

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz



FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO DE TECNOLOGIA EM FÁRMACOS - FARMANGUINHOS / CTM
ESPECIALIZAÇÃO EM TECNOLOGIAS INDUSTRIAIS FARMACÊUTICAS

ALUNA: THISSIANE BITTENCOURT

VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA DE DOSEAMENTO DOS
ÁCIDOS TRITERPÊNICOS EM EXTRATO DA ESPÉCIE *Rosmarinus*
officinalis

Rio de Janeiro

2015

THISSIANE BITTENCOURT

VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA DE DOSEAMENTO DOS
ÁCIDOS TRITERPÊNICOS EM EXTRATO DA ESPÉCIE *Rosmarinus
officinalis*

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao programa de pós-graduação no Instituto de Tecnologia em Fármacos – Farmanguinhos (FIOCRUZ), para obtenção do grau de especialista em Tecnologias Industriais Farmacêuticas.
Orientador: Dr. Marcelo Raul Romero Tappin

Rio de Janeiro
2015

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Medicamentos e Fitomedicamentos/ Farmanguinhos / FIOCRUZ - RJ

B624v Bittencourt, Thissiane

Validação de metodologia analítica de doseamento dos ácidos triterpênicos em extrato da espécie: *Rosmarinus officinalis*. / Thissiane Bittencourt – Rio de Janeiro, 2015.

vi, 27f. il ; 30 cm.

Orientador: Dr. Marcelo Raul Romero Tappin

Monografia (especialização) – Instituto de Tecnologia em Fármacos – Farmanguinhos, Pós-graduação em Tecnologias Industriais Farmacêuticas, 2015.

Bibliografia: f. 26-27

1. Validação. 2. Doseamento. 3. Ácidos triterpênicos
4. *Rosmarinus officinalis*. 5. Título.

CDD 615.1

THISSIANE BITTENCOURT

VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA DE DOSEAMENTO DOS
ÁCIDOS TRITERPÊNICOS EM EXTRATO DA ESPÉCIE *Rosmarinus*
officinalis

Aprovada em _____ de _____ de _____.

Dra. Lais Bastos da Fonseca

Dr. José Luiz Mazzei da Costa

MSc. Igor Cunha Cardoso

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Marcelo Raul Romero Tappin, não só pela orientação, mas também pelo incentivo, confiança e amizade, neste tempo de convivência.

A minha família e amigos pelo apoio e compreensão.

E principalmente a Deus, pois sem ele eu não chegaria até aqui.

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| Resumo | 01 |
| Abstract | 02 |
| 1. Introdução | 03 |
| 1.1 Conjuntura..... | 03 |
| 1.2 Validação..... | 03 |
| 1.3 Ácidos triterpênicos pentacíclicos..... | 04 |
| 1.4 A espécie <i>Rosmarinus officinalis</i> | 06 |
| 1.5 Relevância | 06 |
| 2. Justificativa | 07 |
| 3. Objetivo | 08 |
| 3.1 Objetivo geral..... | 08 |
| 3.2 Objetivos específicos..... | 08 |
| 4. Metodologia | 09 |
| 4.1 Equipamentos..... | 09 |
| 4.2 Reagentes..... | 09 |
| 4.3 Substância de referência..... | 09 |
| 4.4 Amostra..... | 09 |
| 4.5 Método analítico..... | 09 |
| 4.5.1 Parâmetros cromatográficos..... | 09 |
| 4.5.2 Preparo do indicador..... | 10 |
| 4.5.3 Derivatização..... | 10 |
| 4.5.4 Preparo da amostra..... | 10 |
| 4.5.5 Curva de calibração..... | 10 |
| 4.6 Ensaio para validação de metodologia analítica..... | 11 |
| 4.6.1 Seletividade..... | 11 |
| 4.6.1.1 Impurezas..... | 11 |
| 4.6.1.2 Substâncias de degradação..... | 11 |
| 4.6.2 Linearidade..... | 12 |
| 4.6.3 Precisão..... | 12 |
| 4.6.4 Robustez..... | 12 |
| 4.6.5 Exatidão/Recuperação..... | 13 |

| | |
|---|-----------|
| 4.6.6 Estabilidade da solução das amostras..... | 14 |
| 4.6.7 Limite de detecção..... | 14 |
| 4.7 Software de planejamento estatístico..... | 14 |
| 5. Resultados e Discussão..... | 15 |
| 5.1 Ajustes realizados durante a validação..... | 15 |
| 5.2 Seletividade..... | 16 |
| 5.2.1 Impurezas..... | 16 |
| 5.2.2 Substâncias de degradação..... | 17 |
| 5.3 Linearidade..... | 21 |
| 5.4 Estabilidade da solução de amostras..... | 22 |
| 5.5 Limite de detecção..... | 23 |
| 5.6 Robustez..... | 23 |
| 5.7 Precisão..... | 24 |
| 5.8 Recuperação/Exatidão..... | 26 |
| 6. Conclusão..... | 28 |
| 7. Desdobramentos..... | 29 |
| 8. Bibliografias..... | 30 |

Resumo

Os requisitos para registro de medicamentos fitoterápicos, corretamente, estão se igualando aos dos medicamentos sintéticos e entre estes requisitos está o desenvolvimento e validação de metodologias analíticas para todas as etapas de produção de fitoterápicos. A validação garante que a metodologia é adequada sendo seus resultados confiáveis. Os ácidos oleanólico, betulínico e ursólico são de ocorrência ampla na natureza, possuem várias atividades farmacológicas relatadas, como anti-inflamatória e anti-cancerígena e estão presentes em grandes quantidades em espécies de fácil manejo como a *Rosmarinus officinalis*. O objetivo deste trabalho foi validar a metodologia de doseamento dos ácidos triterpênicos em extratos da espécie *Rosmarinus officinalis*. Este método dará suporte ao projeto de isolamento dos ácidos triterpênicos para uma futura certificação como material de referência.

Abstract

The registration requirements for herbal medicines are, correctly, matching to those of synthetic drugs. Among these requirements is the submission of validated analytical methods for all production steps. Validation ensures that the method is suitable for its intended use by presenting reliable results. Oleanolic acid, betulinic and ursolic acids have a wide occurrence in nature, have several reported pharmacological properties, such as anti-inflammatory and anti-carcinogenic, and are present in large quantities in easily manageable species such as *Rosmarinus officinalis*. The objective of this study was to validate the analytical method for the determination of triterpenic acids in extracts of the *Rosmarinus officinalis* species. This method will support the project for the isolation of these triterpenic acids and their further certification.

1. Introdução

1.1 Conjuntura

O mercado farmacêutico brasileiro é estimado em US\$ 26,4 bilhões em 2013 (Deloitte, 2014) sendo o mercado nacional de fitoterápicos estimado em apenas US\$ 540 milhões (Freitas, 2007). Há portanto, um grande potencial de crescimento e, por esse motivo, o desenvolvimento de fitoterápicos é visto como o caminho para o desenvolvimento da indústria farmacêutica nacional. Como forma de fomentar este crescimento, o governo do Brasil instituiu a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (Brasil, 2006). No entanto, o desenvolvimento de medicamentos fitoterápicos, assim como o desenvolvimento de medicamentos sintéticos, é um processo laborioso e complexo visando garantir a eficácia e segurança do uso. Especificamente no caso dos medicamentos fitoterápicos, na última década, os requisitos para o registro têm se tornado mais exigentes e vêm igualando-se aos requisitos dos medicamentos sintéticos (ANVISA, 2014). Uma parte dos requisitos exigidos trata da apresentação de métodos analíticos para controle da qualidade das três etapas tecnológicas da produção de um medicamento fitoterápico: a droga vegetal, o derivado de droga vegetal e o medicamento em si. Para os três é necessário apresentar metodologia analítica validada para a quantificação dos marcadores, que é substância ou classe de substâncias (ex.: alcaloides, flavonoides, ácidos graxos, etc.) utilizada como referência no controle da qualidade da matéria-prima vegetal e do fitoterápico, preferencialmente tendo correlação com o efeito terapêutico. O marcador pode ser do tipo ativo, quando relacionado com a atividade terapêutica do fitocomplexo, ou analítico, quando não demonstrada, até o momento, sua relação com a atividade terapêutica do fitocomplexo (ANVISA, 2014).

1.2 Validação

Para que possa ser possível a avaliação qualitativa ou quantitativa de matérias-primas, do produto em etapas do processo produtivo ou do produto acabado, é necessária a realização de desenvolvimento de metodologias. A validação de metodologia é a etapa final do processo de desenvolvimento de um método analítico, neste momento ele é desafiado e, muito comumente, alguns ajustes são realizados. O resultado final é a demonstração de que o método é adequado para o uso pretendido, seja para a determinação qualitativa, semi-quantitativa e/ou quantitativa de fármacos e outras substâncias em insumos farmacêuticos.

Em revisão Bouabidi e colaboradores (2010) salientam que o objetivo da validação é garantir, o mais cedo possível no processo de desenvolvimento de um método analítico, que os resultados obtidos com a aplicação rotineira do método serão próximos o suficiente do valor real. Atualmente, no controle da qualidade de medicamentos, a indústria farmacêutica utiliza técnicas cromatográficas, como a cromatografia com fase gasosa (CG) e a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), sendo que nos últimos anos a cromatografia líquida de ultra eficiência (CLUE) vem começando a substituir a CLAE. Estas são especialmente importantes no caso de medicamentos fitoterápicos pois estes são misturas complexas e as técnicas cromatográficas são capazes de isolar os sinais dos marcadores dos sinais dos demais componentes.

