



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
CURSO DE GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA**

**Aplicação da espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear
quantitativa de Hidrogênio (RMNq-¹H) na área farmacêutica e afins**

LÍDIA LÚCIA BEZERRA LEITE

**JOÃO PESSOA
2013**

LÍDIA LÚCIA BEZERRA LEITE

Aplicação da espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear quantitativa de Hidrogênio (RMNq-¹H) na área farmacêutica e afins

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado a Coordenação do Curso de Graduação em Farmácia, da Universidade Federal da Paraíba em cumprimento às exigências para obtenção do título de Bacharel em Farmácia.

ORIENTADOR:

Prof. Dr. Eduardo de Jesus Oliveira

**JOÃO PESSOA
2013**

LÍDIA LÚCIA BEZERRA LEITE

Aplicação da espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear quantitativa de Hidrogênio (RMNq-¹H) na área farmacêutica e afins

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado a Coordenação do Curso de Graduação em Farmácia, da Universidade Federal da Paraíba em cumprimento às exigências para obtenção do título de Bacharel em Farmácia.

Trabalho aprovado em ____ / ____ / ____

**Eduardo de Jesus Oliveira, Doutor
Orientador – UFPB**

**Maria de Fátima Vanderlei de Souza, Doutora
Examinador – UFPB**

**Hemerson Iury Ferreira Magalhães, Doutor
Examinador – UFPB**

**Bárbara Viviana de Oliveira Santos, Doutora
Suplente (Examinador) – UFPB**

Dedicatória

*Aos meus pais Lúcia e João,
Por toda credibilidade em mim depositada, pela paciência, pelo
cuidado, pelo norte e pelo incentivo. A vocês dedico a conquista
hoje materializada. Sei que a minha felicidade e minhas dores
também são suas, por isso, não há ninguém melhor para
compartilhar a plenitude da conclusão dessa etapa do que com
aqueles que me ensinaram a reconhecer o que de fato têm valor
na vida. Aos melhores pais e a meu irmão Júnior dedico esta
vitória.*

Agradecimentos

A Deus, pelas oportunidades de aprendizado lançadas no percurso até aqui vencido, ao consolo dado nos momentos em que os planos não tomaram o rumo desejado e a força transferida quando minhas reservas estavam aparentemente esgotadas.

Ao orientador Eduardo Oliveira, pela oportunidade de aprendizado, incentivo e pela disponibilidade em transmitir o conhecimento e ajudar. Por ele guardo admiração e respeito tanto pelo profissional quanto pela pessoa ética que é.

Aos meus pais, por todo apoio, confiança, compreensão e auxílio. A eles que, não só durante a graduação, mas, durante toda minha vida batalharam pra não me faltar nada e zelaram pela minha integridade enquanto pessoa, um obrigado é muito pouco.

Ao meu irmão Júnior, pelas conversas jogadas fora, carinho, respeito e reconhecimento. Agradeço por todas as exposições de afeto que guardo, feitas pelo garoto que mais repreendo e amo.

Aos meus amigos, pela cumplicidade, companheirismo, por aquela “tapa na cara” às vezes merecida, pelas alegrias e tristezas compartilhadas, pelas brigas que me fizeram crescer enquanto ser humano e, principalmente, pelo fato de ser minha pequena família adotiva, àquela a quem você escolhe e se deixa escolher.

A todos que compõem a equipe LAFAM pelo ambiente de companheirismo que há no laboratório e por toda prestatividade, em especial das amigas Ayala Nara e Eugênia Abrantes.

Ao mestre Rony Anderson, a quem acompanhei durante meus 3 anos de iniciação científica, agradeço pela prontidão em esclarecer minhas dúvidas, a paciência e a amizade.

Aos docentes do curso de farmácia da UFPB, tanto aqueles que souberam exigir esforço da minha parte quanto aos que aliviaram para que as grandes exigências dos demais pudessem ser cumpridas. Agradeço pelo norte, a partir deste orientei minhas prioridades.

Aos colegas de curso, por toda vivência durante esses anos, pela construção partilhada, pelo exercício no conviver diariamente com as diferenças, pelas alegrias nas salas, corredores, cantinas e no mundo “extra UFPB”. Agradeço pela história a contar e desejo muito sucesso a todos nós.

*Muito obrigada,
Lídia Lúcia Bezerra Leite*

“O abuso de autoridade é próprio de quem transborda em frustrações” (Neimar de Barros).

“Talvez meio caminho andado seja a gente acreditar no que faz. Mas acima de tudo o que mais nos incentiva, que mais nos valoriza e também mais nos torna conscientes da nossa responsabilidade, é saber que os outros creem em nós. E não há palavras que descrevam o que sentimos ao saber dos sacrifícios a que eles se impõem por crearem não apenas em nós, mas também no que cremos”.

(Albert Einstein)

**Aplicação da Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio (RMNQ-1H) na
área farmacêutica e afins**

LEITE, LLB (2013)

Trabalho de Conclusão de Curso/Farmácia/UFPB

RESUMO

A Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear é uma técnica consagrada na elucidação estrutural de compostos químicos. Essa técnica é fundamentada na propriedade de spin de alguns núcleos que frente a um campo magnético aplicado se orientam assumindo dois estados distintos de spin, um alinhado com o campo- baixa energia- e outro em sentido oposto ao campo aplicado- alta energia. Apesar destes estados de spin serem quase igualmente populados, há um pequeno excesso de spins que assumiram o estado de baixa energia e é esse excesso o responsável pela observação do fenômeno de ressonância que é alcançado quando um pulso de energia de alta frequência correspondente à diferença de energia entre estes dois estados de spin é absorvida pelo sistema, promovendo uma mudança no estado de spin dos núcleos para o estado de maior energia. Esse trabalho teve por objetivo realizar uma revisão bibliográfica sobre a aplicabilidade da Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio com finalidade quantitativa na área farmacêutica e correlatas. A RMNQ-¹H parte da premissa que a intensidade um determinado sinal é diretamente proporcional ao número de núcleos que o geraram, permitindo, assim, que a concentração de um analito X seja determinada pela área integrada desse sinal utilizando para tanto um padrão de referência. A RMNQ-¹H, embora ainda pouco explorada no âmbito nacional, possui várias vantagens sobre as técnicas convencionais de quantificação, as principais incluem: em RMNQ-¹H o padrão de referência não precisa ser estruturalmente relacionado ao analito de interesse, a preparação da amostra é relativamente simples, há possibilidade de identificar e quantificar várias substâncias simultaneamente em único espectro, além de ser um método não destrutivo. Essa gama de vantagens tem despertado interesse em muitos pesquisadores e hoje a técnica tem sido empregada na análise de pureza, avaliação de adulteração de produtos industrializados, metabolômica, toxicologia regulatória etc. O estudo de possibilidades de combinações e alterações de parâmetros para otimização da técnica para fins quantitativos é uma perspectiva, que a âmbito internacional já vem sendo amadurecida.

Palavras-chave: RMN, quantitativa, área farmacêutica.

ABSTRACT

The Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy is an established technique in the structural elucidation of chemical compounds. This technique is based on the property of the spin isotopes in the presence of an applied magnetic field to assume two different spin states, one aligned with the field- low-energy- and the other in the opposite direction to the applied field- high-energy. Albeit these spin states are almost equally populated, there is a small excess of spins that assume the low energy state and this excess is responsible for the observation of the phenomenon of resonance. Resonance is achieved when the sample is irradiated and absorbs radiofrequency pulse with energy matching the difference of the two spin states, promoting thus the nuclei to higher energy spin states. This study aimed to conduct a literature review on the applicability of Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy of Hydrogen with quantitative purpose in the pharmaceutical and related. The ^1H -qNMR assumes that a given signal intensity is directly proportional to the number of nuclei that generated it, thereby allowing the concentration of an analyte X to be determined by the integrated area using the signal of a resonance standard for comparison. The ^1H -qNMR although still underused nationally, has a number of advantages over conventional techniques in quantitative analysis, including: in ^1H -qNMR reference standard need not to be structurally related to the analyte of interest, sample preparation is relatively simple, it is possible to identify and quantify various substances simultaneously in one spectrum and is a non-destructive method. This range of benefits has aroused interest in many researchers and today the technique has been employed in the purity analysis, evaluation of industrialized product tampering metabolomics, regulatory toxicology etc. The study of possible combinations and changes of parameters to optimize the technique for quantitative purposes is a perspective and the technique has already matured internationally.

Keywords: NMR, quantitative, pharmaceutical field.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Esquema de distribuição de energia	18
Figura 2: Espectro RMN- ¹ H 600 MHz.....	37
Figura 3: Espectro RMN- ¹ H 400.13 MHz.....	39
Figura 4: Espectro RMN- ¹ H 300 MHz.....	40
Figura 5: Espectro de curcumina RMN- ¹ H 600 MHz	41
Figura 6: Estrutura química de lactonas sesquiterpênicas	42
Figura 7: Espectro RMN- ¹ H 600.13 MHz.....	42
Figura 8: Espectro RMN- ¹ H 600.13 MHz de pacientes com RCC	44
Figura 9: Espectro RMN- ¹ H 500 MHz.....	45

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Distribuição do número de artigos por base	24
Quadro 2: Agrupamento de artigos em categorias.....	26

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1: Equação de Boltzmann	17
Equação 2: Equação para quantificação absoluta por RMNq- ¹ H	35

LISTA DE ABREVIATURAS

CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLAE-UV	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a detector de Ultravioleta
IS	Internal Standard
LC/MS/MS	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a espectrometria de massas sequencial
MRS	Ressonância Magnética Nuclear <i>in vivo</i>
PCA	Análise de Componentes Principais
RF	Radiofrequência
RMI	Ressonância Magnética Nuclear por Imagem
RCC	Carcinoma de células renais
RMN	Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear
RMNq	Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear quantitativa
RMN- ¹ H	Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
RMNq- ¹ H	Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear quantitativa de Hidrogênio
ssNMR	Ressonância Magnética Nuclear de estado sólido
S/N	Razão sinal/ruído
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 METODOLOGIA	24
3 CONSIDERAÇÕES SOBRE RMNq-¹H E APLICAÇÕES	26
3.1 Dados coletados.....	26
3.2 Preparação da amostra.....	31
3.2.1 Escolha do solvente	31
3.2.2 Seleção do padrão	32
3.3 Validação.....	33
3.3.1 Linearidade.....	33
3.3.2 Limite inferior de quantificação.....	34
3.3.3 Precisão	34
3.3.4 Exatidão	34
3.3.5 Robustez	34
3.3.6 Especificidade e seletividade	35
3.4 Quantificação	35
3.5 Aplicação de RMNQ- ¹ H na área farmacêutica e afins.....	36
4 CONCLUSÃO	48
5 REFERÊNCIAS	50

Introdução

1 INTRODUÇÃO

A Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) é uma das técnicas mais utilizadas para a determinação da estrutura de moléculas orgânicas, tanto aquelas de baixo peso molecular, quanto de macromoléculas como proteínas. Embora amplamente consagrada como instrumento de elucidação estrutural, o aspecto dessa técnica enquanto ferramenta de análise quantitativa é subexplorado, principalmente no Brasil onde estudos voltados para esse fim são escassos.

Em 1963 as primeiras medidas quantitativas utilizando RMN foram realizadas em uma preparação comercial de analgésicos por Hollis. Já na década de 1980 a Farmacopéia Alemã DAB9 caracterizou a composição de gentamicina por RMN- ^1H . Hoje em dia a Ressonância Magnética Nuclear quantitativa (RMNq) é uma técnica bem estabelecida na análise quantitativa de várias classes de substâncias, tais como, drogas, excipientes, vacinas, produtos naturais, peptídeos, agrotóxicos, alimentos e bebidas, perfil metabólico/fingerprinting de extratos de plantas e tinturas, bem como fluidos corporais, como por exemplo, no uso da metabolômica para diagnóstico de doenças e controle do tratamento, dentre outras aplicações (HOLZGRABE, 2010).

Trabalhar com metodologias quantitativas automatizadas que ofereçam especificidade, reprodutibilidade, robustez e, sobretudo praticidade tornou-se condição necessária diante da grande demanda e diversidade de substâncias a serem analisadas na rotina da pesquisa, desenvolvimento e controle de qualidade de produtos farmacêuticos e correlatos. Assim, metodologias, tais como, Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), Espectrofotometria no Ultravioleta (UV), dentre outras, possuem limitações na análise que podem ser supridas com a aplicação da Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear quantitativa de hidrogênio (RMNq- ^1H).

A Ressonância Magnética Nuclear oferece informações sobre o número de átomos magneticamente distintos do isótopo estudado em uma molécula. Para que um determinado isótopo possa ser analisado por RMN é necessário que este tenha a propriedade de *spin*, isto é, que tenha massa ímpar ou número atômico ímpar ou ambos, entretanto, as aplicações de RMNq a núcleos que não o ^1H são limitadas devido à baixa sensibilidade ou baixa abundância natural destes outros núcleos.

