

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

Campus Araraquara

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Departamento de Fármacos e Medicamentos – Laboratório de Cosmetologia

**Validação de método analítico para quantificação de ácido ursólico em
emulsão cosmética utilizando CLAE**

Isabela de Freitas Ferreira

**Araraquara
2017**

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus Araraquara

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Departamento de Fármacos e Medicamentos – Laboratório de Cosmetologia

**Validação de método analítico para quantificação de ácido ursólico em
emulsão cosmética utilizando CLAE**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Graduação em
Farmácia-Bioquímica da Faculdade de
Ciências Farmacêuticas de Araraquara, da
Universidade Estadual Paulista para
obtenção do grau de Farmacêutica-
Bioquímica.

Orientanda: Isabela de Freitas Ferreira

Orientador: Prof. Dr. Marcos Antônio Corrêa

Co-orientadora: Me. Caroline Magnani Spagnol

Araraquara
2017

AGRADECIMENTOS

À minha família e meu namorado Marcos, por todo o apoio que me deram no decorrer desta jornada.

À minha companheira de laboratório Fernanda Cardoso Colombo, pela sua ajuda em todos os momentos da realização deste trabalho.

À minha co-orientadora Me. Caroline Magnani Spagnol, por me nortear nos momentos de maior dificuldade na realização dos experimentos e cálculos.

Ao meu orientador Dr. Marcos Antonio Corrêa, pelo suporte acadêmico e por sempre estar disposto a sanar minhas dúvidas.

Aos técnicos que sempre deram suporte ao me orientar sobre o uso dos equipamentos e reagentes: Ilza, Jussara, Claudia, Vinicius e Caio.

Aos professores Dr. André Luiz Gonzaga e Dra. Hérica Regina Nunes Salgado, por autorizar o uso dos equipamentos em seus laboratórios.

À Pró-Reitoria de Extensão (PROEx) pela concessão da bolsa BAAE-I.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura química do ácido ursólico.....	10
Figura 2 – Curva analítica da área do pico em função da concentração de AU (µg/mL).....	27
Figura 3 – Gráfico da dispersão dos resíduos.....	28
Figura 4 - Cromatograma da solução padrão de AU.....	29
Figura 5 - Cromatograma da solução amostra.....	29
Figura 6 - Cromatograma da solução contendo apenas os componentes da emulsão....	29
Figura 7 - Cromatogramas sobrepostos das três soluções analisadas na seletividade....	30
Figura 8 - Cromatogramas da solução de AU (600µg/mL) submetido a alta temperatura (80°C).....	30
Figura 9 - Cromatogramas da solução de AU (600µg/mL) submetido à degradação em meio ácido (80°C).....	31
Figura 10 - Cromatogramas da solução de AU (600µg/mL) submetido à degradação em meio básico (80°C).....	31
Figura 11 - Cromatogramas da solução de AU (600µg/mL) submetido a peróxido de hidrogênio (80°C).....	31
Figura 12 - Cromatogramas da solução de AU (600µg/mL) submetido à luz ultravioleta a temperatura ambiente.....	32

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Métodos analíticos descritos na literatura para a quantificação de ácido ursólico por CLAE utilizando detector de UV	16
Tabela 2 - Parâmetros estabelecidos para o método.....	19
Tabela 3 - Composição percentual da emulsão utilizada nas análises.....	20
Tabela 4 - Preparo das soluções para a análise da exatidão.....	23
Tabela 5 - Resultados do teste de conformidade do sistema cromatográfico.....	25
Tabela 6 - Resultados da análise da linearidade.....	26
Tabela 7 - Análise da variância para os valores da curva analítica.....	27
Tabela 8 - Resultados do teste de recuperação do AU.....	32
Tabela 9 - Valores de área obtidos pelos dois analistas para 600 µg/mL, média e DPR.....	33
Tabela 10 – Teste F da precisão entre analistas.....	33
Tabela 11 – Teste-t da precisão entre analistas.....	33
Tabela 12 - Resultados do teste de robustez do método.....	34

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

A_S : Fator de assimetria

AU: Ácido ursólico

CLAE: Cromatografia Líquida e Alta Eficiência

DPR (%): Desvio padrão relativo

EROS: Espécies Reativas de Oxigênio

FDA: Food and Drug Administration

ICH: International Conference on Harmonization

K: Fator de capacidade

N: Número de pratos teóricos

T_F : Fator de cauda

T_R : Tempo de retenção

UV: Ultravioleta

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	10
2 OBJETIVOS.....	12
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	12
3.1 O envelhecimento cutâneo.....	12
3.2 Ácido ursólico.....	14
3.2.1 Descrição geral.....	14
3.2.2 Aplicações.....	14
3.3 Métodos analíticos.....	15
3.4 Validação de metodologias analíticas.....	17
3.5 Química Verde.....	18
4 MATERIAL E MÉTODO.....	18
4.1 Material.....	18
4.2 Equipamento.....	19
4.3 Método.....	19
4.3.1 Preparo da solução estoque.....	19
4.3.2 Preparo da emulsão.....	20
4.3.3 Teste de conformidade do sistema cromatográfico.....	20
4.3.4 Avaliação dos parâmetros.....	21
4.3.4.1 Linearidade.....	21
4.3.4.2 Seletividade.....	22
4.3.4.3 Exatidão.....	23
4.3.4.4 Precisão.....	24
4.3.4.5 Robustez.....	24
4.3.4.6 Limites de detecção e quantificação.....	24
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	25
5.1 Conformidade do sistema cromatográfico.....	25
5.2 Validação dos parâmetros.....	25
5.2.1 Linearidade.....	26
5.2.2 Seletividade.....	28
5.2.3 Exatidão.....	32
5.2.4 Precisão.....	33

5.2.5 Robustez.....	34
5.2.6 Limites de detecção e de quantificação.....	34
6 CONCLUSÃO.....	35
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	36

RESUMO

A indústria cosmética vem ganhando grande importância no cenário econômico atual à medida que a promoção e manutenção da beleza tornam-se cada vez mais relevantes na vida de muitas pessoas. Com isso, a competitividade nesse setor aumenta em igual proporção. O desenvolvimento de novos princípios ativos é um fator essencial para a competitividade de novos produtos cosméticos. O uso de plantas medicinais para esse fim tem se destacado nos últimos 20 anos, e o Brasil, por ser um país com biodiversidade bastante expressiva, possui um verdadeiro arsenal de insumos que podem ser incorporados em formulações cosméticas. O ácido ursólico (AU) é um metabólito secundário presente em diversas plantas medicinais brasileiras, especialmente no cerrado. Por apresentar atividade antioxidante, esse princípio ativo é um alvo para o desenvolvimento de cosméticos que visam retardar o envelhecimento da pele. A solubilidade do ácido ursólico é reduzida, e, por isso, sua incorporação em formulações se torna um desafio. As emulsões são uma alternativa promissora, uma vez que o processo de emulsificação permite a preparação de misturas estáveis e homogêneas de dois líquidos imiscíveis. Visando o controle de qualidade de produtos cosméticos, o desenvolvimento de métodos analíticos para a quantificação de princípios ativos é fundamental. Sendo assim, o presente trabalho visou o desenvolvimento e validação de método analítico para a quantificação de ácido ursólico em emulsão cosmética utilizando Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Os métodos para a quantificação de ácido ursólico por CLAE presentes na literatura fazem uso de solventes de alta toxicidade como a acetonitrila e o metanol. Em contrapartida, as análises realizadas para o desenvolvimento do presente método foram feitas com solventes de menor toxicidade e ambientalmente favoráveis, inseridos no contexto da química verde. Os parâmetros analisados estão de acordo com a RDC Nº 166, de 24 de julho de 2017 da ANVISA, sendo eles linearidade, seletividade, exatidão, precisão, limite de detecção, limite de quantificação e robustez.

Palavras-chave: Ácido Ursólico, Quantificação, Cosméticos, Química Verde

ABSTRACT

Cosmetic industry has been gaining importance in the current economic scenario as the promotion and maintenance of beauty becomes more and more relevant in many people's lives. With that in mind, the competitiveness in this field increases in equal proportion. The development of new active substances is an essential point for the competitiveness of new cosmetic products. The use of medicinal plants for that matter has become very important over the last 20 years, and Brazil, with its quite significant biodiversity, has a big amount of potential active principles which can be incorporated in cosmetic formulation. Ursolic acid (UA) is a secondary metabolite found in several Brazilian medicinal plants, especially in Cerrado. Because UA presents antioxidant activity, this substance is a target for the development of cosmetic products which aim to avoid skin aging. The solubility of UA is reduced and because of that its incorporation in formulations is a challenge. Emulsions would be a great alternative, since the emulsification process allows the preparation of stable and homogeneous mixtures of two immiscible components. Aiming the quality control of cosmetic products, the development of analytical methods for the quantification of active principles is essential. Therefore, this project aims the development and validation of analytical method for the quantification of UA in emulsion using High Performance Liquid Chromatography (HPLC). Literature methods for the quantification of UA make use of highly toxic solvents like acetonitrile and methanol. On the other hand, this method provides analysis with green solvents, less toxic and environmentally friendly. The parameters that will be analyzed are in accordance with RDC N° 166 (July 24th, 2017) of ANVISA: linearity, selectivity, accuracy, precision, limit of detection, limit of quantification and robustness.

