UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Programa de Pós Graduação em Toxicologia e Análises Toxicológicas

Certificação de beta-*N*-metil-amino-alanina: um modelo para produção de materiais de referência de substâncias orgânicas obtidas *in-house*

Vinícius Marcondes Rezende

Dissertação para obtenção do grau de

MESTRE

Orientador:

Prof. Dr. Ernani Pinto

São Paulo

2011

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Programa de Pós Graduação em Toxicologia e Análises Toxicológicas

Certificação de beta-*N*-metil-amino-alanina: um modelo para produção de materiais de referência de substâncias orgânicas obtidas *in-house*

Vinícius Marcondes Rezende

Dissertação para obtenção do grau de

MESTRE

Orientador:

Prof. Dr. Ernani Pinto

São Paulo

2011

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e

Documentação do Conjunto das Químicas da USP

R467c

Rezende, Vinícius Marcondes

Certificação de beta-*N*-metil-amino-alanina: um modelo para produção de materiais de referência de substâncias orgânicas obtidas *in-house* / Vinícius Marcondes Rezende. -- São Paulo, 2010.

105p.

Dissertação (mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas.

Orientador: Pinto, Ernani

1. Análise toxicológica 2. Análise Instrumental : Química Espectrometria de massa : Química ambiental 4. Materiais de referência : Normalização : Química analítica I. T. II. Pinto, Ernani, orientador.

615.907 CDD

Vinícius Marcondes Rezende

Certificação de beta-*N*-metil-amino-alanina: um modelo para produção de materiais de referência de substâncias orgânicas obtidas *in-house*

Comissão Julgadora

da Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Prof. Dr. Ernani Pinto

orientador/presidente

_____

1º. Examinador

_____

2º. Examinador

São Paulo, _____ de _____de 2011

AGRADECIMENTOS

Muitos contribuíram direta ou indiretamente para a conclusão desse projeto, e mesmo que não tenham sido citados, certamente estarão presentes na lembrança, ou, ainda, em outro momento aparecerão. Porém, como é de praxe, deve-se registrar nestas linhas aqueles que em hipótese alguma poderiam faltar.

Aos meus pais, Sócrates e Eleonora, pela oportunidade de vir a esse mundo, e também por toda a dedicação aos filhos.

À minha esposa Fernanda, por todos os momentos e caminhos que comigo dividiu e que dividirá.

Aos amigos e colegas do LTPNA, principalmente àqueles que dividiram momentos na bancada, em especial ao Sideni, Felipe, Estela, Vania, Fabyana, Fabiane, Mariah.

Ao Prof. Diogo O. Silva pela seriedade com os conceitos, que muito norteia meus estudos.

Aos colegas da Central Analítica do IQ, pela paciência e disposição com as análises e ensinamentos, em especial à Luzia, Alessandra, e Márcio.

Aos colegas da secretaria do departamento e da pós-graduação, Sueli, Ana, Elaine e Jorge, pela preocupação e empenho diários.

Ao Prof. Ernani, pela amizade, persistência e apoio, sob qualquer circunstância, estímulo que sem dúvida foi fundamental para a conclusão deste trabalho.

REZENDE, V. M. **Certificação de beta-N-metil-amino-alanina: um modelo para produção de materiais de referência de substâncias orgânicas obtidas *in-house.*** Dissertação de Mestrado, 2010 [Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo].

RESUMO

Materiais de Referência (MR) de substâncias químicas têm ampla aplicação, sobretudo na área analítica, servindo de referência para validação de métodos, calibração de instrumentos e controle de qualidade, estabelecendo a comparabilidade de resultados analíticos em escala global e permitindo a transferência da exatidão entre métodos, laboratórios e padrões. Norteado por essas necessidades, o trabalho apresenta uma proposta para certificação de MR baseada nas orientações preconizadas por diretrizes e normas internacionais, principalmente as que seguem o ISO Guia 34, para estabelecer as propriedades certificadas através de técnicas analíticas de Espectrometria de Massas de Alta Resolução, Ressonância Magnética Nuclear, de ^{1}H e de ^{13}C, e de Análise Elementar CHN. A certificação contemplou as caracterizações qualitativa e quantitativa, ensaio de estabilidade e o cálculo da estimativa da incerteza da medição. Como resultado, foi produzido e certificado um lote piloto de MR de β-*N*-metilamino-alanina (BMAA), uma toxina obtida *in-house* através de síntese química e purificação, cujos valores de propriedades certificadas foram rastreáveis ao SI e acompanhadas da estimativa da incerteza da medição.

Palavras-chave: BMAA. Certificação de material de referência. Toxinas. Ressonância Magnética Nuclear (RMN). Análise Elementar CHN.

REZENDE, V. M. **Certification of beta-N-methyl-amino-alanine: a model for *in-house* preparation of reference materials of organic substances.** Dissertação de Mestrado, 2010 [Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo].

ABSTRACT

Reference Materials (RM) of chemicals have wide application, particularly in the analyses, providing a reference for validation of methods, instrument calibration and quality control, establishing the comparability of analytical results on a global scale and enabling the transfer of accuracy between methods, laboratories and standards. Guided by these requirements, the paper presents a proposal for certification of MR based on the guidelines recommended by international guidelines and standards, especially those which follow the ISO Guide 34, to establish the certified properties through analytical techniques of mass spectrometry High resolution Nuclear Magnetic Resonance, ^{1}H and ^{13}C, and CHN elemental analysis. The certification included qualitative and quantitative characterization, stability test and the calculation of the estimate of measurement uncertainty. As a result, was produced and certified a pilot batch of RM β-N-methylamino-alanine (BMAA), a toxin obtained in-house via chemical synthesis and purification, whose property values are certified and traceable to the SI accompanied by an estimative of the uncertainty of measurement.

Keywords: BMAA. Certification of Reference Materials. Toxins. Nuclear Magnetic Ressonance (NMR). Elemental Analysis CHN.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Cadeia de rastreabilidade metrológica, indicando a hierarquia entre os organismos envolvidos em cada nível. A incerteza da medição aumenta ao longo da cadeia (de cima para baixo). BIPM: Bureau Internacional de Pesos e Medidas. Figura extraída de INMETRO, 2010a..... 26

Figura 2: Família de Materiais de Referência idealizada por Emons (2006). MCQ: material para controle de qualidade; CAL: Material de referência utilizado como calibrador; CRM: Material de Referência Certificado. Relacionamento entre os tipos de materiais de referência. 29

Figura 3: Classificação hierárquica de métodos qualitativos de acordo com sua rastreabilidade. Extraído de Rios *et al.* (2003). 34

Figura 4: Espectrograma RMN ^{1}H obtido na análise da BMAA e ajustes do equipamento 71

Figura 5: Espectrograma RMN ^{13}C obtido na análise da BMAA e ajustes do equipamento..... 73

Figura 6: Espectrograma de massas em alta resolução obtido através de HRMS para a BMAA com equipamento MicroTof. 75

Figura 7: Estrutura química da BMAA, na forma de cloridrato, elucidada através das técnicas de RMN ^{1}H e RMN ^{13}C. 76

Figura 8: Espectrograma de massas em alta resolução obtido através de HRMS para a BMAA com equipamento MicroTof. 82

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Dados gerais da BMAA, principais características físico-químicas e fórmula estrutural (VEGA *et al.,* 1967; DUNCAN *et al.,* 1989; PUBCHEM, 2010)..... 15

Quadro 2: Classificação do método analítico por sua confiabilidade – MIL'MAN e KONOPEL'KO 2004 48

Quadro 3: Deslocamentos químicos (δ) obtidos através de RMN ^{1}H para BMAA..... 71

Quadro 4: Deslocamentos químicos (δ) obtidos através de RMN ^{13}C para BMAA..... 73

Quadro 5: Fórmula química da espécie ionizável com massas exatas obtidas através de HRMS para a BMAA..... 74

Quadro 6: Fórmula química da espécie ionizável com massas exatas obtidas através de HRMS para a BMAA..... 81

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Grandezas de base do Sistema Internacional de Medidas (SI) 27

Tabela 2: Solventes e reagentes utilizados nos experimentos..... 55

Tabela 3: Reagentes (r), soventes (s) e padrões (p) de alta pureza utilizados nos experimentos..... 56

Tabela 4: Principais materiais utilizados nos experimentos..... 56

Tabela 5: Equipamentos utilizados nos experimentos 57

Tabela 6: *Softwares* utilizados para os cálculos 58

Tabela 7: Resultados da série de determinações da BMAA através de AE-CHN e respectivas médias e desvios-padrão. Entre parêntese os erros relativos individuais (erro%) em relação aos valores teóricos para cada elemento. 79

Tabela 8: Incertezas padrão utilizadas para o cálculo da incerteza combinada da análise de teor através de AE-CHN 80

Tabela 9: Resultados da série de determinações da amostra de estabilidade através de AE-CHN e respectivas médias e desvio padrão. Entre parêntese os erros relativos individuais (erro%) em relação aos valores teóricos, ... 83

Tabela 10: Incertezas utilizadas para o cálculo da incerteza combinada da análise de estabilidade através de AE-CHN 84

LISTA DE ACRÔNIMOS E SÍMBOLOS

°C	Grau Celsius
µL/min	Microlitros por minuto
AE	Análise Elementar
AE-CHN	Análise Elementar dos elementos carbono, hidrogênio e nitrogênio
AE-CHN	Análise Elementar dos átomos C, H e N
ALS/PDC	Esclerose Lateral Amiotrópica/Complexo da Doença de Parkinson
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOAC	Official Association of Analytical Chemistry
APCI	Atmospheric Pressure Chemical Ionization (Ionização Química a Pressão Atmosférica)
BIPM	Bureau International des Poids et Mesures (Bureau Internacional de Pesos e Medidas)
BMAA	β-N-metilamino –alanina
BPF	Boas Práticas de Fabricação
BPL	Boas Práticas de Laboratório
C	Carbono
CAIQ-USP	Central Analítica do Instituto de Química – Universidade de São Paulo
CAS	Chemical Abstract Service
CAS RN	Chemical Abstract Service Registry Number
Cgcre	Coordenação Geral de Acreditação (Departamento do Inmetro)
CHN	Carbono, Hidrogênio e Nitrogênio: átomos investigados na análise elementar
CITAC	Cooperation on International Traceability in Analytical Chemistry (Cooperação internacional para a Rastreabilidade em Química Analítica)
cm	Centímetro
CNH%	Análise térmica Elementar para Carbono, Hidrogênio e Nitrogênio em %
CQ	Controle da Qualidade
D_2O	Óxido de deutério, ou água deuterada
EI	Electronic Ionization (Ionização Eletrônica)
EUA	Estados Unidos da América
EURACHEM	Rede europeia de organizações engajadas na rastreabilidade em química analítica
FCF	Faculdade de Ciências Farmacêuticas – refere-se à FCF-USP/SP (Universidade de São Paulo – Campus São Paulo)

g	Grama
GQ	Garantia da Qualidade
H	Hidrogênio
HPLC	High Performance Liquid Chromatography (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência) (ver também HPLC, grau)
HPLC, grau	Pureza do reagente próprio para cromatografia e espectroscopia
HRMS	High Resolution Mass Spectrometry (Espectrometria de massas de Alta Resolução)
ICH	International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use
Inmetro	Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
ISO	International Organization for Standardization (Organização Internacional para a Padronização)
ISO GUM	Guide to the expression of uncertainty in measurement (ISO/IEC, 2008)
K	Kelvin
kg	Quilograma
kV	kilovolt
L	Litro
L/min	Litros por minuto
LTPNA:	Laboratório de Toxinas e Produtos Naturais de Algas (Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo – SP)
m	metro
M	mol por Litro (Molar)
mg	miligrama
mL	mililitro
mM	milimol por Litro (milimolar)
MR	Material de Referência
MRC	Material de Referência Certificado
N	Nitrogênio
NBS (NIST)	National Bureau of Standards (antigo nome do NIST)
NIST	National Institute of Standards and Technology
O	Oxigênio
OECD	Organization for Economic Cooperation and Development
OMS	Organização Mundial da Saúde (WHO)
PA:	Reagente Para Análise (grau de Pureza do Reagente)
ppm	Partes por milhão
RMN:	Ressonância Magnética Nuclear
S	Enxofre
SI	Sistema Internacional de unidades.
TMS	Tetrasmetilsilano

UGQ	Unidade da Garantia da Qualidade
USA	United States of America
USP	Universidade de São Paulo
WHO	World Health Organization (Organização Mundial da Saúde - OMS)

SUMÁRIO

Agradecimentos 1

Resumo 2

Abstract 3

Lista de Figuras 4

Lista de Quadros 5

Lista de Tabelas 6

Lista de acrônimos e símbolos 7

Sumário 10

1 Introdução 12

2 Revisão da Literatura 14

2.1 BMAA 14

2.2 Cianobactérias 16

2.3 Aspectos toxicológicos 17

2.3.1 Cianotoxinas 17

2.3.2 Ocorrência da BMAA 18

2.3.3 Toxicidade da BMAA 19

2.4 Histórico da Qualidade 21

2.5 Materiais de Referência 23

2.5.1 Conteúdo de Certificados 24

2.5.2 Rastreabilidade 25

2.5.3 Aplicações 28

2.5.4 Contexto histórico dos Materiais de Referência 29

2.5.5 Situação do Brasil na acreditação de produtores de MR 30

2.5.6 Etapas do processo de produção de materiais de referência 31

2.5.7 Escolha das metodologias 36

2.5.7.1 Fundamentos da técnica de Análise Elementar CHN 37

2.5.7.2 Fundamentos da técnica de Espectrometria de Massas de Alta Resolução 38

2.5.7.3 Fundamentos da técnica de Ressonância Magnética Nuclear 40

2.5.8 Certificação do Material de Referência 43

2.5.9 Incerteza da medição 43

2.5.9.1 Incerteza da determinação qualitativa do material 44

2.5.9.2 Incerteza da determinação quantitativa do material 49

3 Objetivos 54

4 Materiais e Equipamentos 55

5 Métodos 59

5.1 Método 1 – Obtenção de BMAA 59
5.2 Método 2 – Determinação do Ponto de Fusão do material. 60
5.3 Método 3 – Identificação molecular da BMAA por HRMS 61
5.4 Método 4 – Caracterização da estrutura molecular da BMAA por RMN ^{1}H 62
5.5 Método 5 – Caracterização da estrutura molecular da BMAA por RMN ^{13}C 63
5.6 Método 6 – Avaliação quantitativa do material por AE CHN 63
5.6.1 Calibração do equipamento 64
5.6.2 Análise do material 64
5.7 Método 7 – Determinação quantitativa do material 65
5.8 Método 8 – Determinação da incerteza da medição 66
5.8.1 Método 8.1 – Avaliação da Incerteza na caracterização qualitativa 66
5.8.2 Método 8.2 – Avaliação da Incerteza na caracterização quantitativa 67

6 Resultados e Discussão 69
6.1 Avaliação Qualitativa 69
6.1.1 Interpretação dos espectrogramas de RMN ^{1}H 70
6.1.2 Interpretação dos espectrogramas de RMN ^{13}C 72
6.1.3 Interpretação dos resultados através de HRMS 74
6.1.4 Resultado sobre a identidade do material 76
6.2 Avaliação Quantitativa 77
6.3 Avaliação da Estabilidade da BMAA 81
6.4 Elaboração do Certificado de Análise 85

7 Conclusões 86
7.1 Oportunidades 88

8 Referências Bibliográficas 89

9 Apêndice A – Certificado de análise da BMAA 101

10 Apêndice B – Definições de termos relacionados à metrologia 103

1 INTRODUÇÃO

As cianobactérias representam uma fonte biológica praticamente inexplorada de uma grande diversidade de metabólitos secundários. Aproximadamente 150 gêneros destes organismos são capazes de produzir metabólitos biologicamente ativos, dentre os quais estão as cianotoxinas. Os mecanismos de toxicidade dessas substâncias são diversos podendo ser hepatotóxicos, neurotóxicos ou dermatotóxicos (CHORUS; BARTRAM, 1999).

A compreensão de todos os aspectos envolvidos no processo de produção de um Material de Referência Certificado (MRC) faz-se fundamental para o julgamento de sua qualidade e consequente validade e aplicabilidade. Visto essa necessidade, apresenta-se a seguir as informações básicas e pertinentes (i) à molécula alvo do trabalho, sua ocorrência e relacionamento com a saúde humana, (ii) ao universo da qualidade, no qual o assunto certificação está sediado, e, (iii) aos fundamentos normativos e suas implicações técnicas para a produção do MRC.

O presente trabalho teve como objetivo principal a certificação de um Material de Referência (MR) de β-N-Metilamino-alanina (BMAA), um aminoácido não proteico, através da caracterização do material cuja síntese foi padronizada, e realizada no Laboratório de Toxinas e Produtos Naturais de Algas (LTPNA). Para tanto foram realizadas as caracterizações qualitativa (comprovação da estrutura molecular) e quantitativa (avaliação da pureza) bem como a determinação da estimativa da incerteza da medição.

Para o desenvolvimento da etapa de caracterização, foi objetivo a padronização dos critérios para avaliação dos resultados através das técnicas analíticas instrumentais utilizadas: Ressonância Magnética Nuclear de ^{1}H e de ^{13}C, Espectrometria de Massas de Alta Resolução e Análise Elementar CHN.

Com o objetivo de adequação do processo de produção do MRC aos padrões aceitos nos âmbitos nacional e internacional do ponto de vista normativo, fez-se

necessário o estudo das normas e dos padrões adotados nos principais núcleos econômicos e produtivos mundiais (EUA, Europa, Ásia-Pacífico), bem como o acompanhamento do processo de adoção dessas normas e padrões no Brasil através do Inmetro.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 BMAA

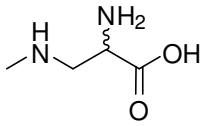
A alta incidência de Esclerose Lateral Amiotrópica/Complexo da Doença de Parkinson (ALS/PDC) entre a população Chamorro (Ilha de Guam, Micronésia) despertou interesse de investigação, tendo sido relacionada ocorrência da doença com a presença de um aminoácido não proteico (BMAA) nas sementes de uma palmeira, espermatófita da família *cicadacea, Cycas circinalis,* típica dessa região (VEGA; BELL; 1967, NUMM; O'BRIEN, 1989, LOBNER *et* al, 2007). A presença de BMAA tem sido também associada a outras espécies de cicadáceas como Cycas *micronesica*, *Macrozamia* spp., (SPENCER, et al., 1987) e *Cycas revoluta* (COX; BANACK; MURCH, 2003). Esse aminoácido, descoberto e sintetizado em 1967 (VEGA; BELL; 1967), vem sendo alvo de inúmeras pesquisas, em relação à toxicidade e à ocorrência em diversos organismos, com o relato de ter sido encontrada em cianobactérias do gênero *Nostoc* (COX *et al*, 2005; BANACK *et al*, 2007).

No Brasil, já foram adotadas medidas preventivas relacionadas ao controle de água para consumo humano através da Portaria N.º 518, de 25 de Março de 2004 (BRASIL, 2004), determinando parâmetros não somente físico-químicos, mas também microbiológicos, onde se destacam as cianobactérias e principalmente as toxinas por elas produzidas, notadamente microcistinas, cilindrospermopsinas e saxitoxinas.

Visto o possível impacto ambiental da descoberta de relação entre a BMAA e ALS/PDC, é apresentado no próximo item um breve resumo sobre as cianobactérias e a produção de BMAA por esses organismos.