Segundo o Guia ICH Q2 (R1) (2015), e de forma similar a RE 899/03 da Anvisa (2003) que trata de validação de métodos analíticos, dentre os procedimentos analíticos, a validação aplica-se a testes de identificação, a testes quantitativos para o conteúdo de impurezas, a testes de limite para controle de impurezas e a testes quantitativos para as substâncias de interesse contidas em produto ou medicamento. Rozet e colaboradores (2012) afirmam que também pode ser realizado para ensaios de performance como dissolução. A validação é realizada por meio de estudos experimentais que podem variar segundo o procedimento analítico ao qual se aplicará. De maneira geral para um teste quantitativo são realizados ensaios de seletividade, linearidade, intervalo, precisão (que ainda se desdobra em repetibilidade, precisão intermediária, reprodutibilidade), limite de quantificação, exatidão e robustez.

Para medicamentos fitoterápicos aplicam-se os mesmos ensaios levando-se em consideração particularidades destes produtos, como a complexidade muito maior da amostra, a ausência de matriz isenta de fármaco para testes de exatidão e a dificuldade de se obter substância de referência adequada.

1.3 Ácidos triterpênicos pentacíclicos

Ácidos triterpênicos pentacíclicos estão entre as substâncias de origem vegetal de maior distribuição na natureza. Jäger e colaboradores (2009) avaliaram a presença de triterpenos pentacíclicos em trinta e nove espécies de diferentes famílias como *Lamiaceae*, *Rosaceae*, *Ericaceae*, etc. Os autores determinaram a presença dos ácidos triterpênicos ursólico, betulínico e oleanólico em 35 das espécies estudadas. As estruturas destes ácidos estão apresentadas na Figura 1. Vários estudos têm demonstrado o potencial terapêutico dos ácidos triterpênicos pentacíclicos. Gautam e Jachak (2009) em

revisão sobre anti-inflamatórios de origem natural, salientaram o grande potencial anti-inflamatório dos três ácidos mencionados. Todos os três apresentam por exemplo, inibição da enzima COX-2, responsável por grande parte dos processos inflamatórios e inibem produção de óxido nítrico, um importante sinalizador inflamatório e vasodilatador. A atividade anticancerígena dos ácidos triterpênicos pentacíclicos também é altamente estudada.

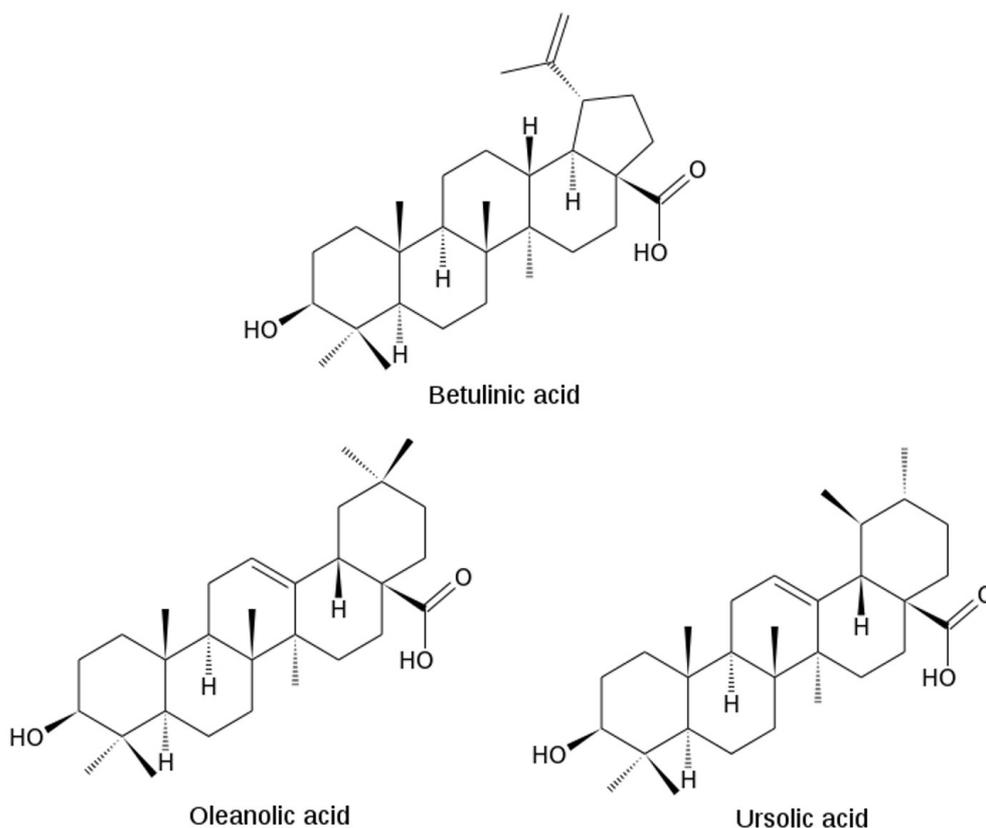


Figura 1: Estruturas de ácidos triterpênicos pentacíclicos presentes em diversas espécies.

Patlolla e Rao (2012) em revisão sobre prevenção e tratamento de câncer por triterpenos levantaram estudos que apontam o potencial dos três ácidos: foi demonstrado que os ácidos ursólico e betulínico são capazes de interromper o ciclo celular de linhagens cancerígenas diversas, os três ácidos também induzem a apoptose de algumas linhagens cancerígenas, também inibem a angiogênese e por fim os ácidos ursólico e oleanólico apresentaram atividade anticancerígena em modelos *in vivo*.

Em outra frente, Horiuchi e colaboradores (2007) também avaliaram a capacidade antimicrobiana de *Salvia officinalis* contra enterococos resistentes a vancomicina e indicaram como sendo responsável por esta atividade o ácido oleanólico. Os autores também avaliaram os ácidos betulínico e ursólico e demonstraram a mesma atividade.

Bero e colaboradores (2013) investigaram a ação antitripanossomicida em *Trypanossoma brucei* do óleo essencial e do extrato de diclorometano de *Keetia leucantha*. Os autores confirmaram a ação do extrato e indicaram os principais componentes destes, os ácidos oleanólico, betulínico e ursólico como responsáveis.

1.4 A espécie *Rosmarinus officinalis*

Em seu estudo sobre a ocorrência de triterpenos pentacíclicos em diversas espécies vegetais Jäger e colaboradores (2009) determinaram que a espécie com maior quantidade dos ácidos betulínico, oleanólico e ursólico a partir de folhas secas da planta foi o *Rosmarinus officinalis* (folha) com 1,53% (m/m), 1,23% (m/m) e 2,95% (m/m). No mesmo estudo um extrato seco de *n*-heptano da mesma espécie apresentou teores de 18,9 % (m/m) para o ácido betulínico, 13,5 % (m/m) para o ácido oleanólico e 22,7 % (m/m) para o ácido ursólico. A espécie *Rosmarinus officinalis* pertencente a família *Lamiaceae*, é um arbusto nativo da região do Mediterrâneo e do Cáucaso, perene, com folhas verdes, lanceoladas e opostas, suas flores são branco arroxeadas com dois estames protuberantes e seus frutos são aquênios (Royal Botanical Gardens, 2015). Conhecida popularmente como alecrim a *R. officinalis* é muito utilizada em culinária no tempero de carnes e aves. A espécie é considerada de fácil cultivo podendo ser propagada por cortes de seus ramos jovens replantados. Folhas secas de *R. officinalis* estão disponíveis comercialmente, tanto íntegras quanto em pó. A espécie *Rosmarinus officinalis* é portanto uma fonte interessante destes três ácidos triterpênicos pentacíclicos

1.5 Relevância

Por sua distribuição na natureza e pelas propriedades farmacológicas já apresentadas o desenvolvimento de um processo de isolamento dos ácidos oleanólico, betulínico e ursólico, tanto para investigações farmacológicas como para a sua certificação como material de referência é de extrema importância. A espécie *R. officinalis* é uma fonte interessante para a obtenção destes ácidos, tanto pelo teor de ácidos presente nesta espécie como pela facilidade de obtenção de material de partida.

O desenvolvimento de processo de isolamento de ácidos triterpênicos descrito acima já é objeto de estudo em projeto de pesquisa no Serviço de Métodos Analíticos. Para monitorar o progresso do desenvolvimento foi desenvolvido um método por cromatografia com fase gasosa. Faz-se necessária assim a validação deste método analítico de cromatografia com fase gasosa visando assegurar os resultados do projeto.

2. Justificativa

A validação do método analítico para a quantificação dos ácidos oleanólico, betulínico e ursólico em extratos de *Rosmarinus officinalis* é fundamental pois este dará suporte ao desenvolvimento do processo de isolamento destes ácidos triterpênicos.

3. Objetivo

3.1 Objetivo geral

O objetivo deste projeto foi validar a metodologia aplicada no doseamento do ácido ursólico em extratos acetato de etila de folhas secas da espécie *Rosmarinus officinalis*.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar os parâmetros de seletividade, linearidade, precisão, robustez, estabilidade da solução, exatidão e limite de detecção.
- Verificar a estabilidade das soluções padrão e amostra através do teste de estresse.
- Aplicar planejamento experimental para o ensaio de robustez.