Key words: Ursolic Acid, Quantification, Cosmetics, Green Chemistry.

1 INTRODUÇÃO

De acordo com a RDC 211, de 14 de julho de 2005 da ANVISA, definem-se produtos de higiene pessoal, perfumes e cosméticos (HPPC) como:

“... preparações constituídas por substâncias naturais ou sintéticas, de uso externo nas diversas partes do corpo humano, pele, sistema capilar, unhas, lábios, órgãos genitais externos, dentes e membranas mucosas da cavidade oral, com o objetivo exclusivo ou principal de limpá-los, perfumá-los, alterar sua aparência e ou corrigir odores corporais e ou protegê-los ou mantê-los em bom estado.”

A indústria cosmética brasileira vem apresentando grande crescimento com o passar dos anos, tendo passado de um faturamento de R\$ 4,9 bilhões em 1996 para R\$ 42,6 bilhões em 2015 (ABIHPEC, 2016).

No Brasil, esse setor é caracterizado pela forte presença de empresas nacionais e grandes multinacionais. A facilidade da manipulação de formulações cosméticas pode ser um fator que justifica a grande diversidade de empresas nesse setor. Consequentemente, a competitividade se torna muito grande e há uma necessidade constante de apresentar novidades (BNDES, 2007). Sendo assim, a busca por novos princípios ativos é fundamental para que o produto se destaque no mercado cosmético.

Nos últimos anos, as plantas medicinais ganharam grande importância na pesquisa por novos insumos. O Brasil, por apresentar grande biodiversidade em sua flora, tem sido alvo de pesquisas por empresas cosméticas do mundo todo (BARBOSA & BICHARA, 2015).

O ácido ursólico (AU) é um triterpeno pentacíclico (Figura 1) amplamente encontrado em plantas medicinais, como por exemplo, *Rosmarinus officinalis* (LIU, 1995), *Eugenia brasiliensis* (FRIGHETTO et. al, 2005) e *Pouteria venosa* (MONTENEGRO et. al, 2006) todas encontradas no Brasil.

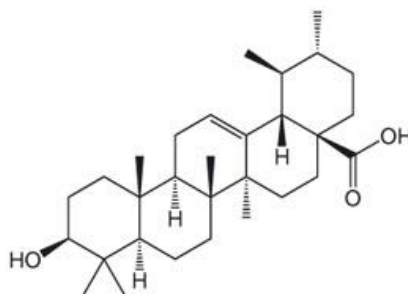


Figura 1. Estrutura química do ácido ursólico.

O AU vem ganhando a atenção de pesquisadores de todo o mundo por ter demonstrado atividade antitumoral (SHANMUGAM et al, 2013), tripanocida (FERREIRA, 2010), anti-hiperlipidêmica, hipoglicemiante (SOMOVA, 2003), antioxidante (YIN, 2007), dentre outras. A atividade antioxidante do AU é uma característica interessante para a indústria cosmética, uma vez que está relacionada à prevenção do envelhecimento precoce ao inibir o estresse oxidativo, o que faz do composto um potencial princípio ativo a ser incorporado em formulações cosméticas.

Devida a sua baixa solubilidade em água, o uso de emulsões como forma cosmética para formulações contendo AU é pertinente, pois permite que, pela adição de tensoativos, dois componentes imiscíveis formem uma mistura estável e homogênea (ANSEL, 2000).

A presença de produtos cosméticos contendo AU no mercado é muito recente. Portanto, a disponibilidade de informações acerca do controle de qualidade relacionadas a esse produto é escassa. A fim de garantir a qualidade de produtos cosméticos, o desenvolvimento e validação de métodos analíticos para a quantificação de princípios ativos é um passo importante (SPAGNOL, 2014). A validação demonstra que o método quantifica o princípio ativo com confiabilidade, mesmo na presença de outros componentes, sendo imprescindível para as Boas Práticas de Fabricação segundo a RDC nº 17 de 2010 da ANVISA.

Não existe, até o presente momento, nenhum método analítico para a quantificação de AU nos compêndios oficiais, e grande parte dos artigos atuais preconiza quantificação da referida substância por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), como pode ser observado em ELOUY et al., 2012; ALVARADO et al., 2015; TARALKAR, 2012 e SUNDARAM et al., 2012.

Sendo assim, o presente trabalho visou o desenvolvimento e validação de métodos analíticos para a quantificação do ácido ursólico utilizando Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Ademais, os métodos analíticos para a quantificação de AU por CLAE presentes na literatura utilizam-se de solventes que geram resíduos tóxicos, como o metanol e a acetonitrila. Diante disso, o método foi desenvolvido com o intuito de utilizar solventes verdes que gerem menos resíduos tóxicos.

O controle de qualidade em indústrias farmacêuticas requer métodos analíticos confiáveis, mas que ao mesmo tempo sejam simples, rápidos, versáteis, menos custosos e que sejam ambientalmente favoráveis. A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência é

muito utilizada devido à possibilidade de se obter dados qualitativos e quantitativos de amostras diferentes em uma só corrida (KARCHER et al., 2005; SPAGNOL et al., 2016).

No caso de metodologias analíticas não descritas em farmacopeias ou compêndios oficiais, a RDC Nº 166, de 24 de julho de 2017 da ANVISA preconiza que os seguintes parâmetros devem ser avaliados para que o método seja validado: linearidade, seletividade, exatidão, precisão e robustez. Desse modo, foram esses os parâmetros analisados neste trabalho. Também foram determinados os limites de detecção e de quantificação do método.

2 OBJETIVOS

O objetivo do trabalho é o desenvolvimento e validação de um método analítico para a quantificação de ácido ursólico em emulsão cosmética utilizando CLAE, fazendo uso de solventes menos tóxicos para o operador e para o meio ambiente.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 O envelhecimento cutâneo

O envelhecimento é um processo biológico de alta complexidade. Sua evolução é bastante variável tanto entre os indivíduos quanto entre órgãos vitais de um mesmo indivíduo (BAGATIN, 2009).

Com o passar dos anos, as células perdem sua capacidade de responder a estímulos proliferativos (HAYFLICK, 1977), o que levou a teoria que o envelhecimento é um mecanismo de prevenção ao câncer que evoluiu em organismos multicelulares, uma vez que inibe a proliferação de um grande número de células que muito provavelmente sofreram danos cumulativos em seu DNA durante anos (CAMPISI, 1996).

Diversos são os mecanismos que explicam o processo de envelhecimento, mas grande parte deles citam danos intrínsecos e extrínsecos ao DNA. Danos intrínsecos estão relacionados ao envelhecimento cronológico, e dependem apenas da passagem do tempo *per se*. Já os danos extrínsecos possuem causas variadas e estão relacionados a fatores externos, sendo o mais importante a exposição à radiação ultravioleta (UV) Dentre os principais mecanismos, é importante considerar o encurtamento dos telômeros e o estresse oxidativo e fotoenvelhecimento.

- Encurtamento dos telômeros: telômeros são estruturas compostas de proteínas e DNA não codificantes que se localizam nas extremidades dos cromossomos. Sua presença protege o material genético da degradação e fusão. Estudos demonstram que o comprimento de telômeros obtidos *in vivo* é inversamente proporcional à idade fisiológica do indivíduo, decrescendo a cada divisão celular (HARLEY et al., 1990; ALLSOP et al., 1992). O comprimento do telômero pode também influenciar a expressão de certos genes adjacentes a ele que podem estar relacionados à idade mais avançada (NING et al., 2003).

- Estresse oxidativo e fotoenvelhecimento: A teoria segundo a qual o envelhecimento precoce está relacionado ao estresse oxidativo foi desenvolvida por Harman (1956). Segundo o autor, a oxidação de proteínas, lipídios e do DNA levam a alterações lentas e progressivas, culminando no envelhecimento. Essa oxidação é causada por radicais livres, espécies químicas que possuem um elétron desemparelhado em sua órbita mais externa. Esse quadro confere grande instabilidade energética, e, para conseguir estabilidade, o radical livre doa ou retira elétron de outra molécula, provocando uma reação em cadeia. Esses radicais livres são produzidos pelas células normalmente, e o organismo possui um mecanismo antioxidante para combatê-los. Porém, quando esse mecanismo não é suficiente, ocorre o quadro de estresse oxidativo (SCHAFFER & BUETTNER, 2001; FINKEL & HOLBROOK, 2000). Um dos principais elementos exógenos responsáveis pela geração de radicais livres é a radiação ultravioleta (UV) emitida pelo sol. Os raios UV geram fotoquimicamente EROS (Espécies Reativas de Oxigênio), que por sua vez recrutam uma sequência de respostas moleculares específicas, responsáveis pelos danos teciduais à pele, incluindo receptores de superfície celular, sinalização por proteínas quinase, fatores de transcrição e enzimas que participam da síntese e degradação de proteínas responsáveis pela firmeza e resistência da pele, além dos efeitos deletérios às biomoléculas como citado acima (FISHER et al., 2002).