No **Quadro 1**, encontram-se dados gerais da BMAA, as suas principais características físico-químicas e fórmula estrutural.

Quadro 1: Dados gerais da BMAA, principais características físico-químicas e fórmula estrutural (VEGA *et al.,* 1967; DUNCAN *et al.,* 1989; PUBCHEM, 2010)

Estrutura Química	
CAS RN (sob a forma de cloridrato)	16676-91-8
CAS RN (L-BMAA)	15920-93-1
CAS RN (mistura racêmica)	17463-44-4
Sinonímia	β-N-Methylamino-alanine (R)-2-amino-3-(methylamino)propanoic acid hydrochloride [alpha]-Amino-[beta]-methylaminopropionic acid hydrochloride
Fórmula Química	$C_4H_{10}N_2O_2$
Massa exata (monoisotópica)	118.07423
Peso molecular	118.13440
Ponto de Fusão	168 °C (para a forma cloridrato: 181 °C a 182 °C)
Solubilidade	Solúvel em água, praticamente insolúvel em metanol, etanol, clorofórmio
InChI	InChI=1/C4H10N2O2/c1-6-2-3(5)4(7)8/h3,6H,2,5H2,1H3,(H,7,8)/t3-/m0/s1
SMILES	O=C(O)[C@@H](N)CNC CNC[C@@H](C(=O)O)N

2.2 Cianobactérias

Compartilhando semelhanças com bactérias e com as algas, as cianobactérias apresentam-se muito difundidas em praticamente todos os ecossistemas. Assemelham-se às bactérias por não possuírem núcleo e estruturas definidas e por apresentarem reprodução assexuada. Assemelham-se também às algas por serem organismos fotossintetizantes, possuindo pigmentos fotossintetizante, muitas vezes clorofila-a. Atualmente a classificação “alga” é reservada a organismos eucariontes, e as cianobactérias, são classificadas como bactérias (OREN, 2004).

Cianobactérias são procariontes autotróficos, unicelulares, coloniais ou filamentosos, largamente distribuídos pelo mundo em diversos ambientes aquáticos, entre eles os destinados à distribuição de água à população ou animais e irrigação de plantações (ATIKOVIC, 2003; CARMICHAEL, 1994). Florações de cianobactérias, também chamadas de *blooms*, têm ocorrido intensamente nos últimos anos, sobretudo devido à elevação do aporte de nutrientes aos corpos aquáticos em decorrência da utilização de fertilizantes nitratos e fosfatos na agricultura, e que alcançam esses corpos. A ocorrência de *blooms* acarreta modificações na cor, odor e sabor da água. Porém, de maior importância é o fato de certos *blooms* liberarem toxinas que comprometem a qualidade da água onde foram encontradas uma grande variedade de toxinas em várias ocorrências de florações (CARMICHAEL, 1997).

2.3 Aspectos toxicológicos

As toxinas produzidas por cianobactérias causam severos, e muitas vezes irreversíveis, danos à saúde dos mamíferos. Os primeiros relatos de intoxicação decorrente da exposição e consumo de água contaminada por *blooms*, remontam do final do século XIX (CARMICHAEL 1994). A exposição a essas toxinas pode causar desequilíbrios nas populações de animais, modificando seu número e sua diversidade, devido à bioacumulação em peixes, moluscos e crustáceos, afetando assim indiretamente outros organismos da cadeia alimentar (COX; BANACK; MURCH, 2003).

2.3.1 Cianotoxinas

As cianotoxinas, ou ficotoxinas (como são também chamadas as toxinas produzidas pelas cianobactérias) podem causar diversos tipos de efeitos, e de acordo com estes, podem ser assim classificadas: dermatotoxinas ou toxinas irritantes são as que acometem a pele ou outros órgãos causando irritações; citotoxinas, são as que causam danos diretamente nas células; hepatotoxinas, as que afetam o fígado; neurotoxinas, que afetam o sistema nervoso, central ou periférico (WIEGAND; PFLUGMACHER, 2005; DÖRR *et al* 2010a).

Mais de 50 espécies de cianobactérias conhecidamente produzem toxinas, mas nem todas são tóxicas ao ser humano ou outros animais. Outra forma de caracterizar as cianotoxinas é através de sua estrutura química: peptídeos cíclicos, geralmente hepatotóxicos, alcalóides que apresentam efeito neurotóxico, lipopolissacarídeos e oligopeptídeos com efeitos diversos (DÖRR *et al* 2010b).

Episódios relevantes para a saúde de seres humanos e outros animais causados por microcistinas (classe de peptídeos cíclicos) já foram relatados nos Estados Unidos da América, na Austrália, na China, na Grã-Bretanha e no Brasil. Após a primeira vítima fatal no Brasil, em 1996, a Organização Mundial da Saúde (OMS), estabeleceu o limite de concentração permitido de 1 µg/L para microcistina LR, uma das mais tóxicas variantes de microcistinas e frequentemente presente em fontes de água para consumo (CARMICHAEL 1994; POURIA *et al.,* 1998; JOCHIMSEN *et al.,* 1998).

2.3.2 Ocorrência da BMAA

A existência de BMAA em cianobactérias é defendida por muitos pesquisadores, sobretudo naquelas do gênero Nostoc, um gênero de cianobactérias endofíticas encontradas em raízes de cicadáceas (RIPPKA *et al.,* 1969, COX *et al.,* 2005. BANACK *et al.,* 2007. METCALF *et al.,* 2008).

Antes de 2003, sabia-se que a BMAA ocorria somente em *Cycas micronesica* e *Cycas revoluta*, e em cianobactérias do gênero *Nostoc* (COX; BANACK; MURCH*,* 2003), mas em um levantamento feito com 21 gêneros de cianobactérias a toxina BMAA foi identificada em 95% das linhagens, sugerindo que a síntese de BMAA esteja distribuída entre as cianobactérias dos mais diversos ecossistemas do mundo (COX *et al.,* 2005).

Outros pesquisadores têm publicado dados contrários, com o relato de ausência de BMAA em cianobactérias (MARLER; SNYDER; SHAW, 2010; KRÜGER *et al*, 2010) Fundamentalmente, o equívoco estaria na detecção cruzada de outras substâncias como sendo BMAA, isto é, uma falha na especificidade dos métodos utilizados até o momento. Esse assunto ainda não está completamente esclarecido, e mesmo esses dados contrários, ainda carecem de maior estudo.

A toxina, objeto desta dissertação, formada por um único aminoácido não proteico, a β-N-metilamino-alanina (BMAA), foi relatada pela primeira vez como presente em gimnospermas da família cicadáceas, *Cycas circinalis* (VEGA; BELL, 1967), sendo considerado esse relato como a descoberta desse aminoácido. Desse vegetal, uma comunidade indígena, o povo Chamorro da ilha de Guam, uma das Ilhas Marianas do norte na Polinésia, se utiliza para produção de farinha que é incorporada na alimentação. A essa toxina é atribuída a ocorrência de uma doença neurológica progressiva que acomete o povo Chamorro, um complexo de esclerose amiotrófica lateral/demência parkinsoniana (SPENCER *et al.,* 1987).

2.3.3 Toxicidade da BMAA

Os mecanismos de neurotoxicidade da BMAA são três: (i) ação como agonista de receptores NMDA e (ii) ação como agonista de receptores mGluR5, e (iii) ação indutiva sobre o estresse oxidativo isoladamente ou em sinergia com outros agressores da célula como. N-metil-D-aspartato (NMDA), ferro, butionina sulfoximina (BSO), proteína amilóide-β, e 1-methyl-4-phenylpyridinium ion (MPP+) (LOBNER *et al.,* 2007). Sabe-se que BMAA despolariza a membrana neuronal, aumentando sua permeabilidade e condutância, e que em combinação com o bicarbonato, esse efeito é potencializado (NEDELJKOV *et al.,* 2005).

A neurotoxicidade da BMAA foi comprovada em cultura de neurônios de ratos, na presença de concentrações fisiológicas de bicarbonato, um cofator da neurotoxicidade da BMAA, tendo sido estabelecida a dependência entre o tempo de exposição e a neurotoxicidade, (NEDELJKOV *et al*., 2005). O mecanismo proposto para a sinergia entre a BMAA e o bicarbonato considera a formação de um aduto de carbonato ou bicarbonato com a porção funcional beta-metilamino, formando assim um complexo trino entre BMAA/bicarbonato/receptor NMDA (WEISS; KOH; CHOI, 1989). Outra hipótese é a de formação de um carbamato de BMAA pelo CO_2

proveniente do carbonato ou do bicarbonato naturalmente presente nos mais diversos tecidos em condições fisiológicas normais (MYERS; NELSON, 1990).

Em experimentos com bicarbonato em concentração de 1 mM, após até 1 hora de exposição, foram observados pequenos danos celulares, mas após 72 horas foram encontradas mudanças muito significativas nas células. Em concentrações elevadas, da ordem de dezenas de mM, observou-se a completa destruição da população neuronal (NUNN; O'BRIEN, 1989).

Não existem dados sobre dose letal, seja por exposição aguda ou crônica. Porém a avaliação da integridade tecidual e funcional, sobretudo do sistema nervoso central já foi estudada, como segue.

Concentrações entre 3 a 10 µg/g de L-BMAA foram detectadas na forma de aminoácido livre no tecido cerebral do giro frontal superior em seis pacientes de Chamorro que sofriam de desordens relacionadas à demência como ALS-PDC com idade na morte de 39 a 89 anos. Descendentes residentes na Califórnia há mais de 30 anos e sem o hábito de se alimentar das sementes de cicádeas não apresentaram quantidades significativas de BMAA (MURCH; COX; BANACK, 2004).

Uma dose única de cerca de 118 µg de BMAA injetada intracranialmente dentro do estriato de camundongos C57BL/6J com 12 a 14 semanas de idade induziu danos teciduais à região CA1 do hipocampo. A avaliação do local da injeção confirmou que a BMAA não fora administrada diretamente no hipocampo de qualquer um dos camundongos. Como efeitos funcionais, alguns animais apresentaram neurônios picnóticos intermitentes na camada piramidal, enquanto outros exibiram morte neuronal significativa e regressão completa dos processos apicais (BUENZ e HOWE, 2007).

Injeções intraperitoniais de L-BMAA em concentrações de 0.7 a 1.7 mg/g de massa corpórea em ratos wistar produziram instabilidade, ataxia, espasmo de torção lenta e redução significativa do peso corpóreo. A completa recuperação foi observada em dois a três dias após injeções de doses menores. Foram observados também sinais agudos de disfunção e degeneração cerebelar (SEAWRIGHT *et al.*, 1990).

Em ratos Sprague-Dawley machos, a injeção intra-cérebro-ventricular de 500 µg de L-BMAA induziu convulsões clônicas em 49% dos animais por cerca de 26 segundos e rigidez em 73 % por três minutos. Outros efeitos incluíram irritabilidade, tremores e respiração profunda (CHANG; CHIU; KAO, 1993).

2.4 Histórico da Qualidade

A noção formal de qualidade aplicada a produtos ou serviços teve início no século XX, com o advento da produção em massa na indústria, emergente à época, e mais intensamente na década de 1920. Uma das preocupações nesse momento era referente às medidas necessárias para a produção de produtos sempre com as mesmas características, com adequabilidade e funcionalidade equivalentes. Temporariamente contornou-se o problema com a inclusão de uma etapa de conferência do que era produzido, com a verificação das características básicas de funcionalidade dentro das condições previstas para o uso. Surgiu assim a figura do Inspetor de Qualidade, que centralizava todos os assuntos e ações referentes à qualidade. Esta foi a primeira fase da qualidade, onde predominou a inspeção (PINTO, KANEKO; OHARA, 2000).

Ainda no início da década de 1920, iniciou-se a segunda fase da qualidade, também chamada de fase estatística, marcada pela análise dos processos produtivos industriais por métodos estatísticos. Uma das primeiras observações de impacto, feita por Shewart no início da mesma década, foi de que a qualidade era gerada pelo processo produtivo e não pelos inspetores. Aplicando técnicas de Controle Estatístico de Precessos (CEP), com técnicas de amostragem de Dodge e Roming, surgia o Controle da Qualidade (PINTO, KANEKO; OHARA, 2000).

Na década de 1930 não ocorreram grandes mudanças, e o Controle da Qualidade foi sendo apenas aperfeiçoado. Durante a Segunda Guerra Mundial fez-se necessário um controle mais rigoroso na produção de armamentos, surgindo

então as primeiras ferramentas da qualidade, com o ciclo PDCA (*Plan Do Check Adopt*), de Deming, que trazia embutido em sua metodologia um conceito que se tornaria uma das principais diretrizes da qualidade moderna, o conceito de melhoria contínua.

Já na década de 1950 iniciou-se a terceira fase da qualidade, baseada no conceito de Sistema da Qualidade, agora norteada por normas, consensos e regulamentos, sempre em constante aprimoramento, conforme a evolução tecnológica e de gestão (DANIEL, 1993). Quando a qualidade já abrangia a organização como um todo, surgiu um conceito que deu nome a essa fase: Gerenciamento Total da Qualidade, em inglês *Total Quality Manegement* (TQM), a qual envolve todas as áreas e esferas da organização com os objetivos da Qualidade (PINTO, KANEKO; OHARA, 2000).

De acordo com a norma ISO 9000:2000, o sistema de gestão da qualidade representa a parte do sistema de gestão da organização que visa alcançar resultados, em relação aos objetivos da qualidade, para satisfazer necessidades, expectativas e requisitos das partes interessadas, conforme apropriado. E a mesma norma define qualidade como a totalidade das características de uma entidade que conferem a capacidade de satisfazer necessidades explícitas e implícitas. Dessa forma, quando se utiliza a palavra qualidade nas relações entre pessoas, empresas, ou qualquer organização, e com o foco no produto (bem material ou serviço) transferido entre elas, têm-se a preocupação com a adequabilidade e esta tem que ser positiva para que satisfaça produtivamente as partes.

2.5 Materiais de Referência

O estudo dos materiais de referência (MR) e assuntos correlatos exige o conhecimento de determinados termos, que têm, em muitos casos, implicações técnicas. Para o esclarecimento desses termos, e suas implicações, seguem nos próximos subitens as definições dos principais termos utilizados, bem como a apresentação das informações mais relevantes para a compreensão da estratégia de certificação adotada, tais como a apresentação de um MR e certificados, o conceito de rastreabilidade, usos e aplicações de MR e o contexto histórico do assunto no âmbito internacional e brasileiro.

No Apêndice B encontram-se algumas definições de termos utilizados ao longo do trabalho ou comumente encontrados durante as leituras dos textos relacionados ao assunto.

Os materiais de referência podem ser divididos basicamente em 5 tipos, segundo o guia "*Selection and use of reference material*" (EURACHEM. EEE/RM/062rev3: 2000) e ISO GUIA 34 (ABNT ISO GUIA 34, 2004):

1. **Materiais puros**: caracterizados pela pureza e/ou impurezas
2. **Soluções calibrantes e misturas gasosas**: geralmente preparadas gravimetricamente a partir de substâncias puras e usadas para calibração de equipamentos ou métodos
3. **Matrizes completas**: caracterizadas pela composição específica de um componente majoritário, minoritário ou traço. Preparadas através de matrizes reais, ou sintéticas simulando a composição da matriz real.
4. **Materiais de referência físico-químicos**: caracterizados por propriedades como ponto de fusão, viscosidade, densidade óptica, outros.
5. **Objetos de referência ou artefatos**: caracterizados através das propriedades funcionais, tais como odor, sabor, número de octanos, dureza,

forma, etc... Essa categoria ainda inclui espécimes microscópicas caracterizadas desde o tipo de fibra até espécie microbiológica.

Materiais puros são aqueles de elevada pureza, normalmente reconhecidos como uma única entidade química. Soluções calibrantes são aquelas preparadas em solvente através da dissolução ou diluição de um padrão. Matrizes completas ou complexas são materiais similares a uma amostra real e que contêm uma ou mais entidades químicas caracterizadas, podendo ser, inclusive, uma amostra real (ABNT. ISO GUIA 32: 2000).

2.5.1 Conteúdo de Certificados

Conforme o ISO GUIA 31 (ABNT. ISO GUIA 31: 2004), deve-se elaborar o certificado de forma que este contenha, quando aplicável, no mínimo as seguintes informações:

- Nome do material
- Identificação do produtor do material
- Uso pretendido
- Instruções para uso apropriado
- Instruções para armazenamento apropriado
- Valores de propriedades certificados, cada um deles acompanhado de suas respectivas unidades e incertezas
- Métodos empregados para obtenção dos valores de propriedade
- Prazo de validade se apropriado
- Rastreabilidade e o prazo de validade do certificado
- Outras informações pertinentes ao uso, transporte e armazenamento, bem como origem do material, rastreabilidade, incertezas, ou homogeneidade, conforme o propósito ou necessidade.

2.5.2 Rastreabilidade

De acordo com os textos de Bièvre e Taylor (1997), e Taylor (1993), o conceito de rastreabilidade, referente a um padrão, diz respeito à cadeia de calibrações ou comparações relativas ao estabelecimento do valor de sua propriedade, incluindo padrões intermediários ou artefatos e todas as medidas envolvidas. Esse conceito sintetiza as definições contidas nos guias ISO GUIDE 35 (2006) e EURACHEM/CITAC (EURACHEM. EEE/RM/062rev3: 2000).

Conforme o VIM 2008, **rastreabilidade metrológica** é a propriedade de um resultado de medição pela qual tal resultado pode ser relacionado a uma referência através de uma cadeia ininterrupta e documentada de calibrações, cada uma contribuindo para a incerteza de medição.

Nas definições apresentadas, o material de referência certificado é descrito como aquele ao qual se associa o conceito de rastreabilidade e de incerteza de medição. Em outras palavras, um material, é tido como um “material de referência certificado” se a este estiver associada uma incerteza pertinente aos valores das propriedades certificadas e se este valor tiver a rastreabilidade estabelecida, garantindo preferencialmente a comparabilidade a uma unidade do Sistema Internacional de Medidas (SI), de base ou derivada.

O Birô Internacional de Pesos e Medidas (BIPM) é uma convenção internacional estabelecida em 1875, responsável pela manutenção de um único e coerente sistema de medição rastreável ao SI, responsável pela disseminação das unidades e pela coordenação das comparações internacionais dos padrões de medida nacionais dos países participantes.

Na **Figura 1**, pode-se visualizar o estabelecimento da cadeia de rastreabilidade, partindo da unidade do SI (onde se encontram as próprias unidades definidas pelo BIPM), disseminando as unidades finalizando-se na utilização final do padrão (representada pelo laboratório de chão de fábrica). A comparabilidade refere-

se ao relacionamento horizontal das propriedades, isto é, relacionamento com padrões de mesma grandeza através dos mesmos métodos. A rastreabilidade e a disseminação são relacionamentos verticais ou hierárquicos (BIMP, 2010b; INMETRO, 2010a).