A frequência da radiação de radiofrequência que é absorvida por um dado núcleo é fortemente afetada pelo seu ambiente químico, isto é, por elétrons e núcleos próximos (SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2002). Um espectro de RMN típico mostra aumento do deslocamento químico expresso em partes por milhão (ppm) da direita para esquerda, isso implica que os prótons menos blindados aparecerão mais a esquerda e os mais blindados à direita do espectro.

O conceito de blindagem refere-se à carga eletrônica que existe em torno do núcleo de um determinado átomo. Quando se aplica um dado campo magnético os elétrons em volta do núcleo são forçados a girar na direção oposta ao campo aplicado gerando um efeito de blindagem diretamente proporcional a densidade eletrônica em volta do núcleo.

Na ausência de um campo magnético aplicado, todos os estados de *spin* de um dado núcleo tem energia degenerada, no entanto, após aplicação de um campo magnético os estados de *spin* degenerados dividem-se em dois estados de energia distintos, um de baixa energia alinhado com o campo aplicado e outro de alta energia com momento magnético oposto ao campo aplicado.

O fenômeno da ressonância magnética nuclear ocorre quando os núcleos alinhados com um campo B_0 aplicado são induzidos a absorver energia e mudar de orientação de *spin* em relação ao campo. Na presença de um campo externo (B_0) os dois estados de *spin* são populados segundo a equação 1 (PAVIA et al., 2010):

$$\frac{N_{\text{mais alto}}}{N_{\text{mais baixo}}} = e^{-\Delta E/kT} \quad (1)$$

Onde,

$N_{\text{mais alto}}$ é o número de núcleos populando o estado de maior energia;

$N_{\text{mais baixo}}$ é o número de núcleos populando o estado de menor energia;

ΔE é a diferença de energia entre os dois estados;

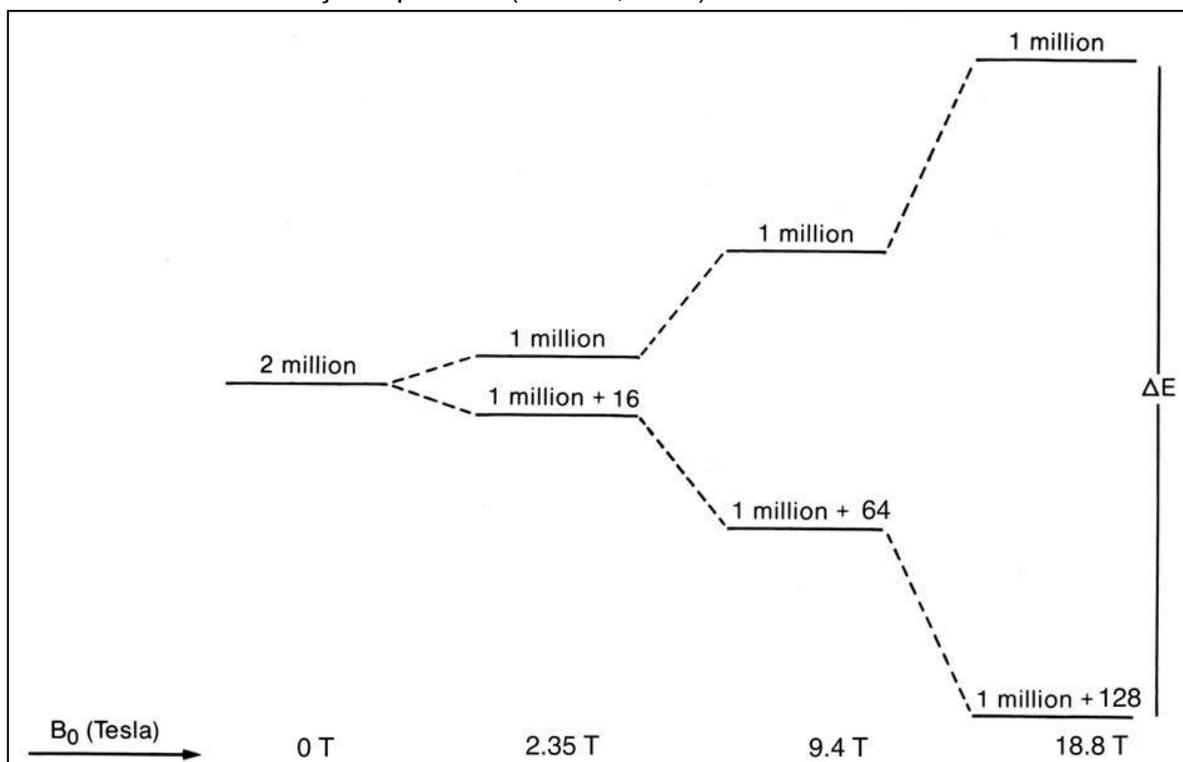
k é a constante de Boltzman e;

T é a temperatura absoluta (em °K).

O efeito do aumento na intensidade do campo magnético sobre esta diferença de população nos núcleos que ocupam o menor e o maior estados de energia pode ser melhor apreciado na Figura 1, que mostra que em uma amostra hipotética com 2 milhões de núcleos (um número imensamente pequeno em termos reais), quando submetida a um campo de 9,4 T (frequência de ressonância do hidrogênio= 400

MHz), o excesso no estado de menor energia corresponde a apenas 64 núcleos. Por esta razão a técnica de RMN é inerentemente pouco sensível.

Fig 1. Influência da intensidade do campo magnético na distribuição dos níveis de energia nucleares em uma situação hipotética (JAMES, 1975).



.Fonte: JAMES, 1975.

A intensidade de um sinal I é diretamente proporcional ao número de núcleos N que compõem o sinal, deste modo, a quantificação pode ser realizada por simples medição da área sob um sinal representado pela integral. O sinal do espectro para quantificação deve ser claramente separado dos demais sinais, sendo, portanto, finalmente atribuído ao átomo da substância a ser quantificada. A concentração absoluta de um analito pode então ser determinada pela comparação da intensidade integrada das ressonâncias da amostra e um padrão de concentração conhecida (BARDING JR; SALDITOS; LARIVE, 2012; HOLZGRABE, 2010).

Há requisitos adicionais que devem ser obedecidos para uma otimização da análise quantitativa, alguns deles são: pureza do sinal de RMN considerado para a quantificação e o efeito da rotação sobre o aparecimento das *side bands*, sendo preferível uma medição sem rotação do tubo de amostra. Um outro requisito adicional, porém não obrigatório, é que o sinal selecionado para fins quantitativos

deve ser tão simples quanto possível, assim, um singlete é preferível a um multiplete.

Métodos quantitativos fundamentados em Ressonância Magnética Nuclear possuem tanto parâmetros operador não-dependente referentes aqueles controláveis por softwares, tais como, delay , tempo de aquisição e otimização, quanto parâmetros operador-dependente, tais como, fases e integração (WATANABE; SUZUKI; OSHIMA, 2010). Em RMNq é de extrema importância que o analista esteja bem familiarizado com os parâmetros de aquisição e processamento para otimização do espectro obtido. Uma extensa revisão de literatura acerca do tema foi realizada na Índia e descreve alguns parâmetros de aquisição importantes para qualidade da análise por esta técnica (BHARTI; ROY, 2012). Dentre outros, temos:

- Pulso de excitação: ângulo de pulso de 90° ou inferior pode ser utilizados para registrar os espectros.
- Tempo de repetição (TR): total de tempo gasto para adquirir o espectro com única varredura (scan).
- Tempo de aquisição (TD): deve ter apenas a duração suficiente para evitar o truncamento do FID, o que pode levar a medições imprecisas de intensidade do sinal.
- Ganho do receptor (RG): é importante manter uma ótima configuração do RG, pois uma alta configuração causa distorção da linha de base, enquanto uma configuração muito baixa provoca perda de sinal do analito ou uma diminuição do razão S/N.
- Resolução Digital: a análise quantitativa também exige que os espectros tenham boa resolução digital. Dados de RMN adquiridos em 32 K pontos de dados são suficientes para a análise quantitativa.
- Shimming: ferramenta disponível para otimizar a homogeneidade do campo magnético em volta da amostra.
- Tuning e matching da sonda (probe): o ajuste inadequado desses dois parâmetros pode afetar a efetividade do pulso de 90° resultando em variações na intensidade dos sinais.

- Temperatura: afeta a reprodutibilidade quantitativa dos resultados, devendo manter-se constante durante todo o estudo a fim de evitar geração de artefatos.
- Precisão do tubo de RMN: deve-se utilizar tubos de RMN de qualidade com diâmetro preciso e espessura uniforme.
- Técnicas de supressão de solvente: é um pré-requisito para quantificação precisa. A escolha do método utilizado para supressão do solvente depende do analito de interesse.

Com efeito, um certo número de parâmetros devem ser cuidadosamente verificados para obter resultados quantitativos precisos. O tempo de repetição, anteriormente citado, deve ser suficientemente longo para permitir que a magnetização do estado de equilíbrio seja restabelecida antes do próximo ciclo de pulso começar. Otimização do processamento, tais como uso da ferramenta zero-filling que multiplica os pontos de dados por 2 e, multiplicação exponencial para melhorar a relação sinal/ruído que deve ser de pelo menos 150 para uma incerteza de 1%, de 30 para uma precisão de aproximadamente 3% ou de 10 para uma precisão de cerca de 10% também são ferramentas de utilização desejável para garantir um resultado confiável em RMNq-¹H (GILARD et al., 2010).

Algumas ferramentas para melhorar a razão S/N incluem, por exemplo, a utilização da função janela ou filtro antes da transformada de Fourier, uso de campos magnéticos elevados (LI et al., 2011), utilização de crioprobos e aumento do número de varrimentos (BHARTI; ROY, 2012), no entanto, uma vez que os ganhos são proporcionais a raiz quadrada do número de varrimentos, tempos de análise significativamente mais longos podem fornecer apenas modesta melhoria da S/N (BARDING JR; SALDITOS; LARIVE, 2012).

A utilização da técnica de RMN abole a necessidade de um extenso manuseamento e preparação da amostra, o que mais do que compensa o custo mais elevado associado com um espectrômetro de RMN, sua baixa sensibilidade, com limite de detecção (LOD) entre 10⁻⁹ e 10⁻¹¹ mol (MALET-MARTINO; HOLZGRABE, 2011), e o risco de precipitação da solução quando se trabalha com extratos de plantas devido ao uso de sondas criogênicas (GILARD et al., 2010; NIELSEN et al., 2008).

Quando aplicado às análises de rotina de espectros de RMN-¹H, o termo "puro por RMN" geralmente indica um grau de pureza ao nível de 95% ou superior. Técnicas de RMN quantitativas vêm sendo introduzidas a fim de melhorar a precisão com a qual os componentes minoritários de uma mistura podem ser quantificados, desde que as ressonâncias de interesse estejam bem resolvidas e a razão sinal/ruído na amostra seja aceitável (> 10:1) (CLARIDGE et al., 2008).

A RMN foi extensivamente utilizada para elucidação da estrutura qualitativa de produtos naturais, bem como para determinações quantitativa de analitos alvo purificados. Essa técnica permite o uso de padrões internos ou externos de referência para a análise quantitativa que não precisam ser idênticos aos analitos alvo possibilitando a seleção de compostos de alta estabilidade química e pureza como padrões de calibração para fins quantitativos (GÖDECKE et al., 2012).

Independentemente do custo atrelado à manutenção do equipamento, a utilização de espectroscopia de RMN para identificar um grande volume de amostra de fármacos pode ser comercialmente mais viável que a identificação por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) devido ao baixo custo na obtenção de um único espectro de hidrogênio, considerando os gastos com consumíveis e o curto tempo de aquisição requerido para registrar um espectro (PODGORSKII; MIKHALEV; KALABIN, 2011).

Além de possibilitar uma fácil manipulação da amostra, a quantificação por RMN traz como vantagens adicionais (I) um baixo tempo de análise, (II) ser uma técnica não destrutiva, (III) permite o acesso simultâneo aos aspectos qualitativos e quantitativos da amostra, (IV) é menos seletivo do que os métodos cromatográficos convencionais que são otimizados para um determinado composto ou classe de compostos o que pode levar a omissão de substâncias cujas propriedades físico-químicas são bastante diferentes daquela para qual o método foi configurado, (V) independe da polaridade do analito, (VI) não requer derivatização da amostra antes, (VII) dispensa separação prévia da fase a ser quantificada e (VIII) possibilita a quantificação de vários analitos em uma mesma análise na ausência de padrões caros do analito de interesse uma vez que a magnitude do sinal de ressonância é sempre diretamente proporcional ao número de hidrogênios que o geraram.

A Espectroscopia de RMN é capaz de proporcionar resultados com alta precisão com erros de menos de 1% para quantificação absoluta e inferior a 0,2%

para a quantificação relativa. A diferença entre esses dois modelos de quantificação reside na possibilidade de determinar a concentração do analito de interesse, onde, na quantificação relativa podemos apenas mensurar a proporção da concentração do analito em relação ao padrão interno, já na quantificação absoluta podemos determinar a concentração real do analito e do padrão interno considerando o valor da área integrada, o número de prótons integrados, a massa molecular e a massa pesada de cada um deles.