A pele, como todos os órgãos, sofre envelhecimento, e por estar sempre em contato direto com o ambiente pode sofrer maiores alterações relativas a fatores extrínsecos, como os raios ultravioleta (FISHER et al., 2002). Para diminuir esse quadro e conseqüentemente retardar o envelhecimento, uma alternativa seria o uso de antioxidantes em alimentos, bebidas e cosméticos (LOBO et al., 2010), uma vez que estes possuem a capacidade de doar um elétron à espécie reativa, neutralizando-a, e

ainda assim continuarem estáveis, inibindo assim a reação em cadeia gerada pelos radicais livres (HALLIWELL, 1995)

3.2 Ácido ursólico

3.2.1 Descrição geral

Nome: Ácido ursólico, Ursolic Acid

Nome químico (IUPAC): (1S,2R,4aS,6aR,6aS,6bR,8aR,10S,12aR,14bS)-10-hydroxy-1,2,6a,6b,9,9,12a-heptamethyl-2,3,4,5,6,6a,7,8,8a,10,11,12,13,14b-tetradecahydro-1H-picene-4a-carboxylic acid.

Fórmula química: C₃₀H₄₈O₃

Massa molecular: 456.711 g/mol

Propriedades físico-químicas: Apresenta-se como um pó branco e muito fino. Sua solubilidade em água é praticamente nula. É pouco solúvel em etanol, ligeiramente solúvel em metanol, moderadamente solúvel em acetona. É solúvel em ácido acético glacial quente (O'NEIL, 2006).

O AU faz parte dos triterpenos, metabólitos secundários amplamente distribuídos entre espécies vegetais. Seu conteúdo varia muito entre as espécies, dependendo da presença e/ou atividade de enzimas responsáveis pela síntese desse metabólito. De uma maneira geral, é encontrado em folhas, cascas de caule e frutos. *Origanum majorana*, *Rosmarinus officinalis*, *Salvia officinalis*, *Eucalyptus* e *Coffea arabica* estão entre as espécies com o maior teor de AU (WOZNIAK et al., 2015).

3.2.2 Aplicações

O ácido ursólico tem chamado a atenção da comunidade científica por todo o mundo por apresentar um gama de atividades farmacológicas. Dentre elas, vale destacar sua atividade antineoplásica, antimicrobiana e antioxidante.

Segundo Wozniak, 2015, a atividade antineoplásica do AU reside no fato de que o composto atua não só na eliminação de células cancerígenas, mas também auxilia na modulação do metabolismo em termos de prevenção à angionênse e metástase. Além disso, a atividade anti-inflamatória e antioxidante do AU diminui as chances de formação de neoplasias.

O AU também é ativo frente a diversas espécies de microrganismos patogênicos, como *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, dentre outros. A resistência a antimicrobianos têm sido um problema cada

vez mais frequente e, como a disponibilidade de fármacos se estreita diante desses microorganismos, faz-se necessário o desenvolvimento de compostos alternativos que auxiliem no tratamento de doenças infecciosas. Foi demonstrado que AU induz a autólise da célula bacteriana, inibe a formação de biofilmes e regula genes de expressão bacterianos (KUREK *et al.*, 2010).

A atividade antioxidante do AU é de especial importância para a cosmetologia. Porém, para além deste ramo, o estresse oxidativo está envolvido não só com o envelhecimento precoce, mas também com o desenvolvimento de inúmeras doenças crônicas, como aterosclerose, infarto do miocárdio, Alzheimer e desordens cromossômicas. Em estudos utilizando linfócitos humanos, o pré-tratamento com AU anulou o efeito oxidativo induzido por raios UV-B através da inibição da peroxidação lipídica. Evidências mostram que o AU otimiza a recuperação da atividade de enzimas envolvidas da detoxificação, como superóxido dismutase, catalase e glutathione redutase (KASHYAP, 2016).

3.3 Métodos analíticos

Não existe, até o momento, nenhum método analítico para a quantificação de ácido ursólico nos compêndios oficiais, porém grande parte dos artigos atuais preconiza quantificação da referida substância por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). CLAE é um método versátil, pois permite a análise qualitativa e quantitativa de substância, além de também ser um método de separação de enantiômeros, macromoléculas biológicas e outras espécies complexas de grande importância para pesquisa e para a clínica. CLAE também apresenta um tempo de análise reduzido, alta precisão e poder de resolução (SNYDER *et al.*, 2010). Na Tabela 1 são apresentados métodos analíticos atuais validados para a quantificação de AU por CLAE utilizando detector de UV.

Tabela 1. Métodos analíticos descritos na literatura para a quantificação de ácido ursólico por CLAE utilizando detector de UV.

Coluna	Fase móvel	Matriz	Vazão	Tempo de retenção	Comprimento de onda	Referências
C18 Lichrospher® Merk (250 mm x 4,6 mm; 5 µm)	Acetonitrila:água (88:12, v/v)	Dispersões sólidas	1,0mL/min	11 min	203nm	ELOY et al., 2012
Kromasil 100 C18 column (250 mm × 4,6 mm; 5 µm)	Acetonitrila:água (85:15 v/v)	Extrato de <i>P. venosa</i>	1,0mL/min	15min	210nm	ALVARADO et al., 2015
Luna C-18 column (250 mm × 4.6 mm; 5 µm)	Metanol:tampão fosfato 0,01M (88:12 v/v)	Extrato de <i>P. spica</i>	0,8mL/min	25min	210nm	LEEA et al., 2009
Waters RP-18 column (250 mm × 4,6 mm; 5 µm)	Metanol: sol. Aquosa pH 3,5 (88:12 v/v)	Extrato de <i>E. tereticornis</i>	1,0mL/min	9,7min	210nm	MAURYA & SRIVASTA, 2012
Symmetry® C18 (250 mm x 4,6 mm; 5µm)	Acetonitrila:metanol (80:20 v/v)	Extrato de <i>V. negundo</i>	0,5ml/min	12,36min	210nm	TARALKAR & CHATTOPADHYA Y, 2012

3.4 Validação de metodologias analíticas

A validação é um ato documentado que comprova que o procedimento ou equipamento em questão realmente leva aos resultados esperados (BRASIL, 2003). Dessa forma, no caso de metodologias analíticas, a validação demonstra que o método proposto mede com confiabilidade o que foi destinado a medir. É uma ferramenta imprescindível para a garantia de qualidade de produtos e processos segundo as Boas Práticas de Fabricação (BRASIL, 2010).

Segundo a RDC 166 de 2017 da ANVISA, para metodologias cuja finalidade é o doseamento (quantificação), os parâmetros a serem validados são: linearidade, seletividade, exatidão, precisão e robustez. No método validado neste trabalho, também foram determinados os limites de detecção e quantificação.

Linearidade: A linearidade demonstra a capacidade da metodologia analítica de fornecer um resultado que é diretamente proporcional à concentração do analito na amostra.

Seletividade: A seletividade de um procedimento analítico representa sua capacidade de avaliar de forma inequívoca a substância em análise na presença de componentes que poderiam interferir com a sua determinação, como componentes da matriz e produtos de degradação.

Exatidão: A exatidão representa a proximidade do resultado obtido experimentalmente pelo método analítico em desenvolvimento com a concentração teórica.

Precisão: A precisão está relacionada à proximidade dos resultados obtidos a partir de uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra. A precisão intradia é avaliada por meio da repetibilidade, com os mesmos analistas e equipamentos. Já a precisão intermediária refere-se à concordância dos resultados variando-se os analistas, equipamentos e dias.

Robustez: A robustez é a capacidade de um método analítico de resistir às pequenas variações dos parâmetros analíticos.

Limite de detecção: O limite de detecção representa a menor quantidade do princípio ativo que pode ser detectado em uma amostra, sob as condições experimentais estabelecidas.

Limite de quantificação: O limite de quantificação é a menor quantidade do princípio ativo que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis em uma amostra, sob as condições experimentais estabelecidas.

3.5 Química Verde

Embora diversos fatores estejam envolvidos na degradação e poluição do meio ambiente, a atividade química é frequentemente associada a essa prática, uma vez que muitos resíduos tóxicos são gerados e muitas vezes não são tratados. A fim de minimizar esse quadro, surge a química verde ou green chemistry, que pode ser definida como um conjunto de esforços em prol da redução ou eliminação do uso e consequentemente da geração de compostos tóxicos aos humanos e ao meio ambiente (LENARDÃO et al., 2003).