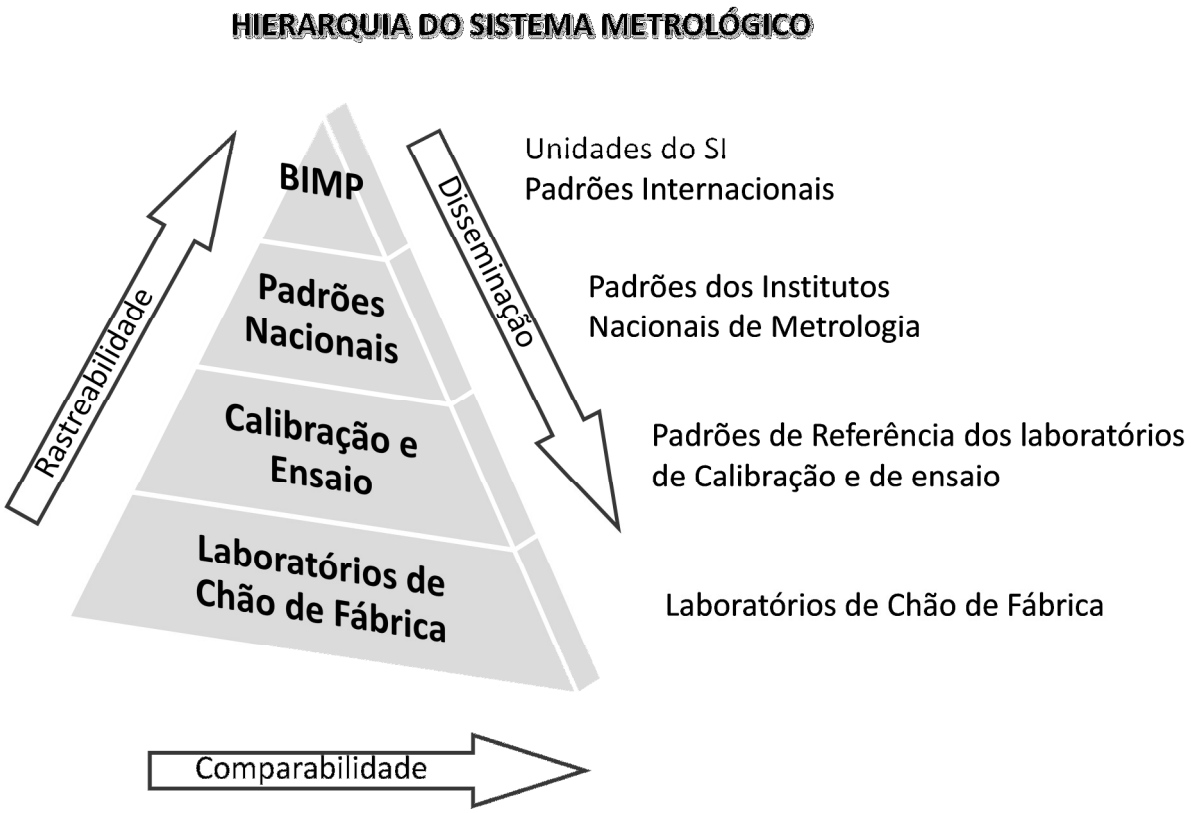


Figura 1: Cadeia de rastreabilidade metrológica, indicando a hierarquia entre os organismos envolvidos em cada nível. A incerteza da medição aumenta ao longo da cadeia (de cima para baixo). BIPM: Bureau Internacional de Pesos e Medidas. Figura extraída de INMETRO, 2010a.

A unidade de grandeza que representa quantidade de matéria no SI é o mol. Além do mol, compõem as sete medidas de base do SI as grandezas ou medidas relacionadas na **Tabela 1** (BIÈVRE; TAYLOR, 1997, INMETRO, 2007 e BIMP 2010b).

Tabela 1: Grandezas de base do Sistema Internacional de Medidas (SI)

Grandeza	Símbolo da Grandeza	Unidade	Símbolo da Unidade
Tempo	t	**segundo**	**s**
Comprimento	l	**metro**	**m**
Massa	m	**quilograma**	**kg**
Intensidade de corrente elétrica	I	**ampére**	**A**
Temperatura	T	**kelvin**	**K**
Quantidade de matéria	n	**mol**	**mol**
Intensidade luminosa	I_v	**candela**	**cd**

A comparabilidade ao SI é garantida quando se usa outras unidades derivadas diretamente das unidades de base do SI. Assim, a expressão da quantidade de matéria em termos de uma fração de massa (relação percentual referente à massa total do material) ou massas/volume (concentração) é aceita, e, comumente usada ao invés da relação massa/mol (a rigor, é uma relação de unidades de base do SI conforme o guia EURACHEM. EEE/RM/062rev3: 2000). Esse valor é uma aproximação, pois há uma relação não propriamente exata entre massas e número de mol, porém, é uma aproximação razoável, dada a relativa estabilidade entre as proporções isotópicas dos átomos. Dessa forma, pode-se indicar a pureza de um material de referência em termos percentuais, o que indica uma fração de massas ou relação massas/massa (ABNT. ISO GUIA 34:2004).

2.5.3 Aplicações

Materiais de referência (MR) desempenham papel fundamental em todas as áreas nas quais resultados analíticos são necessários. Seus principais usos incluem validação de métodos, calibração de instrumentos, controle e garantia de qualidade (CQ/GQ). MR são importantes também para o estabelecimento da comparabilidade de resultados analíticos em escala global, uma vez que permitem a transferência da exatidão entre métodos e laboratórios (EURACHEM. EEE/RM/062rev3: 2000). Segundo o ISO GUIA 30 (ABNT. ISO GUIA 30: 2000), os materiais de referência permitem transferir valores de grandezas medidas ou atribuídas de um lugar para outro, sendo amplamente utilizadas para calibração de equipamentos e instrumentos de medição, avaliação de métodos de análise e para garantia da qualidade de medições.

Em virtude da aplicabilidade de cada tipo de material em relação aos propósitos, recursos disponíveis, e requisitos do uso, surgem outras categorias intermediárias de materiais. Muitos materiais de referência não são acompanhados de um certificado, e estes, quando presentes, não apresentam expressamente os itens indicados no ISO GUIA 31 (ABNT. ISO GUIA 31: 2004). Mesmo assim, esses materiais são utilizados normalmente nas rotinas laboratoriais, fazendo-se necessária a definição do relacionamento entre os diversos tipos de materiais e sua hierarquia. Essa abordagem leva à definição de uma “família” de materiais de referência. O material usado pelo laboratório que contemple as características de homogeneidade e estabilidade suficientes para determinada aplicação como referência, pode ser chamado de Material para Controle da Qualidade, denominação essa aplicável àqueles materiais obtidos *in-house* (dentro do próprio laboratório, pela própria equipe) ou adquirido juntamente com um certificado, porém de um organismo não acreditado (EMONS *et al.,* 2006; EMONS 2006). A **Figura 2** exemplifica essa hierarquia que, por si só, permite a inclusão de outras classes, conforme as necessidades específicas de cada usuário.

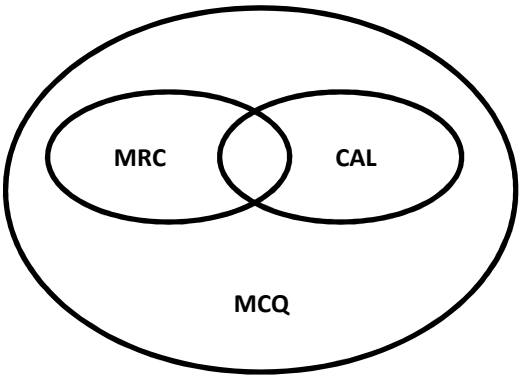


Figura 2: Família de Materiais de Referência idealizada por Emons (2006). MCQ: material para controle de qualidade; CAL: Material de referência utilizado como calibrador; CRM: Material de Referência Certificado. Relacionamento entre os tipos de materiais de referência.

2.5.4 Contexto histórico dos Materiais de Referência

A Official Association of Analytical Chemistry (AOAC) é considerada a responsável pela produção dos primeiros MR. Em 1885, essa associação distribuiu amostras de fertilizantes com o objetivo de promover um consenso entre os resultados de diversos laboratórios. Em seguida, em 1906, o National Institute of Standards and Technology (NIST - USA, antigo NBS) produziu seu primeiro MR: de argila calcárea - SRM 1c (FLANAGAN 1986).

Na década de 1970, o Laboratoire National d'Essais (LNE) propôs uma base de dados denominada Code d'Indexation des Materiaux de Réference (COMAR). Posteriormente à apresentação de tal base ao Comitê da ISO responsável pela normalização e harmonização dos conceitos sobre materiais de referência (REMCO), houve a ampliação do sistema de informação. Na década de 1980, outras

duas importantes organizações aderiram ao projeto, onde o National Physical Laboratory (NPL) representou a Inglaterra e o BAM (Federal Institute for Materials Research and Testing) representou a Alemanha. Nesta ocasião, 3.000 materiais de referência certificados encontravam-se registrados na base de dados COMAR.

Ao longo do século XX e, sobretudo no século XXI, ocorreu um crescimento praticamente exponencial da quantidade e diversidade de MR disponíveis, produzidos por instituições de diversas naturezas, tais como farmacopéias, institutos de pesquisa e tecnologia governamentais e privados, organismos governamentais normalizadores, entre outros. Esse crescimento, como esperado, acompanha o desenvolvimento tecnológico e científico (COMAR, 2010; BAM, 2010).

Até 2003, a inserção de dados sobre o material de referência produzido era cobrada, assim como a sua consulta, porém a partir desse ano tal inserção se tornou gratuita, garantindo a ampliação dos materiais disponíveis para acesso aos mais diferentes laboratórios.

Como referência mundial em qualidade e diversidade na produção de MR, destaca-se o National Institute of Standards and Technology (NIST), anteriormente chamado de The National Bureau of Standards (NBS), que é uma agência governamental não-regulatória da administração de tecnologia do Departamento de Comércio dos Estados Unidos. A missão do instituto é promover a inovação e a competitividade industrial dos Estados Unidos, promovendo a metrologia, os padrões e a tecnologia disseminando as propriedades de seus padrões.

2.5.5 Situação do Brasil na acreditação de produtores de MR

Encontra-se em fase de desenvolvimento e aplicação o Projeto Piloto para Acreditação de Produtores de Materiais de Referência, iniciativa do Inmetro para implantação dessa modalidade de acreditação no Brasil (INMETRO, 2010c), o qual

se baseia nos requisitos do ISO GUIA 34 (ABNT. ISO GUIA 34:2004) em combinação com a norma ISO/IEC 17025 (ABNT. NBR ISO/IEC 17025: 2005).

Em 2004, foi aprovada uma resolução na Assembleia Geral da ILAC (International Laboratory Accreditation Cooperatition), identificando a abordagem a ser utilizada pelos organismos de acreditação para avaliação e acreditação de produtores de materiais de referência. Foi definido que a avaliação da competência técnica de produtores de materiais de referência deve ser conduzida através de critérios harmonizados baseados na combinação do ISO Guia 34 (ABNT ISO GUIA 34) e da norma ISO/IEC 17025 (ABNT. NBR ISO/IEC 17025: 2005)..

Com o objetivo de prover confiança aos materiais de referência comercializados, a Cgcre/Inmetro disponibiliza o projeto piloto para acreditação de produtores de materiais de referência, nos moldes recomendados pela ILAC, com a utilização de critérios de acreditação baseados na NIT-DICLA-046 (INMETRO, 2010d)

2.5.6 Etapas do processo de produção de materiais de referência

Segundo os guias ISO GUIA 34 (ABNT. ISO GUIA 34:2004), ISO GUIDE 35 (ISO. ISO GUIDE 35: 2006), NIST 1012 (DUEWER *et al.,* 2004), e o texto de Taylor (TAYLOR, 1993), o processo de produção de um material de referência envolve basicamente 5 etapas: (i) planejamento, (ii) preparo, (iii) avaliação da homogeneidade e estabilidade, (iv) atribuição dos valores das propriedades e (v) emissão do certificado.

As abordagens de cálculo apresentadas pelo guia ISO GUIDE 35 (ISO. GUIDE 35: 2006) e por Duewer (DUEWER *et al.*, 2004) consideram uma grande quantidade de diferentes embalagens do material produzido, em quantidade de centenas ou milhares de frascos. Dessa forma, para a produção de BMAA, omitiu-se

a avaliação de homogeneidade, uma vez que o material foi produzido em pequena escala, obtendo-se uma única e pequena porção do material a cada síntese.

As condutas adotadas nas etapas de produção encontram-se descritas a seguir, conforme recomendados por esses guias:

- **Planejamento**: análise dos procedimentos envolvidos em relação às possíveis variáveis que afetariam a qualidade do material, padronizando-se a obtenção do material (síntese) e as análises de caracterização. Nesta etapa cabe a enumeração das possíveis fontes de incertezas, e o respectivo estudo em relação à relevância.
- **Preparo**: esta etapa corresponde à obtenção do material em si através de síntese.
- **Avaliação da estabilidade**: refere-se à análise do material armazenado de forma a estabelecer o período pelo qual a substância, BMAA, permaneceu estável, e em que condições de temperatura, luminosidade, umidade.
- **Atribuição dos valores das propriedades**: escolha das propriedades consideradas para certificação do material, tais como a identidade (principal componente) e o seu teor no material (pureza). Nessa etapa está contida a avaliação da incerteza da medição.
- **Emissão do certificado:** de posse de todas as informações obtidas nas outras etapas, elabora-se um certificado de análise conforme o ISO GUIA 31 (ABNT. ISO GUIA 31: 2004).

Deu-se destaque neste trabalho à atribuição dos valores de propriedade, etapa que compõe a caracterização do material de referência que pode ser realizada basicamente de quatro formas segundo o ISO Guia 34 (ABNT. ISO GUIA 34: 2004):

1. Medição através de um método único primário (definitivo), em um único laboratório.

2. Medição por dois ou mais métodos de referência independentes em um único laboratório.

3. Medição por uma rede de laboratórios qualificados que utilizem um ou mais métodos de exatidão demonstrável.

4. Uma abordagem de método específico (estudo interlaboratorial) que forneça apenas valores de propriedades avaliados por esse método.

Os métodos utilizados em laboratórios devem ser rastreáveis a referências estabelecidas, tais como materiais de referência certificados e/ou métodos primários. Na análise qualitativa, os materiais de referência usados para a calibração direta da técnica ou os padrões de calibração do próprio equipamento representam as referências que estabelecem a rastreabilidade de tais métodos. Os vários tipos de métodos qualitativos (de identificação) podem ser divididos em basicamente três tipos: (i) os exploratórios, que buscam identificar uma ou mais substâncias em uma amostra através do reconhecimento direto da espécie ou da sua quantificação acima de certo limite definido (ensaio limite); (ii) os métodos confirmatórios, que possuem qualidade metrológica superior e (iii) os métodos de referência, que são os mais amplamente aceitos. A organização desses três tipos de métodos estabelece a hierarquia demonstrando a rastreabilidade aos métodos de referência ou aos padrões primários, como pode ser visualizado na **Figura 3** (RIOS *et al.,* 2003).

Figura 3: Classificação hierárquica de métodos qualitativos de acordo com sua rastreabilidade. Extraído de Rios *et al.* (2003).

Um método primário ou definitivo é aquele que apresenta as melhores propriedades metrológicas, cuja operação pode ser completamente descrita e compreendida, para o qual se pode descrever uma declaração completa da incerteza em termos de unidades do SI. Um método primário direto mede o valor sem referência a um padrão de mesma grandeza (ISO. ISO GUIDE 35: 2006, MAY *et al.*, 2000).

O NIST esclarece que para a caracterização de substâncias químicas de referência pode ser utilizada uma técnica analítica definitiva e outra de alta qualidade ou oficial para confirmação, de modo a atribuir valores de propriedade com elevada exatidão (MAY *et al.*, 2000). A estratégia já havia sido descrita também nos trabalhos de Rasberry e Gills, (1991); Epstein (1991), Moody e Epstein (1991); Bièvre e Taylor, (1997); Holcombe, Lawn e Sargent(2004).

Essa estratégia foi recentemente atualizada pelo guia ISO GUIDE 35 (ISO. ISO GUIDE 35: 2006), indicando que o material de referência pode ser caracterizado de diferentes maneiras, com um único método ou com múltiplos métodos, em um laboratório ou em múltiplos laboratórios, dependendo da natureza do material e das propriedades avaliadas e seus requisitos para o uso como material de referência. Segundo o mesmo guia, para a determinação da pureza, pode-se realizar a análise de modo que se obtenha o valor da pureza diretamente, ou, mais comum, atribuir valores de teor de impurezas e subtrair da totalidade (100%). Essa abordagem é também chamada de balanço de massas e compõe uma das mais utilizadas estratégias para avaliação e certificação da pureza de um componente principal. ICH (2003); Kipphardt *et al.,* (2006); Willians (2006); Duewer *et al.,*(2004); Bièvre e. Taylor, (1997).

2.5.7 Escolha das metodologias

A Análise Elementar com a medição de CHN apresenta-se como uma técnica suficientemente adequada para a caracterização quantitativa de BMAA (avaliação da pureza). Essa técnica primária pode ser utilizada para medir a fração de massa correspondente a cada átomo na molécula, e uma vez estabelecida a identidade da molécula pelas técnicas de caracterização, pode-se calcular a pureza pela diferença entre o resultado obtido e o teórico. Considerando o trabalho de Jancke, Malz, e Haesselbarth, (2005), e INMETRO, (2007b), esse processo é rastreável às unidades de base do SI através de:

(i) massa: aferida pela balança de precisão do equipamento e rastreável ao kg padrão

(ii) quantidade de matéria: relação estequiométrica das transformações de C em CO_2, H em H_2O, e N em N_2

(iii) medição de condutividade térmica: uma grandeza derivada do SI (watt por metro x kelvin = m x kg x s^{-3} x K^{-1})

Foram utilizadas ainda técnicas analíticas instrumentais de Espectrometria de Massas de Alta Resolução (HRMS), Ressonância Magnética Nuclear, de Hidrogênio (RMN ^{1}H) e de Carbono (RMN ^{13}C).

Os fundamentos teóricos dessas técnicas são apresentados e brevemente descritos nos itens que se seguem.

2.5.7.1 Fundamentos da técnica de Análise Elementar CHN

A Análise Elementar (AE) dos elementos CHN (carbono, hidrogênio e nitrogênio, respectivamente) é utilizada para determinação das proporções entre os átomos de Carbono, Hidrogênio e Nitrogênio presentes em uma molécula. O processo baseia-se no clássico método de Pregl-Dumas, um método calorimétrico que é totalmente automatizado (THOMPSON, 2008).

A metodologia consiste na combustão completa à temperatura de 900 a 1200 °C da amostra de massa conhecida do material orgânico na presença de excesso de oxigênio produzindo CO_2, H_2O, NO_x e SO_x. Esses gases formados são rapidamente homogeneizados em uma câmara de mistura. Após essa mistura, os gases são então despressurizados e carregados por um gás inerte e de alta pureza (Hélio ou Argônio são os mais comuns) através de uma coluna de separação onde são separados e em seguida analisados através de um detector de condutividade térmica (THOMPSON, 2008; MA; GUTTERSON, 1974).

Se outros elementos estão presentes, como cloro ou enxofre, estes também são convertidos em produtos de combustão, como ácido clorídrico e óxidos de enxofre, porém, são eliminados por adsorventes, bem como outros elementos indesejados. O sistema é munido ainda de uma câmara que contém cobre de alta pureza, aquecido a cerca de 600 °C, cuja função é eliminar o oxigênio remanescente do processo e reduzir as espécies NO_x a N_2, antes da separação e análise pelo detector.

