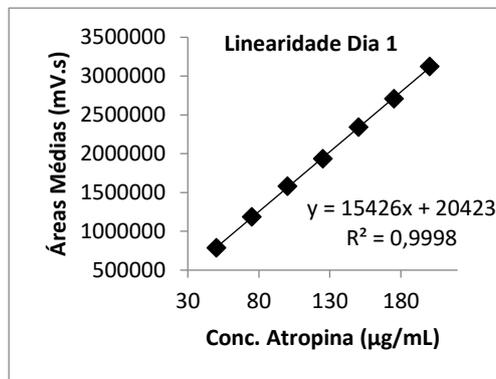
$\mu\text{g/mL}$	Área 1	Área2	Área3	Média	Desvio	CV (%)
320,4	4303,3	4745,1	4837,2	4791,2	65,125	1,3593
427,2	6013,5	6216,5	6049,0	6093,0	108,42	1,7794
534,0	7166,8	7763,7	7581,1	7374,0	292,95	3,9728
641,0	8216,6	8534,9	8209,6	8320,4	185,82	2,2334
747,5	8960,4	9180,2	9030,4	9057,0	112,29	1,2398
813,5	9928	10483	10547	10319	340,77	3,3021



APÊNDICE B – CURVAS DE LINEARIDADE DIAS 1,2 E 3 – CLAE

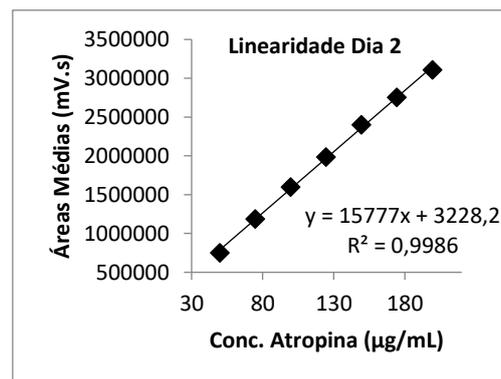
Dados da curva de linearidade da atropina – Dia 1

$\mu\text{g/mL}$	Área 1	Área 2	Área 3	Média	Desvio	CV (%)
50,08	787384	787636	785042	786687	1430,46	0,1818
75,12	1179669	1188839	1187460	1185323	4944,53	0,4171
100,2	1574161	1576631	1593046	1581279	10264,80	0,6491
125,2	1928014	1946928	1935704	1936882	9511,87	0,4911
150,2	2344894	2337706	2340325	2340975	3637,82	0,1554
175,3	2703769	2701238	2719256	2708088	9754,50	0,3602
200,3	3117033	3121172	3130408	3122871	6847,45	0,2193



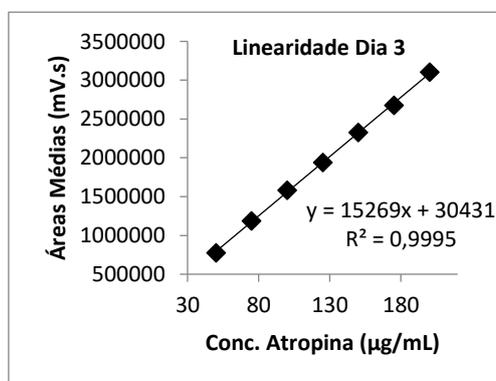
Dados da curva de linearidade da atropina – Dia 2

$\mu\text{g/mL}$	Área 1	Área 2	Área 3	Média	Desvio	CV (%)
49,84	748862	746252	752509	749208	3142,79	0,4195
74,76	1177842	1183335	1199086	1186754	11027,05	0,9292
99,68	1590691	1599044	1608096	1599277	8704,84	0,5443
124,6	1971251	1992226	1992306	1985261	12133,08	0,6112
149,5	2317077	2366470	2522880	2402142	107438,84	4,473
174,4	2736730	2746490	2778621	2753947	21918,46	0,7959
199,4	3060698	3132655	3126056	3106470	39776,51	1,2804