4. Metodologia

4.1 Equipamentos

As análises foram realizadas em cromatógrafo com fase gasosa da marca Agilent, modelo 6890N e software marca Chemstation/Agilent e em cromatógrafo com fase gasosa modelo 6890N acoplado espectrômetro de massas modelo 5973N (Palo Alto; Estados Unidos).

4.2 Reagentes

Os reagentes utilizados foram ácido trifluoroacético, lote BCBJ9444V, fabricante Sigma Aldrich (Bellefonte; EUA), validade setembro de 2015. Acetato de etila, lote 1007016, fabricante Tedia (Fairfield; EUA), validade julho de 2015. Acetonitrila, lote 1206016, fabricante Tedia (Fairfield, EUA), validade setembro de 2017. Metanol, lote 14020096, fabricante Tedia (Fairfield, EUA), validade março de 2017. Alaranjado de metila, lote BCBH6520, fabricante Supelco (St. Louis, EUA), validade março de 2018. MSTFA, lote BCBM6291, fabricante Supelco (Steinheim, Suíça), validade julho de 2017.

4.3 Substâncias de referência

A substância de referência utilizada foi ácido ursólico, lote BCBL8161, fabricante Sigma-Aldrich (Irvine, Reino Unido), teor de 99,1%.

4.4 Amostra

A amostra utilizada foi extraída a partir de folhas secas de *Rosmarinus officinalis* com tamanho de partícula entre 16-32 mesh. Cerca de 10g de folhas foram extraídas com 200 mL de acetato de etila por 30 min. em ultrassom.

4.5 Método analítico

4.5.1 Parâmetros Cromatográficos.

Os parâmetros cromatográficos foram previamente desenvolvidos no laboratório do Serviço de Métodos Analíticos. O equipamento utilizado foi um cromatógrafo com fase gasosa, equipado com amostradores automáticos e detector de ionização em chama (DIC). O injetor foi operado a 280°C em modo split de 1:100 sendo o volume de injeção de 1 µL. A coluna utilizada foi uma DB-17ht da marca Agilent de 30 m de comprimento, 320 µm de diâmetro interno, 0,15 µm de espessura de filme operada com um fluxo de gás de arraste de 1,2 mL/min de hélio. A temperatura inicial do forno foi de 175 °C com taxa de

aquecimento de 10,3 °C/min até 328 °C. A temperatura do detector foi ajustada para 300 °C com fluxo de hidrogênio de 35,0 mL/min, fluxo de ar sintético de 350 mL/min e fluxo de nitrogênio de 30 mL/min.

4.5.2 Preparo do indicador

Foram pesados 2,52 mg de alaranjado de metila em balão volumétrico de 10,0 mL, solubilizou-se e avolumou-se com acetonitrila. A solução foi filtrada em membrana 0,45 µm e tratada com 100 µL de ácido trifluoroacético. A solução final tem uma coloração rosa escura.

4.5.3 Derivatização

A derivatização foi realizada com base no procedimento sugerido por Donike (1975). A amostra foi pesada em tubo de ensaio e dissolvida em solução de metanol / acetato de etila 20:80 (v:v), então a amostra foi seca em fluxo de nitrogênio gasoso formando um filme do fundo do tubo. Adicionou-se 200 µL de solução de alaranjado de metila em acetonitrila e em seguida adicionou-se volume de N-metil-N-trimetilsilil-trifluoroacetamida (MSTFA) suficiente para que a solução passasse de rosa para amarela e permanecesse com esta coloração.

Homogeneizou-se a mistura agitando por 30 segundos em vórtex marca Lab-line modelo Mistral Mixer (Melrose Park, EUA) e incubou-se a 70 °C por 30 minutos em banho-maria fechado da marca Visomes modelo VS50/2 (São Paulo, Brasil). Esperou-se resfriar a solução e transferiu-se o conteúdo do tubo para balão volumétrico de 1 mL e completou-se o volume com acetonitrila. A solução final foi transferida para insert, preenchendo-o totalmente. Este insert foi acomodado em vial e a amostra analisada em cromatógrafo com fase gasosa pelo método descrito na seção 4.5.1.

4.5.4 Preparo da amostra

Foram pesados cerca de 1,5 mg de extrato de *Rosmarinus officinalis* em tubo de ensaio com tampa, derivatizado segundo o procedimento do item 4.5.3.

4.5.5 Curva de calibração

Foram pesados cerca de 15,0 mg de ácido ursólico em balão volumétrico de 15,0 mL, e adicionados 10,0 mL de uma solução de metanol / acetato de etila 20:80 (v:v). Os frascos foram sonicados por 5 minutos e o volume do balão foi completo com a mesma solução

(1000 µg/mL). Após a sonicação foram retiradas alíquotas de 1,0 mL (200 µg/mL), 2,0 mL (400 µg/mL), 3,0 mL (600 µg/mL), 4,0 mL (800 µg/mL) e transferidas para balões volumétricos de 5,0 mL e uma alíquota de 1,0 mL (100 µg/mL) transferida para balão volumétrico de 10,0 mL. Foram completados os volumes de todos os balões com a solução metanol / acetato de etila 20:80 (v:v). Com as diluições prontas, foram distribuídas alíquotas de 1,0 mL de cada diluição para tubos de ensaio previamente identificados. Após a realização da transferência, os tubos foram conservados em baixa temperatura até o momento da derivatização segundo o procedimento 4.5.3.

4.6 Ensaios para validação de metodologia analítica

A validação foi realizada com base no Guia ICH Q2 (R1) (2015) e na norma RE 899/03. Foram realizados os ensaios de linearidade, exatidão/recuperação, robustez, seletividade, estabilidade da solução e precisão, que serão descritos a seguir:

4.6.1. Seletividade

4.6.1.1 Impurezas

A seletividade foi avaliada utilizando pureza de pico por CG-EM. As análises foram realizadas com a mesma coluna e nas mesmas condições do Detector de Ionização em Chama (DIC). O software do espectrômetro de massas escolhe pelo menos dois íons para monitorar através do pico e verifica se a abundância relativa destes varia, emitido um resultado quanto ao número de substâncias presentes no pico.

4.6.1.2. Substâncias de degradação

O experimento foi realizado, pesando-se 299,9 mg de extrato de alecrim, solubilizado e diluído em balão volumétrico de 150,0 mL com solução de metanol / acetato de etila 20:80. Com pipeta volumétrica, alíquotas de 1,0 mL dessa solução foram distribuídas para um total de 104 tubos de ensaio, que foram secos em fluxo de nitrogênio e separados em aproximadamente três grupos de trinta tubos para cada um dos três mecanismos de degradação: hidrólise ácida, hidrólise básica e oxidação. Em cada tubo, dependendo da condição de degradação a ser estudada, foi adicionado 1,0 mL de ácido clorídrico 0,1 M ou 1,0 mL de hidróxido de sódio 0,1 M ou 1,0 mL de peróxido de hidrogênio 3% respectivamente.

As amostras foram incubadas em tubos fechados, a temperatura ambiente sendo posteriormente retiradas em duplicata mensalmente até os seis meses e a última amostra

será retirada após um ano. Quando retiradas as amostras foram neutralizadas, congeladas e liofilizadas. Para a neutralização, foi adicionado na hidrólise básica 1,0 mL de ácido clorídrico 0,1 M. Na hidrólise ácida foi adicionado 1,0 mL de hidróxido de sódio 0,1 M e na oxidação foi adicionado 3,0 mL de água purificada.

Após a liofilização, as amostras foram derivatizadas segundo o método descrito no item 4.5.3. Junto com as amostras em condições de degradação foram preparadas amostras sem tratamento de degradação, para comparação.

4.6.2 Linearidade

Foram pesados 15,23 mg de ácido ursólico para a primeira curva de calibração e 15,10 mg de ácido ursólico para a segunda curva de calibração. As curvas foram preparadas segundo o descrito no item 4.5.5. As amostras foram derivatizadas segundo o procedimento descrito no item 4.5.3.

4.6.3 Precisão

No ensaio de precisão foram realizadas a repetibilidade e precisão intermediária. Foram preparadas curvas de calibração e amostras por dois analistas diferentes em dias diferentes. O preparo das curvas está descrito na seção 4.6.2 (linearidade). Cada analista preparou seis amostras para este teste segundo o procedimento descrito no item 4.5.4. (preparo de amostra). A avaliação dos resultados foi realizada, comparando os resultados das seis amostras preparadas por cada analista.

Tabela 1: Massa das amostras para ensaio de precisão.

| Amostras | Analista 1 (mg) | Analista 2 (mg) |
|----------|-----------------|-----------------|
| 1 | 1,61 | 1,73 |
| 2 | 1,60 | 1,61 |
| 3 | 1,54 | 1,65 |
| 4 | 1,51 | 1,31 |
| 5 | 1,52 | 1,62 |
| 6 | 1,52 | 1,71 |

4.6.4 Robustez

Foram pesados 37,42 mg de extrato de alecrim em balão volumétrico de 25,0 mL. A amostra foi solubilizada e diluída com solução de metanol / acetato de etila 20:80 (v:v). Foram distribuídas em 20 tubos de ensaio com tampa, alíquotas de 1,0 mL desta solução. A robustez foi testada por planejamento fatorial completo utilizando-se os seguintes parâmetros: volume do indicador, temperatura de incubação e o tempo de incubação. A

tabela 2 mostra como foram realizadas as distribuições das variações e os experimentos realizados. As amostras foram preparadas com uma replicata de cada variação.