Cada ressonância de interesse deve ser representada por um número suficiente de pontos de dados para definir com precisão o pico e produzir uma integral confiável, recomendando-se um mínimo de cinco pontos de dados por pico (BARDING JR; SALDITOS; LARIVE, 2012). A determinação da área de picos sobrepostos não pode ser obtida com precisão usando métodos de integração de rotina. Para resolver esse impasse usa-se a deconvolução com o intuito de determinar a contribuição de um determinado pico para a área total (BHARTI; ROY, 2012).

Para a quantificação exata a partir de um espectro de RMN é necessário evitar saturação de ressonâncias causadas por um sinal demasiado rápido e isto requer o equilíbrio completo da magnetização entre cada transiente. Os tempos de recuperação são ditados pelas constantes de tempo de relaxamento longitudinal (T1) dos núcleos RMN e intervalos de pelo menos 5T1 são necessários para reestabelecer uma recuperação praticamente completa (> 99%), após excitação da amostra. É importante ressaltar que um núcleo ^{13}C age como uma fonte de relaxamento eficiente para um próton ligado diretamente a ele, diferentemente do núcleo ^{12}C inativo, o que implica que a taxa de recuperação para os satélites ^{13}C será significativamente mais rápida, e, portanto, os valores T1 mais curtos, do que para a ressonância de hidrogênios ligados a ^{12}C , devendo a definição do intervalo ser baseada na constante de tempo de relaxamento do ^{12}C , por este ser mais lenta (CLARIDGE et al., 2008).

No Brasil, pesquisas envolvendo RMN para fins quantitativos são bastante escassos quando comparados a produção internacional, sendo, portanto, uma abordagem que ainda necessita ser explorada no âmbito local.

Metadologia

2 METODOLOGIA

A pesquisa foi do tipo bibliográfica. As fontes utilizadas para o desenvolvimento do trabalho foram de origem científica nas grandes áreas: Química, Produtos Naturais e Farmacologia. O levantamento foi fundamentado em artigos publicados nos últimos 05 anos (2008-2013) disponíveis nas bases WebofScience, Lilacs e PubMed. Também foram consultados capítulos de livros pertinentes ao tema e páginas eletrônicas.

Os descritores utilizados para a busca dos artigos “qRMN”, “RMN”, “quantitativa” e “farmácia” e suas respectivas traduções para o Inglês, “qNMR”, “NMR”, “quantitative” and “pharmacy”.

Os termos de buscas utilizados resultaram num apanhado de 1276 artigos, sendo 828 encontrados na base WebofScience, 0 na base Lilacs e 447 na base PubMed. O detalhamento do número de artigos encontrados conforme combinação de descritores utilizada estão descritos na tabela abaixo:

Quadro 1. Distribuição do número de artigos encontrados por base conforme combinação de descritores utilizados.

Title/palavras do título/Title		Topics/palavras/all fields	WebofScience	Lilacs	Pubmed
Quantitative NMR	AND	Pharmacy	01	0	5
NMR	AND	Quantitative	827	01	440
qNMR	AND	Pharmacy	0	0	02

Fonte: Próprio autor.

A busca em português utilizando a combinação dos termos de busca descritos não retornou nenhum resultado.

Não foram incluídos artigos cujo acesso ao texto integral não estava disponível através do consórcio CAPES, artigos envolvendo RMN em imagem, RMN envolvendo ressonância de núcleos que não o Hidrogênio e aplicações de RMN bidimensionais.

*Considerações sobre
RMN $q^{-1}H$ e
Aplicações*

3 CONSIDERAÇÕES SOBRE RMNq-¹H E APLICAÇÕES

3.1 Dados coletados

O uso dos descritores indicados no item 2 retornou um total de 1276 artigos distribuídos entre as bases WebofScience e PubMed. Após adição dos critérios adicionais de exclusão (não estava disponível através do consórcio CAPES, artigos envolvendo RMN em imagem, RMN envolvendo ressonância de núcleos que não o Hidrogênio e aplicações de RMN bidimensionais) obteve-se um total de 83 artigos, destes 16 pertenciam a ambas as bases resultando então em 75 artigos.

Os 75 artigos restantes após refinamento da metodologia de busca e agrupamento por base foram classificados de acordo com a área de pesquisa majoritária em 8 grupos: Alimentos (4), Análises Clínicas e Toxicológicas (9), Bioinformática e Tecnologia (9), Biologia Molecular (1), Fármacos e Tóxicos (2), Indústria Química e de Materiais (9), Metabolômica (10) e, Produtos Naturais e Fitoterápicos (31). A tabela 2 mostra a distribuição dos artigos de acordo com a base onde foi encontrado, validação do método empregado, frequência do equipamento utilizado na pesquisa e grupo de classificação por tema principal.

Quadro 2. Distribuição dos artigos de acordo com a base de busca, validação do método, frequência de ressonância e categoria. Os campos onde não há informações, preenchidos com (-), são referentes a artigos de revisão de literatura onde não era aplicável descrever os parâmetros da tabela.

CATEGORIA/ APLICAÇÕES	REFERÊNCIA	BASE (S)	MÉTODO VALIDADO	FREQUÊNCIA DE RESSONÂNCIA
Alimentos	(CAMPO et al., 2010)	WebofScience e PubMed	Sim	500 MHz
Alimentos	(LACHENMEIE R et al., 2009)	PubMed	Sim	400 MHz
Alimentos	(MAES et al., 2012)	PubMed	Sim	400 MHz
Alimentos	(MONAKHOVA et al., 2012)	WebofScience	Sim	400 MHz
Análises Clínicas e	(ANDO et al.,	PubMed	Sim	600 MHz

Toxicológicas	2013)			
Análises Clínicas e Toxicológicas	(BARDING JR; SALDITOS; LARIVE, 2012)	WebofScience e PubMed	Não	400 MHz e 800 MHz
Análises Clínicas e Toxicológicas	(DONG et al., 2013)	PubMed	Não	600.13
Análises Clínicas e Toxicológicas	(PINHEIRO et al., 2009)	WebofScience e PubMed	Não	300 MHz
Análises Clínicas e Toxicológicas	(RHIEU et al., 2013)	PubMed	Não	600 MHz
Análises Clínicas e Toxicológicas	(ROSE et al., 2013)	PubMed	Não	600 MHz
Análises Clínicas e Toxicológicas	(SCHICHO et al., 2012)	PubMed	Sim	600 MHz
Análises Clínicas e Toxicológicas	(TSIAFOULIS et al., 2011)	WebofScience	Sim	-
Análises Clínicas e Toxicológicas	(WATANABE; SUZUKI; OSHIMA, 2010)	PubMed	Não	600 MHz
Bioinformática e Tecnologia	(BHARTI; ROY, 2012)	WebofScience	Sim	400 MHz e 800 MHz
Bioinformática e Tecnologia	(CLARIDGE et al., 2008)	WebofScience	-	500 MHz
Bioinformática e Tecnologia	(GUNN; PARANJI; ZHANG, 2009)	PubMed	Não	300 MHz
Bioinformática e Tecnologia	(HALSE et al., 2009)	PubMed	-	-
Bioinformática e Tecnologia	(HOLZGRABE, 2010)	WebofScience	-	-
Bioinformática e Tecnologia	(LI et al., 2011)	PubMed	-	-
Bioinformática e Tecnologia	(MALET-MARTINO; HOLZGRABE, 2011)	PubMed	-	-
Bioinformática e Tecnologia	(TAKEDA et al., 2012)	PubMed	-	-

Bioinformática e Tecnologia	SCHLEIF et al., 2011)	PubMed	Não	700 MHz
Biologia Molecular	(CIOFFI et al., 2009)	PubMed	Não	600 MHz e 500 MHz
Fármacos/Tóxicos	(SANCHEZ et al., 2008)	PubMed	Não	400 MHz
Fármacos/Tóxicos	(SHARMA et al., 2009)	WebofScience e PubMed	Sim	400.13 MHz
Indústria Química e de Materiais	(BENCSIK et al., 2008)	WebofScience	Não	172 kHz
Indústria Química e de Materiais	(BEYER; SCHOLLMAYE R; HOLZGRABE, 2010)	PubMed	Sim	400 MHz
Indústria Química e de Materiais	(GELLER et al., 2008)	PubMed	Não	600 MHz
Indústria Química e de Materiais	(NAKAHARA et al., 2010)	WebofScience	Não	400 MHz
Indústria Química e de Materiais	(NIELSEN et al., 2008)	WebofScience	Não	400 MHz
Indústria Química e de Materiais	(NUR et al., 2009)	PubMed	Não	300 MHz e 500 MHz
Indústria Química e de Materiais	(RUNDLÖF et al., 2010)	PubMed	Sim	300.13 MHz
Indústria Química e de Materiais	(SADYKOV et al., 2012)	WebofScience	Não	600 MHz
Indústria Química e de Materiais	(WANG et al., 2010)	WebofScience	Não	500 MHz
Metabolômica	(ANDO et al., 2010)	PubMed	Sim	600 MHz
Metabolômica	(DURAND et al., 2010)	PubMed	Não	500 MHz
Metabolômica	(GAO et al., 2012)	PubMed	Não	600.13 MHz
Metabolômica	(LANZA et al., 2010)	WebofScience e PubMed	Não	500 MHz
Metabolômica	(LOURENÇO et al., 2013)	PubMed	Não	500 MHz

Metabolômica	(MUTLIB et al., 2011)	PubMed	Sim	600.13 MHz
Metabolômica	(ROBERT et al., 2011)	PubMed	Sim	400.13 MHz
Metabolômica	(SANDUSKY; APPIAH- AMPONSAH; RAFTERY, 2011)	PubMed	Não	500 MHz
Metabolômica	(WALKER et al., 2011)	WebofScience e PubMed	Sim	600 MHz
Metabolômica	(ZHANG et al., 2008)	PubMed	Não	500 MHz
Produtos naturais/ Fitoterápicos	(BEKIROGLU et al., 2008)	PubMed	Sim	300.13 MHz e 600.13 MHz
Produtos naturais/ Fitoterápicos	(CHAUTHE et al., 2012)	WebofScience e PubMed	Sim	400 MHz
Produtos naturais/ Fitoterápicos	(CHEN et al., 2013)	PubMed	Sim	600.13 MHz
Produtos naturais/ Fitoterápicos	(GILARD et al., 2010)	WebofScience	-	-
Produtos naturais/ Fitoterápicos	(GÖDECKE et al., 2012)	PubMed	Sim	600 MHz
Produtos naturais/ Fitoterápicos	(GÖDECKE et al., 2013)	PubMed	Sim	600 MHz
Produtos naturais/ Fitoterápicos	(GÖREN et al., 2009)	WebofScience	Sim	600 MHz
Produtos naturais/ Fitoterápicos	(GUADAGNO et al., 2013)	PubMed	Não	499.709 MHz
Produtos naturais/ Fitoterápicos	(HASADA et al., 2010)	PubMed	Sim	500 MHz
Produtos naturais/ Fitoterápicos	(HASADA et al., 2011)	PubMed	Sim	600 MHz
Produtos naturais/ Fitoterápicos	(JIAO et al., 2010)	WebofScience	Sim	500 MHz
Produtos naturais/ Fitoterápicos	(LI et al., 2009)	PubMed	Sim	400 MHz
Produtos naturais/ Fitoterápicos	(LIU et al.,	PubMed	Sim	500 MHz

Fitoterápicos	2011)			
Produtos naturais/ Fitoterápicos	(MITTAL et al., 2009)	WebofScience e PubMed	Não	600 MHz
Produtos naturais/ Fitoterápicos	(NERANTZAKI et al., 2011)	WebofScience	Sim	500 MHz
Produtos naturais/ Fitoterápicos	(PARK et al., 2012)	PubMed	Sim	600 MHz
Produtos naturais/ Fitoterápicos	(PAULI et al., 2012)	PubMed	-	-
Produtos naturais/ Fitoterápicos	(PIERI et al., 2011)	WebofScience	Sim	600 MHz
Produtos naturais/ Fitoterápicos	(PIERI; STUPPNER, 2011)	PubMed	Sim	600 MHz
Produtos naturais/ Fitoterápicos	(PODGORSKII; MIKHALEV; KALABIN, 2011)	WebofScience	Sim	600 MHz
Produtos naturais/ Fitoterápicos	(RAMANJOOLO O et al., 2009)	WebofScience	Não	250 MHz
Produtos naturais/ Fitoterápicos	(SILVA et al., 2013)	PubMed	Sim	600 MHz
Produtos naturais/ Fitoterápicos	(SOININEN et al., 2012)	WebofScience	Não	500 MHz
Produtos naturais/ Fitoterápicos	(STANEVA et al., 2011)	WebofScience e PubMed	Sim	600.13 MHz
Produtos naturais/ Fitoterápicos	(TADA et al., 2013)	PubMed	Não	600 MHz
Produtos naturais/ Fitoterápicos	(TANAKA et al., 2013)	PubMed	Sim	500 MHz
Produtos naturais/ Fitoterápicos	(TANAKA; NITTA; NAGATSU, 2013)	PubMed	Sim	500 MHz
Produtos naturais/ Fitoterápicos	(TARDIEU; MAN; THIS, 2010)	PubMed	Sim	300 MHz
Produtos naturais/ Fitoterápicos	(WANG et al., 2013)	PubMed	Sim	500 MHz
Produtos naturais/ Fitoterápicos	(YANG; WANG;	WebofScience e	Sim	500 MHz

Fitoterápicos	KONG, 2012)	PubMed		
Produtos naturais/ Fitoterápicos	(ZHOU; QU, 2011)	PubMed	Sim	500 MHz

Fonte: Próprio autor.