Dados da curva de linearidade da atropina – Dia 3

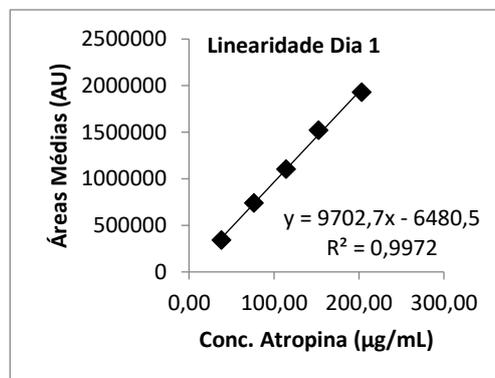
$\mu\text{g/mL}$	Área 1	Área 2	Área 3	Média	Desvio	CV (%)
50,08	776150	782028	769728	775969	6152,00	0,7928
75,12	1187353	1190477	1181663	1186498	4468,82	0,377
100,2	1583719	1580995	1587737	1584150	3391,63	0,2141
125,2	1927210	1938652	1957638	1941167	15369,07	0,7917
150,2	2336511	2316544	2331193	2328083	10340,50	0,4442
175,3	2689059	2680131	2660567	2676586	14573,11	0,5445
200,3	3112444	3104109	3091387	3102647	10604,39	0,3418



APÊNDICE C – CURVAS DE LINEARIDADE DIAS 1,2 E 3 – CLUE

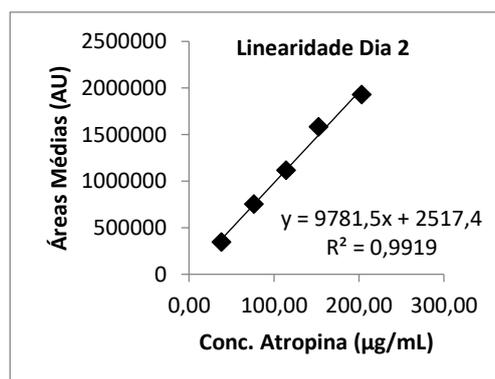
Dados da curva de linearidade da atropina – Dia 1

(µg/mL)	Área 1	Área 2	Área 3	Média	Desvio	CV (%)
38,10	342121	340759	338908	340596	1612,69	0,4735
76,20	744883	754816	723429	741043	16042,04	2,1648
114,3	1099028	1106191	1107694	1104304	4630,82	0,4193
152,4	1541443	1509778	1515188	1522136	16937,46	1,1127
203,2	1927926	1921991	1933646	1927854	5827,83	0,3023



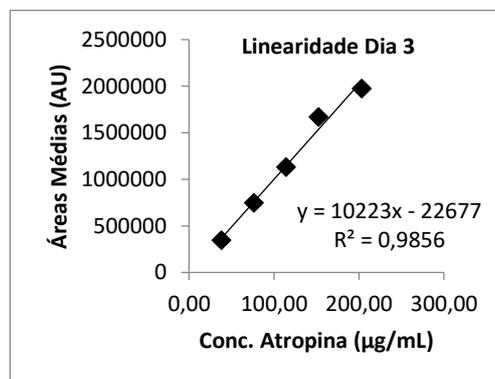
Dados da curva de linearidade da atropina – Dia 2

(µg/mL)	Área 1	Área 2	Área 3	Média	Desvio	CV (%)
38,10	344399	344563	344232	344398	165,50	0,0481
76,20	749264	767819	745405	754163	11983,09	1,5889
114,3	1121066	1114659	1115833	1117186	3411,07	0,3053
152,4	1577824	1585457	1587032	1583438	4924,95	0,3110
203,2	1929441	1910706	1943119	1927755	16272,12	0,8441



Dados da curva de linearidade da atropina – Dia 3

(µg/mL)	Área 1	Área 2	Área 3	Média	Desvio	CV (%)
38,10	339888	342740	347894	343507	4057,78	1,1813
76,20	749720	737047	745959	744242	6508,63	0,8745
114,3	1144945	1123863	1122202	1130337	12678,42	1,1216
152,4	1669450	1665574	1669477	1668167	2245,64	0,1346
203,2	1955614	1981906	1979949	1972490	14647,48	0,7426



APÊNDICE D – CROMATROGRAMAS E ESPECTROS DE MASSAS – CG-EM