Essa é uma técnica relativamente simples, porém poderosa e que permite não somente a caracterização qualitativa dos componentes da substância (por comparação entre as proporções experimentais e teóricas dos átomos), como também a determinação da pureza da amostra. O equipamento é calibrado no momento da análise com um padrão específico para cada tipo de amostra (normalmente acetanilida ou ácido benzóico) garantindo-se assim a exatidão e precisão das medidas.

2.5.7.2 Fundamentos da técnica de Espectrometria de Massas de Alta Resolução

O texto a seguir foi baseado nos textos de Bramer (1998), Andrey (2003), Webb *et al*. (2004); Balogh (2004); Silverstein (2005);. Barwick *et al*. (2006).; e MSU (2010b).

Essa técnica pode ser utilizada para, caracterização estrutural, análises qualitativas e/ou quantitativas de componentes de misturas, e estudo de reatividade em fase gasosa, ou para determinação de massa molecular exata, aplicação explorada nesse trabalho para identificação molecular.

Um espectrômetro de massas pode ser didaticamente dividido em três partes principais: (i) a fonte de íons, (ii) analisador de massas e (iii) o sistema de detecção.

O sistema de detecção não é determinante para a aplicabilidade do espectrômetro, sendo suas variantes tão somente artifícios da engenharia do equipamento. Os detectores são desenvolvidos para sinalizar ao equipamento a quantidade de íons que o alcança, e podem ser basicamente de dois tipos: eletromultiplicadores ou fotomultiplicadores.

Já os sistemas de ionização e de análise de massas diferenciam os equipamentos, sobretudo em relação à aplicabilidade. Como o detector é projetado para sinalizar a presença de íons, estes necessitam ser gerados a partir da(s) substância(s) que são introduzidas no equipamento. Para a geração de íons, podemos citar como principais fontes no vácuo: ionização por elétrons (EI) ou por dessorção assistida por *laser* (MALDI), e em pressão atmosférica: ionização por *electrospray* (ESI) ou por ionização química à pressão atmosférica (APCI). Dependendo do tipo de amostra e necessidade analítica é escolhida a fonte. Ressalta-se que a disponibilidade de determinada fonte está atrelada ao tipo e modelo de equipamento.

Como analisadores de massas podemos citar como mais comuns: quadrupolares, de Tempo de Vôo (ToF), Ion-Trap (armadilha de íons). O sistema

relaciona a massa do íon com a carga que ele adquire, apresentando assim o valor da relação massa/carga, ou m/z na notação mais comum.

O princípio de funcionamento do analisador por tempo de vôo consiste na aceleração diferencial dos íons que adentram ao ToF, e que recebem um pulso de energia igual (pulso de extração), porém são acelerados de maneiras diferentes devido à sua m/z chegando portanto ao detector em tempos diferentes. Os íons com menor m/z terão maior velocidade e chegarão precocemente ao detector, e assim por diante. Desta forma, o equipamento correlaciona o tempo que os íons levam para percorrê-lo com sua relação m/z, podendo-se analisar compostos de massa baixa (dezenas de unidades de massas atômica) até macromoléculas.

A análise através de equipamentos do tipo ToF permite a obtenção de espectros de massas com alta resolução, isto é, com uma precisão de massas que permite a diferenciação do composto por um valor da ordem de 0,0001 unidade de m/z. Quando comparamos a massa de um composto analisado por essa técnica, com a massa teórica, podemos avaliar a identidade do composto através da relação entre essas massas, em partes por milhão (ppm). Usualmente, para compostos de massa de até cerca de 500 Da, considera-se que uma diferença de até 5 ppm confirma a identidade do composto. Compostos com massas da ordem de até 1000 Da, com uma diferença de até 10 ppm para o valor teórico, são tidos como identificados de forma inequívoca. O aumento da complexidade da molécula, sobretudo isotópica, pode alterar essas expectativas.

2.5.7.3 Fundamentos da técnica de Ressonância Magnética Nuclear

A descrição a seguir é baseada nos textos de Jancke, Malz, e Haesselbarth, (2005), Silverstein (2005) e MSU 2010a.

A técnica de RMN é reconhecidamente uma das mais importantes técnicas para a investigação molecular, sobretudo para elucidação estrutural, permitindo obter informação estrutural e dinâmica para qualquer estado da matéria. Em particular é um método decisivo na determinação de estruturas tridimensionais de moléculas no estado líquido.

O fenômeno de ressonância magnética ocorre quando um corpo é submerso em um campo magnético, e que, sob determinadas condições, absorve energia. Devido ao comportamento magnético de certos núcleos atômicos, é possível produzir esse fenômeno nas moléculas de muitos materiais.

Muitos núcleos possuem momentos magnéticos notadamente capazes de entrar em ressonância com a fonte magnética por apresentarem *spin* total e dipolo magnético, como os elétrons.

O núcleo de um átomo possui uma determinada carga total denominada "***Z***" e um momento angular do *spin* total, que, na espectroscopia de *spin* eletrônico foi denominado "***I***". Esse momento angular de *spin* total ("*spin*") do núcleo é determinado pelo número e emparelhamento das partículas nucleares individuais, assumindo os valores 0, 1/2, 1, 3/2, O núcleo de hidrogênio, que é formado por um único próton, tem um *spin* nuclear ***I*** = 1/2. O *spin* nuclear do deutério, trítio, ^{12}C e ^{13}C é igual a 1; 1/2, 0 e ½ respectivamente. O isótopo meta estável, ^{134}Cs, que é radioativo e tem uma meia-vida de 2,90 horas, tem "***I***" igual a 8, o maior valor dentre todos os níveis atômicos. *Spins* nucleares se comportam como *spins* eletrônicos, no sentido de que existe um valor quantizado para o *spin* total e um valor quantizado para o componente "***z***" do *spin* total. Os *spins* do núcleo não se alinham com o

campo magnético devido à rotação em torno de seu próprio eixo promovida pelo momento angular dos elétrons. Surge assim um movimento de precessão.

Instrumentos modernos, em geral, não medem diretamente o espectro de absorção da radiação eletromagnética. Em vez disso, o espectrômetro expõe os núcleos a um campo magnético estático, B_0, que alinha os momentos magnéticos dos núcleos. Em seguida, um segundo campo magnético, "B_1", perpendicular a "B_0", é aplicado à amostra por um curto período (1-10 microsegundos), como um pulso. Esse pulso perpendicular faz com que os momentos magnéticos dos núcleos mudem de direção em um caminho circular de precessão, um efeito que pode ser medido por uma bobina de detecção ao redor da amostra. Assim que o pulso é interrompido, a precessão diminui à medida que os núcleos se realinham com o campo magnético estático "B_0".

Se a frequência de pulso de um campo magnético externo se iguala à frequência de precessão, ocorre absorção de energia, e a transição para um estado de maior energia. Em seguida, com o retorno ao estado fundamental, cada vez mais próximo do plano "z", ocorre a relaxação (relaxamento) produzindo uma sequência de pulsos que são medidos pelo equipamento em função do tempo. Após o tratamento matemático através de Transformada de Fourier, esses pulsos são transformados no espectrograma, indicando os sinais dos núcleos analisados tendo como eixo horizontal a frequência do pulso em relação à frequência do campo externo (convertida em ppm).e no eixo vertical a intensidade relativa.

A circulação dos elétrons de uma ligação sob a influência de um campo magnético externo gera um reduzido campo magnético (campo induzido) que blinda o próton em relação ao externo. No próton, o campo induzido se opõe ao campo externo. Dessa forma, o campo magnético real que atua sobre o próton é menor do que o campo externo. Um próton que está fortemente blindado pelos elétrons não pode absorver a mesma energia que um próton de baixa blindagem, num mesmo campo magnético externo. Um próton blindado absorverá energia num campo externo de maior intensidade (ou em frequências mais elevadas). O campo externo deve ser mais intenso para compensar o efeito do pequeno campo induzido.

Assim, núcleos que se encontram em regiões da molécula com maior densidade eletrônica estão mais blindados, portanto seus sinais serão apresentados em campos mais altos. Ao mesmo tempo, núcleos em regiões da molécula com menor densidade eletrônica encontram-se menos blindados, apresentando sinais de campo baixo. Somado a esse efeito, têm-se ainda a influência de outros núcleos através do acoplamento dos *spins*. Essa somatória de fatores se traduz na forma do deslocamento químico em relação ao padrão de calibração da escala, simbolizado pela letra grega minúscula delta: “δ”, que é medido em ppm).

Realizando-se esse experimento com os núcleos ^{1}H e ^{13}C e combinando-se os resultados, informações muito precisas sobre a disposição dos átomos na molécula podem ser obtidas, realizando assim, inferências precisas sobre a estrutura da mesma. Devido à elevada reprodutibilidade da técnica, pode-se comparar os resultados de deslocamento químico com tabelas resultantes de experimentos anteriores. Essa técnica é tida pela comunidade científica como definitiva para a elucidação estrutural de compostos orgânicos.

2.5.8 Certificação do Material de Referência

A **Certificação do Material de Referência** é, segundo o ISO GUIA 30 (ABNT. ISO GUIA 30: 2000), o procedimento através do qual são estabelecidos os valores de uma ou mais propriedades de um material ou substância, por um processo que assegura a rastreabilidade à compreensão exata das unidades nas quais os valores das propriedades são expressos.

O estabelecimento dos valores das propriedades foi fundamentado pelos documentos: de May *et al.* (2000), Rasberry e Gills (1991); Epstein (1991), Moody e Epstein (1991); Bièvre e Taylor, (1997), Holcombe, (2004) e ISO GUIDE 35 (ISO. ISO GUIDE 35: 2006).

A incerteza da medição foi estimada através da metodologia descrita no guia *Guide number 4* (EURACHEM/CITAC. *Guide number 4*: 2000), documento baseado no guia ISO GUM (ISO/IEC, 2008).

2.5.9 Incerteza da medição

A incerteza da medição merece atenção especial no campo do estudo dos MR, pois através de sua estimativa pode-se compreender o nível de qualidade do material, etapa importante para escolha e uso de um padrão de referência (ABNT. ISO GUIA 32: 2000; EURACHEM, 2000).

2.5.9.1 Incerteza da determinação qualitativa do material

A incerteza associada à determinação qualitativa do material não é tratada nos guias ISO GUIA 32 (ABNT. ISO GUIA 32: 2000), no EEE/RM/062rev3 (EURACHEM. EEE/RM/062rev3: 2000), ou no *Guide number 4* (EURACHEM/CITAC. *Guide number 4*: 2000). O ISO GUIDE 35 (ISO. ISO GUIDE 35: 2006) indica que a incerteza em avaliações qualitativas pode ser expressa como probabilidade. Assim, a abordagem utilizada para a caracterização desse tipo de incerteza foi baseada num conjunto de considerações como apresentado a seguir.

A análise qualitativa é caracterizada por sua natureza binária de conclusão, isto é, só podem existir duas conclusões com cada experimento: presença/ausência, isto é, identidade corresponde/não corresponde. Essa abordagem é válida para o modelo de caracterização da BMAA uma vez que o material é composto majoritariamente de uma única espécie, e de que sua presença é próxima da totalidade da amostra (RIOS. *et al.,* 2003).

Apesar de as técnicas utilizadas demandarem tratamento dos dados brutos, como interpretação dos sinais, comparação com tabelas, ou comparação com dados relatados pela comunidade científica, a conclusão final é sempre convertida em um resultado binário, eliminando-se assim a possibilidade de existirem múltiplas conclusões.

As técnicas de identificação mais simples, de triagem ou exploratórias, cuja especificidade não é plenamente garantida por não fornecer informações sobre a composição, mas sim sobre um comportamento específico de determinada substância ou conjunto delas, são tidas como binárias em toda sua extensão. São binárias desde o seu princípio analítico até sua conclusão, pois em todos os momentos só existem as duas possibilidade: corresponde/não corresponde.

Nas técnicas confirmatórias mais aprimoradas, durante o processo analítico podem ser avaliadas variáveis (i) uni-variadas, como tempo de eluição

cromatográfica ou presença de um sinal espectroscópico, e (ii) variáveis multivariadas, como espectro óptico com padrões de intensidades de absorção, em diversos comprimentos de onda, que podem levar a uma conclusão binária, ou não. Caso a investigação envolvida na caracterização seja sobre uma substância desconhecida (através do problema: “qual a composição da amostra?”), então não se terá uma resposta binária, mas, sim, uma gama de possibilidades. Por outro lado, se a amostra é de natureza conhecida, e o método objetiva confirmar sua presença, e então, retorna-se à situação binária.

Ao mesmo tempo, a utilização de várias técnicas com caráter primário, que são aplicadas em condição vantajosa em relação aos respectivos limites, reduz significativamente as possibilidades de interpretação errônea. Esse fato pode ser compreendido pela aplicação do teorema de Bayes, equação , o qual possibilita a avaliação cumulativa e sistemática dos resultados corretos ou incorretos, estimando a probabilidade de uma conclusão correta, baseando-se fundamentalmente nas probabilidades de serem verdadeiros ou falsos os resultados positivos e/ou negativos (MIL'MAN; KONOPEL'KO, 2004; ELISSON; STEPHEN, 1998; ELLISON; GREGORY, 1998; ELLISON, 2000)

O teorema de Bayes declara que:

$$P(A \mid e) = \frac{P(e \mid A) \times P(A)}{P(e \mid A) \times P(A) + P(e \mid \neg A) \times P(\neg A)} \tag{5}$$

Onde $P(A \mid e)$ é a probabilidade condicional de A dado e, $P(A)$ é a probabilidade prévia de A, $P(e \mid A)$ é a probabilidade de e dado A, e o prefixo $\neg$ denota a negação, “não”.

Em termos de um teste analítico para um determinado analito, A denota a presença do analito e $\neg A$ a ausência dele, e e a evidência, ou o resultado do teste. $P(A)$ é, então, a probabilidade do analito estar presente antes que o teste seja realizado (isto é, sem a evidência), e uma vez que os eventos (ausente ou presente) são mutuamente exclusivos, e representam todas as possibilidades, então, $P(A)+P(\neg A)=1$, e $P(A \mid e)$ é a probabilidade do analito estar presente levando-se em conta o resultado e do teste.

$P(e \mid A)$ é a probabilidade de observar um resultado e, sendo que A está presente. Na prática, se e representa o resultado positivo, $P(e \mid A)$ aproxima-se do valor 1, exceto se o experimento for realizado próximo ao limite de detecção da técnica – o que não é o caso da aplicação das técnicas utilizadas para caracterização de substâncias químicas, seja qualitativa ou quantitativa.

É importante notar, ainda, que $P(e \mid A)=1-P(\neg e \mid A)$ quando $P(\neg e \mid A)$ é a probabilidade de ocorrência de um falso negativo. $P(e \mid \neg A)$ é a probabilidade de se obter o resultado e na ausência do analito A, situação também conhecida como falso positivo. Assim, a equação (1) pode ser utilizada para combinar as probabilidades de falso positivo e falso negativo para determinar o quanto a presença de A é provável, isto é, o grau de certeza ou de confiabilidade na conclusão.

Como consequência direta da aplicação do teorema em uma situação com análises múltiplas, pode-se observar que, combinando-se as baixas probabilidades de ocorrência de falso negativo e falso positivo, e considerando ainda que a ocorrência de um falso negativo é praticamente nula, uma vez que o operador tem ciência do material que está sendo analisado, temos que $P(\neg e \mid A)$ tende a zero. Isso ocorre porque as técnicas utilizadas já foram amplamente estudadas e são consideradas como definitivas. Nota-se ainda que $P(\neg A)$ tende a zero, devido à utilização de diversas técnicas simultaneamente, e então:

$$P(A \mid e) = \frac{P(e \mid A) \times P(A)}{P(e \mid A) \times P(A)} = 1 \qquad (6)$$

A interpretação direta da equação é de que, uma vez observado o efeito e, têm-se a probabilidade máxima de A estar presente.

Dispondo-se dos valores das probabilidades de falso negativo e falso positivo, conforme **Quadro 2**, pode-se calcular a incerteza da caracterização qualitativa, utilizando-se a equação (3).

Quadro 2: Classificação do método analítico por sua confiabilidade – MIL'MAN e KONOPEL'KO 2004

Método ou procedimento	Probabilidade de Falso Resultado		Comentários
	negativo	positivo	
Referência	< 1: 10^4	< 1: 10^6	Métodos padrão ou oficiais, como no sistema Europeu de Controle de Qualidade; baseados em métodos de espectroscopia molecular, garantindo a identificação confiável dos analitos.
Confirmatório	< 1: 10^4	< 1: 10^4	Identificação confiável de compostos regulados ou ilícitos; os procedimentos podem variar dependendo do laboratório.
Exploratório (*Screening*)	< 1: 10^4	< 1: 5	Detecção de analitos, ou suas classes, presentes nas amostras acima de um valor pré-estabelecido, com alto rendimento e evitando respostas falso-negativas.

Considerando-se os valores das probabilidades de falso negativo e falso positivo como mostrado no **Quadro 2** para um método confirmatório, e substituindo-os na equação 1, temos:

$$P(A \mid e) = \frac{P(e \mid A) \times P(A)}{P(e \mid A) \times P(A) + 10^{-4} \times 10^{-4}} = \frac{P(e \mid A) \times P(A)}{P(e \mid A) \times P(A) + 10^{-8}} \qquad (7)$$

Nota-se que o termo $P(e \mid \neg A) \times P(\neg A)$ apresenta um resultado da ordem de 10^{-8} para a análise através de uma única técnica de caráter confirmatório. Se

considerarmos o uso de **n** técnicas, as probabilidades resultantes de $P(e \mid \neg A)$ e $P(\neg A)$ passam a ser o produto das probabilidades individuais:

$$P(e \mid \neg A_1, A_2, \ldots A_n) = \prod_{i=1}^{n} P(e \mid \neg A_i) \tag{8}$$

Portanto, com a utilização de duas ou mais técnicas de elevada qualidade metrológica, compostas de métodos primários e definitivos, é possível a qualificação do material com incerteza considerada desprezível (não significativa), confirmando a aplicação da equação .

2.5.9.2 Incerteza da determinação quantitativa do material

Como definido no guia "*Guide number 4*" (EURACHEM/CITAC. *Guide number 4*: 2000) a incerteza da medição é o parâmetro associado a um resultado de medição que caracteriza a dispersão dos valores que podem ser razoavelmente atribuídos a um mensurando. Assim, a incerteza reflete uma limitação em relação ao conhecimento exato do mensurando, e o resultado é apenas uma estimativa.

De acordo com o ISO GUM, a incerteza da medição pode ser quantificada segundo três abordagens, as quais também são as mais usuais:

1. Abordagem "passo a passo", "componente a componente", sub-analítica ou, na língua inglesa, "*bottom-up*";

2. Abordagem baseada em informação interlaboratorial;
3. Abordagem baseada em dados da validação e/ou controle da qualidade do método analítico obtidos em ambiente intra-laboratorial.

Os laboratórios podem usar qualquer uma destas metodologias, desde que demonstrem que são tecnicamente válidas e aplicáveis aos métodos em estudo. A escolha da metodologia de cálculo decorre da informação e recursos disponíveis, bem como da dimensão necessária da estimativa da incerteza tendo em vista o objetivo do ensaio e os limites de aceitabilidade.

Para o presente estudo, utilizou-se a abordagem passo-a-passo que é a que mais se adéqua ao propósito e aos recursos disponíveis.