Como explicado anteriormente, os métodos analíticos para a quantificação de ácido ursólico por CLAE presentes na literatura fazem uso de solventes como a acetonitrila e o metanol. Ambos os solventes podem causar intoxicações graves em seres humanos.

A acetonitrila é rapidamente absorvida pela mucosa gastrintestinal, pela via cutânea e pelos pulmões. Os sintomas relatados em casos de intoxicação pelo solvente são dor e rigidez peitoral, vômitos, hipotensão, dores de cabeça, fadiga e tontura. Seus efeitos tóxicos parecem estar associados à conversão da acetonitrila a cianeto, já que os níveis séricos de tiocianato estão elevados em indivíduos que sofrem intoxicação aguda (HSDB, 2017a).

Os seres humanos e primatas são particularmente sensíveis ao metanol, pois possuem uma deficiência na metabolização do formato, que se acumula no organismo podendo levar à acidose metabólica, cegueira, depressão do sistema nervoso central, coma e morte (HSDB, 2017c).

O etanol, solvente orgânico utilizado para o desenvolvimento e validação do método descrito neste trabalho, é consideravelmente menos tóxico que o metanol e acetonitrila. Além disso, o etanol possui um custo muito menor que ambos os solventes, sendo caracterizado como um solvente verde (HSDB, 2017b)

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

Ácido ursólico 90% Sabinsa Corporation, água ultrapura (obtida pelo sistema Milli-Q®), etanol grau CLAE (marca Panreac® e J.T.Baker®), ácido acético glacial grau CLAE (J.T. Baker), filtro hidrofóbico de PTFE 0,22 µm.

4.2 Equipamentos

Pipetador automático de 100-1000 µL, 500-5000 µL (Eppendorf), balança analítica, ultrassom, cromatógrafo CLAE - PDA analítico marca Perkin-Elmer, constituído por degaseificador, sistema quaternário de bombeamento, injetor manual, forno de coluna (a 30 °C), detector PDA com cela analítica e detector UV-VIS com cela preparativa, coluna RP18 (XDB, 4,6 x 250 mm, 5 µm, Waters), câmara UVC 254nm.

4.3 Método

Foram testadas diversas condições cromatográficas visando obter uma quantificação confiável do fármaco, diminuição dos desvios, redução da assimetria do pico, redução de danos à coluna cromatográfica e diminuição da geração de resíduos tóxicos. O equipamento utilizado foi o cromatógrafo CLAE - PDA analítico marca Perkin-Elmer, constituído por degaseificador, sistema quaternário de bombeamento, injetor manual, forno de coluna (a 30 °C), detector PDA com cela analítica e detector UV-VIS com cela preparativa. A partir dos testes preliminares, foi possível determinar as condições ideais para o método, representada na Tabela 2.

Tabela 2 – Parâmetros estabelecidos para o método.

Parâmetros	Descrição
Coluna	RP18 (XDB, 4,6 x 250 mm, 5 µm, Waters®)
Fase móvel	etanol:água acidificada 1% com ácido acético (85:15 v/v)
Vazão	0,6mL/min
Tempo de retenção	8,5 minutos
Comprimento de onda	210 nm
Volume de injeção	20µL

4.3.1 Preparo da solução estoque

Para o preparo das soluções contendo ácido ursólico para a análise, o padrão de referência utilizado foi ácido ursólico a 90%, adquirido da empresa Sabinsa Corporation.

A concentração da solução estoque foi determinada em função das concentrações utilizadas para a construção da curva analítica. Foram pesadas analiticamente 120mg de ácido ursólico, que posteriormente foi transferido para um balão de 100 mL e então diluído no mesmo sistema de solvente da fase móvel do método: 85% de

etanol e 15% de água acidificada a 1% com ácido acético. Obteve-se assim solução estoque de concentração 1200µg/mL.

4.3.2 Preparo da emulsão

A composição da emulsão cosmética utilizada para as análises da exatidão e seletividade encontram-se na Tabela 3.

Tabela 3. Composição percentual da emulsão utilizada nas análises.

	INCI name	%(m/m)	Função
1	Cetearyl Acohol	4,0%	Agente de consistência
2	Ceteareth-20	2,0%	Tensoativo não-iônico
3	Ethylhexil Stearate	1,5%	Emoliente
4	Glyceryl Stearate	1,0%	Agente de consistência
5	Propylenoglycol	3,0%	Umectante
6	Sodium Polyacrylate	1,5%	Polímero hidrofílico espessante
7	Water	q.s.p 100g	Veículo

Os componentes da emulsão foram primeiramente pesados em balança semi-analítica, em recipientes apropriados. A emulsão foi preparada por mistura da fase oleosa (itens 1, 2, 3 e 4) aquecida a 70°C sobre a fase aquosa (itens 5, 6 e 7) a 70°C, com agitação manual até completa homogeneização. A mistura realizada não foi misturada em conformidade com o que preconiza a literatura (fase aquosa sobre a oleosa), uma vez que a fase aquosa formada com o poliacrilato de sódio possui grande viscosidade, o que dificultaria a transferência para o recipiente contendo a fase oleosa, além da possibilidade de perdas por transferência.

4.3.3 Teste de conformidade do sistema cromatográfico

Segundo a ICH, o teste de conformidade do sistema cromatográfico é parte integrante do processo de validação, uma vez que permite verificar se o método proposto é capaz de fornecer resultados com exatidão e precisão confiáveis. Os parâmetros calculados para a verificação foram: tempo de retenção (T_R), área do pico, fator de capacidade (K), fator de cauda (T_F), fator de assimetria (A_S) e número de pratos

teóricos (N). O teste foi realizado com uma solução padrão de AU de concentração 600µg/mL, em triplicata. Também foram os desvio-padrão relativos (DPR) e a média.

As equações para os cálculos de K, T_F, A_S e N estão representados pelas Equações 1, 2, 3 e 4 respectivamente:

$$K = \frac{(t_R - t_M)}{t_M} \quad \text{Equação 1}$$

Em que:

t_R = tempo de retenção

t_M = volume morto

$$T_F = \frac{a+b}{2a} \quad \text{Equação 2}$$

$$A_S = \frac{b}{a} \quad \text{Equação 3}$$

Em que:

a = distância do ponto frontal ao ponto médio do pico a 5% para o cálculo e T_F e 10% para o cálculo de A_S

b = distância do ponto posterior ao ponto médio do pico a 5% para o cálculo e T_F e 10% para o cálculo de A_S

$$N = 5,54 \left(\frac{t_R}{W_{50}} \right)^2 \quad \text{Equação 4}$$

Em que:

t_R = tempo de retenção

W₅₀ = largura do pico a meia altura

4.3.4 Avaliação dos parâmetros

4.3.4.1 Linearidade

Para a análise da linearidade foram preparadas, a partir da solução estoque, soluções de concentração 200, 400, 600, 800, 1000 µg/mL em balões de 5mL diluídas com o mesmo sistema de solventes da fase móvel, em triplicata. Em seguida, as

soluções foram filtradas em filtro hidrofóbico de PTFE 0,22 μm e injetadas no cromatógrafo. O procedimento foi realizado três vezes.

A partir dos resultados obtidos, foi construída uma curva analítica da área do pico em função da concentração de AU das soluções, obtendo-se uma equação da reta pelo método dos mínimos quadrados, juntamente com o coeficiente de correlação (r). Os resultados da linearidade foram tratados estatisticamente utilizando a análise da variância (ANOVA) com um nível de significância a 5% e gráfico de dispersão dos resíduos.

4.3.4.2 Seletividade

Para a análise da seletividade, foi realizada a comparação dos cromatogramas de uma solução padrão de AU de concentração 600 $\mu\text{g/mL}$, de uma solução contendo AU 600 $\mu\text{g/mL}$ juntamente com os componentes da emulsão (solução amostra) e de uma solução placebo contendo apenas os componentes da matriz.

O preparo da solução padrão foi feito a partir de uma solução estoque de 1200 $\mu\text{g/mL}$, de modo semelhante ao preparo das soluções da linearidade.

Para o preparo da solução amostra, foram pesadas analiticamente 60mg de AU e 1,2g de emulsão, que posteriormente foram transferidos para um balão de 50 mL simulando uma emulsão contendo ácido ursólico a 5%. O volume foi completado com o mesmo sistema de solventes da fase móvel e a solução foi filtrada em papel de filtro, obtendo-se solução de AU com concentração 1200 $\mu\text{g/mL}$. A partir desta solução estoque, foi preparada uma solução de AU 600 $\mu\text{g/mL}$, que por sua vez foi filtrada em filtro hidrofóbico de PTFE 0,22 μm e injetada no cromatógrafo.

A solução contendo apenas os componentes da emulsão foi feita da mesma maneira da solução da anterior, excetuando-se o fato que não foi acrescentado o ácido ursólico.