3.2 Preparação da amostra

3.2.1 Escolha do solvente

A análise de amostras por RMN requer preparo simples e rápido, limitando-se, na maioria das vezes, em solubilizar a amostra no solvente deuterado ideal com ou sem auxílio do vórtex e/ou ultrassom para melhorar a homogeneidade. Consequentemente o fator limitante para escolha do solvente deuterado é a solubilidade do analito alvo, sendo, em alguns estudos, preferível misturas de solventes deuterados a fim de melhorar a separação entre sinais de interferência e os sinais de interesse. Os solventes mais amplamente usados em análises por RMN-¹H são CCl₄, CDCl₃, DMSO-d₆, CD₃OD e D₂O.

A escolha do solvente adequado considerando sua polaridade e aromaticidade é um fator essencial na otimização da separação do sinal, pois, conduz a mudanças consideráveis no deslocamento químico, acoplamento padrão, dispersão do sinal, padrão da linha de base, bem como na complexidade global do espectro de RMN-¹H. A fim de conseguir a separação de ressonâncias sobrepostas e evitar o efeito de solvente geralmente causado pela interação soluto-solvente, anisotropia das moléculas do solvente e força de van der Waals, o tipo de solvente ou o valor do pH da solução podem ser alterados, assim como, o emprego de reagentes auxiliares como as ciclodextrinas ou adição de reagentes de deslocamento lantanídeos (BEYER; SCHOLLMAYER; HOLZGRABE, 2010).

Quando trabalha-se com analitos de baixa abundância em matrizes complexas como ocorre em extratos de plantas, o caráter universal da técnica e sua baixa seletividade pode ser interpretado como uma limitação no que tange a detecção. Nesses casos o analista pode optar por utilizar técnicas de extração antes da análise quantitativa, como a extração em fase sólida (SPE), que é um método estabelecido para a concentração dos componentes minoritários (GÖDECKE et al.,

2012). As amostras podem ainda ser filtradas ou centrifugadas, coletando, no último caso, o sobrenadante.

3.2.2 Seleção do padrão

A quantificação de constituintes individuais por meio de RMNq-¹H baseia-se na utilização de um padrão interno contendo pelo menos um sinal sem interferência no espectro, utilizando, quando possível, padrões com ressonância próxima daquelas do analito a fim de minimizar distorções do espectro causadas por spins fora de ressonância (YANG; WANG; KONG, 2012). Assim, deve-se escolher um padrão interno cujo espectro de RMN seja simples, grau de pureza disponível, solúvel em diferentes solventes, facilmente pesável, baixo peso molecular, não-volátil, não-reativo, estável e cujo sinais não se sobreponham com as ressonâncias da amostra estudada.

Alguns exemplos de padrões internos utilizados de acordo com o analito de interesse são o ácido maleico (6,12ppm) como referência interna para análise quantitativa de kavalactonas em extratos de kava-kava; antraceno (8,45 ppm) para análise quantitativa de análogos da efedrina em *Ephedra*; canabinóides em *Cannabis sativa*; floroglucinol (6,38ppm), 3,4,5-trimetoxibenzaldeído (9,85 ppm) e pirazina (8,60 ppm) para o doseamento de vários componentes ativos da *Ginkgo biloba*, *Nothapodytes foetida* e várias espécies de *Codonopsis*, respectivamente (GILARD et al., 2010).

A adequação de 25 compostos em quatro diferentes solventes deuterados (D₂O, DMSO-d₆, CD₃OD, CDCl₃) foram estudados a fim de verificar suas viabilidades enquanto padrões internos empregados em RMNq-¹H. Os resultados desse estudo apontaram, dentre outras conclusões, solubilidade total do ácido maleico em todos os solventes, exceto em CDCl₃; solubilidade da 3,4,5-tricloropiridina em DMSO-d₆, CD₃OD, e CDCl₃; o ácido fumárico mostrou-se solúvel em DMSO-d₆ e CD₃OD, mas não em CDCl₃ e requer calor e sonicação para dissolver em D₂O; o acetato de sódio é solúvel em CD₃OD e em D₂O, parcialmente solúvel em DMSO-d₆ e insolúvel em CDCl₃. Antraceno e fluorouracil, por vezes utilizados como padrão interno, não se mostraram devidamente adequados para este fim, pois não atendem a certos critérios exigidos para ser qualificado como um

bom padrão interno, tais como, não reatividade, estabilidade e toxicidade (RUNDLÖF et al., 2010).

O deslocamento químico de referência é uma consideração importante em um experimento envolvendo RMNq. Vários espectros de compostos, como por exemplo, TSP (sal sódico do ácido 3-(trimetilsilil) propiônico-d4) e DSS (2,2-dimetil-2-silapentano-5-sulfonato de sódio) são comumente utilizados como referência. As substâncias que dão origem ao deslocamento químico de referência, chamamos padrão interno de calibração (BARDING JR; SALDITOS; LARIVE, 2012).

Como alternativa a adição de padrões internos químicos tradicionais, um sinal de referência eletrônico (ERETIC) pode ser adicionado ao sinal de RMN durante o processo de aquisição e utilizado como um padrão convencional, contudo, este tipo de abordagem requer hardware e software especializado.

O ERETIC é um sinal gerado matematicamente que pode ser inserido num espectro pós aquisição e usado como referência quantitativa, permitindo que a magnitude do sinal inserido seja modificada de acordo com a intensidade das ressonâncias da amostra. Essa ferramenta já foi aplicada e teve seu desempenho comparado com a quantificação através da adição de um padrão interno (ácido maleico 10 mM), apontando uma performance similar (WALKER et al., 2011).

3.3 Validação

Antes da quantificação propriamente dita é necessário validar o método desenvolvido, bem como fazer uma análise dos componentes da amostra e identificar as regiões do espectro mais viáveis para realizar a quantificação.

Os parâmetros a serem observados para validação de métodos analíticos para fins quantitativos são linearidade, limite inferior de quantificação, precisão, exatidão, robustez, especificidade e seletividade, conforme estabelecido na Resolução da Diretoria Colegiada 899/2003 (ANVISA, 2003).

3.3.1 Linearidade

Linearidade é uma medida feita utilizando como instrumento a curva de calibração. Para obtenção da curva de calibração deve-se fazer a análise das amostras considerando pelo menos 5 pontos com concentrações distintas e em dias

também distintos. Esse parâmetro serve para garantir que os resultados obtidos são diretamente proporcionais a concentração da amostra.

3.3.2 Limite inferior de quantificação

É um parâmetro que avalia qual a concentração mínima que pode ser quantificada com exatidão e precisão pela metodologia desenvolvida. Esse parâmetro é especialmente importante quando a amostra contém analitos de interesse em concentrações muito baixas, sendo dispensável sua determinação para analitos em concentrações suficientemente altas para quantificação, como foi observado no trabalho desenvolvido na Índia para análises de drogas utilizadas no tratamento de emergência por intoxicação com drogas anticolinesterásicas (SHARMA et al., 2009).

3.3.3 Precisão

Refere-se à relação de proximidade entre as várias medidas de uma mesma amostra em uma dada concentração. Esse parâmetro é determinado fazendo-se uma análise intra e interdias de uma determinada concentração da amostra e observando sua variabilidade.

3.3.4 Exatidão

É a proximidade do valor determinado pela metodologia desenvolvida e o valor real. Para RMNq-¹H estima-se a exatidão do método medindo a concentração do analito de interesse frente a uma concentração conhecida do padrão interno dispensando-se a utilização de padrões de referência do analito alvo. Para fins de estimativa de exatidão, ainda pode-se comparar o método desenvolvido com métodos de análise já validados, devendo, nos casos em que se requer uma preparação da amostra mais elaborada, realizar estudos de recuperação.

3.3.5 Robustez

Avalia a susceptibilidade do método a pequenas variações indicando assim o nível de confiabilidade na utilização da metodologia desenvolvida. Esse parâmetro pode ser avaliado tomando como base a estabilidade da amostra, alterações no pH, alterações na temperatura, dentre outros. No caso de experimento por RMN-¹H pode-se ainda avaliar a interferência no posicionamento do tubo na turbina e o volume da amostra no tubo.

3.3.6 Especificidade e seletividade

São parâmetros destinados a avaliar a capacidade do método em identificar e, no caso desse trabalho, quantificar o analito alvo, ainda que na presença de substâncias interferentes como produtos de degradação, excipientes, impurezas, combinação de ativos, dentre outros. Pode-se fazer esse tipo de análise quantificando um dado componente ativo e analisando posteriormente, amostras em que foram adicionados, gradualmente, interferentes até se obter a composição final da mistura.

3.4 Quantificação

Baseado na premissa de que intensidade integrada do sinal no espectro de RMN-¹H é proporcional ao número de núcleos responsáveis por essa ressonância em particular, como também à concentração molar da substância geradora daquele sinal, foi formulada a seguinte equação para prever teores absolutos de constituintes totais ou individuais utilizando esta técnica (CHAUTHE et al., 2012; HOLZGRABE, 2010):

$$W_X = (A_X / A_S)(N_S / N_X)(M_X / M_S)(m_s / m_x)W_S \quad (2)$$

Onde,

W_x é a massa do analito;

W_s é a massa do padrão;

A_x é o valor da integral do analito;

A_s é o valor da integral do padrão;

N_x representa o número de hidrogênios integrados do analito;

N_s é o número de hidrogênios integrados do padrão;

M_x é a massa molecular do analito;

M_s é a massa molecular do padrão;

m_x é a massa pesada do analito;

m_s é a massa pesada do padrão

3.5 Aplicações da RMNq-¹H na área farmacêutica e afins

A Ressonância Magnética Nuclear quantitativa vem ganhando espaço nas mais diversas áreas da pesquisa e desenvolvimento científico, tendo aplicabilidade desde análise de materiais candidatos a produtos de uso externo, até estudos *in vivo* combinando as técnicas de RMI e RMNq.

A RMNq-¹H é uma técnica bem adequada para a identificação e quantificação de diferentes tipos de hidrocarbonetos e pode fornecer informações sobre o conteúdo relativo de hidrocarbonetos alifáticos, olefínicos, e componentes aromáticos. Baseado nessa premissa, foi desenvolvido um estudo na Universidade de Aarhus, Dinamarca, para análise do teor de enxofre e água em óleos combustíveis pesados, bem como de outros componentes, tais como, teor de cálcio, chumbo, fósforo, sódio e zinco, no entanto, nos últimos 5 casos a RMN-¹H foi incapaz de prever os teores desses elementos possivelmente devido às propriedades paramagnéticas desses átomos, afetando prótons vizinhos e, assim, indiretamente, afetando o espectro de RMN-¹H inteiro (NIELSEN et al., 2008).

A RMN com fins quantitativos foi utilizada na determinação não invasiva e controle, a partir da Ressonância Magnética Nuclear por Imagem (RMI) utilizando como instrumento o NMR MOUSE®, da quantidade de líquido que é capaz de penetrar através do tecido repelente confeccionado com o intuito de evitar contato de fluídos contaminantes com a pele (BENCSEK et al., 2008).

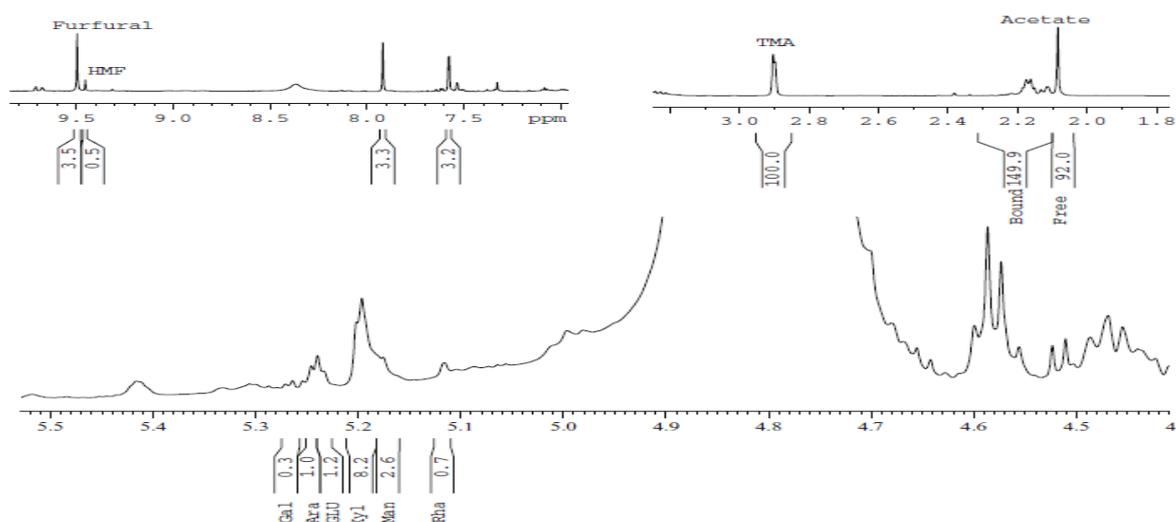
Ainda no âmbito da indústria química e de materiais, estudos envolvendo a biorefinaria mostram-se relevantes na otimização do aproveitamento de recursos na geração de sustentabilidade. Partindo dessa premissa um método analítico que unisse a química analítica verde, isto é, um método que produz o menor dano possível ao meio ambiente, e a versatilidade da espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de ¹H foi desenvolvido como método alternativo para análise

quantitativa da produção de ácido láctico a partir do açúcar por fermentação industrial utilizando lactobacilos específicos (RAMANJOOLOO et al., 2009).