O Guia "*Guide number 4*" (EURACHEM/CITAC. *Guide number 4*: 2000) foi baseado no guia ISO Guide 98: "*Guide to the expression of uncertainty in measurement*" também conhecido como ISO GUM, e serve como referência para a avaliação, cálculo e expressão da incerteza da medição em ensaios. Ele sugere cinco etapas para a estimativa da incerteza da medição, como segue:

Etapa 1: Especificação do mensurando

Etapa 2: Identificação das fontes de incerteza

Etapa 3: Quantificação das fontes de incerteza

Etapa 4: Cálculo da incerteza combinada

Etapa 5: Cálculo da incerteza expandida

A primeira etapa do processo consiste na definição clara do mensurando, e enumeração das grandezas que influenciam o resultado da medição. O mensurando

deve ser expresso por meio de uma equação matemática que a relacione com as variáveis de entrada, assumindo a forma de uma função $Y=f(X_1,X_2,...X_n)$, ou seja o valor do mensurando Y depende das n variáveis de entrada $(X_1,X_2,...X_n)$, equação (1). Posteriormente, devem ser identificadas todas as fontes de incerteza e, se necessário, deve-se alterar a expressão usada para calcular o mensurando de forma a incluir fatores capazes de refletir o impacto de todas as fontes de incerteza no valor medido.

$$Y=f(X_1,X_2,...X_n) \quad \textbf{(1)}$$

Na segunda etapa, devem-se determinar quais são as fontes relevantes de incertezas e caracterizá-las dividindo-as em dois grupos, pelo tipo de avaliação: avaliação Tipo A e avaliação Tipo B da incerteza padrão.

A **avaliação do Tipo A** da incerteza padrão pode ser aplicada quando tenham sido feitas várias observações independentes para uma das grandezas de entrada sob as mesmas condições de medição. Caso haja suficiente resolução no processo de medição haverá uma dispersão ou espalhamento observável nos valores obtidos. A avaliação do Tipo A da incerteza padrão é o método de avaliação da incerteza pela análise estatística de uma série de observações. Neste caso, a incerteza padrão é o desvio padrão experimental da média que se obtêm de um procedimento de cálculo da média aritmética ou de uma análise de regressão adequada.

A **avaliação do Tipo B** da incerteza padrão é a avaliação da incerteza associada com uma estimativa x_i de uma grandeza de entrada (x_i) feita por outros meios que não a análise estatística de uma série de observações. A incerteza

padrão $u_c(x_i)$ é avaliada pelo julgamento científico baseado em todas as informações disponíveis sobre a possível variabilidade de (x_i). Valores pertencentes a esta categoria podem ser obtidos a partir de:

- Dados de outras medições
- Experiência ou conhecimento geral do comportamento e propriedades do material e métodos,
- Instrumentos relevantes,
- Especificações do fabricante,
- Dados provenientes de calibração e de outros certificados,
- Incertezas atribuídas aos dados de referência provenientes de manuais ou publicações.

Quando não está disponível uma estimativa detalhada de um componente de incerteza, podem ser usados consensos ou outros tipos de avaliação para estimar a dimensão desse componente.

De posse das atribuições das incertezas referentes às abordagens Tipo A e Tipo B, realizam-se os cálculos para atribuição dos valores de incerteza padrão a cada componente, representando o desvio experimental. A incerteza Tipo A é o próprio desvio padrão das séries de medidas tomadas do mesmo mensurando. A incerteza Tipo B será representada pelos dados elencados anteriormente, aos quais se atribuem valores, conforme a fonte de informação.

Na quarta etapa, as incertezas padrão dos diversos componentes são combinadas gerando assim a incerteza padrão combinada, a qual segue a expressão da **equação (2)** sempre que as grandezas de entrada forem independentes (não correlacionadas). Considerando $u_c^2(x_i)$ a incerteza padrão de diferentes parâmetros, $(x_1, x_2, x_3 ...)$, a incerteza padrão combinada de um valor y,

$u_c(y)$ será a raiz quadrada da soma dos quadrados das incertezas-padrão calculadas para cada parâmetro. $u_c(y)$

$$u_c(y(x_1, x_2, x_3 ...)) = \sqrt{\sum_{i=1,n} c_i^2 u\ (x_i)^{(2)}} \tag{2}$$

Por fim, a incerteza combinada $u_c(y)$ é multiplicada por um fator de abrangência k, de modo a garantir que certo nível de confiança seja alcançado. Na maioria dos casos um nível de confiança de 95% é suficiente, o que corresponde a utilizar um fator de abrangência $k=2$ que corresponde ao coeficiente *t-Student* para esse nível de confiança.

No cálculo da incerteza combinada $u_c(y)$ de um processo de medição é considerada a ação simultânea de todas as fontes de incerteza, e $u_c(y)$ está relacionada a um desvio padrão da distribuição resultante.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Produção de material de referência (BMAA) seguindo as condutas adotadas nas etapas de produção, tais como (i) planejamento, (ii) preparo, (iii) avaliação da estabilidade, (iv) atribuição dos valores das propriedades e (v) emissão do certificado.

3.2 Objetivos específicos

(i) Obtenção da BMAA sob a forma de cloridrato ($C_4H_{11}ClN_2O_2$);

(ii) Realizar análise elementar (determinar as proporções entre os átomos de Carbono, Hidrogênio e Nitrogênio) da molécula BMAA;

(iii) Realizar a caracterização da estrutura molecular da BMAA por RMN ^1H e por RMN ^{13}C;

(iv) Realizar a determinação qualitativa e quantitativa do material de referência, ou seja, determinar o grau de pureza da BMAA em relação à massa total do material;

(v) Determinar a incerteza da medição na caracterização qualitativa e quantitativa da BMAA, uma vez que tanto a identidade do composto como a sua pureza são fundamentais para a certificação do material;

(vi) Avaliar a estabilidade da BMAA obtida por síntese.

(vii) Certificar a beta-n-metil-amino-alanina como material de referência.

4 MATERIAIS E EQUIPAMENTOS

Para realização dos ensaios foram utilizados os seguintes materiais contidos nas tabelas que seguem.

Os solventes e reagentes utilizados foram escolhidos com base nas necessidades de pureza para seu uso e estão relacionados na **Tabela 2**.

Tabela 2: Solventes e reagentes utilizados nos experimentos

Nome	Tipo/Grau	Marca
Etanol	ACS / HPLC	Carlo Erba
Metanol	ACS / HPLC	JT Baker/ Malinckrodt
Ácido Clorídrico	PA	Vetec
Água Deionizada	Tipo 1	Milli-Q ® - Millipore

Para a síntese de BMAA foram utilizados reagentes de alta pureza com o intuito de minimizar as impurezas remanescentes no produto final.

O solvente utilizado no preparo de amostras para análise por Ressonância Magnética Nuclear foi água deuterada, também de elevada pureza. Esses reagentes bem como os padrões analíticos utilizados para calibração dos equipamentos estão relacionados na **Tabela 3**.

Tabela 3: Reagentes (r), soventes (s) e padrões (p) de alta pureza utilizados nos experimentos

Nome	CAS RN	Marca/Fabricante	Lote
Ácido acetamidacrílico (r)	5429-56-1	Aldrich	517480-218
Metilamina (r)	74-89-5	Fluka	65580
Acetanilida ≥99,9% (p)	103-84-4	Perkin Elmer	0210-1131
Acetanilida ≥99,9% (p)	103-84-4	Sigma Aldrich	11909MH-358
L-BMAA HCl ≥97% (p)	65-85-0	Sigma Aldrich	0240-2037
Ácido benzóico ≥99,5% (p)	65-85-0	Perkin Elmer	0240-2037
Água Deuterada RMN (s)	7789-20-0	Acros Organics	A0230609/A0230711
Formiato de sódio (p)	141-53-7	Fluka	171841

Para a realização dos experimentos e ensaios foram utilizados materiais de qualidade elevada para minimizar a contaminação das substâncias manipuladas com outras indesejadas. Os principais materiais utilizados encontram-se relacionados na **Tabela 4**.

Tabela 4: Principais materiais utilizados nos experimentos

Material	Marcas
Tubo Cônico em Polipropileno, 15 e 50 mL	TPP
Tubo Cônico com tampa em Polipropileno, 1,5 mL	Eppendorf
Tubos de Vidro 100mm X 13 mm, fundo redondo para Ensaios	Laborglass
Balões de fundo redondo 50 e 100 mL	Laborglass
Balões Volumétricos em Vidro 5, 10, 50 e 100 mL	Laborglass
Ponteiras em Polipropileno para pipetas automáticas, 10 µL , 200 µL e 1000 µL	Axygen
Pipetas de vidro tipo Pasteur	Laborglass
Provetas Graduadas	Laborglass, Pyrex
Tubo ressonância NMR 500 MHz 5 mm 7”	Kontes Gerresheimer

Foram utilizados equipamentos analíticos e de suporte, relacionados na **Tabela 5,** pertencentes aos laboratórios da Universidade de São Paulo, como o: LAT (Laboratório de Análises toxicológicas), LTPNA (Laboratório de Toxinas e Produtos Naturais de Algas), e CA-IQ (Central Analítica do Instituto de Química), .

Tabela 5: Equipamentos utilizados nos experimentos

Tipo	**Modelo**	**Marca/Fabricante**
Evaporador Rotativo	RotaVapor	Büchi
Espectrômetro de Massas de Alta Resolução	ESI-ToF – Micro ToF	Bruker Daltonics
Análise Elementar CHN	CHN 2400	Perkin-Elmer
Espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear	DPX300	Bruker Daltonics
Pipetas automáticas	Pipetman P20, P100, P1000	Gilson
Balança Analítica	R200D	Sartorius Research

Para realização dos cálculos apresentados foram utilizados os *softwares* (programas de computador) apresentados na **Tabela 6**. O programa Isotope Pattern é nativo do conjunto do equipamento MicroToF – Bruker Daltonics.

de usos gratuitos, e disponíveis *on line* ou para *download*,

Tabela 6: *Softwares* utilizados para os cálculos

Nome	Direitos	Descrição	Fonte
EPS - Chemistry CHN Calculator v 1.30	©2000 Gareth Evans	Calculador de proporção centesimal dos elementos em moléculas	[1]
Isotope Distribution Calculator and Mass Spec Plotter	© 1996-2009 Scientific Instrument Services	Calculador de massa exata de substâncias e preditor de distrinuição isotópica	[2]
Compass Data Analysis – comando Smart Formula	Bruker Daltonics	Calculador de erro experimental HRMS e preditor de fórmula química	[3]
Molecular Weight to Formula	Bruker Daltonics	Preditor de fórmula química a partir de massas exata	[4]
Isotope Pattern	Bruker Daltonics	Estimador de espectro de massa exata	[5]
Uncertainty Calculator 3.2	Desenvolvido por Christopher L. Grachanen	Aplicativo para cálculo da incerteza da medição	[6]

[1] http://www.che.hw.ac.uk/research /services/chnequat.html
[2] http://www.sisweb.com/mstools/isotope.htm
[3] Software do equipamento MicroToF
[4] Aplicativo do equipamento Micro ToF – Bruker Daltonics
[5] Aplicativo do equipamento Micro ToF – Bruker Daltonics
[6] http://www.agilent.com/metrology/download3.shtml

5 MÉTODOS

Nos itens 5.1 a 5.8 são descritos os procedimentos adotados para síntese de BMAA, para as análises instrumentais, e para a avaliação da incerteza da medição.

5.1 Método 1 – Obtenção de BMAA

Através do método descrito por Veja e Bell (1967), foi obtida a BMAA (β-N-metilamino-alanina) sob a forma de cloridrato ($C_4H_{11}ClN_2O_2$). Esse método descreve a síntese da BMAA através de reação entre o ácido alfa-acetamidoacrílico e metilamina, uma reação sem especificidade simétrica, e que resulta em uma mistura enantiomérica impura, tendendo a se apresentar como a forma racêmica (proporções iguais dos enantiômeros).

Para que o material atendesse à necessidade de alto grau de pureza, foi realizada uma etapa de purificação adicional, posteriormente à síntese, conforme recomendado pelo ISO GUIA 35 (ISO. ISO GUIDE 35: 2006) para substâncias obtidas por síntese química.

Após a síntese descrita, foram realizadas mais duas recristalizações sucessivas, dissolvendo o precipitado em solução aquosa de etanol (50/50; v/v) aquecida a 35 °C, deixando-se resfriar naturalmente, e, após alcançar o equilíbrio térmico com o ambiente, e, sob refrigeração de 2 a 8 °C, foi finalizada a recristalização. Após cada recristalização, o cristalizado foi separado do líquido por filtração a vácuo e lavado com etanol 99.8%. Em seguida, o etanol foi removido sob vácuo à temperatura ambiente por 1 hora. Ao final, o material foi mantido em estufa

a 60 °C por 4 horas para completa secagem. Com esse procedimento adicional, obteve-se a BMAA com elevado grau de pureza, na forma de cloridrato.·.

5.2 Método 2 – Determinação do Ponto de Fusão do material.

A análise do Ponto de Fusão (PF) do material foi utilizada como suporte para a evidência da composição (comparando-se com os dados obtidos por Vega e Bell; 1967). Na tentativa de padronizar a leitura, foi estipulado que uma faixa estreita indicaria que o material teria alta pureza. Caso contrário, ou seja, uma faixa larga de temperatura ou a observação de fusão não uniforme, indicaria baixa pureza do material.

A determinação do PF foi realizada com o equipamento Tecnopon® munido de um termômetro de mercúrio calibrado para a faixa de -10 a 250 °C. Para a análise, utilizou-se um tubo de vidro capilar limpo, colocando-se uma porção do material a ser analisado ocupando cerca de 0,5 cm de extensão do capilar e posicionado no primeiro terço do mesmo, de modo a aproximar o material da fonte de calor do equipamento. O equipamento foi ajustado para produzir uma rampa de temperatura até 250 °C, e foi observado o momento da fusão durante a elevação da temperatura através da leitura do termômetro. O início e final do derretimento marcaram a faixa de fusão do material.

5.3 Método 3 – Identificação molecular da BMAA por HRMS

Para apoiar a análise elementar do composto, e indicar que a relação centesimal entre os elementos presentes na amostra baseia-se em uma única substância, foi realizada análise por HRMS, obtendo-se a massa exata da substância, e posteriormente submetendo-a a comparação com dados teóricos, e estabelecendo a identidade através da observação do valor do erro experimental.

Foram pesados 1,0 mg de cloridrato de BMAA em balança analítica com precisão de 0,1 mg, e dissolvidos em 0,765 mL de mistura de metanol/água 70/30 produzindo uma solução estoque de concentração 1,0 mg/mL em BMAA livre . A solução resultante foi então diluída 20 vezes com mistura de metanol/água 70/30, obtendo-se uma solução com concentração de 50,0 µg/mL.

O equipamento MicroTof foi utilizado com uma fonte de ionização com sonda *electrospray*, ajustada com potencial de capilar de 4,5 kV, gas nebuilizador com pressão de 0,4 Bar, Dry Gas com fluxo de 4,0 L/min e temperatura da fonte de 180 °C.

Foi realizada calibração interna (com função *High Precision Calibration*), utilizando uma solução de formiato de sódio 1,0 mg/mL, no início de cada aquisição e ao final para confirmação da manutenção da calibração durante o experimento.

As soluções foram introduzidas no espectrômetro através de infusão direta a um fluxo constante de 3 µL/min. Os resultados foram tratados diretamente no software do equipamento através do recurso *Smart Formula* no aplicativo de apoio *Compass Data Analysis*.

O cálculo para obtenção do erro experimental em ppm (partes por milhão) é dado pela equação (3). O *software* do equipamento realiza esse cálculo automaticamente após o comando, e compara em sua base de dados interna as

proporções isotópicas dos respectivos íons, utilizando esses valores para estabelecer a semelhança dos resultados obtidos com a fórmula molecular proposta.

$$E_{ppm} = \frac{x_i - x_t}{x_t} \times 1000000\ ppm \qquad (3)$$

Onde:

E_{ppm} : erro relativo experimental em ppm

x_i : i-ésimo valor experimental

x_t : valor teórico

5.4 Método 4 – Caracterização da estrutura molecular da BMAA por RMN ^{1}H

Foram pesados 2,0 mg de cloridrato de BMAA em balança analítica com precisão de 0,1 mg, e dissolvidos em 0,5 mL de água deuterada (D_2O). A solução foi colocada em tubo para ressonância, e a análise de ^{1}H foi realizada utilizando o equipamento Bruker DX300 operando na frequência de 300,13 MHz à temperatura de 303 K com uma sonda multinuclear de 5 mm.

A calibração do equipamento, imediatamente antes da análise, foi realizada com TMS (tetrametilsilano), cujo sinal foi ajustado em 0 ppm para os núcleos de ^{1}H.

5.5 Método 5 – Caracterização da estrutura molecular da BMAA por RMN ^{13}C

Foram pesados 8,0 mg de cloridrato de BMAA em balança analítica com precisão de 0,1 mg, e dissolvidos em 0.5 mL de água deuterada (D2O). A solução foi colocada em tubo para ressonância, e a análise de ^{13}C foi realizada utilizando o equipamento Bruker DX300 operando na frequência de 75,13 MHz, à temperatura de 303 K com uma sonda multinuclear de 5 mm.

A calibração do equipamento, imediatamente antes da análise, foi realizada com TMS (tetrametilsilano), cujo sinal foi ajustado em 0 ppm para o sinal dos núcleos de ^{1}H. Essa calibração foi usada para o ajuste de deslocamentos químicos de ^{13}C.

5.6 Método 6 – Avaliação quantitativa do material por AE CHN.

A Análise Elementar (AE) de BMAA foi realizada objetivando evidenciar a composição elementar do material, apoiando a caracterização qualitativa, e também obter informação para estabelecimento da pureza do material.

As análises foram realizadas em equipamento Perkin Elmer CHN2400 conforme o roteiro que segue, no qual estão consideradas as etapas de calibração do equipamento e da análise do material propriamente dito.

5.6.1 Calibração do equipamento

Após a pesagem de 1,000 mg de padrão de acetanilida dentro de uma cápsula de estanho em micro balança analítica, esse conjunto foi introduzido no equipamento para análise. Foi realizada uma única calibração antes de cada lote de análise (lote refere-se a análises realizadas em sequência).

Para confirmar a exatidão da calibração foi realizada a análise de um padrão certificado de ácido benzóico, utilizando o mesmo procedimento para a acetanilida. Em seguida, esse resultado foi comparado com os valores nominais das proporções de C e H. Como critério de aceitação da calibração, a análise de C e H no ácido benzóico não poderia ultrapassar o desvio nominal de 0,3 % para cada elemento. Caso ultrapassasse, nova calibração com acetanilida seria realizada e a verificação com ácido benzóico seria repetida até que a calibração estivesse adequada. Durante os experimentos realizados, não foi necessária repetição da calibração.

5.6.2 Análise do material

Após a pesagem de 1,000 mg de amostra do material obtido por síntese dentro de uma cápsula de estanho em micro balança analítica, esse conjunto foi introduzido no equipamento para análise. Após a análise, os resultados foram anotados para realização dos cálculos.

A análise do material foi realizada com cinco réplicas e os resultados foram avaliados em relação à precisão das medidas (desvio padrão). O valor utilizado para o cálculo da pureza foi a média dos valores obtidos para cada elemento.

5.7 Método 7 – Determinação quantitativa do material

A determinação quantitativa do material de referência refere-se à determinação do seu grau de pureza, isto é, o teor do componente principal em relação à massa total do material.