Além do procedimento analítico descrito acima, a seletividade também foi avaliada submetendo o AU a condições de estresse durante 48 horas, de modo a verificar se produtos de degradação da matéria prima interfeririam na quantificação do AU. As condições testadas foram:

Alta temperatura (80°C): Foi preparada 25mL uma solução de AU a 600 $\mu\text{g/mL}$ e depois submetida a banho de aquecimento a 80° durante 48 horas.

Meio ácido a 80°C: Foi preparada 25mL uma solução de AU a 600µg/mL e ácido clorídrico a 0,005M e depois submetida a banho de aquecimento a 80° durante 48 horas.

Meio básico a 80°C: Foi preparada 25mL uma solução de AU a 600µg/mL e hidróxido de sódio a 0,05M e depois submetida a banho de aquecimento a 80° durante 48 horas.

Condição oxidante - peróxido de hidrogênio a 80°C: Foi preparada 25mL uma solução de AU a 600µg/mL e peróxido de hidrogênio a 0,25% e depois submetida a banho de aquecimento a 80° durante 48 horas.

Luz ultravioleta: Foi preparada 25mL uma solução de AU a 600µg/mL e depois submetida à luz ultravioleta em câmara (UVC, 254nm) durante 48 horas em temperatura ambiente.

O solvente utilizado nos preparos das soluções foi o mesmo sistema de solventes da fase móvel.

Os tempos de coleta das soluções foram: 0, 2, 4, 8, 24 e 48 horas.

4.3.4.3 Exatidão

Para a análise da exatidão foi utilizado o método de recuperação, no qual quantidades conhecidas de solução estoque de AU a 1200µg/mL foram adicionadas à solução contendo os componentes da matriz (solução placebo) diluídos no sistema de solventes da fase móvel. As concentrações utilizadas no teste foram 80% (R1), 100% (R2) e 120% (R3) em relação à concentração de trabalho (600 µg/mL). As soluções para análise foram preparadas de acordo com a Tabela 4, em balões de 10mL e em triplicata.

Tabela 4 - Preparo das soluções para a análise da exatidão.

	Volume adicionado de solução placebo (mL)	Volume adicionado de padrão (1200µg/mL) (mL)	Concentração final teórica (µg/mL)
P	-	5,0	600
R1	4,0	4,0	480
R2	4,0	5,0	600
R3	4,0	6,0	720

Os volumes que não totalizaram 10mL de acordo com a tabela foram completados com fase móvel.

As soluções foram injetadas no cromatógrafo e os resultados foram obtidas as porcentagens de recuperação em relação à solução padrão de 600µg/mL. De acordo com a AOAC, os limites aceitáveis para a porcentagem de recuperação é de 98% a 101%

4.3.4.4 Precisão

A precisão intradia foi avaliada por meio da repetibilidade, na qual sete réplicas da solução de ácido ursólico na concentração de 600 µg/mL foram analisadas no mesmo dia, sob as mesmas condições experimentais e pelo mesmo analista. Também foi realizada a precisão entre analistas (precisão intermediária), na qual o mesmo procedimento descrito foi feito por dois analistas. Os resultados obtidos foram estatisticamente tratados utilizando o teste F e posteriormente o teste-t, com o intuito de se verificar se houve diferença estatisticamente significativa entre as medidas dos dois analistas.

4.3.4.5 Robustez

A robustez foi avaliada modificando-se condições cromatográficas previamente estabelecidas. Foi injetado no cromatógrafo, em triplicata, solução contendo ácido ursólico de concentração 600µg/mL alterando-se as variáveis:

Vazão da fase móvel: 0,58 mL/min, 0,60 mL/min e 0,62 mL/min.

Proporção da fase móvel: etanol e água 83:17, 85:15 e 87:13.

Fabricante do etanol: JT Baker® e Panreac®.

4.3.4.6 Limites de detecção e quantificação

Os limites de detecção e de quantificação foram calculados baseados desvio padrão dos resultados e na inclinação da curva analítica. A Equação 5 corresponde ao cálculo do limite de detecção e a Equação 6 corresponde ao limite de quantificação:

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

Equação 5

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

Equação 6

Em que:

σ= desvio padrão do intercepto com o eixo do Y de, no mínimo, três curvas analítica.

S= inclinação da curva analítica

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Conformidade do sistema cromatográfico

Os resultados obtidos no teste de conformidade do sistema cromatográfico estão representados na Tabela 5.

Tabela 5. Resultados do teste de conformidade do sistema cromatográfico.

	Tempo de retenção	Área	Fator de capacidade	Fator de cauda	Fator de assimetria	Número de pratos
	8,580	8612058	2,486	0,98	1,02	5567,09
	8,567	8230200	2,446	0,98	1,03	5574,11
	8,588	8362323	2,472	0,98	1,02	5187,43
	8,543	8260423	2,437	0,94	0,95	5497,06
	8,546	8849172	2,436	0,97	1,02	5532,02
Média	8,564	8481343	2,455	0,97	1,00	3471,54
DPR (%)	0,233	3,108	0,914	1,785	3,245	2,956

Os valores preconizados pelo FDA para fator de capacidade (K), fator de cauda (T_F), de assimetria (A_S) e número de pratos teóricos (N) são, respectivamente: $K > 2$, $T_F \leq 2$, $A_S \leq 2$ e $N > 2000$.

Ao comparar os resultados obtidos com os preconizados, é possível concluir que o sistema cromatográfico estabelecido é adequado e fornece resultados precisos e exatos.

5.2 Validação dos parâmetros

5.2.1 Linearidade

Os valores para cada concentração analisada, as médias e desvios-pradão relativos (DPR%) estão representados na Tabela 6.

Tabela 6. Resultados da análise da linearidade.

Concentração (µg/mL)	Área	Média	DPR (%)
200	2917717,9233	3017058,0867	2,8550
	3070993,9700		
	3062462,3667		
400	5490904,6500	5671724,5045	3,3375
	5655783,0367		
	5868485,8267		
600	8573884,4800	8516776,2833	1,7953
	8632900,5400		
	8343543,8300		
800	11035009,5967	11085840,0367	2,3050
	10859545,5700		
	11362964,9433		
1000	13622223,7333	13768969,4578	1,0215
	13782086,6800		
	13902597,9600		

A curva analítica obtida a partir dos resultados está representada na Figura 2, assim como a equação da reta e o valor do coeficiente de correlação (r).

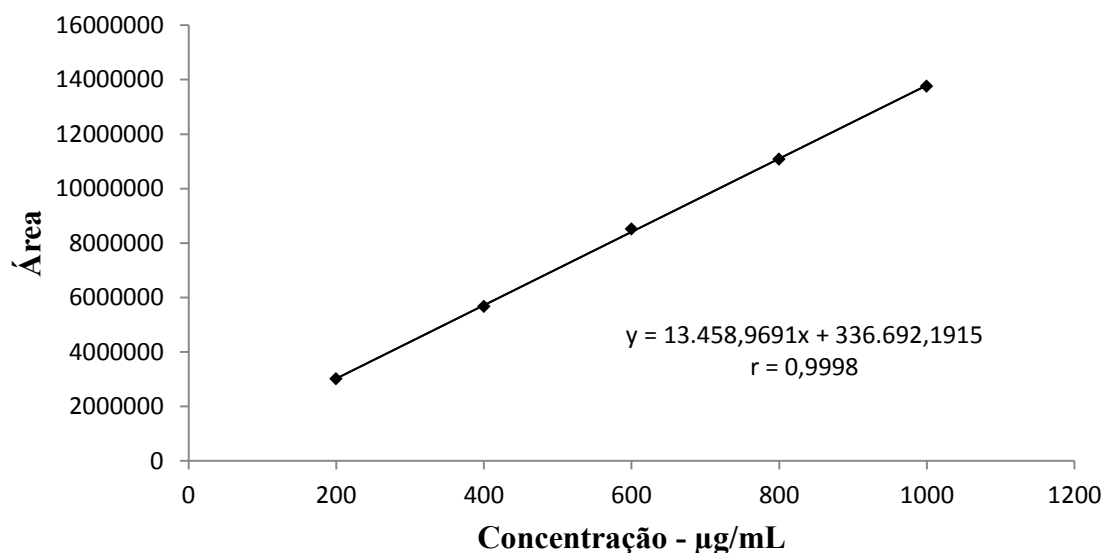


Figura 2 – Curva analítica da área do pico em função da concentração de AU (µg/mL)

Foi realizada a análise da variância (ANOVA) para os valores da curva analítica obtida. Os resultados estão apresentados da Tabela 7.

Tabela 7. Análise da variância para os valores da curva analítica.

Fontes de variação	Graus de liberdade	Soma de quadrados	Variância	F calculado	F tabelado
Entre concentrações	4	217416085185233	54354021296308	1791,42	3,48
Regressão linear	1	217343643681450	217343643681450	7163,27	4,96
Desvio de linearidade	3	72441503782	24147167927	0,80	3,71
Resíduos	10	303413815224	30341381522	-	-
Total	14	217719499000458	-	-	-

O gráfico de dispersão dos resíduos utilizando os dados da linearidade está representado na Figura 3.