A técnica de RMN tem sido amplamente aplicada na análise de produtos naturais e de biotecnologia devido a vantagens inerentes a técnica aqui já descritas, tais como, facilidade da preparação da amostra, possibilidade de identificação e quantificação de uma gama de substâncias simultaneamente em uma mesma análise. Essas prerrogativas da técnica otimizam o tempo do analista diante da demanda crescente de análises requeridas, além de poupar amostra e materiais relacionados a seu exame.

A quantificação de carboidratos presentes na madeira antes e após hidrólise ácida da qual resulta xilana polimérica, xilooligômeros e xilose (proveniente da hidrólise da xilose), bem como determinação da cinética de autohidrólise no material testado foi determinado por RMNq-¹H (MITTAL et al., 2009). Estudos quantitativos dos teores de xilooligômeros e xilose são importantes devido à conversão em produtos, os quais têm o potencial de utilização em alimentos, rações, produtos farmacêuticos, agrícolas, dentre outras aplicações. A Fig. 2 ilustra espectro de RMN-¹H de amostras de madeira hidrolisadas exibindo os picos dos grupos acetil livres (2.1 ppm) e grupos acetil ligados a cadeia de xilana (2.2 ppm), além dos picos de β- glicose, β- xilose e β- arabinose.

Fig 2. Espectro de RMN-¹H 600 MHz, 10°C de madeira após hidrólise ácida para redução de oligômeros a monômeros.



Fonte: MITTAL et al., 2009.

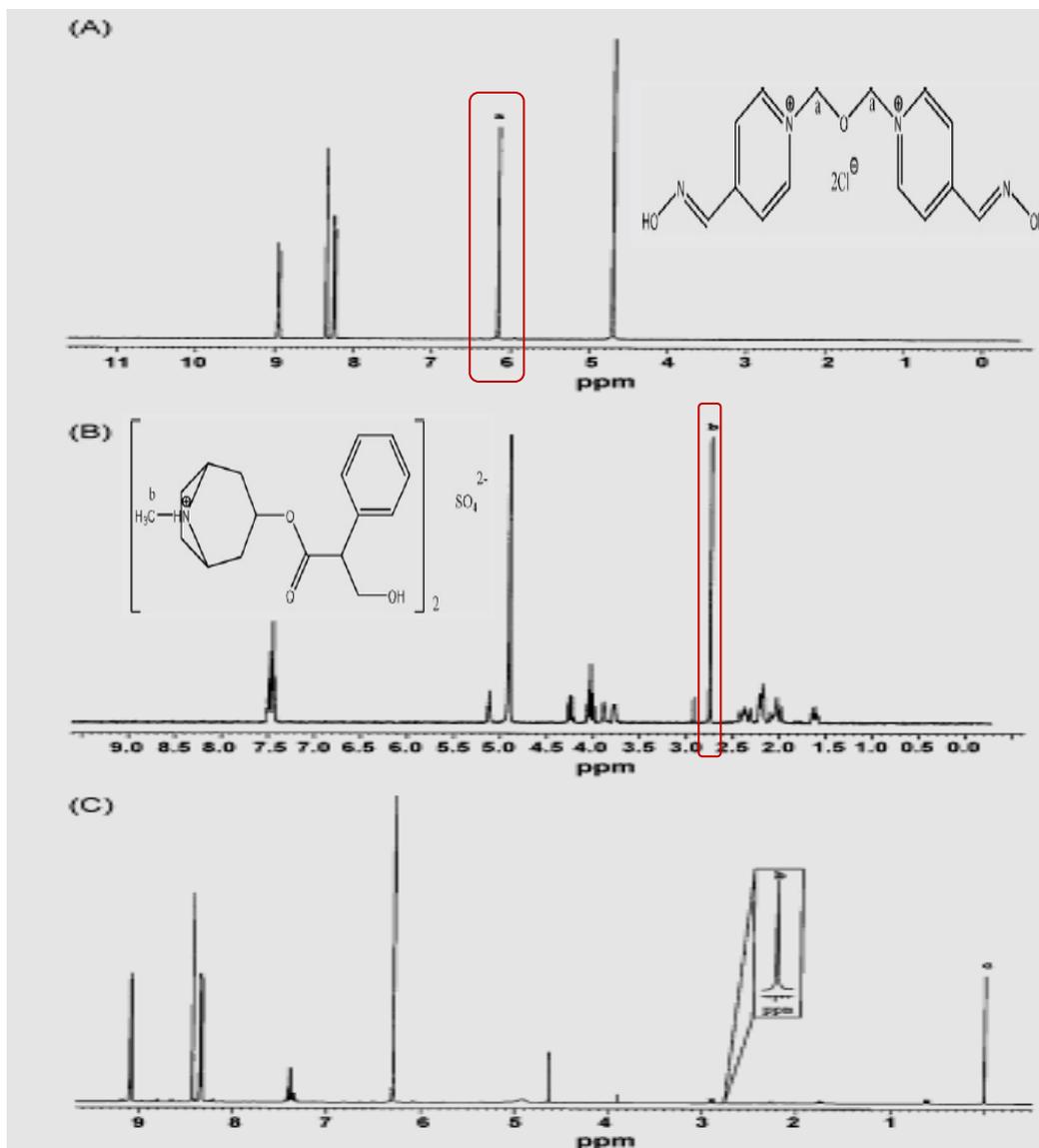
RMNq possui um elevado potencial em análises de suspeita de produtos adulterados (BEKIROGLU et al., 2008). Análise de medicamentos falsificados e de baixa qualidade, produtos estes cada vez mais presentes no mercado americano e europeu, é um outro viés em que a RMN tem ganhado campo. Estes produtos além dos ingredientes farmacêuticos ativos também terão impurezas adicionadas aos diluentes. Nestes casos, lançar mão da RMN-¹H como técnica ortogonal aumenta a probabilidade de visualização dos sinais do espectro quando comparadas por exemplo a um cromatograma obtido por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HOLZGRABE, 2010).

Com o enorme aumento da utilização de plantas medicinais em todo o mundo, a segurança e eficácia, bem como o controle qualidade tornaram-se preocupações importantes, principalmente no que tange problemas relacionados à adulteração fraudulenta com drogas sintéticas. Nesse contexto a RMN-¹H tem sido aplicada na identificação e quantificação de adulterantes e no estabelecimento do perfil quali e quantitativo dos metabólitos primários e secundários de extratos de plantas medicinais utilizando como instrumento auxiliar a Análise de Componentes Principais (PCA) (GILARD et al., 2010).

Na indústria alimentícia, a preocupação com possíveis adulterações também é frequente. Fundamentado nessa temática foi desenvolvido estudo para identificar e quantificar o teor de melamina em alimentos usando RMNq-¹H (LACHENMEIER et al., 2009). A melamina contém altos teores de nitrogênio, sendo, por essa razão, utilizada na fraude de alimentos com a intenção de superestimar o conteúdo proteico de uma dada preparação. No entanto, essa substância tem alto potencial nefrotóxico e sua determinação passa a atingir não só o âmbito do controle de qualidade de produtos acabados, mas também o setor toxicológico, regulatório e clínico, dada a importância da presença dessa substância enquanto fator determinante de um estado de morbidade.

Método baseado em RMNq-¹H para a análise simultânea de cloridrato de obidoxima, sulfato de atropina e de seus respectivos cartuchos para auto-administração intramuscular foi desenvolvido na Índia e mostrou-se mais simples, rápido e seletivo quando comparado a análises similares realizadas em CLAE-UV (SHARMA et al., 2009). Os sinais escolhidos para quantificação são demonstrados na Fig 3.

Fig 3. Espectro de RMN-¹H 400.13 MHz. Em (A) cloridrato de obidoxima, (B) sulfato de atropina e (c) cartuchos para auto-administração intramuscular.

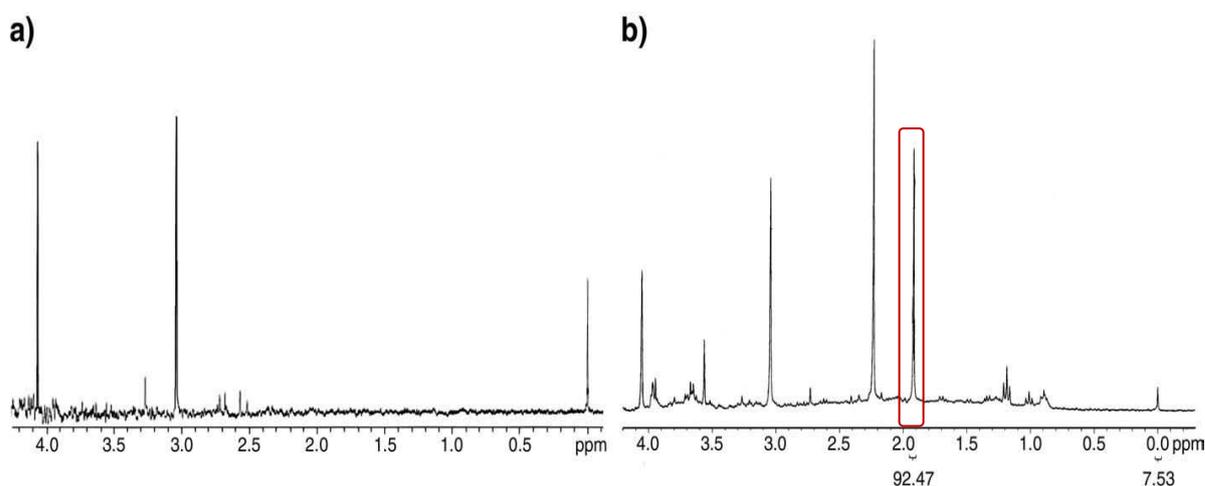


Fonte: SHARMA et al., 2009.

A técnica de RMN-¹H ainda pode ser acoplada a CLAE, tanto para fins qualitativos quanto quantitativos. Quando da quantificação, esta é realizada no modo em fluxo, através do uso de um padrão interno, dispensando o uso de um padrão de referência e de curva de calibração. Estudo para estabelecer a via de biodegradação do agrotóxico mesotriona e quantificar seus principais metabólitos utilizou a CLAE-RMN (DURAND et al., 2010).

A busca de marcadores para algumas doenças neurológicas, como a doença de Canavan, levou ao desenvolvimento de um método utilizando RMNq-¹H para análise de N-acetilaspártato em urina sem qualquer pré-tratamento, baseado no excesso de excreção desse metabólito em algumas condições neurológicas. A fig. 4 mostra os espectros de RMN-¹H em amostras de urina coletadas em voluntários saudáveis e com desordens neurológicas do tipo epiléticas, mostrando a presença do singlete referente a prótons metil acetil em 1,95 ppm nas amostras dos voluntários doentes, com concentrações de N-acetilaspártato variando de $1,5 \times 10^{-4}$ mol/L a $6,94 \times 10^{-3}$ mol/L (PINHEIRO et al., 2009).

Fig 4. Espectro de RMN-¹H 300 MHz. Em (a) urina de voluntários saudáveis, (b) urina de pacientes epiléticos. Em destaque, o sinal dos hidrogênios metílicos do metabólito N-acetilaspártato.



Fonte: PINHEIRO et al., 2009.