Essa avaliação foi realizada através da análise elementar de CHN e do valor médio obtido para cada elemento. Esse resultado foi comparado com os respectivos valores teóricos, obtendo-se assim um erro experimental relativo para cada um deles.

Submetendo-se a determinação da pureza à abordagem de balanço de massas, tem-se que a pureza de uma substância no material p é dada pela soma das massas de todas as impurezas com a massa da própria substância. Em outras palavras, a pureza é a totalidade do material subtraída das impurezas, o que matematicamente pode ser representado pela equação (4) (DUEWER, 2004; KIPPHARDT *et al.,* 2006; ISO GUIDE 35, 2006).

$$p = 100 - \sum_{i=1}^{k} x_i \tag{4}$$

Onde:

p : pureza da substância

x_i : participação da i-ésima impureza no total do material (%)

i : índice da impureza

k : total de impurezas

As medidas de um mesmo mensurando devem ser submetidas ao cálculo da respectiva média aritmética, enquanto as de mensurandos diferentes devem ser somadas. Uma vez que os resultados da análise elementar são realizados para cada elemento independentemente, cada respectivo erro foi considerado como o desvio devido a uma impureza (DUEWER, 2004 e ISO GUIDE 35, 2006).

5.8 Método 8 – Determinação da incerteza da medição

Para que fossem atendidas as recomendações contidas nas normas e guias ISO Guia 34 (ABNT. ISO GUIA 34: 2004), ISO GUIDE 35 (ISO GUIDE 35, 2006) e ISO GUM (ISO/IEC. Guide 98-3: 2008), fez-se necessária à avaliação da incerteza da medição. Essa necessidade se aplica tanto à caracterização qualitativa como quantitativa, uma vez que tanto a identidade do composto como a sua pureza são fundamentais para a certificação do material.

Cada tipo de caracterização, qualitativa ou quantitativa, teve sua própria abordagem como já descrito no item 2.4.10 e subitens. A avaliação da incerteza referente análise quantitativa seguiu o procedimento passo-a-passo, por ser o mais adequado ao tipo de avaliação e às condições experimentais.

5.8.1 Método 8.1 – Avaliação da Incerteza na caracterização qualitativa

Foram utilizadas, três técnicas distintas de identificação química: Espectrometria de Massas de Alta resolução, Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio e de Carbono 13, garantindo a correta identificação do material, pois conforme apresentado no item 2.4.10.1, com a utilização de duas ou mais técnicas

de elevada qualidade metrológica, compostas de métodos primários e definitivos, é possível a qualificação do material com incerteza considerada desprezível (não significativa).

5.8.2 Método 8.2 – Avaliação da Incerteza na caracterização quantitativa

A incerteza da medição em relação à caracterização quantitativa foi realizada utilizando-se a sistemática descrita no guia "*Guide number 4*" EURACHEM/CITAC (2000), através da utilização do *software* Uncertainty Calculator 3.2.

A **avaliação Tipo A** da incerteza foi realizada com os resultados das séries de análises, através dos desvios dos valores obtidos.

A **avaliação do Tipo B** da incerteza foi realizada a partir das informações disponíveis sobre as técnicas utilizadas, a saber:

- Especificações do fabricante
- Dados provenientes da calibração
- Incertezas atribuídas aos dados de referência provenientes de manuais ou publicações

Para a quantificação da incerteza da medição segundo o tipo de avaliação, foram considerados os seguintes argumentos:

1. **Avaliação da incerteza tipo A:**

   i. desvio padrão da série de cinco medidas da amostra

   ii. desvio obtido da confirmação da calibração com ácido benzóico

2. Avaliação da incerteza tipo B:

i. valor de exatidão do equipamento (declarado nas especificações do fabricante)

ii. pureza do padrão de calibração acetanilida

iii. pureza do padrão de confirmação ácido benzóico

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados analíticos foram criticamente avaliados, comparando-se os resultados obtidos com dados teóricos ou já relatados na literatura. Durante a coleta dos dados e compilação, observou-se também criticamente a contribuição de cada etapa para a composição da incerteza da medição.

A utilização de métodos primários dispensa sua validação, por serem técnicas reconhecidamente exatas e confiáveis, já tendo sido amplamente estudadas e validadas para as mais diversas aplicações. A garantia da confiabilidade das medidas relaciona-se ao correto funcionamento dos equipamentos utilizados (o que normalmente é garantido pela análise de uma amostra de referência ou calibração interna do equipamento) e à capacidade de interpretação dos resultados pelos analistas, quando requerido.

Nos itens que se seguem encontram-se os resultados divididos pela abrangência: **Avaliação Qualitativa** e **Avaliação Quantitativa**, cada uma subdividida, detalhando os resultados obtidos com cada técnica utilizada.

6.1 Avaliação Qualitativa

A avaliação qualitativa foi fundamentada na interpretação dos espectros de RMN ^{1}H e RMN ^{13}C e HRMS conjuntamente com a evidência da composição centesimal atômica do composto obtida com os resultados de AE-CHN. Como informação de suporte, considerou-se relevante o valor obtido para o ponto de fusão com o método 5: 181 a 182 °C, valor correspondente ao esperado de acordo com as informações prévias de Vega e Bells (1967), e indicando que o material possuía

elevada pureza (ausência de sinais estranhos à molécula ou ao solvente nos espectros de RMN e faixa estreita de fusão).

Como critério, todas as análises deveriam confirmar a identidade química do material (BMAA), considerando a possibilidade de interpretação de cada técnica como descrito a seguir.

6.1.1 Interpretação dos espectrogramas de RMN ^{1}H

Foram observados os sinais característicos de deslocamento químico "**δ**" dos núcleos de ^{1}H identificados na **Figura 4** e descritos no **Quadro 3**. Foram considerados identificáveis apenas os sinais referentes aos núcleos H1, H1', H1'', H2, H3 e H3'. Os demais sinais possíveis seriam pouco prováveis de serem detectados devido à menor sensibilidade da técnica para esses núcleos. Isso é decorrente do fato desses núcleos se encontrarem mais "blindados" devido à presença dos átomos de oxigênio e nitrogênio, isto é, sofrem ação da alta densidade de elétrons das proximidades, suprimindo o sinal nuclear.

Nesse experimento foram avaliados o deslocamento químico "**δ**" e a integração dos sinais, que indica a proporcionalidade entre as quantidades de hidrogênios da cada grupo.

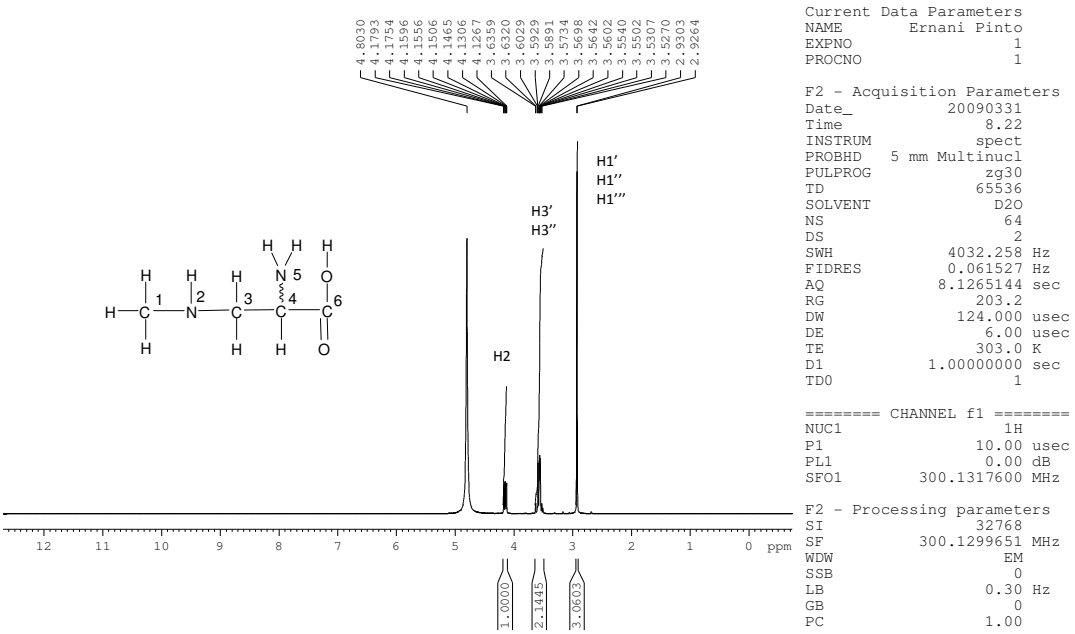
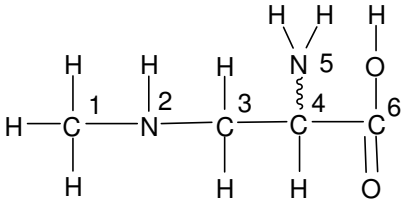


Figura 4: Espectrograma RMN ¹H obtido na análise da BMAA e ajustes do equipamento

Quadro 3: Deslocamentos químicos (δ) obtidos através de RMN ¹H para BMAA



Núcleos	Deslocamento δ (ppm)	Integração do sinal
H1	2.92 (s, 3H)	3
H3	3.58 (m, 2H)	2
H4	4.15 (t, 1H)	1
¹H da água residual do solvente	4.80	

Comparando-se os resultados obtidos por Vega e Bell (1967), Numm e O'Brien (1989) e Moura *et. al.* (2009), com as tabelas de referência de deslocamentos químicos "δ" (SILVERSTEIN, 2005), os valores de "**δ**" obtidos, coincidem com os teóricos para o ácido 2-amino-3-(metilamino) propiônico, ou BMAA.

Além dos deslocamentos químicos, a análise das proporções quantitativas entre as abundâncias dos núcleos obtidas através da integração dos sinais indica a proporção esperada: (H4)/(H3)/(H1): 1/2/3.

6.1.2 Interpretação dos espectrogramas de RMN ^{13}C

Para a técnica de RMN ^{13}C foram considerados identificáveis os sinais referentes aos deslocamentos químicos dos núcleos C1, C3, C4 e C6 (**Figura 5**). O critério adotado foi o de identificar todos os sinais.

Foram observados os sinais característicos de deslocamento químico "**δ**" dos núcleos de ^{13}C identificados na **Figura 5** e descritos no **Quadro 4**.

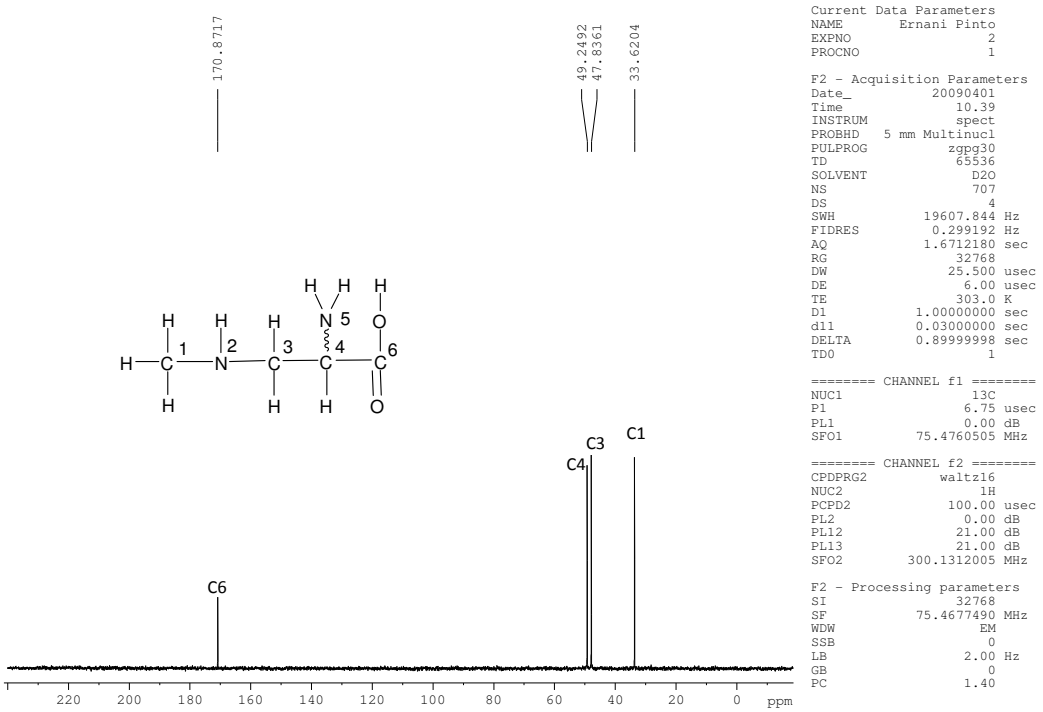
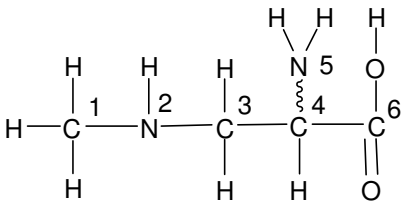


Figura 5: Espectrograma RMN ^{13}C obtido na análise da BMAA e ajustes do equipamento

Quadro 4: Deslocamentos químicos (δ) obtidos através de RMN ^{13}C para BMAA



Núcleos	Deslocamento δ (ppm)
C1	33.62
C3	49.25
C4	47,83
C6	170,87

Conforme Myers (1990), e confrontando os resultados obtidos com as tabelas de referência de deslocamentos químicos "**δ**" (SILVERSTEIN 2005), os valores de "**δ**" obtidos coincidem com os esperados para o ácido 2-amino-3-(metilamino) propiônico, ou BMAA.

6.1.3 Interpretação dos resultados através de HRMS

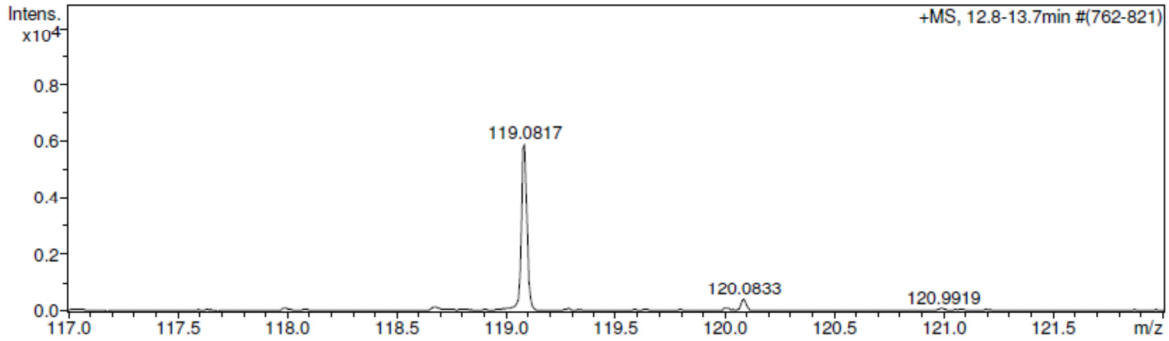
Foi detectado o íon molecular $[M+H]^+$, com relação m/z igual a 119,0817, que corresponde ao composto de fórmula química $[C_4H_{11}N_2O_2]^+$ ou seja, a molécula da BMAA ionizada por um próton hidrogênio. O erro de 1,5 ppm para a predição dessa fórmula química indica a identificação inequívoca da substância. O *software* não encontrou outra estrutura compatível com essa relação m/z. No **Quadro 5** encontram-se esses dados consolidados e na **Figura 6** o espectrograma com o resultado da análise pelo comando "*Smart Formula*" (resultados em ppm e mSigma). O resultado "*mSigma*" está relacionado com a proporção isotópica do composto iônico detectado, sendo que valores menores que 30 indicam também a identificação inequívoca.

Quadro 5: Fórmula química da espécie ionizável com massas exatas obtidas através de HRMS para a BMAA

Espécie	Fórmula química	Massa exata	Erro (ppm)
$[M+H]^+$	$[C_4H_{11}N_2O_2]^+$	119,0817	1,5

Acquisition Parameter

Source Type	ESI	Ion Polarity	Positive	Set Nebulizer	0.4 Bar
Focus	Not active	Set Capillary	4500 V	Set Dry Heater	180 °C
Scan Begin	50 m/z	Set End Plate Offset	-500 V	Set Dry Gas	4.0 l/min
Scan End	1000 m/z	Set Collision Cell RF	100.0 Vpp	Set Divert Valve	Source



Meas. m/z	#	Formula	Score	m/z	err [mDa]	err [ppm]	mSigma	rdb	e⁻ Conf	N-Rule
119.0817	1	C 4 H 11 N 2 O 2	100.00	119.0815	-0.2	-1.5	12.8	0.5	even	ok

#	m/z	I	I %	S/N
1	119.0817	5912	100.0	247.3
2	120.0833	428	7.2	17.9
3	120.9919	119	2.0	5.0

Figura 6: Espectrograma de massas em alta resolução obtido através de HRMS para a BMAA com equipamento MicroTof.

6.1.4 Resultado sobre a identidade do material

Os resultados de RMN ^{13}C, RMN ^{1}H e HRMS apoiados pelos resultados de AE e PF, confirmam a identidade do material como sendo ácido 2-amino-3-(metilamino) propiônico (BMAA) na forma de cloridrato, cadastrado no CAS com o número 17463-44-4, cuja fórmula estrutural encontra-se na **Figura 7**.

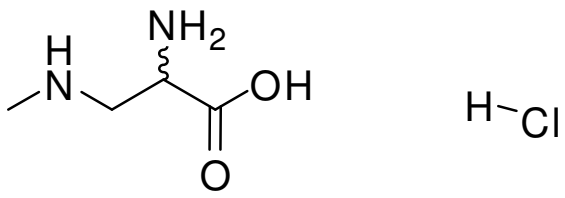


Figura 7: Estrutura química da BMAA, na forma de cloridrato, elucidada através das técnicas de RMN ^{1}H e RMN ^{13}C.

6.2 Avaliação Quantitativa

A avaliação quantitativa foi baseada nos resultados da técnica de análise elementar AE-CHN, conforme métodos 6 e 7, e a incerteza da medição foi quantificada conforme descrito no método 8.1.

Foi realizada uma série de cinco determinações, cujos resultados (desvios em relação aos valores teóricos e o desvio padrão da série) são apresentados na **Tabela 7**. Os valores teóricos foram obtidos através da aplicação *on line EPS - Chemistry CHN Calculator* indicado na **Tabela 6**. O valor da média dos resultados experimentais foi obtido através da equação (9). O erro relativo (%) refere-se à exatidão de cada medida individual em relação ao valor teórico conforme a equação (10): O desvio padrão dos resultados das determinações foi calculado segundo a equação (11).

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^{N} x_i}{N} \qquad (9)$$

Onde:

$\bar{x}$: média aritmética dos valores experimentais

N : número total de observações

i : ordem da observação

$$E_r = \frac{x_i - x_t}{x_t} \times 100\% \tag{10}$$

Onde:

E_r: erro relativo em %

x_i : i-ésimo valor experimental

x_t : valor teórico

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{N} (x_i - \bar{x})^2}{N-1}} \tag{11}$$

Onde:

σ : desvio padrão de N valores

x_i : i-ésimo valor experimental

$\bar{x}$: média aritmética dos valores experimentais

Tabela 7: Resultados da série de determinações da BMAA através de AE-CHN e respectivas médias e desvios-padrão. Entre parêntese os erros relativos individuais (erro%) em relação aos valores teóricos para cada elemento.