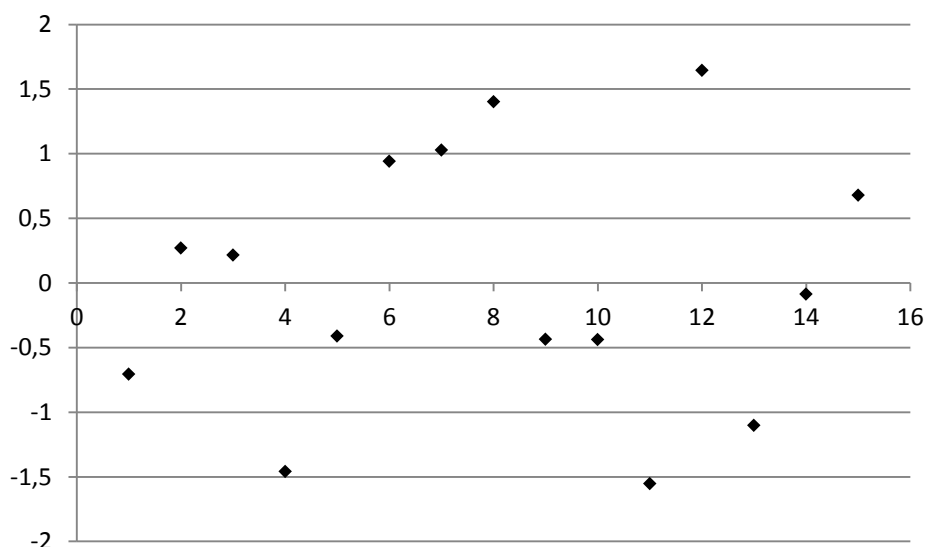


Figura 3. Gráfico da dispersão dos resíduos

Analisando os resultados obtidos, é possível concluir que o método se apresentou linear na faixa de concentração analisada, uma vez que o valor de r obtido foi de 0,9998. A análise da variância (ANOVA) demonstrou que não houve variação significativa entre as doses, uma vez que F calculado (1791,92) > F tabelado (3,48). O desvio da linearidade também não foi significativo, pois F calculado (0,80) < F tabelado (3,71). A análise também demonstrou que a regressão linear foi significativa, visto que F calculado (7163,27) > F tabelado (4,96).

O gráfico de dispersão dos resíduos também mostrou resultados favoráveis, pois os pontos não ultrapassam os valores 2 e -2 no eixo vertical.

5.2.2 Seletividade

Os cromatogramas obtidos na análise da seletividade da solução padrão, amostra e solução placebo estão representados nas Figuras 4, 5 e 6, respectivamente.

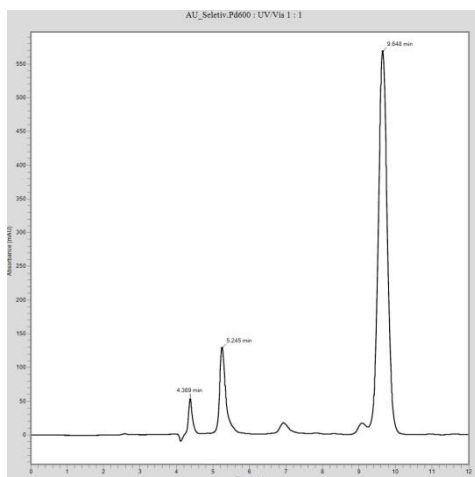


Figura 4. Cromatograma da solução padrão de AU.

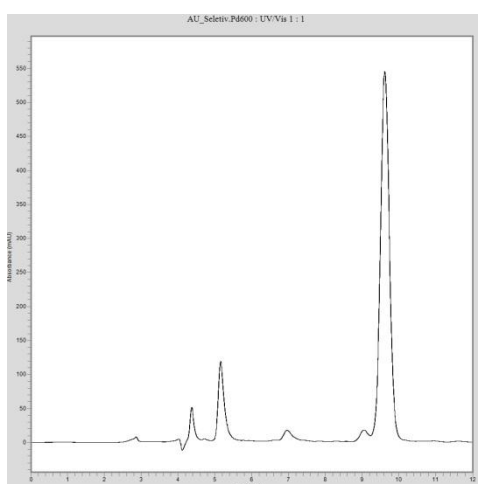


Figura 5. Cromatograma da solução amostra.

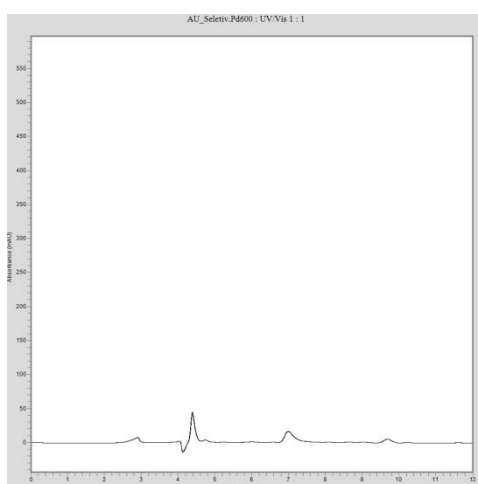


Figura 6. Cromatograma da solução contendo apenas os componentes da emulsão.

Os três cromatogramas foram sobrepostos e estão representados na Figura 7.

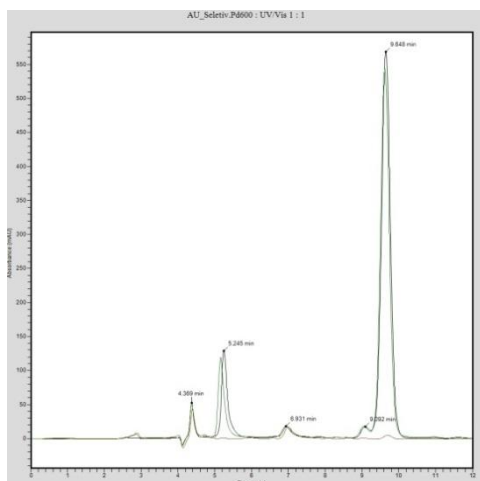


Figura 7. Cromatogramas sobrepostos das três soluções analisadas na seletividade.

A partir da observação dos cromatogramas sobrepostos, conclui-se que os componentes da emulsão não interferem na quantificação do ácido ursólico, o que demonstra a seletividade do método frente aos componentes da matriz (emulsão).

Os cromatogramas obtidos do estudo de degradação forçada em alta temperatura (80°C), meio ácido a 80°C, meio básico a 80°C, peróxido de hidrogênio a 80°C e luz ultravioleta estão representados nas Figuras 8, 9, 10, 11 e 12 respectivamente. Os tempos sobrepostos foram: 0, 8, 24 e 48 horas.

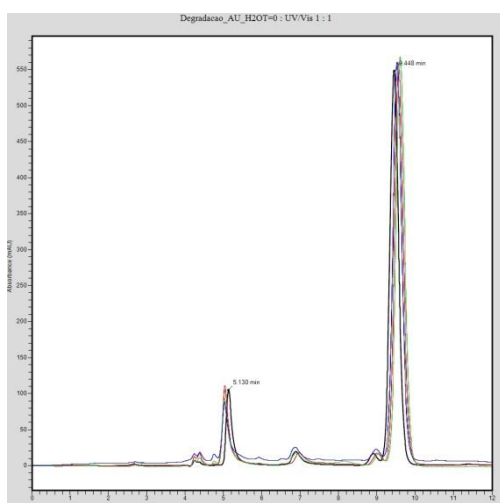


Figura 8. Cromatogramas da solução de AU (600µg/mL) submetida à alta temperatura (80°C).

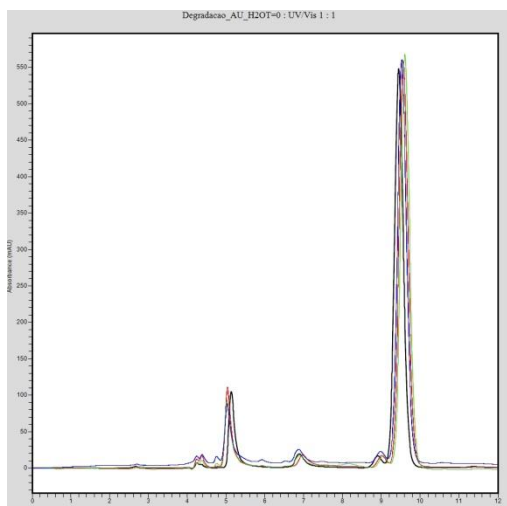


Figura 9. Cromatogramas da solução de AU (600µg/mL) submetida à degradação em meio ácido (80°C).