Tabela 2: Variações realizadas no ensaio de robustez

| Volume de indicador (µL) | Temperatura de incubação (°C) | Tempo de incubação (min) |
|---------------------------------|--------------------------------------|---------------------------------|
| 180 | 67,5 | 28 |
| 180 | 67,5 | 32 |
| 180 | 72,5 | 28 |
| 180 | 72,5 | 32 |
| 220 | 67,5 | 28 |
| 220 | 67,5 | 32 |
| 220 | 72,5 | 28 |
| 220 | 72,5 | 32 |
| 200 | 70,0 | 30 |

Com exceção das variações propostas as amostras foram preparadas e analisadas segundo o procedimento descrito nos itens 4.5.1 e 4.5.4.

4.6.5 Exatidão/Recuperação

Para a curva de calibração, foram pesados 14,96 mg de ácido ursólico. A curva foi preparada e derivatizada segundo os itens 4.5.3 e 4.5.5.

Foi realizada a adição de concentração conhecida da substância de referência sobre a amostra. Para isso, foram preparadas três soluções-estoque em concentrações 100, 300 e 700 µg/mL de ácido ursólico. Para a concentração de 100 µg/mL foram pesados 1,17 mg de ácido ursólico, solubilizado e diluído em balão de 10,0 mL com solução de metanol / acetato de etila 20:80 (v:v). Para a concentração de 300 µg/mL foram pesados 1,59 mg de ácido ursólico, solubilizado e diluído em balão de 4,0 mL com solução de metanol / acetato de etila 20:80 (v:v). Finalmente, para a concentração de 700 µg/mL foram pesados 2,78 mg de ácido ursólico, solubilizado e diluído em balão de 4,0 mL com solução de metanol / acetato de etila 20:80 (v:v).

Para o preparo das amostras, foram pesados 37,37 mg de extrato de alecrim, solubilizado e diluído em balão de 25,0 mL com solução de metanol / acetato de etila 20:80. Foram transferidas alíquotas de 1,0 mL desta solução para 12 tubos de ensaio com tampa e secas em fluxo de nitrogênio. As amostras foram separadas em quatro grupos de três tubos, um grupo para cada concentração de adição e um para o branco. Foi então adicionado 1,0 mL de cada solução de referência por tubo para a formação de cada concentração descrita e secou-se em fluxo de nitrogênio. As amostras foram derivatizadas segundo o procedimento descrito na seção 4.5.3.

Estas amostras foram analisadas em cromatógrafo com fase gasosa pelo método descrito no item 4.5.1. A área média do ácido ursólico nos brancos foi calculada e subtraída da área correspondente nas amostras com adição do padrão. A área resultante foi utilizada para o cálculo da recuperação.

4.6.6 Estabilidade da solução de amostras

Uma amostra do ensaio de precisão foi reinjetada a cada 24h por três dias. As áreas das injeções de cada dia foram medidas e comparadas. Entre as amostras injetadas no primeiro e no segundo dia foi realizado um teste t. Entre as amostras injetadas entre os três dias foi realizada uma análise de variância.

4.6.7 Limite de detecção

O limite de detecção é a menor quantidade da substância presente em uma amostra que pode ser detectada, porém não necessariamente quantificado, sob as condições experimentais estabelecidas (ICH, 2015).

O limite de detecção foi calculado com base na regressão da curva de calibração segundo o descrito no guia do ICH Q2 (R1) (2015) utilizando a seguinte expressão:

$$LD = 3,3 s / S$$

Aonde LD é o limite de detecção, s é o desvio padrão do intercepto e S é o coeficiente angular da curva.

4.7 Software de planejamento estatístico

Todos os planejamentos e análises estatísticas descritos acima foram elaborados e calculados no *software* estatístico JMP versão 8.

5. Resultados e Discussão

O objetivo da validação é avaliar se a metodologia analítica é apropriada para a finalidade pretendida. Por esse motivo, a validação é importante para detectar possíveis problemas e corrigi-los. Na metodologia em estudo o preparo de amostras envolve a derivatização das substâncias de interesse para que passem a ser voláteis e passíveis de serem analisadas por cromatografia com fase gasosa. A reação de derivatização selecionada é a da sililação por MSTFA e está ilustrada na Figura 2. O extrato de acetato de etila é o extrato com maior abundância dos ácidos triterpênicos, quando utilizado apenas um solvente que está na lista da classe 3 do ICH, e por isso foi escolhido.

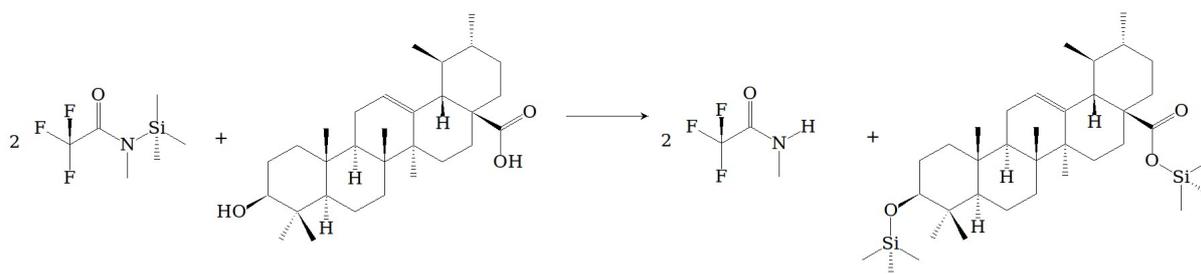


Figura 2: Reação de sililação do ácido ursólico com MSTFA.

5.1 Ajustes realizados durante a validação

Durante a presente validação ocorreu um problema com relação a reprodutibilidade das injeções, gerando respostas incoerentes e desvios altos. Na tabela 3 é mostrado um exemplo, onde estão demonstradas áreas referentes a uma amostra de ácido ursólico com concentração de 200 µg/mL.

Tabela 3: Respostas obtidas no ensaio para a verificação da alta variação entre as injeções.

| Injeções | Áreas |
|------------------------------|----------|
| 1 | 45,62637 |
| 2 | 50,42342 |
| 3 | 53,08952 |
| 4 | 56,08209 |
| Média | 51,30535 |
| Desvio padrão | 4,44 |
| Coefficiente de Variação (%) | 8,64 |

A princípio, acreditou-se que a luz e/ou o ar presente no espaço entre a tampa do vial e a solução estivesse interferindo e perturbando o equilíbrio da reação de sililação da amostra. Para avaliar se algum desses fatores seria o causador do problema, foram testadas duas soluções simultaneamente, uma amostra em vial âmbar e outra em vial

transparente, ambas com inserts totalmente preenchidos com a amostra. Na tabela 4 estão apresentados os resultados obtidos.

Tabela 4: Resultados obtidos após o uso de vial âmbar e vial incolor.

| Injeções | Áreas vial âmbar | Áreas vial incolor |
|------------------------------|------------------|--------------------|
| 1 | 64,30778 | 62,31438 |
| 2 | 64,76373 | 63,10512 |
| 3 | 65,18378 | 64,14488 |
| 4 | 65,65030 | 64,12444 |
| Média | 64,97640 | 63,42221 |
| Desvio padrão | 0,57 | 0,89 |
| Coefficiente de Variação (%) | 0,89 | 1,40 |

Observou-se uma queda significativa no coeficiente de variação das duas condições, podendo-se concluir através destes resultados que a luz não é a causa da falta de reprodutibilidade entre as injeções, mas o ar acima da solução tem um impacto importante. Como os resultados obtidos foram reprodutivos, adicionou-se à metodologia a colocação da amostra em insert com este inserido dentro do vial. Após a modificação, durante toda a validação não ocorreram mais problemas referentes a reprodutibilidade entre injeções.

5.2 Seletividade

No ensaio de seletividade, avaliou-se a capacidade da metodologia de selecionar a(s) substância(s) de interesse na presença de outros componentes como impurezas da amostra e produtos de degradação.

5.2.1 Impurezas

Os resultados referentes a análise de pureza espectral de pico realizada para cada ácido triterpênico por cromatógrafo com fase gasosa acoplado a espectrofotômetro de massas (CG-EM) estão apresentados na tabela 5.

Tabela 5: Resultados referentes a pureza espectral.

| Ácido | Varreduras* | Íons monitorados (m/z) | Componentes |
|------------|-------------|------------------------|-------------|
| Oleanólico | 1466,3 | 202; 320 | 1 |
| Betulínico | 1490,7 | 73; 75 | 1 |
| Ursólico | 1523,1 | 320; 119 | 1 |

*Número de varreduras realizadas

Nas varreduras realizadas nos três ácidos triterpênicos, utilizando os íons monitorados automaticamente escolhidos pelo software do espectrômetro de massas, foram

identificadas apenas uma substância por pico, sendo assim, pode-se dizer que o método é seletivo para impurezas do extrato. No mesmo teste os espectros de massas dos três ácidos triterpênicos foram comparados com a literatura (Razboršek e colaboradores, 2008) e confirmados.

5.2.2 Substâncias de degradação

O método deve ser capaz de selecionar os sinais de interesse na amostra, os correspondentes aos ácidos triterpênicos, de possíveis substâncias de degradação que poderão vir a se formar com o armazenamento prolongado. Para amostras que não tem determinados os mecanismos de degradação é interessante a realização de testes de degradação forçada na tentativa de prever quais serão as substâncias de degradação formadas e se estas substâncias interferem com a quantificação das substâncias de interesse.