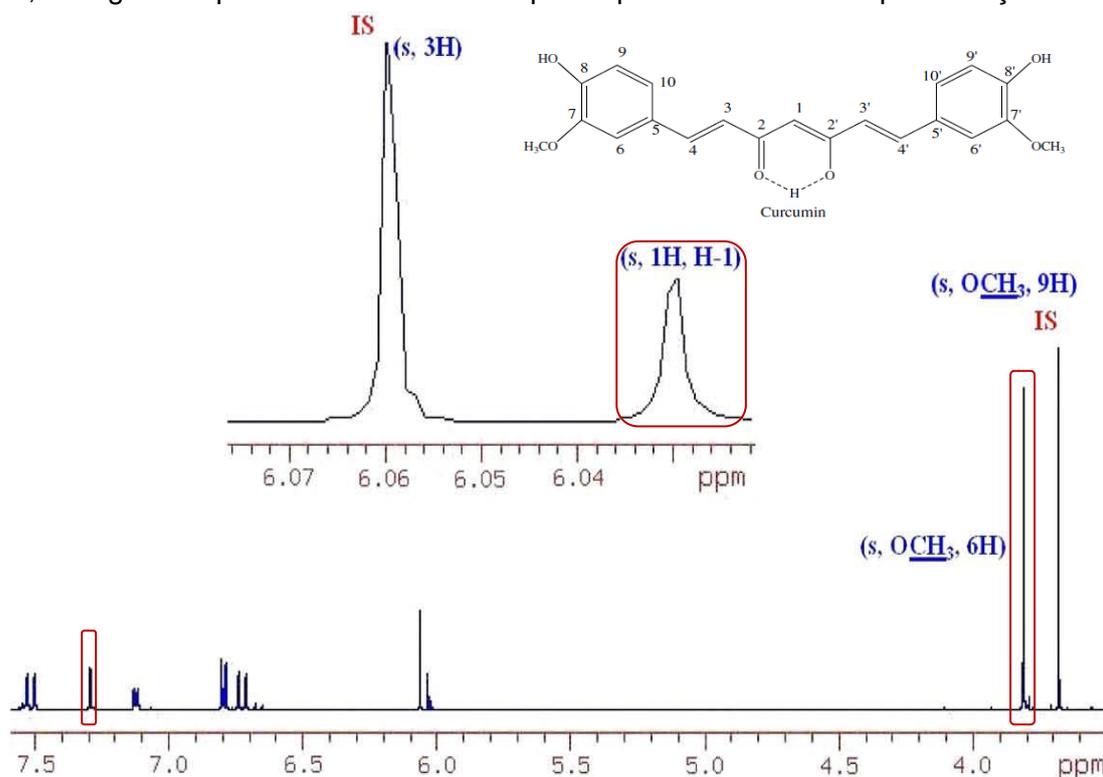
Estratégias com base na aplicação de RMN como uma ferramenta quantitativa para análise de metabólitos têm sido propostas em resposta às exigências de órgãos reguladores para definir melhor a exposição a determinados agentes tanto em humanos quanto em ensaios pré-clínicos (MUTLIB et al., 2011). O espectro de RMN de um fluido biológico pode ser visto como a soma dos seus metabólitos individuais, portanto, se adquirido sob condições quantitativas podem ser usadas tanto na identificação quanto na quantificação de metabólitos (SILVA et al., 2013).

Os termos metabonômica e metabolômica são usados nesse trabalho como sendo indistintos. Essa técnica tem sido largamente utilizada na caracterização

metabólica de produtos naturais e fluidos biológicos antes e após submissão a fatores de estresse, sendo hoje considerada como importante ferramenta na área médica e farmacêutica.

As espécies do gênero *Curcuma* tem sido estudadas devido as atividades farmacológicas, tais como antiinflamatória, antimicrobiana, antioxidante, anti-parasitária, anti-mutagênicas e anti-câncer, sendo a curcumina o principal constituinte das espécies *Curcuma*, o qual é uma substância fotosensível responsável pela atividade biológica do açafrão. Diante do crescente interesse nesse princípio ativo, foi desenvolvido um método baseado em RMN-¹H e os resultados foram comparados àqueles obtidos com o uso de LC/MS/MS, mostrando aquele ser um método mais preciso, exato, rápido e reproduzível na detecção de pequenas impurezas e / ou análogos da curcumina do que os métodos de CLAE convencionais (GÖREN et al., 2009).

Fig 5. Espectro de RMN-¹H de curcumina dissolvida em DMSO-d₆ utilizando 1,3,5-trimetoxi-benzeno como padrão interno. Espectrômetro Varian de 600 MHz, 64 scans, delay de 1,0 s e grau de pulso de 45°. Em destaque os picos candidatos a quantificação.



Fonte: GÖREN et al., 2009.

Foram observados três picos de referência candidatos em 7,29 (d, 2H, H₆ e H'6), 6,03 (s, 1H, H-1) e 3,81 (OCH₃, 6H), no espectro de RMN-¹H em DMSO-d₆ da curcumina. Para a preparação das amostras e obtenção dos espectros de curcumina optou-se por utilizar 1,3,5-trimetoxibenzeno como padrão interno (IS), uma vez que gera dois picos referentes a singletos bem resolvidos na mesma área da curcumina, isto é, 6,06 (3H, s) e 3,68 (9H, s) (GÖREN et al., 2009).

Arnica montana L. é uma planta medicinal cujas preparações são aplicadas externamente para o tratamento de hematomas, contusões, entorses, doenças reumáticas e inflamação superficial da pele. Um método fundamentado em RMN-¹H foi desenvolvido na Bulgária com a finalidade de determinar a quantidade total e individual das principais lactonas sesquiterpênicas responsáveis pelas propriedades farmacológicas desta planta— a helenalina, a dihidrohelenalina e os seus ésteres de cadeia curta, utilizando o 3,4-dimetoxibenzaldeído como padrão interno (STANEVA et al., 2011). As quantidades de lactonas individuais foram determinadas a partir das áreas integradas de alguns sinais característicos bem isolados, já a determinação do teor total de lactonas sesquiterpênicas foi baseada na área média dos sinais correspondentes aos H-2 e H-3 como mostrado nas Fig. 6 Fig. 7, os quais são comuns para as lactonas presentes na fração estudada.

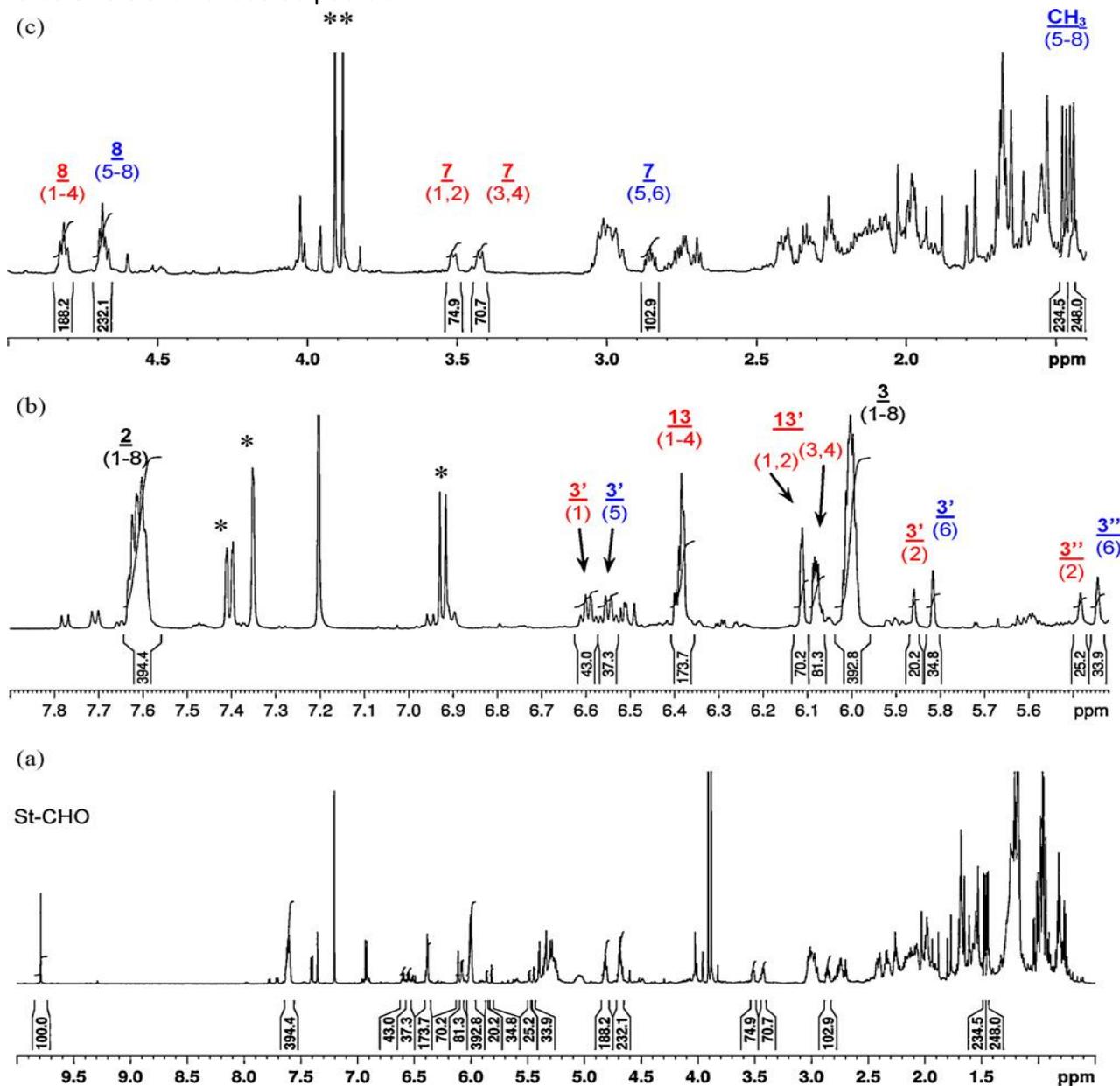
Fig 6. Estrutura das principais lactonas sesquiterpênicas responsáveis pela atividade da *Arnica montana*. Em destaque os hidrogênios H-2 e H-3 usados para quantificação.



Fonte: STANEVA et al., 2011.

Fig 7. Espectro de RMN-¹H (600,13 MHz) da fração de lactona bruta: (a) espectro completo o sinal do grupo CHO referente ao padrão 3,4 dimetoxibenzaldeído indicado por (St-CHO), (b) e (c) correspondem a partes expandidas do espectro, com atribuição de sinais selecionados para a análise quantitativa em negrito. Os sinais de componentes da helenalina (H) estão em vermelho, enquanto que os sinais provenientes dos componentes

da 11,13-dihidrohelenalina (DH) estão em azul. Os asteriscos indicam os dois grupos OCH₃ e os sinais aromáticos do padrão.



Fonte: STANEVA et al., 2011.

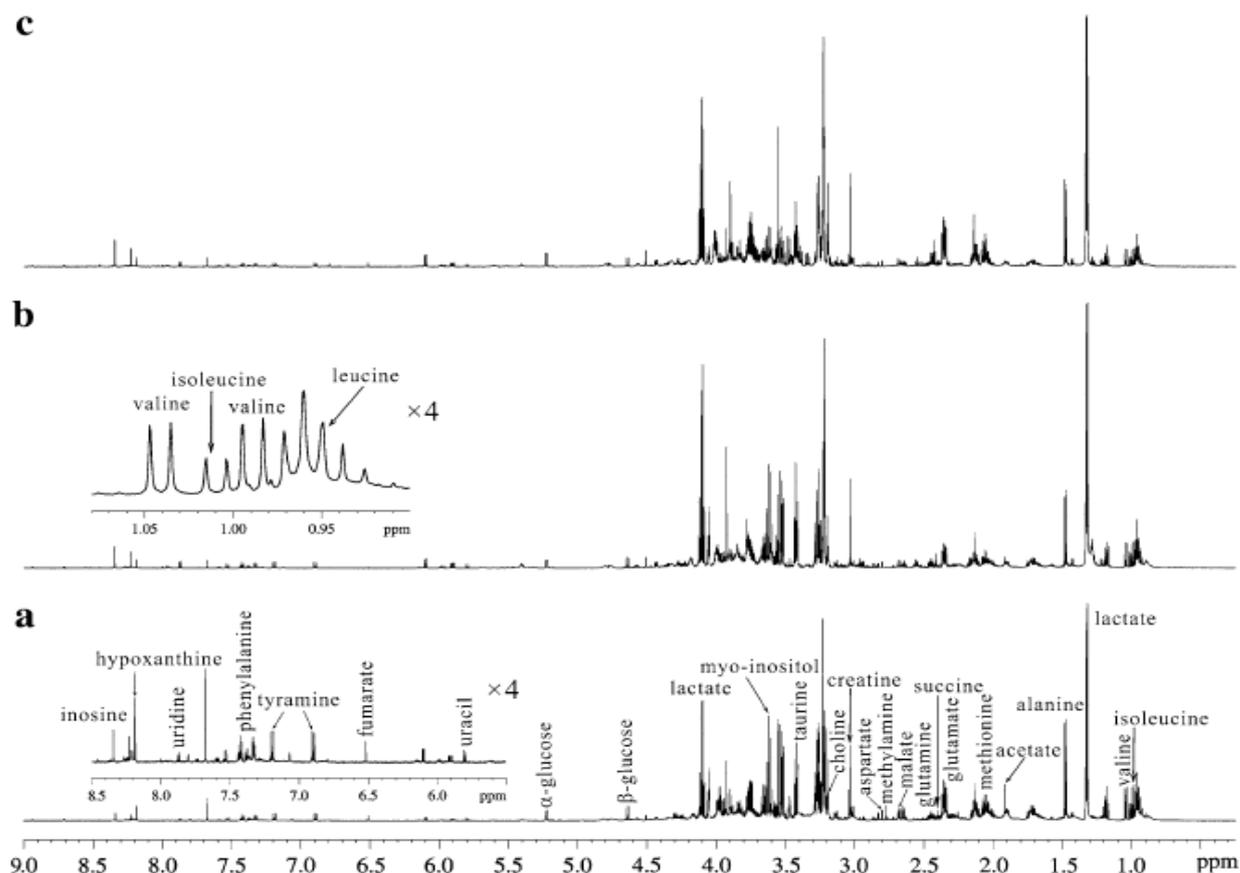
Estudo de metabolômica com o objetivo de prever a capacidade de recuperação da função renal após alívio de uropatias obstrutivas em adultos utilizando amostras de urina provou que a RMNq-¹H é muito útil para a investigação da patogênese, diagnóstico e acompanhamento terapêutico de doenças (DONG et al., 2013).