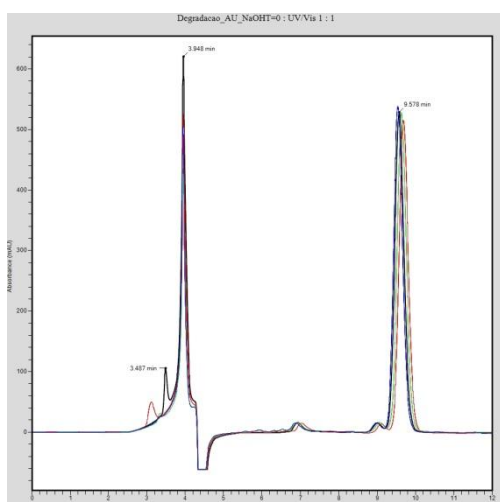


Figura 10. Cromatogramas da solução de AU (600µg/mL) submetida à degradação em meio básico (80°C).

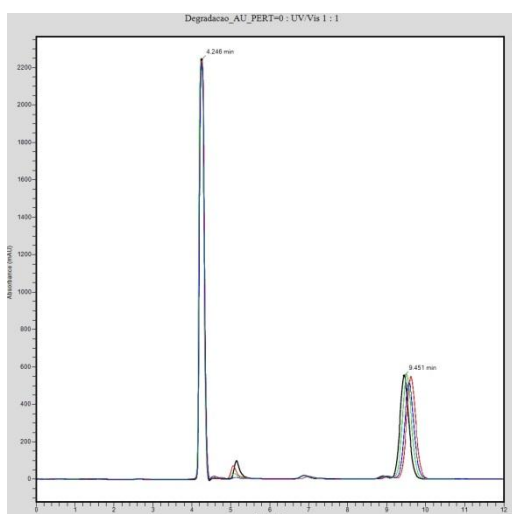


Figura 11. Cromatogramas da solução de AU (600µg/mL) submetida a peróxido de hidrogênio (80°C).

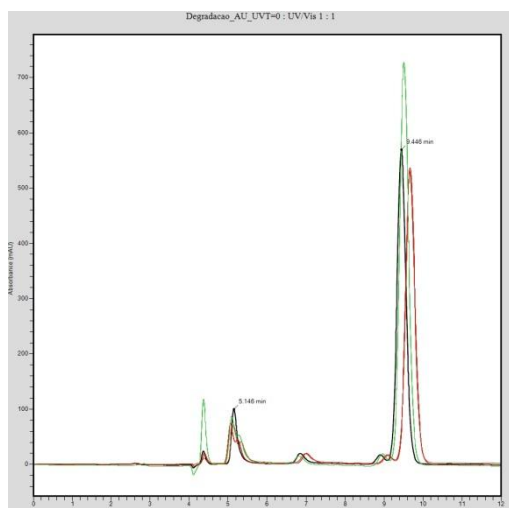


Figura 12. Cromatogramas da solução de AU (600µg/mL) submetida à luz ultravioleta a temperatura ambiente.

O estudo de degradação forçada mostrou não há picos de produtos de degradação que interfiram no pico referente ao ácido ursólico. Sendo assim, o método se mostrou seletivo e indicativo de estabilidade.

5.2.3 Exatidão

Os valores obtidos no teste de recuperação para o ácido ursólico estão expressos na Tabela 8.

Tabela 8. Resultados do teste de recuperação do AU.

	Recuperação média do dia (%)	Recuperação média total (%)	DPR(%)
1º dia	98,36		
2º dia	98,99	98,47	0,48
3º dia	98,07		

Os resultados da tabela 7 mostram que o método é exato, uma vez que o valor médio de recuperação foi de 98,47%, ou seja, as concentrações obtidas experimentalmente são muito próximas das concentrações teóricas. Além disso, não houve variações significativas entre os valores, pois o desvio calculado foi de 0,48%.

5.2.4 Precisão

Na análise da repetibilidade o DPR% obtido foi de 3,02. Os resultados da precisão entre analistas (precisão intermediária) estão apresentados na Tabela 9.

Tabela 9 – Valores de área obtidos pelos dois analistas para 600 µg/mL, média e DPR.

600µg/mL	Área1	Área2	Área3	Área4	Área5	Área6	Área7	Média	DPR%
Analista 1	8130810	8154729	8409340	8331868	8704997	8320421	8496882	8364150	2,3766
Analista 2	7983155	8015794	7964882	8068953	7849308	8415328	8832820	8161463	4,2233

Foi realizado o teste F (Tabela 10), com o intuito de verificar se a variância entre os valores obtidos são estatisticamente iguais ou diferentes.

Tabela 10 – Teste F da precisão entre analistas.

	Analista 1	Analista 2
Média	8364150,173	8161463,433
Variância	39515951739	1,18804E+11
Observações	7	7
gl	6	6
F	0,332614944	
P (F<=f) uni-caudal	0,103089662	
F crítico uni-caudal	0,233434021	

O teste F demonstrou que as variâncias entre os valores são estatisticamente diferentes, uma vez que F calculado 0,33 > F tabelado 0,23. Com isso, aplicou-se um teste-t para duas amostras presumindo variâncias diferentes (Tabela 11), com o intuito de verificar se houve diferença significativa entre os valores de área obtidos.

Tabela 11 – Teste-t da precisão entre analistas.

	Analista 1	Analista 2
Média	8364150,173	8161463,433
Variância	39515951739	1,18804E+11
Observações	7	7
gl	10	
Stat-t	1,347741724	
P (T<=t) uni-caudal	0,103739955	
t crítico uni-caudal	1,812461123	
P(T<=t) bi-caudal	0,20747991	
t crítico bi-caudal	2,228138852	

O teste-*t* demonstrou que não houve diferença significativa entre os valores de área encontrados entre os dois analistas, já que o *t* calculado $1,34 < t$ tabelado 2,22 e o *P*valor $0,10 > 0,05$. Além disso, O DPR entre as medidas foi menor que 5%. Com isso, pode-se concluir que o método é preciso.

5.2.5 Robustez

Os resultados da análise da robustez do método estão representados na Tabela 12.

Tabela 12. Resultados do teste de robustez do método.

Variável	Faixa investigada	AU (%)	DPR (%)
Vazão (mL/min)	0,58	99,67	1,6867
	0,60	100,00	
	0,62	96,96	
Proporção fase móvel (etanol:água acidificada)	83:17	102,40	1,3020
	85:15	100,00	
	87:13	100,29	
Fabricante do etanol	Panreac [®]	100,00	2,0005
	J.T.Baker [®]	97,21	

Os valores obtidos da análise da robustez mostram que os desvios foram menores do que 5% e que os teores de AU estão muito próximos do valor de referência (100%). Dessa forma, é possível concluir que o método é robusto para as alterações analisadas.

5.2.6 Limites de detecção e de quantificação

Após os devidos cálculos, o limite de detecção encontrado foi 21,28µg/mL e o limite de quantificação encontrado foi 64,48µg/mL.

A primeira concentração usada na curva analítica deve ser superior ao valor do limite de detecção e do limite de quantificação, ou seja, deve ser maior que 64,48µg/mL. A faixa de trabalho utilizada no desenvolvimento do método foi de 200 a 1000µg/mL.

6 CONCLUSÃO

Foi desenvolvido e validado um novo método analítico para a quantificação de ácido ursólico em emulsão cosmética que, além de cumprir com os parâmetros necessários para a validação, também é ambientalmente favorável, visto que faz uso de dois solventes de baixa toxicidade para o ser humano e para o meio ambiente. A baixa vazão utilizada no método também é parte do contexto da química verde, pois diminui a geração de resíduos. Estudos citados neste trabalho demonstram que o ácido ursólico é um composto promissor em muitos aspectos, o que torna importante o desenvolvimento de novos métodos para sua quantificação.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIHPEC. “Panorama do setor – Higiene pessoal, perfumaria e cosméticos”, 2016.

ALLSOP, R.C., VAZIRI, H., PATTERSON, C., GOLDSTEIN, S., YOUNGLAY, E.V., FUTCHER, A.B., GREIDER, C.W., HARLEY, C.B., Telomere length predicts replicative capacity of human fibroblasts. **Proc. Natl Acad. Sci.**, v.89, 10114–10118, 1992.

ALVARADO, H.L., ABREGO, G., GARDUÑO-RAMIREZ, M.L., CLARES, B., GARCÍA, M.L., CALPENA, A.C., Development and validation of a high-performance liquid chromatography method for the quantification of ursolic/oleanic acids mixture isolated from *Plumeria obtuse*, **J. of Chromat. B**, v.983-984, p. 111-116, 2015.

ANSEL, H.C., POPOVICH, N.G., LOYD, A.J., Farmacotécnica - formas farmacêuticas & sistemas de liberação, Premier, 6ed., 2000.

AOAC - Guidelines for Single Laboratory Validation of Chemical Methods for Dietary Supplements and Botanicals, 2002.

BAGATIN, E., Mecanismos do envelhecimento cutâneo e o papel dos cosmeceúticos, **Rev. Bras. de Med.**, v.66, p.5-11, 2009.