Devido ao pouco tempo e pouco reagente de sililação, só foi possível analisar um tubo de cada um dos três primeiros meses de degradação para cada condição de degradação. A Figura 3 mostra o cromatograma referente a amostra sem degradação, em que o ácido ursólico se encontra com tempo de retenção de 13,17 minutos.

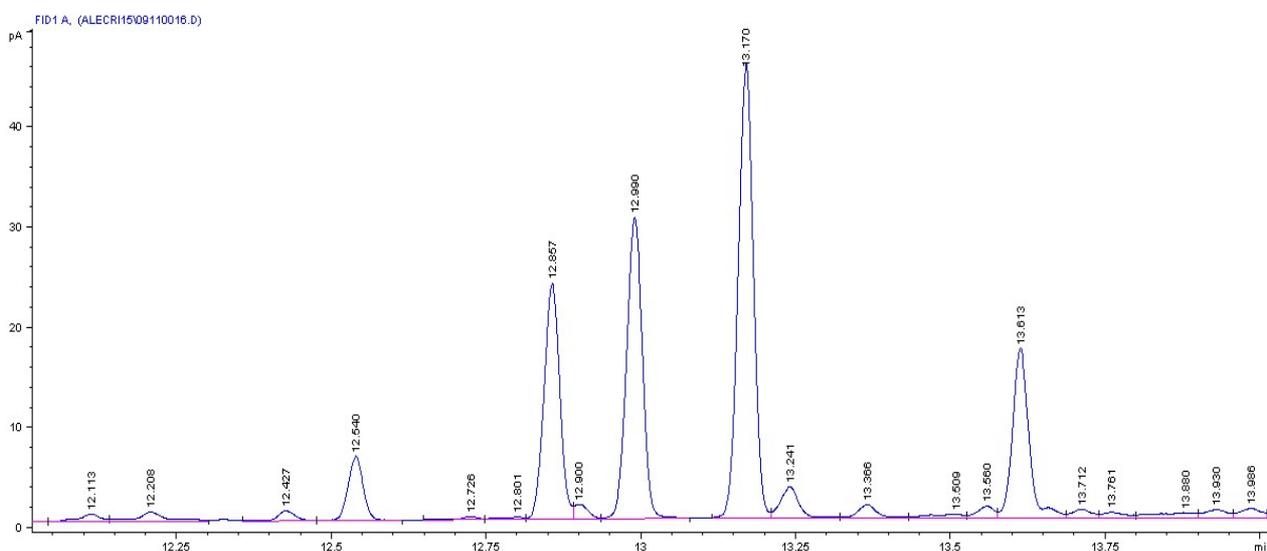


Figura 3: Cromatograma obtido no teste de seletividade – Condição Original.

A Figura 4 mostra os cromatogramas resultantes do teste de degradação por hidrólise ácida, onde a linha azul representa a amostra sem degradação, a linha vermelha o primeiro mês de exposição em ácido clorídrico 0,1 M, a linha verde representa o segundo mês e a linha rosa o terceiro mês de exposição.

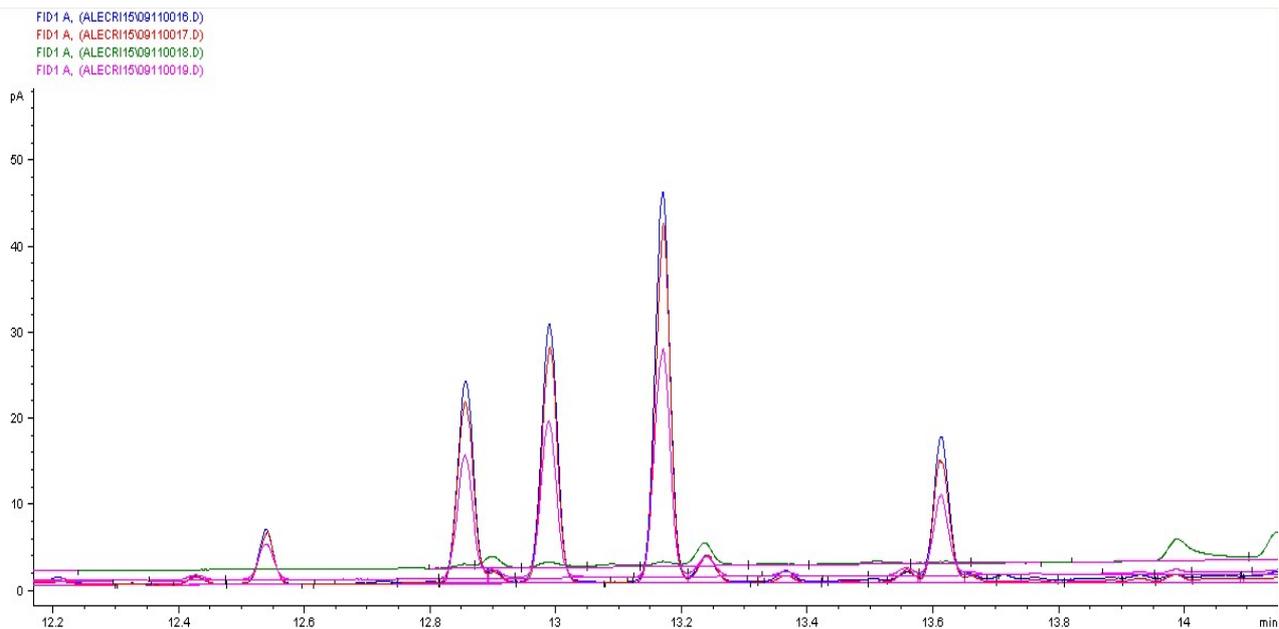


Figura 4: Cromatogramas de amostras submetidas a hidrólise ácida.

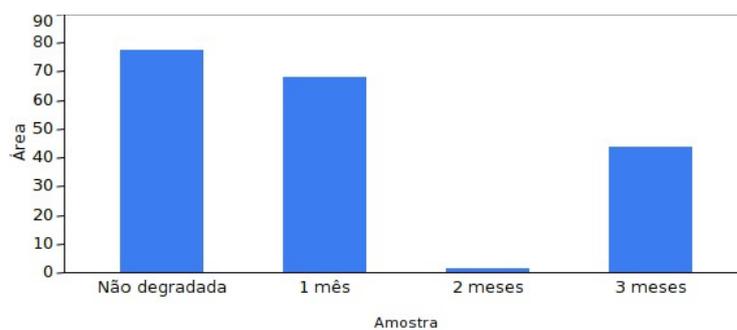


Figura 5: Áreas do ácido ursólico em amostras submetidas a hidrólise ácida.

A Figura 5 apresenta as áreas do ácido ursólico nas amostras dos três primeiros meses de hidrólise ácida com a amostra não degradada. Pode ser observado que ocorreu uma pequena queda na área no primeiro mês, no segundo mês há uma queda acentuada e no terceiro mês parece ocorrer um aumento.

Através do resultado obtido até o momento, foi possível considerar duas hipóteses para a hidrólise ácida. A primeira seria ter ocorrido uma degradação brusca do primeiro mês de degradação para o segundo mês, e no terceiro mês ter ocorrido a formação de uma substância de degradação. A segunda seria uma possível troca dos tubos no momento do preparo das amostras. Para dirimir esta dúvida é necessário analisar a replicata destes três meses, para confirmar estes resultados e analisar as amostras dos três meses por CG-EM para avaliar o espectro e a pureza de pico dos sinais do ácido ursólico.

A sobreposição dos cromatogramas da hidrólise básica está apresentada na Figura 6, em que a amostra não degradada é representada pela linha azul, o primeiro mês pela linha vermelha, o segundo mês pela linha verde e o terceiro mês pela linha rosa.

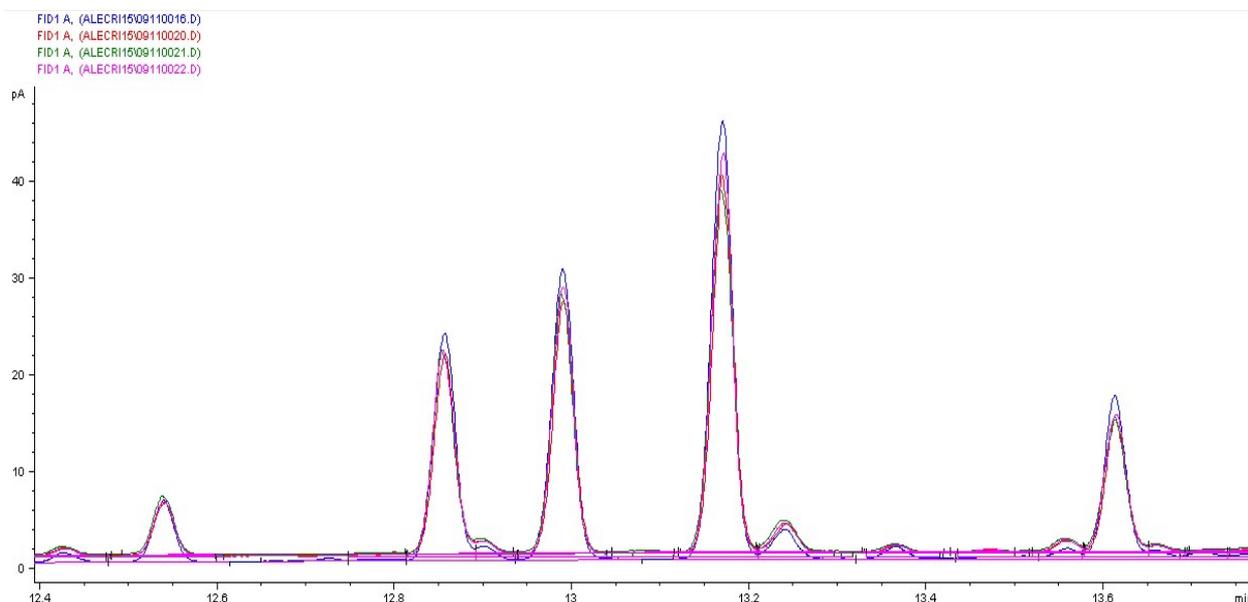


Figura 6: Cromatogramas de amostras submetidas a hidrólise básica.