	Valores teóricos para BMAA,HCl		
	C	H	N
	31,08	7,17	18,12
Determinações	Valores experimentais individuais (erro%)		
	C	H	N
1	31,21 (0,42)	6,98 (-2,65)	17,92 (-1,1)
2	31,34 (0,84)	7,05 (-1,67)	18,01 (-0,61)
3	31,22 (0,45)	7,29 (1,67)	18,17 (0,28)
4	31,19 (0,35)	7,15 (-0,28)	18,11 (-0,06)
5	31,25 (0,55)	7,18 (0,14)	18,19 (0,39)
Média	31,24	7,13	18,08
desvio padrão σ	0,0589	0,1198	0,1136
Erro relativo (%) da média em relação ao valor teórico	**0,52**	**-0,56**	**-0,22**

Foi realizado o balanço de massas como indicado na equação (4), com a substituição dos valores dos módulos dos erros relativos de cada elemento C, H e N, obtendo-se:

$$p = 100 - (x_C + x_H + x_N) \tag{12}$$

$$p = 100 - (0{,}52 + 0{,}56 + 0{,}22)$$

$$p = 98{,}70\%$$

Com esses resultados foi realizada a quantificação da incerteza da medição, considerando como incerteza tipo A o desvio padrão das séries de cinco medidas e o desvio obtido da confirmação da calibração com ácido benzóico. Como incertezas tipo B foram considerados o valor de exatidão do equipamento (declarado nas especificações do fabricante) e a pureza dos padrões de calibração acetanilida e ácido benzóico.

Os valores de entrada de incerteza padrão para o cálculo da incerteza combinada e expandida através do *software* Uncertain Calculator 3.2 estão relacionados na **Tabela 8**:

Tabela 8: Incertezas padrão utilizadas para o cálculo da incerteza combinada da análise de teor através de AE-CHN

Tipo da incerteza	Valor atribuído	Origem do valor
Tipo A	0,0589	Desvio Padrão AE Carbono
Tipo A	0,1198	Desvio Padrão AE Hidrogênio
Tipo A	0.1136	Desvio Padrão AE Nitrogênio
Tipo B	0.3%	Erro máximo do equipamento (conforme fabricante) *
Tipo B	0,1%	Impureza do padrão de Acetanilida
Tipo B	0,1%	Impureza do padrão de Ácido Benzóico

*Esse erro refere-se ao equipamento de Análise Elementar e engloba o sistema como um todo, já considerando o erro da balança acoplada.

Após a alimentação com os valores, o *software* retornou o valor da incerteza expandida de **0,75**, com um fator de abrangência **k=2**.

6.3 Avaliação da Estabilidade da BMAA

Para a avaliação da estabilidade da BMAA, depois de decorrido o período de 626 dias com o material mantido sob refrigeração (2 a 8 °C), foi realizada nova avaliação qualitativa, e quantitativa, baseando-se nos resultados das técnicas de HRMS e AE-CHN conforme métodos 3 e 6.

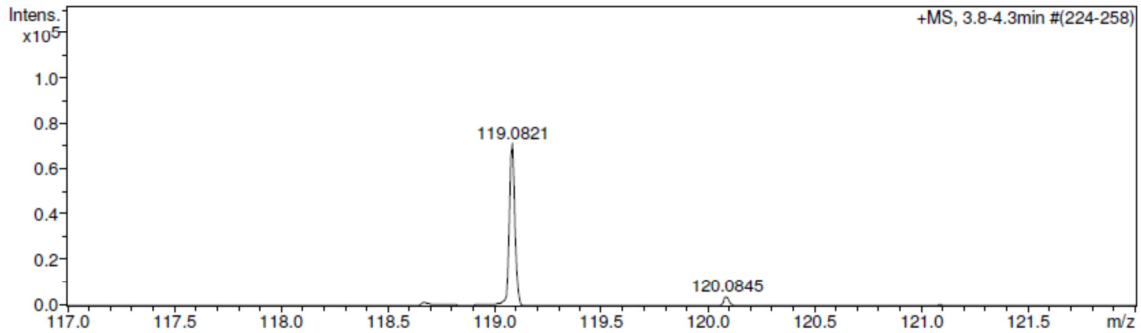
Através de HRMS foi detectado o íon molecular $[M+H]^+$, com relação m/z igual a 119,0815, que corresponde ao composto de fórmula química $[C_4H_{11}N_2O_2]^+$ ou seja, a molécula da BMAA ionizada por um próton hidrogênio. O erro de 5,3 ppm para a predição dessa fórmula química indica a identificação inequívoca da substância. O *software* não encontrou outra fórmula química compatível com essa relação m/z. A identidade molecular da substância se manteve conforme verificado através dessa análise, como pode ser visualizado no **Quadro 6** e na **Figura 8**. O resultado "mSigma" observado na **Figura 8** está relacionado com a proporção isotópica do composto iônico detectado, sendo que valores menores que 30 indicam também a identificação inequívoca.

Quadro 6: Fórmula química da espécie ionizável com massas exatas obtidas através de HRMS para a BMAA

Espécie	Fórmula química	Massa exata	Erro (ppm)
$[M+H]^+$	$[C_4H_{11}N_2O_2]^+$	119,0815	5

Acquisition Parameter

Source Type	ESI	Ion Polarity	Positive	Set Nebulizer	0.4 Bar
Focus	Not active	Set Capillary	4500 V	Set Dry Heater	180 °C
Scan Begin	50 m/z	Set End Plate Offset	-500 V	Set Dry Gas	4.0 l/min
Scan End	1000 m/z	Set Collision Cell RF	100.0 Vpp	Set Divert Valve	Source



Meas. m/z	#	Formula	Score	m/z	err [mDa]	err [ppm]	mSigma	rdb	e⁻ Conf	N-Rule
119.0821	1	C 4 H 11 N 2 O 2	100.00	119.0815	-0.6	-5.3	3.4	0.5	even	ok

#	m/z	I	I %	S/N
1	119.0821	71291	100.0	5458.4
2	120.0845	4020	5.6	307.8
3	121.0851	433	0.6	33.2

Figura 8: Espectrograma de massas em alta resolução obtido através de HRMS para a BMAA com equipamento MicroTof.

Para a avaliação quantitativa da estabilidade do material, foram realizadas 5 determinações, relacionadas na **Tabela 9**, e com as quais foi calculada a pureza e a incerteza da medição.

Tabela 9: Resultados da série de determinações da amostra de estabilidade através de AE-CHN e respectivas médias e desvio padrão. Entre parêntese os erros relativos individuais (erro%) em relação aos valores teóricos,

	Valores teóricos para BMAA,HCl		
	C	H	N
	31,08	7,17	18,12
Determinações	Valores experimentais individuais (erro%)		
	C	H	N
1	30,45 (-2,03)	7,21 (0,56)	17,85 (-1,49)
2	30,68 (-1,29)	7,12 (-0,7)	17,89 (-1,27)
3	31,25 (0,55)	7,09 (-1,12)	18,1 (-0,11)
4	30,87 (-0,68)	7,13 (-0,56)	17,92 (-1,1)
5	31,44 (1,16)	7,15 (-0,28)	18,12 (0)
Média	30,94	7,14	17,98
desvio padrão σ	0,4058	0,0447	0,1250
Erro relativo (%) da média em relação ao valor teórico	**-0,46**	**-0,42**	**-0,79**

Da mesma forma que realizado com a amostra sujeita à certificação, a amostra de estabilidade teve a incerteza da medição calculada, com as entradas relacionadas na **Tabela 10**.

$$p = 100 - (x_C + x_H + x_N) \tag{13}$$

$$p = 100 - (0{,}46 + 0{,}42 + 0{,}79)$$

$$p = 98{,}33\%$$

Tabela 10: Incertezas utilizadas para o cálculo da incerteza combinada da análise de estabilidade através de AE-CHN

Tipo da incerteza	Valor atribuído	Origem do valor
Tipo A	0,4058	Desvio Padrão AE Carbono
Tipo A	0,0447	Desvio Padrão AE Hidrogênio
Tipo A	0,1250	Desvio Padrão AE Nitrogênio
Tipo B	0.3%	Erro máximo do equipamento (conforme fabricante)
Tipo B	0,1%	Impureza do padrão de Acetanilida
Tipo B	0,1%	Impureza do padrão de Ácido Benzóico

Após a alimentação com os valores, o *software* retornou o valor da incerteza expandida de **1,09**, com um fator de abrangência **k=2**.

Os valores foram comparados com os obtidos inicialmente para o material (data próxima da obtenção do material por síntese), sendo constatado que não ocorreu variação significativa da pureza – diferença de **0,37 %** calculada pela equação (10). Esse valor foi menor que o valor da própria incerteza da medição. Foi considerado então, para fins de inclusão no certificado do material, o prazo de validade de 20 meses, a partir da data de emissão do certificado.

Com esse resultado, assumiu-se que o padrão é estável por pelo menos 20 meses nas condições ensaiadas. O período de 20 meses, ao invés de 626 dias (aproximadamente 20,5 meses), corresponde a uma margem de segurança arbitrária adotada.

6.4 Elaboração do Certificado de Análise

Por fim foi elaborado um Certificado de Análise conforme preconizado pelo ISO Guia 31, com a declaração dos valores de propriedade e incerteza da medição, apresentado no **Apêndice A**. Constam nesse certificado as informações recomendadas no mesmo guia, conforme descrito no item 2.4.1.2.

A propriedade "pureza do material", determinada nos ensaios quantitativos através de AE-CHN, teve como valor **98,7%** de pureza, com incerteza expandida de **0,75**, para um fator de abrangência **k=2** (**95% de confiança**)

O ensaio de estabilidade da substância demonstrou que a mesma permaneceu estável por até 626 dias quando armazenada em temperatura de 2 a 8 °C. Foi indicado no certificado o período de 20 meses de validade, pois se adotou a conduta de subestimar esse período como margem de segurança. A escolha foi arbitrária.

7 CONCLUSÕES

A estratégia adotada para caracterização qualitativa e quantitativa permitiu a obtenção de um material de referência analítica de elevada qualidade metrológica, tendo sido atendidos todos os requisitos técnicos aplicáveis conforme preconizado pela comunidade científica e segundo as diretrizes normativas de organismos de referência internacional como NIST, ISO e Inmetro, para a produção de Material de Referência.

Com os dados obtidos e o Certificado de Análise gerado concluiu-se com êxito o objetivo de certificação do material referência cloridrato de β-N-metilamino-alanina para a propriedade pureza, obtendo-se assim um MRC.

Dessa maneira, os estudos realizados neste trabalho mostraram que:

(i) A BMAA foi obtida na forma de cloridrato, por síntese e purificação e apresentou elevado grau de pureza, conforme resultados obtidos por Análise Elementar de CHN.

(ii) A identificação da composição centesimal entre os átomos presentes na molécula da BMAA foi realizada com sucesso por HRMS, RMN ^{1}H e RMN ^{13}C. Foi obtido um resultado definitivo apoiado pelos resultados da análise elementar (AE) e pelo valor do PF.

(iii) A elucidação da estrutura molecular da BMAA foi possível através das técnicas de HRMS, RMN ^{1}H e RMN ^{13}C.

(iv) A determinação qualitativa confirmou a identidade do material através da composição centesimal dos átomos na molécula e pela elucidação da estrutura química. A determinação quantitativa (pureza) do material foi realizada através do balanço de massas utilizando-se os resultados de análise elementar (AE).

(v) Foi possível determinar a incerteza da medição conforme a metodologia indicada nos guias ISO GUM e ISO GUIDE 35, avaliando-se incertezas do Tipo A e Tipo B. Foram calculadas as incertezas padrão e combinada, e finalmente a incerteza expandida para um nível de confiança de 95%.

(vi) A BMAA não apresentou degradação significativa durante o período de teste, tendo sido atribuída validade de 20 meses ao material, quando armazenado em temperatura de 2 a 8 °C.

(vii) A técnica de Análise Elementar CHN utilizada para determinação da pureza da BMAA mostrou-se adequada para caracterização da pureza propriamente dita, permitindo a observação de valores rastreáveis a unidades do SI, certificando assim a pureza do material.

7.1 Oportunidades

O modelo adotado para a certificação do material de referência, com a utilização de metodologias primárias e amplamente aceitas pela comunidade científica como definitivas, se mostrou adequado para a BMAA e pode ser expandido para a certificação de outras substâncias, sejam toxinas ou outros compostos orgânicos obtidos *in-house*, mantidas as devidas proporções com a complexidade do composto. Dependendo da estrutura química da substância, faz-se necessária avaliação criteriosa, analisando as peculiaridades de cada molécula e quais são as informações relevantes, para um planejamento analítico apropriado e confiável. Dessa forma, outras técnicas analíticas, sobretudo as primárias, podem servir aos propósitos da certificação de materiais de referência.

Com o desenvolvimento do projeto do Inmetro para acreditação de produtores de materiais de referência, que se encontra em fase piloto (INMETRO. 2010c, INMETRO 2010d), abre-se uma grande perspectiva para a consolidação dessa prática no país, fomentando o surgimento de novos produtores de materiais, gerando competitividade da produção nacional e posicionando o país em destaque no cenário mundial, junto aos grandes polos como Estado Unidos da América, Europa e eixo Ásia-Pacífico.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABNT. ISO GUIA 32: 2000. Calibração em química analítica e uso de materiais de referência certificados. Associação Brasileira de Normas Técnicas. Brasil.

ABNT. ISO GUIA 30: 2000. Termos e definições relacionados a materiais de referência. Associação Brasileira de Normas Técnicas. Brasil.

ABNT. ISO GUIA 33: 2002. Utilização de materiais de referência certificados. Associação Brasileira de Normas Técnicas. Brasil.

ABNT. ISO GUIA 31: 2004. Materiais de Referência - conteúdo de certificados e rótulos. Associação Brasileira de Normas Técnicas. Brasil.

ABNT. ISO GUIA 34: 2004. Requisitos gerais para a competência de produtores de material de referência. Associação Brasileira de Normas Técnicas. Brasil.

ABNT. NBR ISO/IEC 17025: 2005. Requisitos gerais para competência de laboratórios de ensaio e calibração. Associação Brasileira de Normas Técnicas. Brasil.

ABNT. NBR ISO 9000: 2005. Sistema de gestão da qualidade - Fundamentos e vocabulário. Associação Brasileira de Normas Técnicas. Brasil.

ABNT. NBR ISO 9001: 2008. Sistemas de Gestao da Qualidade. Associação Brasileira de Normas Técnicas. Brasil.

ARDREY, R. E. Liquid chromatography-mass spectrometry: an introduction. University of Huddersfield, Huddersfield, UK: John Wiley & Sons, Ltd., 2003. (Analytical Techniques in the Sciences (AnTS)).

ATIKOVIC, E. Evaluation of a new DNA amplification technique to screen cyanobacteria isolated from drinking water sources for microcystin toxins. Norse Scientist [S.I.], 2003.

BALOGH, M. P. Debating Resolution and Mass Accuracy. Spectroscopy, n. 19 (10), 2004. Disponível em:<http://spectroscopyonline.findanalytichem.com/spectroscopy/data/articlestandard//spectroscopy/422004/128057/article.pdf>. Acesso em: 02/12/2010.

BAM. Federal Institute for Materials Research and Testing - Germany. 2010. Disponível em: http://www.bam.de/en/index.htm. Acesso em: 28/05/2010.

BANACK, S. A.; JOHNSON, H. E.; CHENG, R.; COX, P. A. Production of the neurotoxin BMAA by a marine cyanobacterium. Marine Drugs [S.I.], v. 5, n. 4, p. 180-196, 2007.

BARWICK, V.; LANGLEY, J.; MALLET, T.; STEIN, B.; WEBB, K. Best practice guide for generating mass spectra. Royal Society of Chemistry, 2006.

BIÈVRE, P. D.; TAYLOR, P. D. P. Traceability to the SI of amount-of-substance measurements: from ignoring to realizing, a chemist's view. Metrologia [S.I.], v. 34, n. 1, p. 67, 1997.

BIMP. The International System of Units (SI). Bureau international des poids et mesures. 2010b. Disponível em: http://www.bipm.org/en/si Acesso em: 13/05/2010.

BIPM. BIPM: Bureau International des Poids et Mesures. 2010a. Disponível em: http://www.bipm.org. Acesso em: 12/05/2010.

BRAMER, S. E. V. An Introduction to Mass Spectrometry. 1998. Disponível em:<http://science.widener.edu/svb/massspec/massspec.pdf>. Acesso em: 10/02/2010.

BRASIL. PORTARIA N.º 518, DE 25 DE MARÇO DE 2004. In: SAÚDE, M. D. (Ed.). v. Seção 1. Brasília: Diário Oficial da União, 2004. p. Pg. 22.

BUENZ, E. J.; HOWE, C. L. Beta-methylamino-alanine (BMAA) injures hippocampal neurons in vivo. NeuroToxicology [S.I.], v. 28, n. 3, p. 702-704, 2007.

CARMICHAEL, W. W. Toxins of Cyanobacteria. Scientific American [S.I.], v. 270, n. 1, p. 78-86, 1994.

CARMICHAEL, W. W. The CyanotoxinsAdvances in Botanical Research: Academic Press, 1997. p. 211-256.

CHANG, Y. C.; CHIU, S. J.; KAO, K. P. beta-N-methylamino-L-alanine (L-BMAA) decreases brain glutamate receptor number and induces behavioral changes in rats. Chin J Physiol [S.I.], v. 36, n. 2, p. 79-84, 1993.

CHORUS, I.; BARTRAM, J. (Eds.) Toxic Cyanobacteria in Water: A guide to their public health consequences, monitoring and management: E & FN Spo, ed. 1999.

COMAR. User Guide. How to search the COMAR database? Germany: Code d'Indexation des Materiaux de Réference - The Database for Certified Reference Materials, 2008. Disponível em:<http://www.comar.bam.de/en/comar_information/comar_user_guide.pdf>. Acesso em: 28/05/2010.

COMAR. COMAR: The database for certified reference materials. Code d'Indexation des Materiaux de Réference - The Database for Certified

Reference Materials. 2010. Disponível em: http://www.comar.bam.de/en/. Acesso em: 28/05/2010.

COX, P. A.; BANACK, S. A.; MURCH, S. J. Biomagnification of cyanobacterial neurotoxins and neurodegenerative disease among the Chamorro people of Guam. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America [S.I.], v. 100, n. 23, p. 13380-13383, 2003.

COX, P. A.; BANACK, S. A.; MURCH, S. J.; RASMUSSEN, U.; TIEN, G.; BIDIGARE, R. R.; METCALF, J. S.; MORRISON, L. F.; CODD, G. A.; BERGMAN, B. Diverse taxa of cyanobacteria produce beta-N-methylamino-l-alanine, a neurotoxic amino acid. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America [S.I.], v. 102, n. 14, p. 5074-5078, April 5, 2005 2005.

DANIEL, E. H. Quality Control of Documents. Library Trends [S.I.], v. Vol. 41, n. 4 Spring 1993, p. 644-64, 23/05/2010 1993.

DÖRR, F. A.; PINTO, E.; SOARES, R. M.; FELICIANO DE OLIVEIRA E AZEVEDO, S. M. Microcystins in South American aquatic ecosystems: Occurrence, toxicity and toxicological assays. Toxicon [S.I.], v. 56, n. 7, p. 1247-1256, 2010b.