BARBOSA, E. P., BICHARA, J. S., Bioindústria, inovação e desenvolvimento: uma análise para o Estado do Amazonas, **RECED**, p. 12-32, 2015.

BRASIL, Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC 166 de 24 de julho de 2017 – Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências, **DOU**, Brasília, DF, 25 de julho de 2017

BRASIL. ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC n.17 de 16 de abril de 2010 - Dispõe sobre as boas práticas de fabricação de medicamentos. **DOU**, Brasília, DF, 21 de agosto de 2006.

BRASIL. ANVISA- Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC nº 211, de 14 de julho de 2005 - Estabelece a Definição e Classificação de Produtos de Higiene Pessoal, Cosméticos e Perfumes e outros com abrangência neste contexto. **DOU**, Brasília, DF, 18 de julho de 2005.

BRASIL. ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC n.899 de 29 de maio de 2003 - Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. **DOU**, Brasília, DF, 02 de junho de 2005.

BNDES Setorial, Rio de Janeiro, n. 25, p. 131-156, mar. 2007.

CAMPISI, J., Replicative senescence: an old lives' tale? **Cell**, v. 84, 497–500.

ELOUY, J.O., OLIVEIRA, E.C.V., MAROTTA-OLIVEIRA, S.S., SARAIVA, J., MARCHETT, J.M., Desenvolvimento e validação de um método analítico por CLAE para quantificação de ácido ursólico em dispersões sólidas, **Quím. Nova**, Vol. 35, n. 5, p.1036-1040, 2012.

FDA – **Food and Drug Administration**. Guidance for Industry, Analytical Procedures and Methods Validation, 2000.

FERREIRA, D. D. S. et al., Trypanocidal activity and acute toxicity assessment of triperne acids. **Par. Research**, v. 106. p. 985-989, 2010.

FINKEL, T.; HOLBROOK, N.J. Oxidative stress and aging: catalase is a longevity determinant enzyme. **Nature**, v.408, p.239, 2000.

FISHER, G.J, KANG, S., VARANI, J., Mechanisms of photoaging and chronological skin aging, **Arch Dermatol.**, v.138, n.11, pp.1462-1470, 2002

FRIGHETTO, N., WELENDORF, R.M, SILVA, A.M.P, NAKAMURA, M.J, SIANI, A.C., Aplicação de cromatografia centrífuga de contra-corrente na purificação de ácido ursólico das folhas de *Eugenia brasiliensis* Lam. **Rev. Bras. de Farmacog.**, v.15, n.4, p.338-343, 2005.

HALIWELL, B., How to characterize an antioxidant: an update, **Biochem. Soc. Symp**, v.61, p.73-101, 1995.

HARLEY, C.B., FUTCHER, A.B., GREIDER, C.W. Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts, **Nature**, v.345, p.458–460, 1990.

HARMAN, D., Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry, **J. Gerotol.**, v.11, n.3, p.298-300, 1956.

HAYFLICK, L., The cellular basis of biological aging, **Handbook of the Biology of Aging**, pp. 159–179, 1977.

HSDB. Harzadou Substances Data Bank – **Acetonitrila**. Disponível em: <<https://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search/a?dbs+hsdb:@term+@DOCNO+42>> Acessado em: 01/10/2017a.

HSDB. Harzadou Substances Data Bank – **Etanol**. Disponível em: <<https://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search/a?dbs+hsdb:@term+@DOCNO+82>> Acessado em: 01/10/2017b.

HSDB. Harzadou Substances Data Bank – **Metanol**. Disponível em: <<https://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search/a?dbs+hsdb:@term+@DOCNO+93>> Acessado em: 01/10/2017c.

ICH - **International Conference on Harmonization**. Validation of Analytical Procedures: Methodology, Q2B, Step 4, Consensus Guideline, 1996.

KARCHER, B.D., DAVIES, M.L., DELANEY, E.J., VENIT, J.J., A 21st Century HPLC Workflow for Process R&D, **Jala**, v.10, p381-393, 2005.

KASHYAP, D., TULI, H. S., SHARMA, A.K, Ursolic acid (UA): A metabolite with promising therapeutic potential, **Life Sciences**, v.146, pp.201–213, 2016.

KUREK, A., GRUDNIAK, A.M., SZWED, M., KLIČKA, A., SAMLUK, L., WOLSKA, K.I., Oleanolic acid and ursolic acid affect peptidoglycan metabolism in *Listeria monocytogenes*, **Ant. V. Leeuwenhoek**, v.9, pp.61–68, 2010.

LEE, M.K., AHNA, Y.M., LEE, K.R., JUNG, J.H., JUNG, O., HONG, J., Development of a validated liquid chromatographic method for the quality control of *Prunellae spica*: Determination of triterpenic acids, **Anal. Chim. Acta**, v. 633, p. 271-277, 2009.

LENARDÃO, E.J., FREITAG, R. A., DABDOUB, M.J., BATISTA, A.C.F., SILVEIRA, C.C., Green Chemistry – Os 12 princípios da química verde e sua inserção nas atividades de ensino e pesquisa, **Quím. Nova**, v. 26, n. 1, pp.123-129, 2003.

LIU, J. J., Pharmacology of oleanolic acid and ursolic acid., **Ethnopharmacol.**, v. 49, p.57–68, 1995.

LOBO, V.; PATIL, A.; PHATAK, A.; CHANDRA, N. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. **Pharmacogn. Rev.** v.4, n.8, p. 118–126, 2010.

MAURYA, A., SRIVASTA, S.K., Determination of ursolic acid and ursolic acid lactone in the leaves of *Eucalyptus tereticornis* by HPLC, **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 23, n. 3, p. 468-472, 2012.

MONTENEGRO, L. H. M., OLIVEIRA, P. E. S., CONSERVAL, L. M., ROCHA, E. M. M., BRITO, A. C., ARAÚJO, R. M., TREVISAN, M. T., LEMOS, R. P. L., Terpenóides e avaliação do potencial antimalárico, larvicida, anti-radicalar e anticolinesterásico de *Pouteria venosa* (Sapotaceae). **Rev. Bras. de Farmacog.**, v. 16, p.611-617, 2006.

NING, Y., XU, J.F., LI, Y., CHAVEZ, L., RIETHMAN, H.C., LANDSDORP, P.M., WENG, N.P., Telomere length and the expression of natural telomeric genes in human fibroblasts. **Hum. Mol. Genet.**, v.12, p.1329–1336, 2003.

O'NEIL, M.J, The Merck Index - an encyclopedia of chemicals, drugs and biological, **White House Station: Merck & Co.**, 14 ed, p.1699, 2006.

SCHAFER, F. Q.; BUETTNER, G. R. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. **Free Radic. Biol. Med.**, v.30, n.11, p.1191-212, 2001.

SHANMUGAM, M. K., DAI, X., KUMAR, A. P., TAN, B.K.H., SETHI, G., BISHAYEE, A., Ursolic acid in cancer prevention and treatment: Molecular targets, pharmacokinetics and clinical studies, **Bioch. Pharm.**, v.85, p.1579–1587, 2013.

SNYDER, L.R., KIRKLAND, J.J., DOLAN, J.W., Introduction to Modern Liquid Chromatography, **Hoboken**, 3ed, 2010.

SOMOVA, L. O., NADAR, A., RAMMANAN, P., SHODE, F. O., Cardiovascular, antihyperlipidemic and antioxidant effects of oleanolic and ursolic acids in experimental hypertension. **Phytome.**, v. 10, p. 115-121, 2003.

SPAGNOL, C.M.; ISAAC, V. L. B.; CORRÊA, M. A.; SALGADO, H. R. N. Validation of HPLC–UV Assay of Caffeic Acid in Emulsions. **J. Chromatogr. Sci.**, v.54, p.305–311, 2016

SPAGNOL, C.M, Estudo da eficácia e citotoxicidade de filme e sistema emulsionado contendo ácido cafeico, 2014.

SUNDARAM, R. S., RAMANATHAN, M., RAJESH, R., SATHEESH, B., SARAVANAN, D., LC-MS quantification of rosmarinic acid and ursolic acid in the *Ocimum sanctum* leaf extract, **J. of Liq. Chromat. & Rel. Tech.**, v. 35, p. 634-650, 2012.

TARALKAR, S.V., CHATTOPADHYAY, S., A HPLC Method for Determination of Ursolic Acid and Betulinic Acids from their Methanolic Extracts of *Vitex negundo* Linn, **Anal. & Bio. Tech.**, v. 3, 2012.

WOZNIAK, L., SKAPSKA, S., MARSALEK, K., Ursolic acid: A pentacyclic triterpenoid with a wide spectrum of pharmacological, **Molecules**, v.20, p.20614–20641, 2015.

YIN, M., CHAN, K., Nonenzymatic Antioxidative and Antiglycative Effects of Oleanolic Acid and Ursolic Acid. **J. Agric. Food Chem.**, v.55, n.17, p. 7177-7181, 2007.