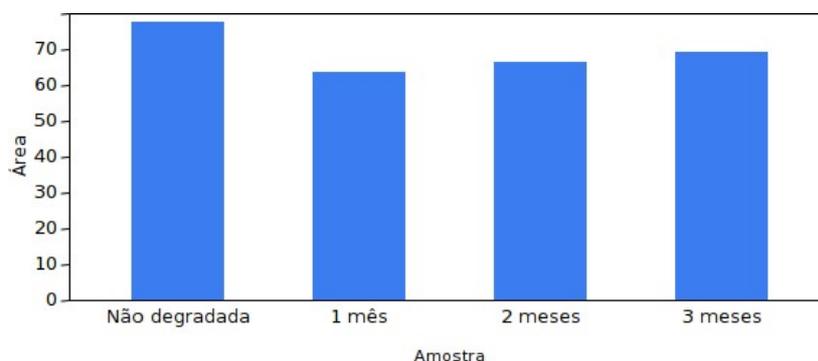


Figura 7: Áreas do ácido ursólico em amostras submetidas a hidrólise básica.

Pode-se observar na Figura 7, que ocorreu uma pequena degradação no primeiro mês de exposição em relação à amostra não degradada. No segundo e terceiro meses, pode ter ocorrido a formação de substâncias de degradação de forma crescente. No entanto, como as áreas foram próximas a diferença entre elas pode ser resultado de uma variação aleatória natural. Sugere-se então que também sejam realizados alguns ensaios complementares, como análise das replicatas e analisar estas amostras por CG-EM para determinar e avaliar os espectros de massas e a pureza dos picos.

A oxidação está demonstrada na Figura 8, com a linha azul representando a amostra sem degradação, a linha vermelha representando o primeiro mês de exposição, a linha verde representa o segundo mês de contato com o peróxido de hidrogênio e a linha rosa o terceiro mês de contato.

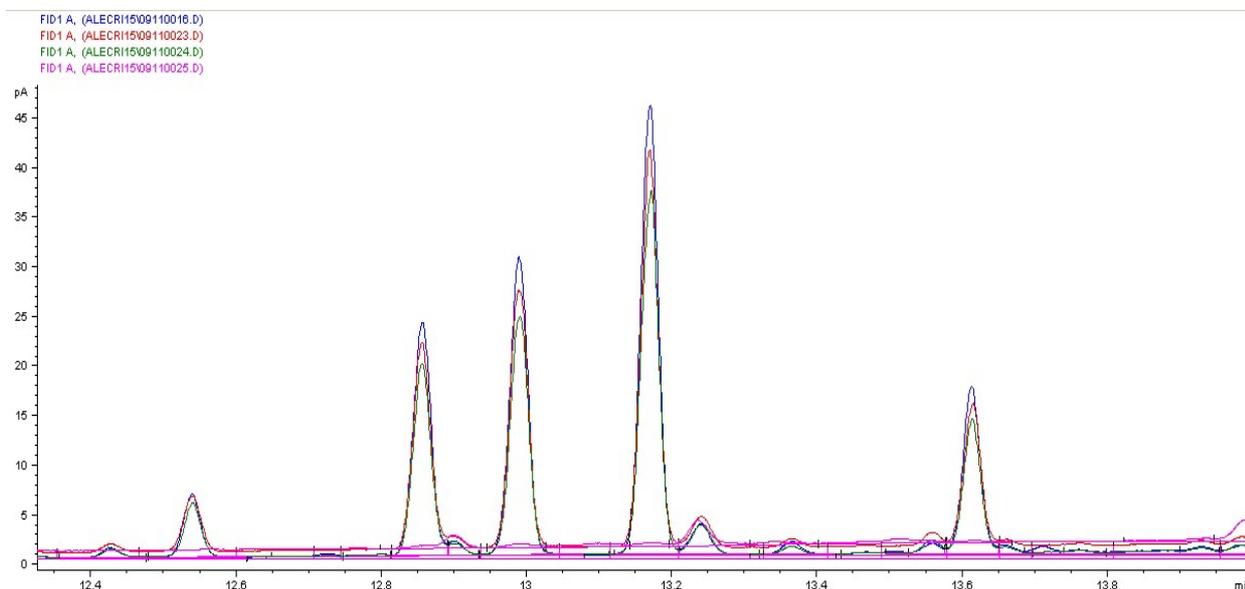


Figura 8: Cromatogramas de amostras submetidas a oxidação.

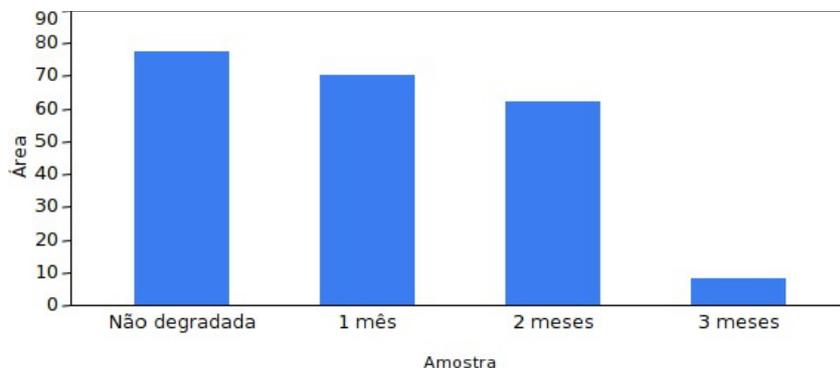


Figura 9: Áreas do ácido ursólico em amostras submetidas a oxidação.

A degradação por oxidação se comportou de forma diferente em relação as outras duas condições de degradação, visto que, o primeiro e segundo mês degradaram de forma crescente em relação a amostra não degradada. Do segundo para o terceiro mês ocorreu um crescimento brusco na intensidade de degradação, como mostra a Figura 9.

Na oxidação observa-se que, apesar de ter ocorrido a degradação brusca, não surgiram novos sinais. Pode-se concluir que a metodologia é seletiva pois não foram detectadas substâncias de degradação formadas por oxidação da amostra em coeluição aparente

com as substâncias de interesse. No entanto, a análise por CG-EM para a inspeção dos espectros e a análise das replicatas destas amostras também é interessante.

Independente destes resultados é interessante realizar a análise das amostras dos meses seguintes, assim como suas replicatas, para todos os mecanismos de degradação. Isto é particularmente importante para o mecanismo da hidrólise básica já que nestes primeiros meses ocorreu apenas uma variação muito pequena.

5.3 Linearidade

A linearidade é a capacidade da metodologia em demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado(ICH, 2015). São apresentados na tabela 6 os resultados da regressão linear.

Tabela 6: Resultados do ensaio de linearidade

| Analista | Coefficiente de determinação (R^2) | Teste de falta de ajuste | Teste de significância do intercepto |
|----------|--|--------------------------|--------------------------------------|
| 1 | 0,9991 | $p = 0,0812$ | $p < 0,0001^*$ |
| 2 | 0,9991 | $p = 0,6123$ | $p = 0,0077^*$ |

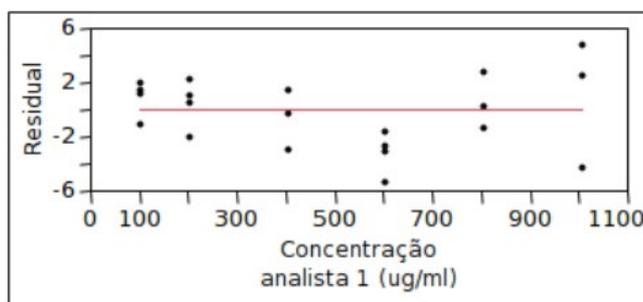


Figura 10: Gráfico de resíduos do teste de linearidade do analista 1.

O ensaio de linearidade foi realizado por dois analistas. O analista 1 apresentou um coeficiente de determinação de 0,9994, o que demonstra que 99,94% da variação dos resultados brutos é explicada pelo modelo linear. A avaliação do gráfico de resíduos (Figura 10) mostra um pequeno desvio da homoscedasticidade na concentração de 600 µg/mL, no entanto o teste de falta de ajuste (tabela 6) não chega a ser significativo. Este fato somado ao R^2 elevado permitem concluir que dentro do intervalo de concentrações avaliado a resposta do detector tem um comportamento linear e, portanto, este modelo é adequado para a quantificação dos ácidos ursólico, betulínico e oleanólico. Nota-se ainda

que o intercepto é significativamente diferente de zero (Tabela 6), sendo necessário que se prepare uma curva de calibração a cada análise.