Estabelecer o perfil e rotas metabólicas em produtos naturais e em humanos é uma área promissora no que tange a metabolômica, visto que, a partir desta,

pode-se obter dados e correlacioná-los com a fisiopatologia e exposição a fatores externos. Nesse contexto, tem aumentado o interesse das aplicações de RMNq-¹H, dado a possibilidade de identificação e quantificação de vários metabólitos em único espectro, viabilizando a análise tanto em termos de economia de amostra e solventes, como também em relação ao dispêndio de tempo.

A metabonômica auxiliada pela RMNq-¹H também tem fornecido informações sobre marcadores bioquímicos e seu o potencial de diagnóstico de metástases. Essa técnica tem sido aplicada na caracterização e detecção de possíveis metástases de carcinoma de células renais (RCC). O estudo detectou aumento dos níveis de lactato, glutamato, piruvato, glutamina, e creatina, e diminuição do acetato, malato e aminoácidos em carcinoma de células renais quando comparados às células adjacentes (GAO et al., 2012). A fig. 8 ilustra a diferença do perfil metabólico entre tecido renal com carcinoma e tecido saudável adjacente.

Fig 8. Espectro de RMN-¹H 600,13 MHz. Em (a) tecidos adjacentes, (b) tecido com baixo grau de RCC e, (c) RCC em grau avançado, respectivamente.

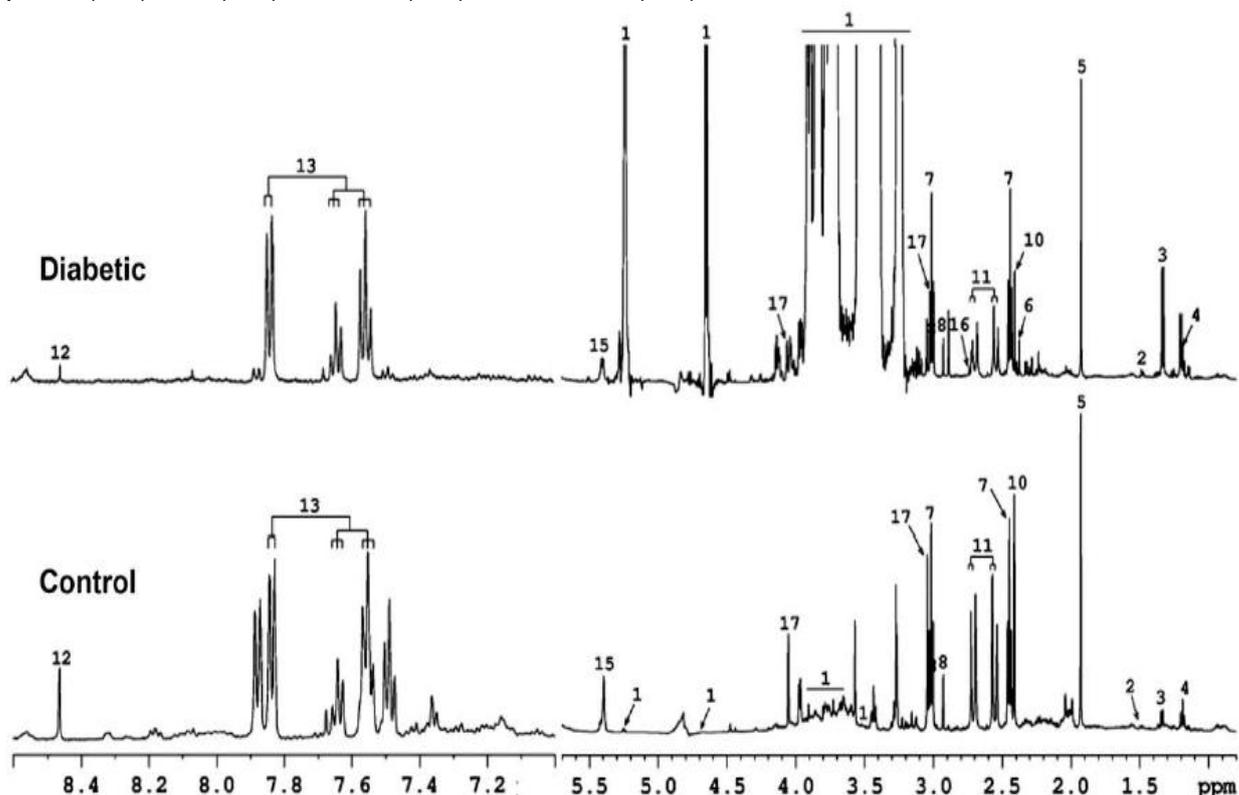


Fonte: GAO et al., 2012.

Ressonância magnética nuclear de estado sólido (ssNMR) tem ocupado espaço na caracterização de produtos, não requerendo solubilização da amostra e assim, excluindo problemas relacionados à escolha do solvente. Esse tipo de análise permite não só o estudo da estrutura química, mas também das propriedades físicas do fármaco. Estudo utilizando esse método foi realizado com misturas sintéticas de meprobamato e amido (SANCHEZ et al., 2008).

Pesquisa de metabólitos em ratos do tipo Sprague-Dawley após indução de diabetes tipo I pela administração de estreptozocina, agente que na terapêutica é utilizado como medicamento antineoplásico, foi conduzida com o intuito de estabelecer um perfil metabólico qualitativo e quantitativo dos animais diabéticos através da técnica de RMNq-¹H (ZHANG et al., 2008). Para o estudo fez-se análise de urina no grupo controle e no grupo teste submetido a estreptozocina. A figura 8 mostra os espectros de ambos os grupos estudados.

Fig 9. Espectro de RMN-¹H 500 MHz. O espectro mostra os sinais dos metabólitos encontrados em urina de ratos do grupo controle e do grupo teste. Os números assinalados correspondem a: 1, glicose, 2, alanina, 3, lactato, 4, etanol; 5, acetato, 6, piruvato, 7, 2-oxoglutarato, 8, dimetilglicina, 9, fumarato, 10, succinato, 11, citrato, 12, formiato, 13, hipurato, 14, ureia, 15, alantoína, 16, dimetilamina, 17, creatinina.



Fonte: ZHANG et al., 2008.

Estudos utilizando RMI e MRS combinados para fins de diagnóstico tem ganhado espaço na área médica, embora essas técnicas necessitem de softwares complexos para esse fim. Foi proposto um método de quantificação de metabólitos individuais em tecido de tumor cerebral e amostras de extrato celular por integração da área dos picos onde o aproveitamento das variações dos deslocamentos químicos de metabólitos com o pH são usados em substituição a deconvolução espectral (ROBERT et al., 2011).

A área farmacêutica abrange uma ampla variedade de subáreas as quais por sua vez permitem a aplicação de técnicas inicialmente voltadas para química analítica e orgânica, como é o caso da cromatografia e métodos espectroscópicos em geral.

Outras aplicações da RMNq-¹H na área farmacêutica são na análise de substância endógenas (PINHEIRO et al., 2009; TSIAFOULIS et al., 2011 RHIEU et al., 2013), análise de produtos naturais (LI et al., 2009; CAMPO et al., 2010; HASADA et al., 2010; JIAO et al., 2010; NERANTZAKI et al., 2011; PIERI et al., 2011; SOININEN et al., 2012; TANAKA et al., 2013; TARDIEU; MAN; THIS, 2010; CHEN et al., 2013) e industrializados (MAES et al., 2012), avaliação do estado fisiológico e bioquímico de plantas após estresse (GUADAGNO et al., 2013), padronização e análise quantitativa para fins de controle de qualidade de extratos de plantas medicinais (CHAUTHE et al., 2012), controle de qualidade (MONAKHOVA et al., 2012), determinação de alterações quantitativas de vias metabólicas em ensaios clínicos (LANZA et al., 2010; SCHICHO et al., 2012; SILVA et al., 2013) e pré-clínicos (ZHANG et al., 2008), etc.

Considerações finais

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Foram encontrados 1276 artigos distribuídos entre as bases WebofScience e PubMed. Nenhum artigo de interesse foi encontrado na base Lilacs com a combinação dos descritores de busca utilizados. Após refinamento da busca por adição dos critérios de exclusão obteve-se 83 artigos, onde 47 pertenciam a base WebofScience, 20 pertenciam a base PubMed e 08 artigos eram compartilhados por ambas as bases. A combinação dos descritores em português não retornaram nenhum arquivo.
- A técnica de RMNq-¹H possui vasta aplicação na área farmacêutica, química e médica. Sua utilização requer conhecimento técnico dos parâmetros de aquisição e processamento bem desenvolvidos para obtenção de resultados otimizados.
- O desenvolvimento de técnicas fundamentadas na RMNq-¹H é uma perspectiva relevante, dada o grande número de vantagens de utilização dessa técnica frente aos métodos utilizados na rotina de química analítica, como a CLAE.

Referências

5 REFERÊNCIAS

ANDO, I. et al. Quantification of molecules in ^1H -NMR metabolomics with formate as a concentration standard. **The Journal of Toxicological Sciences**, v. 35, n. 2, p. 253–256, 2010.

ANDO, I. et al. ^1H NMR Spectroscopy Quantification of Plasma Metabolites in Dialysate during Hemodialysis. **Magnetic Resonance in Medicine**, v. 12, n. 2, p. 129–135, 2013.

BARDING JR, G. A.; SALDITOS, R.; LARIVE, C. K. Quantitative NMR for bioanalysis and metabolomics. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 404, p. 1165–1179, 2012.

BEKIROGLU, S. et al. Validation of a quantitative NMR method for suspected counterfeit products exemplified on determination of benzethonium chloride in grapefruit seed extracts. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 47, p. 958–961, 2008.

BENCSIK, M. et al. Quantitative NMR monitoring of liquid ingress into repellent heterogeneous layered fabrics. **Journal of Magnetic Resonance**, v. 193, p. 32–36, 2008.

BEYER, T.; SCHOLLMAYER, C.; HOLZGRABE, U. The role of solvents in the signal separation for quantitative ^1H NMR spectroscopy. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 52, p. 51–58, 2010.

BHARTI, S. K.; ROY, R. Quantitative ^1H NMR spectroscopy. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 35, p. 5–26, 2012.

CAMPO, G. DEL et al. Quantitative determination of caffeine, formic acid, trigonelline and 5-(hydroxymethyl)furfural in soluble coffees by ^1H NMR spectrometry. **Talanta**, v. 81, p. 367–371, 2010.

CHAUTHE, S. K. et al. Quantitative NMR: An Applicable Method for Quantitative Analysis of Medicinal Plant Extracts and Herbal Products. **Phytochemical Analysis**, v. 23, p. 689–696, 2012.

CHEN, Y.-G. et al. Metabolic differentiations of *Pueraria lobata* and *Pueraria thomsonii* using ^1H NMR spectroscopy and multivariate statistical analysis. *Yan*. 2013.

CIOFFI, M. et al. Use of quantitative ^1H NMR chemical shift changes for ligand docking into barnase. **Journal of Biomolecular NMR**, v. 43, p. 11–19, 2009.

CLARIDGE, T. D. W. et al. “Pure by NMR”? v. 10, n. 23, p. 5433–5436, 2008.

DONG, B. et al. Application of ^1H NMR metabolomics in predicting renal function recoverability after the relief of obstructive uropathy in adult patients. **Clinical Biochemistry**, v. 46, n. 346–353, 2013.

DURAND, S. et al. Biodegradation pathway of mesotrione: Complementarities of NMR, LC–NMR and LC–MS for qualitative and quantitative metabolic profiling. **Chemosphere**, v. 81, p. 372–380, 2010.

GAO, H. et al. Application of *ex vivo* ^1H NMR metabonomics to the characterization and possible detection of renal cell carcinoma metastases. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 138, p. 753–761, 2012.

GELLER, A.-M. et al. Quantitative ^1H NMR-analysis of technical octabrominated diphenylether DE-79TM and UV spectra of its components and photolytic transformation products. **Chemosphere**, v. 73, p. S44–S52, 2008.