DÖRR, F. A.; RODRÍGUEZ, V.; MOLICA, R.; HENRIKSEN, P.; KROCK, B.; PINTO, E. Methods for detection of anatoxin-a(s) by liquid chromatography coupled to electrospray ionization-tandem mass spectrometry. Toxicon [S.I.], v. 55, n. 1, p. 92-99, 2010a.

DUEWER, D. L.; PARRIS, R. M.; V, E. W.; MAY, W. E.; ELBAUM, H. NIST Special Publication 1012: An approach to the metrologically sound traceable assessment of the chemical purity of organic reference materials. National Institute of Standards and Technology, 2004.

ELLISON, L. R., STEPHEN. Using validation data for ISO measurement uncertainty estimation Part 1. Principles of an approach using cause and effect analysis. Analyst [S.I.], v. 123, n. 6, p. 1387-1392, 1998.

ELLISON, S. L. R. Uncertainties in qualitative testing and analysis. Accreditation and Quality Assurance: Journal for Quality, Comparability and Reliability in Chemical Measurement [S.I.], v. 5, n. 8, p. 346-348, 2000.

ELLISON, S. L. R.; GREGORY, S.; HARDCASTLE, W. A. PerspectiveQuantifying uncertainty in qualitative analysis. Analyst [S.I.], v. 123, n. 5, p. 1155-1161, 1998.

EMONS, H. The 'RM family'—Identification of all of its members. Accreditation and Quality Assurance: Journal for Quality, Comparability and Reliability in Chemical Measurement [S.I.], v. 10, n. 12, p. 690-691, 2006.

EMONS, H.; FAJGELJ, A.; VAN DER VEEN, A.; WATTERS, R. New definitions on reference materials. Accreditation and Quality Assurance: Journal for Quality, Comparability and Reliability in Chemical Measurement [S.I.], v. 10, n. 10, p. 576-578, 2006.

EPSTEIN, M. S. The independent method concept for certifying chemical-composition reference materials. Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy [S.I.], v. 46, n. 12, p. 1583-1591, 1991.

EURACHEM. EEE/RM/062rev3: 2000. The Selection and use of Reference Materials.

EURACHEM/CITAC. Guide number 4: 2000. Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement.

EURACHEM/CITAC. Guide to Quality in Analytical Chemistry - An Aid to Accreditation. 2002.

EURACHEM/CITAC. Traceability in Chemical Measurement - A guide to achieving comparable results in chemical measurement. 2003.

FLANAGAN, F. J. Reference Samples in Geology and Geochemistry. Geostandards Newsletter [S.I.], v. 10, n. 2, p. 191-194, 1986.

HOLCOMBE, G.; LAWN, R.; SARGENT, M. Improvements in efficiency of production and traceability for certification of reference materials. Accreditation and Quality Assurance: Journal for Quality, Comparability and Reliability in Chemical Measurement [S.I.], v. 9, n. 4, p. 198-204, 2004.

ICH. Q1A(R2): 2003. Q1A(R2): Stability testing of new drug substances and products. International Conference On Harmonisation Of Technical Requirements For Registration Of Pharmaceuticals For Human Use. Genève, Switzerland.

INMETRO. NIT-DICLA-021, REV 03: 2007a. Expressão da incerteza da medição. Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. Rio de Janeiro.

INMETRO. SI: Sistema Internacional de Unidades. 8a. Edição Revisada. ed. Rio de Janeiro: Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial, 2007b.

INMETRO. VIM 2008: 2009. Vocabulário Internacional de Metrologia: conceitos fundamentais e gerais e termos associados (VIM 2008). Instituto Nacional de Metrologia Normalização e Qualidade Industrial. Rio de Janeiro. Brasil.

INMETRO. Metrologia CientÍfica e Industrial. 2010a. Disponível em: http://www.inmetro.gov.br/metcientifica/. Acesso em: 12/05/2010.

INMETRO. O que é acreditação. 2010b. Disponível em: http://www.inmetro.gov.br/credenciamento/oqe_acre.asp. Acesso em: 15/07/2010.

INMETRO. Projeto Piloto para Acreditação de Produtores de Materiais de Referência. 2010c. Disponível em: http://www.inmetro.gov.br/credenciamento/produtoresMat.asp. Acesso em: 15/07/2010.

INMETRO. NIT-DICLA-46_01: 2010d. Acreditação de produtores de materiais de referência em fase piloto. Instituto Nacional de Metrologia Normalização e Qualidade Industrial. Rio de Janeiro. Brasil.

ISO. GUIDE 35: 2006. Reference materials — General and statistical principles for certification. International Organization for Standardization. Geneve, Switzerland.

ISO/IEC. Guide 98-3: 2008. Uncertainty of measurement -- Part 3: Guide to the expression of uncertainty in measurement (GUM:1995). International Organization for Standardization. Geneva.

JANCKE, H.; MALZ, F.; HAESSELBARTH, W. Structure analytical methods for quantitative reference applications. Accreditation and Quality Assurance: Journal for Quality, Comparability and Reliability in Chemical Measurement [S.I.], v. 10, n. 8, p. 421-429, 2005.

JOCHIMSEN, E. M.; CARMICHAEL, W. W.; AN, J.; CARDO, D. M.; COOKSON, S. T.; HOLMES, C. E. M.; ANTUNES, M. B.; DE MELO FILHO, D. A.; LYRA, T. M.; BARRETO, V. S. T.; AZEVEDO, S. M. F. O.; JARVIS, W. R. Liver Failure and Death after Exposure to Microcystins at a Hemodialysis Center in Brazil. New England Journal of Medicine [S.I.], v. 338, n. 13, p. 873-878, 1998.

KIPPHARDT, H.; MATSCHAT, R.; RIENITZ, O.; SCHIEL, D.; GERNAND, W.; OETER, D. Traceability system for elemental analysis. Accreditation and Quality Assurance: Journal for Quality, Comparability and Reliability in Chemical Measurement [S.l.], v. 10, n. 11, p. 633-639, 2006.

KRÜGER, T.; MÖNCH, B.; OPPENHÄUSER, S.; LUCKAS, B. LC-MS/MS determination of the isomeric neurotoxins BMAA ([beta]-N-methylamino-l-alanine) and DAB (2,4-diaminobutyric acid) in cyanobacteria and seeds of Cycas revoluta and Lathyrus latifolius. Toxicon [S.l.], v. 55, n. 2-3, p. 547-557, 2010/3// 2010.

LOBNER, D.; PIANA, P. M. T.; SALOUS, A. K.; PEOPLES, R. W. [beta]-N-methylamino-l-alanine enhances neurotoxicity through multiple mechanisms. Neurobiology of Disease [S.l.], v. 25, n. 2, p. 360-366, 2007.

MA, T. S.; GUTTERSON, M. Organic elemental analysis. Analytical Chemistry [S.l.], v. 46, n. 5, p. 437-451, 1974.

MARLER, T. E.; SNYDER, L. R.; SHAW, C. A. Cycas micronesica (Cycadales) plants devoid of endophytic cyanobacteria increase in [beta]-methylamino-l-alanine. Toxicon [S.l.], v. 56, n. 4, p. 563-568, 2010.

MAY, W.; PARRIS, R.; BECK, C.; FASSETT, J.; GREENBERG, R.; GUENTHER, F.; KRAMER, G.; WISE, S. NIST Special Publication 260-136 - Standard Reference Materials: Definitions of Terms and Modes Used at NIST for Value-Assignment of Reference Materials for Chemical Measurements. Gaithersburg: National Institute of Standards and Technology, 2000. (260-136).

METCALF, J. S.; BANACK, S. A.; LINDSAY, J.; MORRISON, L. F.; COX, P. A.; CODD, G. A. Co-occurrence of β-N-methylamino-l-alanine, a neurotoxic amino acid with other cyanobacterial toxins in British waterbodies, 1990–2004. Environmental Microbiology [S.l.], v. 10, n. 3, p. 702-708, 2008.

MIL'MAN, B. L.; KONOPEL'KO, L. A. Uncertainty of Qualitative Chemical Analysis: General Methodology and Binary Test Methods. Journal of Analytical Chemistry [S.I.], v. 59, n. 12, p. 1128-1141, 2004.

MOODY, J. R.; EPSTEIN, M. S. Definitive measurement methods. Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy [S.I.], v. 46, n. 12, p. 1571-1575, 1991.

MOURA, S.; ULTRAMARI, M. D. A.; DE PAULA, D. M. L.; YONAMINE, M.; PINTO, E. 1H NMR determination of [beta]-N-methylamino-l-alanine (l-BMAA) in environmental and biological samples. Toxicon [S.I.], v. 53, n. 5, p. 578-583, 2009.

MSU. Michigan State University. Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. 2010a. Disponível em: http://www2.chemistry.msu.edu/faculty/reusch/VirtTxtJml/Spectrpy/nmr/nmr1.htm. Acesso em: 25/09/2010.

MSU. Michigan State University. Mass Spectrometry. Department of Chemistry. 2010b. Disponível em: http://www2.chemistry.msu.edu/faculty/reusch/VirtTxtJml/Spectrpy/MassSpec/masspec1.htm#ms1. Acesso em: 01/11/2010.

MURCH, S. J.; COX, P. A.; BANACK, S. A. A mechanism for slow release of biomagnified cyanobacterial neurotoxins and neurodegenerative disease in Guam. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America [S.I.], v. 101, n. 33, p. 12228-12231, August 17 2004.

MYERS, T. G.; NELSON, S. D. Neuroactive carbamate adducts of beta-N-methylamino-L-alanine and ethylenediamine. Detection and quantitation under physiological conditions by 13C NMR. Journal of Biological Chemistry [S.I.], v. 265, n. 18, p. 10193-10195, June 25, 1990 1990.

NEDELJKOV, V.; LOPIČIĆ, S.; PAVLOVIĆ, D.; ČEMERIKIĆ, D. Electrophysiological Effect of β-N-Methylamino-L-Alanine on Retzius Nerve Cells of the Leech Haemopis sanguisuga. v. 1048: Blackwell Publishing Ltd, 2005. p. 349-351.

NUNN, P. B.; O'BRIEN, P. The interaction of [beta]-N-methylamino-L-alanine with bicarbonate: an 1H-NMR study. FEBS Letters [S.I.], v. 251, n. 1-2, p. 31-35, 1989.

NUNN, P. B.; SEELIG, M.; ZAGOREN, J. C.; SPENCER, P. S. Stereospecific acute neuronotoxicity of [`]uncommon' plant amino acids linked to human motor-system diseases. Brain Research [S.I.], v. 410, n. 2, p. 375-379, 1987.

OREN, A. A proposal for further integration of the cyanobacteria under the Bacteriological Code. Int J Syst Evol Microbiol [S.I.], v. 54, n. 5, p. 1895-1902, September 1, 2004 2004.

PINTO, T. J. A.; KANEKO, T. M.; OHARA, M. T. Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos, correlatos e cosméticos. São Paulo: Atheneu Editora São Paulo Ltda., 2000.

POURIA, S.; DE ANDRADE, A.; BARBOSA, J.; CAVALCANTI, R. L.; BARRETO, V. T. S.; WARD, C. J.; PREISER, W.; POON, G. K.; NEILD, G. H.; CODD, G. A. Fatal microcystin intoxication in haemodialysis unit in Caruaru, Brazil. The Lancet [S.I.], v. 352, n. 9121, p. 21-26, 1998.

RASBERRY, S. D.; GILLS, T. E. The certification, development and use of standard reference materials. Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy [S.I.], v. 46, n. 12, p. 1577-1582, 1991.

RÍOS, A.; BARCELÓ, D.; BUYDENS, L.; CÁRDENAS, S.; HEYDORN, K.; KARLBERG, B.; KLEMM, K.; LENDL, B.; MILMAN, B.; NEIDHART, B.; STEPHANY, R. W.; TOWNSHEND, A.; ZSCHUNKE, A.; VALCÁRCEL, M.

Quality assurance of qualitative analysis in the framework of the European project 'MEQUALAN'. Accreditation and Quality Assurance: Journal for Quality, Comparability and Reliability in Chemical Measurement [S.I.], v. 8, n. 2, p. 68-77, 2003.

RIPPKA, R.; DERUELLES, J.; WATERBURY, J. B.; HERDMAN, M.; STANIER, R. Y. Generic Assignments, Strain Histories and Properties of Pure Cultures of Cyanobacteria. J Gen Microbiol [S.I.], v. 111, n. 1, p. 1-61, March 1, 1979 1979.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. Spectrometric Identification of Organic Compounds. 7th. ed.: John Wiley & Sons, Inc, 2005.

SIMONS, W. W. (Ed.) The Sadtler Handbook of Proton NMR Spectra, 1254 ed. 1978.

SPENCER, P.; NUNN, P.; HUGON, J.; LUDOLPH, A.; ROSS, S.; ROY, D.; ROBERTSON, R. Guam amyotrophic lateral sclerosis-parkinsonism-dementia linked to a plant excitant neurotoxin. Science [S.I.], v. 237, n. 4814, p. 517-522, July 31, 1987 1987.

TAYLOR, J. K. (Ed.) NIST Special Publication 260-100: Handbook for SRM users. Standard Reference Material. Gaithersburg, MD: National Institute of Standards and Technology, p, Standard Reference Materialed. 1993.

THOMPSON, M. (Ed.) CHNS Elemental Analysers. AMC Technical Briefs The Royal Society of Chemistry, p, AMC Technical Briefs ed. 2008.

VEGA, A.; BELL, E. A. [alpha]-Amino-[beta]-methylaminopropionic acid, a new amino acid from seeds of Cycas circinalis. Phytochemistry [S.I.], v. 6, n. 5, p. 759-762, 1967.

WEBB, K.; BRISTOW, T.; SARGENT, M.; STEIN, B. (Eds.) Methodology for Accurate Mass Measurement of Small Molecules. Teddington, UK: Royal Society of Chemistry, 30 ed. 2004.

WEISS, J. H.; KOH, J. Y.; CHOI, D. W. Neurotoxicity of[beta]-N-methylamino-l-alanine (BMAA) and[beta]-N-oxalylamino-l-alamine (BOAA) on cultured cortical neurons. Brain Research [S.l.], v. 497, n. 1, p. 64-71, 1989.

WIEGAND, C.; PFLUGMACHER, S. Ecotoxicological effects of selected cyanobacterial secondary metabolites a short review. Toxicology and Applied Pharmacology [S.l.], v. 203, n. 3, p. 201-218, 2005.

WILLIAMS, R. L. Official USP Reference Standards: Metrology concepts, overview, and scientific issues and opportunities. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis [S.l.], v. 40, n. 1, p. 3-15, 2006.

9 APÊNDICE A – CERTIFICADO DE ANÁLISE DA BMAA

Na próxima página encontra-se o modelo para o Certificado de Análise do material de referência cloridrato de BMAA, lote 01.

Laboratório de Toxinas e Produtos Naturais de Algas

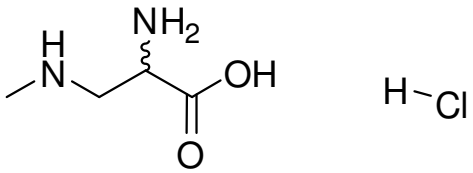
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo / SP

Av. Prof. Lineu Prestes, 580,
Bloco 17 – Cidade Universitária
São Paulo – SP – CEP 05508-900

CERTIFICADO DE ANÁLISE – C001

BMAA (cloridrato de β-*N*-metil-amino--alanina) – lote 01

CAS: 16676-91-8



Propriedade Certificada	Pureza	
	Valor Certificado [1] (% em massa)	Incerteza [2] (% em massa)
Valores	98,70	0,75

Data do Certificado	09/12/2010
Validade do Certificado/material	20 meses
Uso pretendido	Padrão Analítico
Armazenamento	2 a 8 °C
Utilização	Tal qual

(1) O valor certificado é rastreável ao SI com as limitações da incerteza declarada.
(2) A incerteza declarada é a incerteza expandida calculada usando-se um fator de abrangência k=2, correspondendo a um nível de confiança de aproximadamente 95%.

Avaliação Qualitativa	
RMN ^{1}H	De acordo
RMN ^{13}C	De acordo
Espectrometria de Massas	De acordo
Ponto de Fusão (181-182 °C)	De acordo
Avaliação Quantitativa	
Análise Elementar	Pureza conforme declarado

Responsável: _____

10 APÊNDICE B – DEFINIÇÕES DE TERMOS RELACIONADOS À METROLOGIA

Metrologia: Ciência da medição e suas aplicações. Engloba todos os aspectos teóricos e práticos da medição, qualquer que seja a incerteza ou o campo de aplicação (INMETRO. VIM 2008, 2009).

Medição: Conjunto de ações que têm por objetivo determinar um valor de uma grandeza (INMETRO. VIM 2008, 2009).

Valor (de uma grandeza): Expressão quantitativa de uma grandeza específica, geralmente sob a forma de uma unidade multiplicada por um número. Ex: Pureza de BMAA em um MR = 99,8% (reflete a concentração de BMAA na amostra em uma relação massa/massa) (INMETRO. VIM 2008, 2009).

Mensurando: Grandeza específica submetida à medição. Ex: a "concentração de BMAA" ou "pureza" do exemplo anterior (INMETRO. VIM 2008, 2009).

Grandeza: Atributo de um fenômeno, corpo ou substância que pode ser qualitativamente distinguido e quantitativamente determinado (concentração - %) (INMETRO. VIM 2008, 2009).

Padrão Primário: Padrão que é designado ou amplamente reconhecido como tendo as mais altas qualidades metrológicas e cujo valor é aceito sem referência a outros padrões de mesma grandeza, dentro de um contexto especificado. Esse conceito é válido tanto para unidades de base como derivadas do SI (ABNT. ISO GUIA 30, 2000).

Padrão Secundário: Padrão cujo valor é estabelecido por comparação a um padrão primário da mesma grandeza (ABNT. ISO GUIA 30, 2000).

Acreditação: É o reconhecimento formal por um organismo de acreditação, de que um organismo de Avaliação da Conformidade - OAC (laboratório, organismo de certificação ou organismos de inspeção), atende a requisitos previamente definidos e demonstra ser competente para realizar suas atividades com confiança (INMETRO, 2010b).

Em relação aos materiais de referência, o ISO GUIA 30:2000 (ABNT. ISO GUIA 30, 2000) apresenta ainda as seguintes definições:

Material de referência: material ou substância que tem um ou mais valores de propriedades que são suficientemente homogêneos e bem estabelecidos para ser usado na calibração de um aparelho, na avaliação de um método de medição ou atribuição de valores a materiais.

Material de referência certificado: material de referência, acompanhado por um documento chamado de certificado com um ou mais valores de propriedade, certificado por um procedimento que estabelece sua rastreabilidade à obtenção exata da unidade na qual os valores da propriedade são expressos, com cada valor certificado acompanhado por uma incerteza para um nível de confiança estabelecido.

Homogeneidade: condição de uniformidade de estrutura ou composição com respeito a uma ou mais propriedades especificadas.

Estabilidade: capacidade do material de referência de manter o valor de uma determinada propriedade dentro de limites especificados por um período de tempo estabelecido, quando armazenado nas condições especificadas.

Certificação do Material de Referência: o procedimento através do qual são estabelecidos os valores de uma ou mais propriedades de um material ou substância, por um processo que assegura a rastreabilidade à compreensão exata das unidades nas quais os valores das propriedades são expressos.

Certificado de um material de referência é o documento que acompanha um material de referência certificado, declarando um ou mais valores de propriedades e suas incertezas e confirmando que os procedimentos necessários foram realizados para assegurar sua validade e rastreabilidade.