Os resultados de linearidade do analista 2 também estão apresentados na tabela 6. O coeficiente de determinação de 0,9991 demonstra que 99,94% da variação dos resultados brutos é explicada pelo modelo linear. A avaliação do gráfico de resíduos (Figura 11) mostra uma distribuição homogênea dos resíduos ao redor da regressão, podendo ser considerada homoscedástica, o que é confirmado pelo resultado não significativo do teste de falta de ajuste (Tabela 6). Estes fatos somados ao R^2 elevado permitem concluir novamente que dentro do intervalo de concentrações avaliado, a resposta do detector tem um comportamento linear e portanto este modelo é adequado para a quantificação dos ácidos ursólico, betulínico e oleanólico. Novamente fica indicado que o intercepto é significativamente diferente de zero (Tabela 6) sendo necessária uma injeção de uma curva de calibração a cada análise.

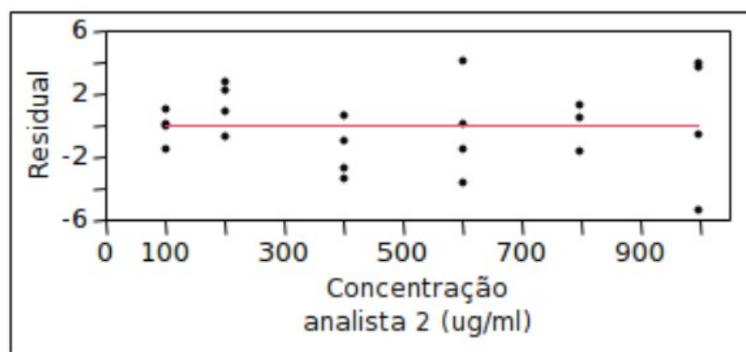


Figura 11: Gráfico de resíduos do teste de linearidade do analista 2.

5.4 Estabilidade da solução das amostras

A estabilidade da solução tem por objetivo, avaliar por quanto tempo se mantém estável a solução amostra após seu preparo.

No ensaio de estabilidade da solução, foi possível observar que as respostas obtidas no primeiro dia e no segundo dia, se mantiveram sem variação significativa como resultado do teste t de $p = 0,7182$. O gráfico da Figura 12 mostra uma comparação entre as áreas obtidas no primeiro e no segundo dias, mostrando que são muito similares, confirmando o resultado do teste t. No terceiro dia de injeção as áreas aumentaram, ocasionando assim, um desvio considerável, como demonstrado no gráfico da Figura 13. O resultado de uma análise de variância confirma esta conclusão com o resultado de $p < 0,0001$.

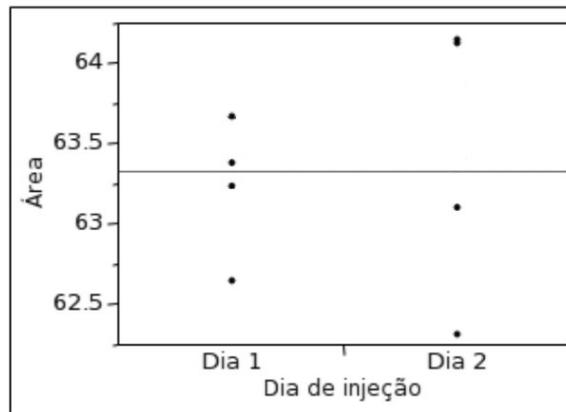


Figura 12: Estabilidade da solução – Injeções do 1º e 2º dias.

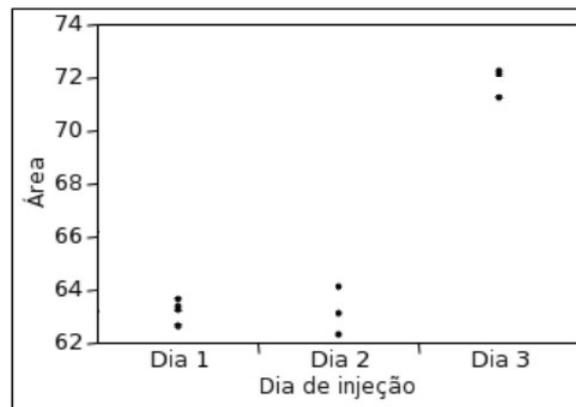


Figura 13: Estabilidade da solução – Injeções do 1º, 2º e 3º dias.

A amostra se mostrou estável durante o período de 24 horas após o seu preparo, sendo possível nas futuras análises de rotina injetar amostras durante esse período.

5.5 Limite de detecção

O limite de detecção foi calculado utilizando o erro padrão do intercepto para a regressão do analista 1, calculado em 1,014336. Este foi escolhido por apresentar um valor maior. O valor calculado do limite de detecção foi de 59 µg/mL.

5.6 Robustez

O ensaio de robustez, foi realizado com o objetivo de medir a capacidade da metodologia em resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos, indicando assim, a confiabilidade durante a utilização rotineira. Para a realização do ensaio, foi escolhido fazer o planejamento experimental estatístico, pois através dele é possível verificar mais de uma variável ao mesmo tempo. Para a escolha dos fatores a

serem avaliados foi considerado que as maiores fontes de incerteza da metodologia estão no procedimento de preparo de amostra. Sendo assim as três variáveis escolhidas fazem parte do processo de sililação: o tempo de incubação, a temperatura de incubação e o volume de indicador.

Na Figura 14, que apresenta a significância dos fatores escolhidos, indica não terem ocorrido variações significativas nas áreas de ácido ursólico associadas a variação dos fatores escolhidos. Portanto o método se demonstra, sob este aspecto, robusto.

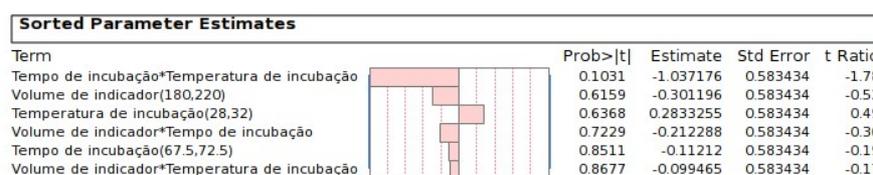


Figura 14: Gráfico de significância dos fatores estudados no ensaio de robustez.

5.7 Precisão

O objetivo da precisão é avaliar a incerteza dos resultados obtidos em conjunto de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra.

A precisão é avaliada pelo desvio padrão absoluto, que utiliza um número significativo de medições, normalmente maior que 20. Na prática, em validação de métodos, o número de determinações é geralmente pequeno e o que se calcula é a estimativa do desvio padrão absoluto (Ribani e colaboradores, 2004).

Segundo Ribani e colaboradores (2004), para a repetitividade, o INMETRO recomenda sete ou mais repetições para o cálculo da estimativa do desvio padrão. A ICH3 e ANVISA sugerem que a repetitividade seja verificada a partir de um mínimo de nove determinações cobrindo o limite especificado do procedimento (ex.: três níveis, três repetições cada um), ou a partir de um mínimo de seis determinações a uma concentração similar ao valor esperado.

Durante o ensaio, ocorreram algumas perdas de amostras, foram verificadas no dia seguinte da análise: as amostras 1 e 6 do analista 1 mudaram de coloração após serem colocadas no injetor e a amostra 6 do analista 2 foi perdida no momento da incubação, retornando à sua coloração original. Tentou-se reverter a situação, adicionando mais MSTFA e a tentativa foi mal sucedida, porque ainda assim a reação se reverteu (cor original). A reversão da reação ocorre, na maioria dos casos, devido a absorção de

umidade, assim a inspeção das vedações dos frascos é fundamental. Como o reagente de sililação estava no fim não foram preparadas novas replicatas. A precisão foi avaliada nos níveis da repetibilidade e precisão intermediária. A distribuição dos resultados de cada analista individualmente foi utilizada para avaliar a repetibilidade e dos dois analistas combinados para avaliar a precisão intermediária. A tabela 7 mostra os resultados dos teores individualmente determinados pelos analistas. As amostras 1 e 6 referentes ao analista 1 e a amostra 6, referente ao analista 2, foram descartadas. Na Figura 15 estão apresentadas as referidas distribuições.

Tabela 7: Teores determinados por cada analista individualmente no ensaio de precisão.

| Amostras | Teor Analista 1 (%) | Teor Analista 2 (%) |
|----------|---------------------|---------------------|
| 1 | - | 13,89 |
| 2 | 14,94 | 14,84 |
| 3 | 14,59 | 15,70 |
| 4 | 16,55 | 13,19 |
| 5 | 14,41 | 13,60 |
| 6 | - | - |

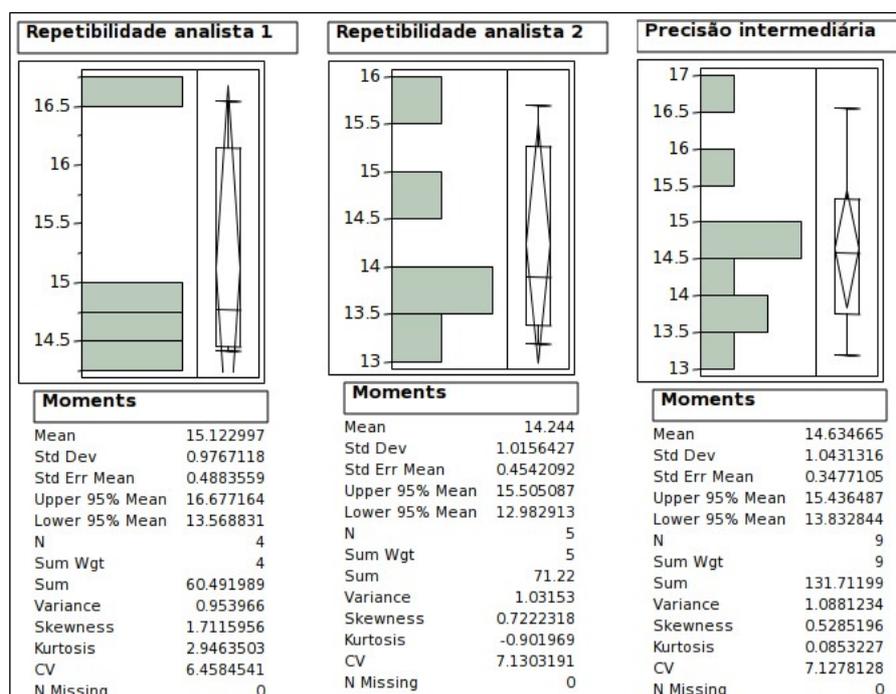


Figura 15: Distribuição dos resultados dos analistas 1 e 2 em separado e combinado.