GILARD, V. et al. Quality Control of Herbal Medicines Assessed by NMR. **Current Pharmaceutical Analysis**, v. 6, p. 234–245, 2010.

GÖDECKE, T. et al. Integrated standardization concept for *Angelica botanicals* using quantitative NMR. **Fitoterapia**, v. 83, p. 18–32, 2012.

GÖDECKE, T. et al. Validation of a Generic Quantitative ^1H NMR Method for Natural Products Analysis. **Phytochemical Analysis**, 2013.

GÖREN, A. C. et al. Rapid quantitation of curcumin in turmeric via NMR and LC–tandem mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 113, p. 1239–1242, 2009.

GUADAGNO, C. R. et al. NMR (^1H) analysis of crude extracts detects light stress in *Beta vulgaris* and *Spinacia oleracea* leaves. **Photosynthesis Research**, v. 115, p. 115–122, 2013.

GUNN, J.; PARANJI, R. K.; ZHANG, M. A Simple and Highly Sensitive Method for Magnetic Nanoparticle Quantitation Using ^1H -NMR Spectroscopy. **Biophysical Journal**, v. 97, p. 2640–2647, 2009.

HALSE, M. E. et al. Quantitative analysis of Earth's field NMR spectra of strongly-coupled heteronuclear systems. **Journal of Magnetic Resonance**, v. 200, p. 88–94, 2009.

HASADA, K. et al. Quantitative determination of atractylon in *Atractylodis Rhizoma* and *Atractylodis Lanceae Rhizoma* by ^1H -NMR spectroscopy. **Journal of Natural Medicines**, v. 64, p. 161–166, 2010.

HASADA, K. et al. Application of ^1H -NMR spectroscopy to validation of berberine alkaloid reagents and to chemical evaluation of *Coptidis Rhizoma*. **Journal of Natural Medicines**, v. 65, p. 262–267, 2011.

HOLZGRABE, U. Quantitative NMR spectroscopy in pharmaceutical applications. **Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy**, v. 57, p. 229–240, 2010.

JAMES, T. L. **Nuclear Magnetic Resonance in Biochemistry**. New York: Academic Press, 1975.

JIAO, P. et al. Quantitative $^1\text{H-NMR}$ Spectrometry Method for Quality Control of Aloe vera Products. **Journal of AOAC International**, v. 93, n. 3, p. 842–848, 2010.

LACHENMEIER, D. W. et al. NMR-Spectroscopy for Nontargeted Screening and Simultaneous Quantification of Health-Relevant Compounds in Foods: The Example of Melamine. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 7194–7199, 2009.

LANZA, I. R. et al. Quantitative Metabolomics by $^1\text{H-NMR}$ and LC-MS/MS Confirms Altered Metabolic Pathways in Diabetes. **PLoS ONE**, v. 5, n. 5, 2010.

LI, C.-Y. et al. A rapid and simple determination of protoberberine alkaloids in *Rhizoma Coptidis* by $^1\text{H NMR}$ and its application for quality control of commercial prescriptions. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 49, p. 1272–1276, 2009.

LI, M. et al. Reduction of magnetic field fluctuations in powered magnets for NMR using inductive measurements and sampled-data feedback control. v. 212, p. 254–264, 2011.

LIU, F.-C. et al. Efficient $^1\text{H-NMR}$ Quantitation and Investigation of N-Acetyl-D-glucosamine (GlcNAc) and N,N'-Diacetylchitobiose (GlcNAc)₂ from Chitin. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 12, p. 5828–5843, 2011.

LOURENÇO, A. B. et al. Quantitative $^1\text{H-NMR}$ -Metabolomics Reveals Extensive Metabolic Reprogramming and the Effect of the Aquaglyceroporin FPS1 in Ethanol-Stressed Yeast Cells. **PLoS ONE**, v. 8, n. 2, p. 1–12, 2013.

MAES, P. et al. Qualitative and Quantitative Control of Carbonated Cola Beverages Using $^1\text{H NMR}$ Spectroscopy. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, p. 2778–2784, 2012.

MALET-MARTINO, M.; HOLZGRABE, U. NMR techniques in biomedical and pharmaceutical analysis. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 55, p. 1–15, 2011.

MITTAL, A. et al. Quantitative analysis of sugars in wood hydrolyzates with $^1\text{H NMR}$ during the autohydrolysis of hardwoods. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 6398–6406, 2009.

MONAKHOVA, Y. B. et al. NMR spectroscopy as a screening tool to validate nutrition labeling of milk, lactose-free milk, and milk substitutes based on soy and grains. **Dairy Science and Technology**, p. 109–120, 2012.

MUTLIB, A. et al. Application of Quantitative NMR in Pharmacological Evaluation of Biologically Generated Metabolites: Implications in Drug Discovery. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 39, n. 1, p. 106–116, 2011.

NAKAHARA, Y. et al. Quantitative $^1\text{H NMR}$ analysis of reacted silanol groups in silica nanoparticles chemically modified with monochlorosilanes. **Surface and Interface Analysis**, v. 43, p. 809–815, 2010.

NERANTZAKI, A. A. et al. Novel determination of the total phenolic content in crude plant extracts by the use of ^1H NMR of the –OH spectral region. **Analytica Chimica Acta**, v. 688, p. 54–60, 2011.

NIELSEN, K. E. et al. Quantitative Analysis of Constituents in Heavy Fuel Oil by ^1H Nuclear Magnetic Resonance (NMR) Spectroscopy and Multivariate Data Analysis. v. 22, n. 6, p. 4070–4076, 2008.

NUR, H. et al. Semi-quantitative analysis of the monomer composition in co-polymer microgels using solid state Raman and NMR spectroscopy. **Analyst**, v. 134, p. 1366–1372, 2009.

PARK, H. E. et al. Simple preparative gas chromatographic method for isolation of menthol and menthone from peppermint oil, with quantitative GC-MS and ^1H NMR assay. **Journal of Separation Science**, v. 35, p. 416–423, 2012.

PAULI, G. F. et al. Quantitative ^1H NMR: Development and Potential of an Analytical Method – an Update. **Journal of Natural Products**, v. 75, n. 4, p. 834–851, 2012.

PAVIA, D. L. et al. **Introdução à Espectroscopia**. 1. ed. São Paulo: Cengage Learning, 2010.

PIERI, V. et al. Identification and Quantification of Major Steviol Glycosides in *Stevia rebaudiana* Purified Extracts by ^1H NMR Spectroscopy. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, p. 4378–4384, 2011.

PIERI, V.; STUPPNER, H. Quantification of Cynaropicrin in Artichoke Leaf Extracts by ^1H NMR Spectroscopy. **Planta Med**, v. 77, p. 1756–1758, 2011.

PINHEIRO, G. M. S. et al. A fast ^1H NMR spectroscopy procedure for quantitative determination of N-acetylaspartate in urine samples. **Clinica Chimica Acta**, v. 404, p. 166–168, 2009.

PODGORSKII, V. V.; MIKHALEV, A. S.; KALABIN, G. A. Quantitative NMR Spectroscopy for Quality Control of Drugs and Pharmaceuticals. **Pharmaceutical Chemistry Journal**, v. 45, n. 3, 2011.

RAMANJOOLOO, A. et al. ^1H NMR Quantitative Assessment of Lactic Acid Produced by Biofermentation of Cane Sugar Juice. **Spectroscopy Letters**, v. 42, p. 296–304, 2009.

DIRETORIA COLEGIADA DA AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA
Resolução-RDC nº 899. **ANVISA**, Brasil, 2003.

RHIEU, S. et al. Quantitative measurements of glutathione in yeast cell lysate using ^1H NMR. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 405, p. 4963–4968, 2013.

ROBERT, O. et al. pH optimization for a reliable quantification of brain tumor cell and tissue extracts with ^1H NMR: focus on choline-containing compounds and taurine. v. 399, p. 987–999, 2011.

ROSE, H. M. et al. Quantitative NMR analysis of Erk activity and inhibition by U0126 in a panel of patient-derived colorectal cancer cell lines. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1834, p. 1369–1401, 2013.

RUNDLÖF, T. et al. Survey and qualification of internal standards for quantification by ^1H NMR spectroscopy. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 52, p. 645–651, 2010.

SADYKOV, B. R. et al. Determination of the Fractional Composition of Merchantable Oil Using Quantitative ^1H NMR Spectra. **Petroleum Chemistry**, v. 52, n. 1, 2012.

SANCHEZ, S. et al. Improved solid-state NMR quantifications of active principles in pharmaceutical formulations. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 47, p. 683–687, 2008.

SANDUSKY, P.; APPIAH-AMPONSAH, E.; RAFTERY, D. Use of optimized 1D TOCSY NMR for improved quantitation and metabolomic analysis of biofluids. **Journal of Biomolecular NMR**, v. 49, p. 281–290, 2011.

SCHICHO, R. et al. Quantitative Metabolomic Profiling of Serum, Plasma, and Urine by ^1H NMR Spectroscopy Discriminates between Patients with Inflammatory Bowel Disease and Healthy Individuals. **Journal of Proteome Research**, v. 11, p. 3344–3357, 2012.

SHARMA, R. et al. A quantitative NMR protocol for the simultaneous analysis of atropine and obidoxime in parenteral injection devices. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 49, p. 1092–1096, 2009.

SILVA, D. L. et al. High-Resolution Quantitative Metabolome Analysis of Urine by Automated Flow Injection NMR. **Analytical Chemistry**, v. 85, p. 5801–5809, 2013.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. **Princípios de Análise Instrumental**. 5. ed. Porto Alegre: Bookman, 2002.

SOININEN, T. H. et al. The combined use of constrained total-line-shape ^1H NMR and LC–MS/MS for quantitative analysis of bioactive components in yellow onion. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 25, p. 208–214, 2012.

STANEVA, J. et al. Quantitative analysis of sesquiterpene lactones in extract of *Arnica montana* L. by ^1H NMR spectroscopy. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 54, p. 94–99, 2011.

TADA, A. et al. Absolute Quantitation of Stevioside and Rebaudioside A in Commercial Standards by Quantitative NMR. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 61, n. 1, p. 33–38, 2013.

TAKEDA, K. et al. Elemental analysis by NMR. **Journal of Magnetic Resonance**, v. 224, p. 48–52, 2012.

TANAKA, R. et al. Application of quantitative $^1\text{H-NMR}$ method to determination of paeoniflorin in *Paeoniae radix*. **Journal of Natural Medicines**, v. 67, p. 657– 661, 2013.

TANAKA, R.; NITTA, A.; NAGATSU, A. Application of a quantitative $^1\text{H-NMR}$ method for the determination of amygdalin in *Persicae semen*, *Armeniaca* semen, and *Mume fructus*. **Journal of Natural Medicines**, 2013.

TARDIEU, A.; MAN, W. D.; THIS, H. Using one-dimensional (1D) and two-dimensional (2D) quantitative proton (^1H) nuclear magnetic resonance spectroscopy (q NMR) for the identification and quantification of taste compounds in raw onion (*Allium cepa L.*) bulbs and in aqueous solutions where onion tissues are soaked. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 398, p. 3139– 3153, 2010.

THEILLET, F.-X. et al. Site-Specific Mapping and Time-Resolved Monitoring of Lysine Methylation by High-Resolution NMR Spectroscopy. **Journal of the American Chemical Society**, v. 134, p. 7616–7619, 2012.

TSIAFOULIS, C. G. et al. A new method for the determination of free L-carnitine in serum samples based on high field single quantum coherence filtering $^1\text{H-NMR}$ spectroscopy. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 399, p. 2285–2294, 2011.

WALKER, G. S. et al. Validation of Isolated Metabolites from Drug Metabolism Studies as Analytical Standards by Quantitative NMR. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 39, n. 3, p. 433–440, 2011.

WANG, X. et al. $^1\text{H NMR}$ Determination of the Doping Level of Doped Polyaniline. **Macromolecular Chemistry and Physics**, v. 211, p. 1814–1819, 2010.

WANG, Z.-W. et al. Developmental Changes in the Composition of Five Anthraquinones from *Rheum palmatum* as Quantified by $^1\text{H-NMR}$. **Phytochemical Analysis**, v. 24, p. 329–335, 2013.

WATANABE, R.; SUZUKI, T.; OSHIMA, Y. Development of quantitative NMR method with internal standard for the standard solutions of paralytic shellfish toxins and characterisation of gonyautoxin-5 and gonyautoxin-6. **Toxicon**, v. 56, p. 589–595, 2010.

YANG, M.; WANG, J.; KONG, L. Quantitative analysis of four major diterpenoids in *Andrographis paniculata* by $^1\text{H NMR}$ and its application for quality control of commercial preparations. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 70, p. 87–93, 2012.

ZHANG, S. et al. Correlative and quantitative $^1\text{H NMR}$ -based metabolomics reveals specific metabolic pathway disturbances in diabetic rats. **Analytical Biochemistry**, v. 383, p. 76–84, 2008.

ZHOU, J.; QU, F. Analysis of the extracts of *Isatis tinctoria* by new analytical approaches of HPLC, MS, and NMR. **African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines**, v. 8, n. S, p. 33–45, 2011.