A repetibilidade referente ao analista 1 foi 6,46% (coeficiente de variação), a referente ao analista 2 foi de 7,13% (coeficiente de variação), a interseção ou precisão

intermediária entre os analistas apresentou um coeficiente de variação de 7,13%, compatível com os resultados individuais.

Adicionalmente um teste t comparando os dois analistas foi realizado, o resultado foi de $p = 0,2311$ o que demonstra que não ocorreu diferença significativa entre os dois analistas.

Os valores de repetibilidade se mostraram muito altos para os dois analistas, apesar de coerentes entre si, fato confirmado pela distribuição unificada e pelo resultado do teste t. Uma hipótese para explicar este fato é a possibilidade de o extrato não ser homogêneo. A falta de homogeneidade de extratos é devido a forma como as amostras são secas após sua extração, associada a massas de extrato pequenas, que resulta em concentração de alguns compostos em partes diferentes do frasco. Esta hipótese terá de ser ainda investigada.

Devido os coeficientes de variação altos para os dois analistas, pode-se observar a necessidade de preparo de mais amostras, no mínimo sete determinações, como relata Ribani e colaboradores (2004) em revisão, para que se possa assim obter-se um resultado mais confiável do ensaio de precisão.

5.8 Recuperação/Exatidão

A recuperação de uma metodologia analítica é realizada para avaliar a proximidade dos resultados obtidos pela metodologia em estudo em relação ao valor verdadeiro na presença de matriz. Por falta de reagente de sililação, assim como em outros testes, não foi possível analisar todas as amostras então foram realizadas apenas duas replicatas. Prepararam-se três concentrações diferentes, para avaliar se há recuperação em concentrações baixa, média e alta da curva de calibração. A tabela 8 mostra os resultados referentes a recuperação.

Tabela 8: Resultados referentes a recuperação

| Amostra ($\mu\text{g/mL}$) | Recuperação (%) |
|--|------------------------|
| 300 (1) | 99,7 |
| 500 (1) | 91,0 |
| 900 (1) | 95,6 |
| 300 (2) | 76,6 |
| 500 (2) | 90,0 |
| 900 (2) | 100,8 |

Por problemas analíticos, será necessário preparar mais amostras para avaliar melhor a exatidão, porque os resultados apresentados são discrepantes e inconclusivos. Os resultados a concentração baixa, de 300 $\mu\text{g/mL}$, é o que apresenta os resultados mais

discrepantes, com mais de 20% de diferença. A 500 $\mu\text{g/mL}$ os resultados estão bem coerentes entre si, apesar de a recuperação estar um pouco baixa. A 900 $\mu\text{g/mL}$ os resultados estão um pouco discrepantes entre as duas replicatas, mas com uma diferença de cerca de 4%. Em todas as concentrações será necessário realizar um número maior de replicatas, a fim de se ter uma conclusão clara sobre a recuperação da amostra.

6. Conclusão

A partir dos resultados obtidos, pode-se considerar a metodologia seletiva para impurezas presentes na matriz, robusta, com solução estável por 24 horas e linear.

Entretanto, será necessário realizar testes complementares para que seja possível concluir se a metodologia é precisa, exata e seletiva para produtos de degradação, visto que estes ensaios não puderam ser concluídos devido a falta de reagente de sililação e de tempo.

Pode-se concluir que a presente validação foi e está sendo de extrema importância, pois através dela uma série de problemas na metodologia foram detectados e corrigidos. Sendo assim, no futuro será possível obter uma metodologia confiável, dando o suporte necessário ao projeto de isolamento dos ácidos triterpênicos citados para uma posterior certificação como material de referência.

7. Desdobramentos

Os ensaios a serem realizados estão descritos abaixo:

- Analisar mais replicatas no ensaio de seletividade para produtos de degradação;
- Analisar as amostras de seletividade para produtos de degradação no CG-EM;
- Preparar um novo extrato mais homogêneo, e repetir o ensaio de precisão com o mesmo;
- Preparar mais replicatas de cada uma das concentrações para o ensaio de recuperação.

8. Bibliografias

2015 life sciences outlook. Deloitte, Brasil, 2014. Disponível em:

<http://www2.deloitte.com/content/dam/Deloitte/global/Documents/Life-Sciences-Health-Care/gx-lshc-2015-life-sciences-report-brazil.pdf>

Acessado em 17/05/2016.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 26 de 13 de maio de 2014. "DISPÕE SOBRE O REGISTRO DE MEDICAMENTOS FITOTERÁPICOS E A NOTIFICAÇÃO DE PRODUTOS TRADICIONAIS FITOTERÁPICOS". **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 13 de maio de 2014.

Acessado em 02/12/2015.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº 899 de 29 de maio de 2003. Determina a publicação do "GUIA DE VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS E BIOANALÍTICOS" **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 29 de maio de 2003.

Acessado em 03/04/2015.

BERO, J; BEAUFAY, C; HANNAERT, V; HERENT, M. F; MICHELS, P. A; QUETIN-LECLERC, J. Antitrypanosomal compounds from the essential oil and extracts of *Keetia leucantha* leaves with inhibitor activity on *Trypanosoma brucei* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. **Phytomedicine**, 20(3-4), 270-274. 2013.

BOUABIDI, A; ROZET, E; FILLET, M; ZIEMONS, E; CHAPUZET, E; MERTENS, B; KLINKENBERG, R; CECCATO, A; TALBI, M; STREEL, B; BOUKLOUZE, A; BOULANGER, B; Hubert, P. Critical analysis of several analytical method validation strategies in the framework of the fit for purpose concept. **Journal of Chromatography A**, 1217 (2010) 3180-3192. 2010.

BRASIL. Decreto nº 5813, de 22 de Junho de 2006. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Poder executivo, Brasília, DF, 22 de junho de 2006.

DONIKE, M. Control of trimethylsilylation potential and trimethylsilylation capacity by the use of colour indicators. **Journal of Chromatography A**, v. 115, pp. 591-595. 1975.

FREITAS, A. Estrutura do mercado do segmento de fitoterápicos no contexto atual da indústria farmacêutica brasileira. Ministério da Saúde. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/estudo_fitoterapicos.pdf

Acessado em: 07/04/2015.

GAUTAM, R; JACHAK, S. M. Recent Developments in Anti-Inflammatory Natural Products. **Medicinal Research Reviews**, 29(5), 767-820. 2009.

HORIUCHI, K; SHIOTA, S; HATANO, T; YOSHIDA, T; KURODA, T; TSUSHYIA, T. Antimicrobial activity of oleanolic acid from *Salvia officinalis* and related compounds on vancomycin-resistant enterococci (VRIE). **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, 30(6), 1147-1149. 2007.

ICH Harmonised Tripartite Guideline. Validation of analytical procedures: Text and Methodology R2 (Q1).

Acessado em 02/12/2015.

JÄGER, S; TROJAN, H; KOPP, T; LASZCZYK, M. N. SCHEFFLER, A. Pentacyclic Triterpene Distribution in Various Plants - Rich Sources for a New Group of Multi-Potent Plant Extracts. **Molecules**, 14(6), 2016-2031. 2009.

PATLOLLA, J. M. R; RAO, C. V. Triterpenoids for Cancer Prevention and Treatment: Current Status and Future Prospects. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, 13(1), 147-155. 2012.

RAZBORŠEK, B. D; VONCINA, V; DOLECEK, E. V. Determination of Oleanolic, Betulinic and Ursolic Acid in Lamiaceae and Mass Spectral Fragmentation of Their Trimethylsilylated Derivatives. **Chromatographia**, 67, 433–440. 2008.

RIBANI, M; BOTTOLI, C. B. G; COLLINS, C.H; JARDIM, I. C. S. F; MELO, L. F. C. Validação em Métodos Cromatográficos e Eletroforéticos. **Química Nova**, 27(5), 771-780. 2004.

Royal Botanical Gardens, Kew, *Rosmarinus L. (Rosemary) Fact Sheet*, disponível em: <http://www.kew.org/science-conservation/plants-fungi/rosmarinus-officinalis-rosemary>
Acessado em 01/12/2015.

ROZET, E; ZIEMONS, E; MARINI, R. D; BOULANGER, B; HUBERT, P. Validation of analytical methods involved in dissolution assays: Acceptance limits and decision methodologies. **Analytica Chimica Acta**, 751 (2012) 44-51. 2012.